

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Estudo fitoquímico biomonitorado de
Duguetia lanceolata e *Lithraea molleoides* e
desenvolvimento de nanoformulações no
controle de insetos pragas.**

Vanessa de Cássia Domingues*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes
* Bolsista FAPESP/ Processo: 2010/18303-1

**São Carlos-SP
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Vanessa de Cássia Domingues, realizada em 29/04/2016:

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
UNESP

Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca
UNESP

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Agradecimentos

A minha família e amigos.

Aos meus pais, Nilton Glei Domingues e Edna M. Silveira Domingues pela ajuda, apoio, compreensão, amor e carinho durante toda esta jornada.

Ao meu irmão Nilton Silveira Domingues um agradecimento especial, pois este trabalho foi publicado graças a força, apoio e ajuda que ele me deu principalmente na etapa final. Ele quem me deu forças para não desistir.

A minha irmã de coração Marina Denadai, por todos os anos vividos em São Carlos, agradeço a amizade e carinho.

A minha grande amiga Katia Carnier, sempre presente e muitas vezes me ajudou a concentrar em outras coisas e ver que a vida não era apenas esta Tese.

Aos Amigos QULN-06, onde tudo começou na minha formação como química.

Ao Professor João Batista Fernandes pelo apoio, ensinamentos e orientação durante a realização deste trabalho.

A Dra. Cristiane Cazal, pelos ensinamentos e ajuda durante a iniciação científica.

A banca: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento, Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e Prof. Dr. Moacir Rossi Forim.

A todos os professores do DQ-UFSCar pela contribuição em minha formação.

Ao Prof. Odair Correa Bueno e sua aluna Marcela Ceccato do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS- Rio Claro), pela colaboração na realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras.

A Técnica Doraí e à Dra. Ana Paula Terezan pelo apoio e colaboração nos ensaios biológicos com fungo simbiote.

Ao Prof. Dr. Prof. Dr. José Djair Vendramin e ao Dr. Leandro do Prado Ribeiro colaboração nos ensaios biológicos com *Sitophilus zeamais*.

Aos técnicos Luciana e Paulo e aos Professores Dr. Tiago Venâncio e Prof. Antônio Gilberto Ferreira nas análises de RMN.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais, pela amizade, trocas de experiências e ensinamentos durante todos estes anos. Em especial: Karlinha, Lia, Cris, Leila, Japa, Taynara, Jaque, Tati Alba e Babi.

Aos Amigos Dr Emerson Rios e Dr. Adriano Rabelo, pela ajuda e amizade.

Às demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A FAPESP pela bolsa concedida.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão. Agradeço a compreensão, carinho e ajuda. Vocês me deram o suporte necessário para que eu pudesse chegar até aqui. Amo vocês.

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
DLE Caf	Extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> .
DLE Caf-Hex	Extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hexânica).
DLE Caf-Dicloro	Extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição diclorometano)
DLE Caf-Acoet	Extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição acetato de etila).
DLE Caf-Hidro	Extrato etanólico das cascas dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hidroalcoólica)
DLER	Extrato etanólico dos ramos de <i>Duguetia lanceolata</i>
DLER-Hex	Extrato etanólico dos ramos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hexânica)
DLER-Dicloro	Extrato etanólico dos ramos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição diclorometano)
DLER-Acoet	Extrato etanólico dos ramos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição acetato de etila)
DLER-Hidro	Extrato etanólico dos ramos de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hidroalcoólica)
DLES	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i>
DLES-Hex	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hexânica)
DLES-Dicloro	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição diclorometano)

DLES-Acoet	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição acetato de etila)
DLES-Hidro	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hidroalcoólica)
DLES-Acoet	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição acetato de etila).
DLES-Hidro	Extrato etanólico das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i> (partição hidroalcoólica).
DP	Diâmetro de partícula
EE	Eficiência de Encapsulação
H ₂ O	Água
Hex	Hexano
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kg	Quilograma
l	Litros
IV	Infravermelho
LMEF	Extrato etanólico das folhas de <i>Lithraea molleoides</i>
LMEF-Hex	Extrato etanólico das folhas de <i>Lithraea molleoides</i> (partição hexânica)
LMEF-Dicloro	Extrato etanólico das folhas de <i>Lithraea molleoides</i> (partição diclorometano)
LMEF-Acoet	Extrato etanólico das folhas de <i>Lithraea molleoides</i> (partição acetato de etila))
LMEF-Hidro	Extrato etanólico das folhas de <i>Lithraea molleoides</i> (partição hidroalcoólica)
LMEG	Extrato etanólico dos galhos de <i>Lithraea molleoides</i>
LMEG-Hex	Extrato etanólico dos galhos de <i>Lithraea molleoides</i> (partição hexânica)
LMEG-Dicloro	Extrato etanólico dos galhos de <i>Lithraea molleoides</i> (partição diclorometano)
LMEG-Acoet	Extrato etanólico dos galhos de <i>Lithraea molleoides</i> (partição acetato de etila)

LMEC	Extrato etanólico do caule de <i>Lithraea molleoides</i>
LMEC-Hex	Extrato etanólico do caule de <i>Lithraea molleoides</i> (partição hexânica)
LMEC-Dicloro	Extrato etanólico do caule de <i>Lithraea molleoides</i> (partição diclorometano)
LMEC-Acoet	Acoet Extrato etanólico do caule de <i>Lithraea molleoides</i> (partição acetato de etila)
LMEC-Hidro	Extrato etanólico do caule de <i>Lithraea molleoides</i> (partição hidroalcoólica)
<i>m</i>	multipleto
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol Deuterado
MHz	MegaHertz
mg	Miligrama
mg/mL	Miligramas por mililitros
mm/min	Milímetros por minuto
NC	Nanocápsulas
nm	Nanômetros
NP	Nanopartículas poliméricas
NS	Nanoesferas
Pz	Potencial Zeta
ppm	Partes por milhão
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	Singleto
TCEA	Extrato etanólico do arilo de <i>Trichilia catigua</i>
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - Extratos obtidos com seus respectivos códigos e massas.....	24
TABELA 2.2- Frações dos extratos de <i>D. lanceolata</i> após a partição líquido.....	27
TABELA 2.3 - Métodos analíticos e preparativos utilizados na fração CdlCaf-hex-1_52-60.....	40
TABELA 2.4 - Dados de RMN ¹ H da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃) comparados com literatura.....	60
TABELA 2.5 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e indicação DEPT-135 da substância 5.....	69
TABELA 2.6 - Comparação RMN ¹ H da substância 6 com literatura.....	76
TABELA 2.7 - Comparação RMN ¹³ C da substância 6 com literatura.....	76
TABELA 2.8 - Comparação de RMN ¹ H da mistura das substâncias 9 e 10 com literatura.....	96
TABELA 2.9 - Comparação de RMN ¹ H da substância 11 com a literatura.....	101
TABELA 2.10 - Comparação de RMN ¹³ C da substância 11 com literatura.....	102
TABELA 2.11 - Comparação RMN ¹ H da substância 12 com literatura.....	103
TABELA 2.12 - Comparação RMN ¹³ C da substância 12 com literatura.....	106
TABELA 2.13 - Comparação de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do flavonoide paquipodol com literatura.....	117
TABELA 2.14 - Picos dos hidrocarbonetos utilizados no cálculo do índice de kovats com seus respectivos tempos de retenção e massa molecular.....	120
TABELA 2.15 - Identificação dos picos do cromatograma do óleo essencial de <i>D. lanceolata</i>	121
TABELA 2.16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	129
TABELA 2.17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação..	131
TABELA 2.18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos das folhas de <i>Duguetia lanceolata</i>	132

TABELA 2.19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de <i>Duguetia lanceolata</i>	133
TABELA 2.20 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.....	134
TABELA 2.21 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.....	135
TABELA 2.22 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> após 30 dias do experimento, com os as frações da partição do extrato da casca dos frutos de <i>D. lanceolata</i>	136
TABELA 2.23 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> após 30 dias do experimento, com os as frações da partição do extrato da casca dos frutos de <i>D. lanceolata</i>	138
TABELA 2.24 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de <i>Duguetia lanceolata</i> (Cdlef-D-1_4-7 e 2,4,5-trimetoxiestireno), ambas na concentração de 0,1 mg/mL.....	140
TABELA 2.25 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	141
TABELA 2.26 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com 2,4,5-trimetoxifenilamina isolado da partição hexânica das folhas de <i>Duguetia lanceolata</i> na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.....	142
TABELA 2.27 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	143

TABELA 2.28 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento para o Óleo essencial de <i>D. lanceolata</i>	144
TABELA 2.29 - Mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos etanólicos de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) (1500 ppm e 3000 ppm). Temp.: 25 \pm 2 °C; U.R.: 60 \pm 10% e fotofase de 14 h.....	145
TABELA 2.30 - Mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com partições do extrato etanólico de folhas de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) (1500 ppm). Temp.: 25 \pm 2°C; U.R.: 60 \pm 10% e fotofase de 14 h.....	146
TABELA 2.31 - Mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com subfrações da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) (300 ppm). Temp.: 25 \pm 2°C; U.R.: 60 \pm 10% e fotofase de 14 h.....	148
TABELA 2.32 - Porcentagem de mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com as substâncias isolados da fração hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e o 2,4,5-trimetoxiestireno (75 ppm).....	150
TABELA 3.1 - Extratos obtidos com seus respectivos códigos e massa.....	159
TABELA 3.2 - Subfrações dos extratos etanólicos de <i>L. molleoides</i> após a partição líquido-líquido.....	161
TABELA 3.3 - Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C da substância galato de etila comparados com a literatura.....	172
TABELA 3.4 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Lithraea molleoides</i>	173
TABELA 3.5 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio inseticida de incorporação em dieta artificial com <i>Lithraea molleoides</i>	175

TABELA 3.6 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com folhas de <i>Lithraea molleoides</i>	176
TABELA 3.7 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de <i>Lithraea molleoides</i> (Slm 2- 1:8) nas concentrações 0,1mg/mL e 0,2mg/mL.....	177
TABELA 3.8 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galeato de etila nas concentrações 0,1mg/mL e 0,2mg/mL.....	178
TABELA 3.9 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	179
TABELA 3.10 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	181
TABELA 4.1 - Extrato dos arilos dos frutos de <i>Trichilia catigua</i>	194
TABELA 4.2 - Sistemas de solventes encontrados na literatura e suas proporções.....	195
TABELA 4.3 - Métodos analíticos empregados para análise da cedrelona.....	200
TABELA 4.4 - Composição das nano partículas pelo método de nano precipitação.....	203
TABELA 4.5 - Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2^3 centrado na média.....	204
TABELA 4.6 - Planejamento fatorial 2^3 centrado na média. N_p = Nanopartícula.....	205
Tabela 4.7 - Nanopartículas sem cedrelona - Controle.....	206
TABELA 4.8 - Teste com sistemas de solventes da literatura.....	209
TABELA 4.9 - Testes com sistema de solvente Hex/Etanol/ACN/ H ₂ O variando as proporções dos solventes envolvidos.....	210
TABELA 4.10 - Dados de RMN ¹ H da Cedrelona em comparação com a literatura.....	215

TABELA 4.11 - Dados de RMN ¹³ C da Cedrelona em comparação com a literatura.....	216
TABELA 4.12- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do acetato de cedrelona (400 e 100 MHz, CDCl ₃).....	220
TABELA 4.13 - Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do mesilato de cedrelona em comparação com a cedrelona.....	227
TABELA 4.14 - Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C do propionato de cedrelona em comparação com a cedrelona.....	234
TABELA 4.15 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto acetato de cedrelona.....	238
TABELA 4.16- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto mesilato de cedrelona.....	239
TABELA 4.17- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o propionato de cedrelona.....	241
TABELA 4.18 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	242
TABELA 4.19 - Análise de variância de fator único (ANOVA) para o modelo de regressão linear.....	245
TABELA 4.20 - Análise de variância de fator único (ANOVA) para o modelo de regressão linear.....	246
TABELA 4.21- Dados para o preparo das formulações.....	247
TABELA 4.22- Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 14 ensaios de nanopartículas de cedrelona.....	248
TABELA 4.23 - Medidas de pH das nanopartículas contendo cedrelona, medidas de 5 em 5 dias durante um mês.....	250
TABELA 4.24 - Medidas de pH das nanopartículas contendo cedrelona, medidas durante quatro meses.....	251

TABELA 4.25 - Efeitos calculados em porcentagem para o planejamento fatorial com interação das variáveis independentes 1, 2 e 3.....	252
TABELA 4.26 - Média das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias	257
TABELA 4.27- Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento das NP1, NP4 e Controle 1; NP2, NP14 e Controle 2.....	259
TABELA 4.28 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento das amostras NP3, NP7 e controle 3 e NP5, NP8 controle 4.....	260
TABELA 4.29 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento das amostras NP10 e controle 5.....	261

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Comércio Agroalimentar no Brasil 1995-2013.....	02
FIGURA 1.2 - Formigas Cortadeiras	04
FIGURA 1.3 - Castas das Formigas	04
FIGURA 1.4 - Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo <i>L. gongylophorus</i>	05
FIGURA 1.5 - <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky, 1855 (coleoptera: curculionidae).....	10
FIGURA 1.6 - Ciclo biológico <i>Sitophilus zeamais</i>	11
FIGURA 2.1- Estrutura geral das acetogeninas.....	20
FIGURA 2.2 - Alcaloides isoquinolínicos encontrados na família Annonaceae. Fonte: RABELO, 2014.....	21
FIGURA 2.3 - Folhas e frutos de <i>Duguetia lanceolata</i>	22
FIGURA 2.4 - Alcaloides de <i>Duguetia flagellaris</i>	23
FIGURA 2.5 - Preparo dos extratos de <i>Duguetia lanceolata</i>	25
FIGURA 2.6 - Procedimentos gerais de Partição líquido-líquido do extrato etanólico dos ramos de <i>D. lanceolata</i> . (1) -Fração de Hexano, (2) -Fração de Diclorometano, (3) - Fração de Acetato de etila e (4) -Fração Hidroalcoólica.....	26
FIGURA 2.7 - Condição 1: Coluna de vidro ($\varphi \times h = 5,5 \text{ cm} \times 22\text{cm}$); Fase estacionária: Sílica (70-230 mesh); Modo de eluição: gradiente; Solventes: Hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.....	28
FIGURA 2.8 -Condição 2: coluna de vidro ($\varphi \times h = 3,5 \text{ cm} \times 35\text{cm}$); fase estacionária: Silica (230-400 mesh); Modo de eluição: gradiente; Solventes: Hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol.....	29
FIGURA 2.9 - Condição 3: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol:diclorometano (1:1 v/v).....	30
FIGURA 2.10 - Condição 4: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \text{ cm} \times 56 \text{ cm}$); fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol: diclorometano (1:1 v/v).....	31
FIGURA 2.11- Condição 5: Coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); Fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol.....	32

FIGURA 2.12 - Cromatograma da fração Sdl1-10-13 modo analítico Condições cromatográficas: Coluna Luna C18 (25 x 0,46 cm, 10 µm), fase móvel MeOH:H ₂ O (65:35 v/v); vazão de 1,0 mL.min ⁻¹ e detector ultravioleta 254nm.....	33
FIGURA 2.13 - Fluxograma do CLAE da fração Sdl1-11-13, Condição 6: Coluna :Luna C18 (25 x 0,46 cm, 10 µm); fase móvel MeOH:H ₂ O (65:35 v/v).....	34
FIGURA 2.14 - Fluxograma da fração Sd1-14-18 na Condição 7: Coluna C18-Luna (25 x 0,46 cm, 10 µm); fase móvel ACN:H ₂ O (45:55 v/v).....	35
FIGURA 2.15 - Fluxograma - Condição 8: coluna de vidro (φ x h = 4,0 x 45 cm),fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol; Condição 9: Coluna de vidro (φ x h = 2,0 x 140 cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol; Condição 10: Coluna de vidro (φ x h = 2,0 x 140 cm),fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol; Condição 11: Coluna-semi-preparativa C18-Luna (30x 0,78 cm, 10µm, fase móvel MeOH:H ₂ O (60:40 v/v).....	37
FIGURA 2.16 - Fluxograma da fração diclorometano das folhas de <i>D. lanceolata</i> -Condição 12: coluna de vidro (φ x h = 2,5 cm x 62 cm); fase estacionária: <i>Sephadex LH-20</i> ; Solvente: metanol:diclorometano (1:1 v/v).....	38
FIGURA 2.17 - Fluxograma 04 - Condição 13: coluna de vidro (φ x h = 3,0 cm x 36,5 cm); fase estacionária: sílica (230-400 mesh); Modo de eluição: isocrático Solventes: Hexano: Acetona (2:1 v/v).....	39
FIGURA 2.18 - Condição 14: C18 Luna Phenomenex ^R 10 µm (0,46 x 25 cm) eluição isocrática semi-preparativa; solvente: MeOH:H ₂ O 60:40, fluxo 5,5 mL/min, λ = 254 nm e 365 nm.....	41
FIGURA 2.19 - Condição 15: coluna de vidro (φ x h = 2,5 cm x 62 cm); fase estacionária: <i>Sephadex LH-20</i> ; Solvente: metanol.	42
FIGURA 2.20 - Condição 16: coluna de vidro (φ x h = 8,0 cm x 1,0 cm); fase estacionária: sílica (230-400 mesh); Modo de eluição: isocrático, Solventes: CH ₂ Cl ₂ com 2% de MeOH).....	43
FIGURA 2.21 - Condição 17:coluna de vidro (φ x h = 8,0 cm x 1,0 cm); fase estacionária: sílica (230-400 mesh); Modo de eluição: <i>isocrático</i> - Solventes: CH ₂ Cl ₂ com 2% de MeOH.....	44

FIGURA 2.22 - Campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3).....	56
FIGURA 2.23 - Espectro de RMN ¹ H da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	56
FIGURA 2.24 - Espectro de RMN ¹³ C da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl ₃ , 400 MHz).....	57
FIGURA 2.25 - Cromatograma obtido no GC-EM.	57
FIGURA 2.26 - Espectro de massas do campesterol (1) (IE = 70 eV).....	58
FIGURA 2.27 - Espectro de massas do estigmasterol (2) (IE = 70 eV).....	58
FIGURA 2.28- Espectro de massas do sitosterol (3) (IE = 70 eV).....	58
FIGURA 2.29 - Estrutura do composto 2,4,5-trimetoxiestireno	58
FIGURA 2.30 - Espectro de RMN ¹ H da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	59
FIGURA 2.31 - Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 4, com integração dos picos (400 MHz, CDCl ₃).....	59
FIGURA 2.32 -Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	60
FIGURA 2.33 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 4 (100 MHz, CDCl ₃).....	61
FIGURA 2.34 - Mapa de contorno de HSQC da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	62
FIGURA 2.35 - Ampliação do mapa de contorno de HSQC da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	62
FIGURA 2.36 - Mapa de contorno de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	63
FIGURA 2.37 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	64
FIGURA 2.38 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl ₃).....	64
FIGURA 2.39 - Cromatograma obtido no GC-MS da substância 4	65
FIGURA 2.40 - Espectro de massas da substância 4 (IE = 70 eV).....	65
FIGURA 2.41 - Estrutura do composto 2,4,5- Trimetoxifenilamina.....	66
FIGURA 2.42 - Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	67
FIGURA 2.43 - Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	67

FIGURA 2.44 - Espectro de RMN ¹³ C da substância 5 (100 MHz, CDCl ₃).....	68
FIGURA 2.45 - Espectro de RMN DEPT-135 da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	68
FIGURA 2.46 - Mapa de contorno de HSQC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	70
FIGURA 2.47 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	70
FIGURA 2.48 - Mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	71
FIGURA 2.49 - Expansão mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	72
FIGURA 2.50 - Expansão mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl ₃).....	72
FIGURA 2.51 - Estrutura da lisicamina.....	73
FIGURA 2.52 - Espectro de RMN ¹ H da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	74
FIGURA 2.53 - Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)	75
FIGURA 2.54- Espectro de RMN ¹³ C da substância 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	75
FIGURA 2.55 - Mapa de correlação HSQC da mistura da substância 6 (CDCl ₃ ,400 MHz).....	77
FIGURA 2.56 - Expansão do espectro de COSY ¹ H- ¹ H 45° da substância 6 (400 MHz, MeOD).....	78
FIGURA 2.57 - Espectro de massas (ESI) no modo positivo [M+H] ⁺ com o íons pseudomolecular da lisicamina.....	78
FIGURA 2.58 – Proposta de fragmentação da lisicamina (ESI, modo positivo).....	79
FIGURA 2.59- Estrutura da oxoglaucina.....	80
FIGURA 2.60- Espectro de RMN ¹ H da substância 7 (MeOD, 400 MHz).....	81
FIGURA 2.61 - Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 7 (MeOD, 400 MHz).....	81
FIGURA 2.62 - Espectro de COSY ¹ H- ¹ H 45° da substância 7 (400 MHz, MeOD).....	82

FIGURA 2.63 - Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância 7 (400 MHz, MeOD).....	82
FIGURA 2.64 - Mapa de contorno de HSQC da substância 7 (400 MHz, MeOD).....	83
FIGURA 2.65 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 7 (400 MHz, MeOD).....	83
FIGURA 2.66 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 7 (400 MHz, MeOD).....	84
FIGURA 2.67 - Espectro de massas (ESI) no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ com o íons pseudomolecular da oxoglucina.....	85
FIGURA 2.68 - Proposta de fragmentação da oxoglucina (ESI, modo positivo).....	86
FIGURA 2.69- Estrutura da Glaucina.....	87
FIGURA 2.70 - Espectro de RMN ^1H da substância 8 (MeOD, 400 MHz).....	87
FIGURA 2.71 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 8 (MeOD, 400 MHz).....	88
FIGURA 2.72- Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 8 (MeOD, 400 MHz).....	88
FIGURA 2.73 - Mapa de contorno de HSQC da substância 8 (400 MHz, MeOD).....	89
FIGURA 2.74 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 8 (400 MHz, MeOD).....	90
FIGURA 2.75 - Mapa de contorno de HMBC da substância 8 (400 MHz, MeOD).....	91
FIGURA 2.76- Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 8 (400 MHz, MeOD).....	91
FIGURA 2.77 - Espectro de massas (ESI) no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ com íons pseudomolecular da glaucina.....	92
FIGURA 2.78 - Substâncias 9 e 10.....	93
FIGURA 2.79 – Espectro de RMN ^1H das substâncias 9 e 10	93
FIGURA 2.80 – Espectro de RMN ^1H das substâncias 9 e 10	94
FIGURA 2.81 – Espectro de RMN ^1H das substâncias 9 e 10	94

FIGURA 2.82 – Mapa de correlação HSQC da mistura das substâncias 9 e 10 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	95
FIGURA 2.83 – Mapa de correlação HSQC ampliado da mistura das substâncias 9 e 10 (CDCl ₃ , 600 MHz).....	95
FIGURA 2.84 – Expansão do cromatograma obtido no GC-MS da mistura de 9 e 10.....	96
FIGURA 2.85 – Expansão do cromatograma obtido no GC-MS da mistura de 9 e 10.....	97
FIGURA 2.86 – Espectro de massas do pico 01 (IE = 70 eV).....	97
FIGURA 2.87 – Espectro de massas do pico 02 (IE = 70 eV).....	97
FIGURA 2.88 – Estrutura da liriodenina.....	98
FIGURA 2.89 – Espectro de RMN ¹ H da substância 11(CDCl ₃ , 400 MHz).....	99
FIGURA 2.90 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 11 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	99
FIGURA 2.91 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 11 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	100
FIGURA 2.92 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 11 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	100
FIGURA 2.93 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 11 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	101
FIGURA 2.94 – Estrutura da dihidronaftalenona.....	103
FIGURA 2.95 – Espectro de RMN ¹ H da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	104
FIGURA 2.96 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	104
FIGURA 2.97 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	105
FIGURA 2.98 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	105
FIGURA 2.99 – Mapa de contorno HSQC da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	107
FIGURA 2.100 – Mapa de contorno HMBC da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	108
FIGURA 2.101 – Nomenclatura usual dos flavonoides: designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono.....	109
FIGURA 2.102 – Principais tipos de flavonoides.....	109

FIGURA 2.103- Estrutura do paquipodol.....	110
FIGURA 2.104 – Espectro de RMN ¹ H da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>).....	111
FIGURA 2.105 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substancia 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>).....	111
FIGURA 2.106 – Expansão do espectro de RMN ¹ H da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	112
FIGURA 2.107 – Espectro de COSY ¹ H - ¹ H da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	112
FIGURA 2.108 – Expansão do espectro de COSY ¹ H - ¹ H da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	113
FIGURA 2.109 – Espectro de RMN ¹³ C da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	113
FIGURA 2.110 – Mapa de contorno HSQC da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>).	114
FIGURA 2.111 – Expansão do mapa de contorno HSQC da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	115
FIGURA 2.112 – Expansão do mapa de contorno HSQC da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	115
FIGURA 2.113 – Mapa de contorno HMBC da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>).	116
FIGURA 2.114 – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>).	116
FIGURA 2.115 – Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 13 (400 MHz, Acetona- <i>d</i>)	117
FIGURA 2.116 – Espectro de massas (ESI)no modo negativo da [M-H] ⁻ com o íons pseudomolecular do flavonoide paquipodol	118
FIGURA 2.117- Cromatograma obtido no GC-MS do óleo essencial das folhas de <i>D. Lanceolata</i>	119
FIGURA 2.118 – Expansão do cromatograma obtido no GC-MS do óleo essencial das folhas de <i>D. Lanceolata</i>	119
FIGURA 2.119 – Cromatograma obtido no GC-MS padrão de hidrocarbonetos C14-C30.....	120

FIGURA 2.120 – Espectro de massas referente ao pico 1 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> (IE = 70 eV).....	121
FIGURA 2.121 – Espectro de massas referente ao pico 2 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> (IE = 70 eV).....	122
FIGURA 2.122 – Espectro de massas referente ao pico 3 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> (IE = 70 eV).....	122
FIGURA 2.123 – Espectro de massas referente ao pico 4 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> (IE = 70 eV).....	122
FIGURA 2.124 – Espectro de massas referente ao pico 5 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> (IE = 70 eV).....	122
FIGURA 2.125 – Estruturas química dos compostos identificados no óleo essencial de <i>Duguetia lanceolata</i>	123
FIGURA 2.126 – Estrutura 2,4,5-trimetoxiestireno.....	124
FIGURA 2.127- Estrutura 3,4,5-trimetoxiestireno.....	124
FIGURA 2.128 – Espectro de RMN ¹ H do óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> (400 MHz, CDCl ₃).....	125
FIGURA 2.129 – Expansão do espectro de RMN ¹ H do óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> (400 MHz, CDCl ₃).....	126
FIGURA 2.130 – Expansão do espectro de RMN ¹ H do óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> (400 MHz, CDCl ₃).....	126
FIGURA 2.131 – Mapa de contorno HSQC do óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> (400 MHz, CDCl ₃).....	127
FIGURA 2.132 – Expansão do mapa de contorno HSQC do óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> (400 MHz, CDCl ₃).....	127
FIGURA 2.133 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Duguetia lanceolata</i> na concentração de 2 mg/mL.....	129
FIGURA 2.134 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de <i>Duguetia lanceolata</i>	130
FIGURA 2.135 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos folhas de <i>Duguetia lanceolata</i>	132

FIGURA 2.136 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de <i>Duguetia lanceolata</i>	133
FIGURA 2.137 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de <i>Duguetia lanceolata</i>	134
FIGURA 2.138 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.....	135
FIGURA 2.139- Efeito do extrato DLE Caf (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> . As imagens referem-se ao fungo na presença do controle (A) e extrato DLE Caf (1000 µg/mL) (B)	137
FIGURA 2.140 – Efeito do extrato DLE F (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	137
FIGURA 2.141 – Efeito do extrato DLE R (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	137
FIGURA 2.142 – Efeito do extrato DLE S (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	138
FIGURA 2.143 – Efeito das partições dos extratos (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	139
FIGURA 2.144 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de <i>Duguetia lanceolata</i> (Cdlef – D – 1:4-7 (flavonoide) e 2,4,5-trimetoxiestireno), ambas na concentração de 0,1 mg/mL.....	140
FIGURA 2.145 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com 2,4,5-trimetoxifenilamina isolado da partição hexânica das folhas de <i>Duguetia lanceolata</i> na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.....	142
FIGURA 2.146 – Imagens do fungo simbiote na presença do controle (A), 50 µg/ml de Óleo essencial de <i>D. lanceolata</i> (B) e 100 µg/ml de Óleo de <i>D. lanceolata</i> (C).....	144
FIGURA 2.147 – Percentagem de mortalidade ao 10º dia (± erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com	

partições do extrato etanólico de folhas de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) (1500 ppm). Temp.: 25±2°C; U.R.: 60±10% e fotofase de 14 h.....	147
FIGURA 2.148 – Percentagem de mortalidade ao 10º dia (± erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com subfrações da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) (300 ppm). Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10% e fotofase de 14 h.....	148
FIGURA 2.149 – Percentagem de mortalidade ao 10º dia (± erro padrão) de adultos de <i>S. zeamais</i> expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com subfrações da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>D. lanceolata</i> (Annonaceae) (750 ppm).....	149
FIGURA 3.1 – Folhas, flores e frutos de <i>Lithraea molleoides</i>	157
FIGURA 3.2 – Resorcinóis alquilênicos de <i>Lithraea molleoides</i>	158
FIGURA 3.3 – Preparo dos extratos de <i>L. molleoides</i>	159
FIGURA 3.4 – Fluxograma dos procedimentos gerais de Partição Líquido-Líquido dos extratos etanólicos de <i>L. molleoides</i>	160
FIGURA 3.5 – Condição 1: Coluna de vidro (φ x h = 7cm x 24 cm), Fase estacionária: gel comum (70-230 mesh), Modo de eluição: gradiente, Solventes: Hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol.....	162
FIGURA 3.6 – Fluxograma- Condição 2: coluna de vidro (φ x h = 4,0 x 56 cm), fase estacionária.....	163
FIGURA 3.7- Fluxograma- Condição 4: coluna de vidro (φ x h = 2,5 cm x 62 cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol:diclorometano (1:1 v/v).....	164
FIGURA 3.8 – Espectro de RMN ¹ H do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (400 MHz, CDCl ₃).....	166
FIGURA 3.9 – Espectro de RMN ¹³ C do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (100 MHz, CDCl ₃).....	167
FIGURA 3.10 – Mapa de contorno de HSQC do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (400 MHz, CDCl ₃).....	168
FIGURA 3.11 – Mapa de contorno de HMBC do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (400 MHz, CDCl ₃).....	169
FIGURA 3.12 – 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno.....	169

FIGURA 3.13 – Espectro de massas (ESI) modo negativo da substância 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno.....	170
FIGURA 3.14 – Estrutura galato de etila.....	170
FIGURA 3.15 – Espectro de RMN ¹³ H do galato de etila (Acetona-d ₆ , 400 MHz).....	171
FIGURA 3.16 – Espectro de RMN ¹³ C do galato de etila (Acetona-d ₆ , 400 MHz).....	171
FIGURA 3.17 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio inseticida de incorporação em dieta artificial com <i>Lithraea molleoides</i>	173
FIGURA 3.18 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Lithraea molleoides</i>	174
FIGURA 3.19 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com folhas de <i>Lithraea molleoides</i>	175
FIGURA 3.20 Substância 1,4-dihidroxi-2-(5-pentadecenil)-benzeno (Slm 2 - 1:8).....	176
FIGURA 3.21 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de <i>Lithraea molleoides</i> (Slm 2- 1:8) nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.....	177
FIGURA 3.22 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de etila nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.....	178
FIGURA 3.23 – Efeito do extrato LMEF (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte <i>L. gongylophorus</i>	179
FIGURA 3.24 – Efeito do extrato LMEC (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte <i>L. gongylophorus</i>	180
FIGURA 3.25 – Efeito do extrato LMEG (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte <i>L. gongylophorus</i>	180
FIGURA 3.26 – Efeito das partições do extrato LMEF (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte <i>L. gongylophorus</i>	182

FIGURA 4.1 Cromatógrafo de Contracorrente de Alta Velocidade (High-speed counter-current chromatography).....	188
FIGURA 4.2 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	189
FIGURA 4.3 – Estrutura do limonoide azadiractina.....	191
FIGURA 4.4 – Frutos de <i>Trichilia atiguá</i> A. Juss.....	192
FIGURA 4.5 -Estrutura do limonoide cedrelona.....	193
FIGURA 4.6 – Extração e Fracionamento de <i>T. catiguá</i> e cedrelona.....	194
FIGURA 4.7- Determinação do coeficiente de partição (K).....	196
FIGURA 4.8 Fluxograma da obtenção de cedrelona do caule de <i>Toona ciliata</i>	197
FIGURA 4.9 – Estrutura dos polímeros poli- ϵ -(caprolactona) (PCL), poli- β -(hidroxibutirato) (PHB) e poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA).....	202
FIGURA 4.10 – Esquema de preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Figura Cedida pelo Prof. Moacir R Forim.....	204
FIGURA 4.11- Filtro de acetato de celulose utilizado para determinação da quantidade de cedrelona encapsuladas.....	208
FIGURA 4.12 – Fluxograma de Frações reunidas do HSCCC.....	212
FIGURA 4.13 -Estrutura da cedrelona.....	213
FIGURA 4.14 -Espectro de RMN ^1H da cedrelona (400 MHz, CDCl_3).....	214
FIGURA 4.15-Expansão do espectro de RMN ^1H da cedrelona (400 MHz, CDCl_3).....	214
FIGURA 4.16 -Expansão do espectro de RMN ^1H da cedrelona (400 MHz, CDCl_3).....	214
FIGURA 4.17 -Espectro de RMN ^{13}C da cedrelona (100 MHz, CDCl_3).....	216
FIGURA 4.18- Produto sintetizado- acetato de cedrelona.....	217
FIGURA 4.19 – Espectro de RMN ^1H do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).....	217
FIGURA 4.20 – Expansão do espectro de RMN ^1H do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).....	218
FIGURA 4.21- Expansão do espectro de RMN ^1H do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).....	218

FIGURA 4.22 – Espectro de RMN ¹³ C do acetato de cedrelona (100 MHz, CDCl ₃).....	219
FIGURA 4.23 – Mapa de contorno de HSQC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	221
FIGURA 4.24 – Expansão do mapa de contorno de HSQC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	221
FIGURA 4.25 – Expansão do mapa de contorno de HSQC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	222
FIGURA 4.26- Mapa de contorno de HMBC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	223
FIGURA 4.27- Sobreposição dos cromatogramas da cedrelona (preto) e do produto de acetilação (rosa) obtido no GC-MS.....	223
FIGURA 4.28 – Cromatograma do produto de acetilação obtido no GC-MS.....	224
FIGURA 4.29 - Espectro de massas do acetato de cedrelona(IE = 70 e.V).....	224
FIGURA 4.30 - Mesilato de cedrelona.....	225
FIGURA 4.31 - Espectro de RMN ¹ H do mesilato de cedrelona (400 MHz CDCl ₃).....	225
FIGURA 4.32 - Expansão do espectro de RMN ¹ H do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	226
FIGURA 4.33 - Expansão do espectro de RMN ¹ H do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	226
FIGURA 4.34 - Espectro de RMN ¹³ C do mesilato de cedrelona (100 MHz, CDCl ₃).....	227
FIGURA 4.35 - Mapa de contorno de HSQC do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	229
FIGURA 4.36 - Expansão do mapa de contorno de HSQC do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	229
FIGURA 4.37 - Mapa de contorno de HMBC do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).	230
FIGURA 4.38 - Espectro de massas (ESI) modo positivo do [M+Na] ⁺ do mesilato de cedrelona.....	230
FIGURA 4.39 - Substância sintetizada - propianato de cedrelona.....	231

FIGURA 4.40 - Espectro de RMN ¹ H do propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	232
FIGURA 4.41 - Expansão do espectro de RMN ¹ H do propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	232
FIGURA 4.42 - Expansão do espectro de RMN ¹ H do propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	233
FIGURA 4.43- Espectro de RMN ¹³ C do propionato de cedrelona (100 MHz, CDCl ₃).....	233
FIGURA 4.44 - Mapa de contorno de HSQC do Propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	235
FIGURA 4.45 - Mapa de contorno de HMBC do Propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl ₃).....	236
FIGURA 4.46 - Cromatograma do produto da reação com cloreto de propionila obtido no GC-MS.....	236
FIGURA 4.47 - Espectro de massas do propionato de cedrelona (IE = 70 e.V).....	236
FIGURA 4.48 - Espectro de massas (ESI) modo positivo da [M+Na] ⁺ do propionato de cedrelona.....	237
FIGURA 4.49- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto acetato de cedrelona.....	237
FIGURA 4.50 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	238
FIGURA 4.51 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto mesilato de cedrelona.....	239
FIGURA 4.52 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	240
FIGURA 4.53 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o propionato de cedrelona.....	241

FIGURA 4.54 - Gráfico das médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> de propionato de cedrelona comparada ao controle.....	242
FIGURA 4.55 - Cromatograma de cedrelona.....	243
FIGURA 4.56 - Cromatograma de cedrelona. Análise por CLAE método isocrático da amostra de cedrelona a ser encapsulada nas condições: C18 Gemini Phenomenex 5 µm (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH:H ₂ O 85:15, fluxo 1,0 mL/min, λ =278 nm.....	243
FIGURA 4.57 - Curva de calibração para análise de cedrelona. As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Agilent 1260, nas condições: C18 Gemini Phenomenex 5 µm (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH:H ₂ O 85:15, fluxo 1,0 mL/min, λ = 278 nm.....	244
FIGURA 4.58 - Preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.....	247
FIGURA 4.59 - Distribuição de tamanho pela intensidade das partículas das 14 formulações.....	249
FIGURA 4.60 - Distribuição do potencial zeta calculado pela média dos deslocamentos de fases medidos durante as análises em triplicata.....	250
FIGURA 4.61 - Gráfico da distribuição dos efeitos em relação ao valor normal esperado do planejamento fatorial (Análise da ANOVA).....	253
FIGURA 4.62 - Visualização dos efeitos principais em porcentagem e de interação ao alterar entre os níveis baixo (-1) e alto (+1) (ANOVA).....	254
FIGURA 4.63 Imagem de MEV das partículas de PCL, NP1, contendo cedrelona incorporada.....	255
FIGURA 4.64 Imagem de MEV das partículas de PCL, NP2, contendo cedrelona incorporada.....	255
FIGURA 4.65 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP3 e NP5, contendo cedrelona incorporada.....	255
FIGURA 4.66 Imagem de MEV das partículas de PCL, NP10, contendo cedrelona incorporada.....	256
FIGURA 4.67 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP14, contendo cedrelona incorporada.....	256

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE *Duguetia lanceolata* E *Lithraea molleoides* NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS E PROCESSOS DE NANOENCAPSULAMENTO

As formigas cortadeiras e o gorgulho do milho são responsáveis por grandes prejuízos na agricultura brasileira devido ao difícil controle destas pragas. Produtos naturais vêm conquistando grande importância, principalmente na busca de compostos químicos que não sejam tóxicos aos homens, aos animais e ao meio ambiente e que possam controlar biorracionalmente o comportamento de pragas agrícolas, como insetos e fungos. Diferentes métodos e novas estratégias têm sido alvo de estudos em busca de propostas para o controle de pragas. Dentre elas, destaca-se a busca na natureza de novos compostos com potencial inseticida e fungicida, bem como a síntese de derivados de produtos naturais com estas propriedades. Nesta perspectiva, este trabalho visou a busca de compostos e frações ativas frente às formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa*, o seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e *Sitophilus zeamais*, também conhecido como gorgulho-do-milho. Através de estudos fitoquímicos biomonitorados dos extratos das partes de vegetais de *Duguetia lanceolata* (Annonaceae) e *Lithraea molleoides* (Anacardeaceae), verificou-se frações com potencial no controle de pragas. Este estudo levou ao isolamento/identificação de 19 substâncias, incluindo algumas com destaque inseticida/fungicida. Atualmente, estudos vêm buscando novas tecnologias para aplicação de princípios ativos e o nanoencapsulamento vem demonstrando ser uma técnica com grande potencial, visto que podemos encontrar sistemas de liberação controlada de substâncias controlando a estabilidade dos ativos. Portanto, a outra vertente do trabalho está relacionada ao desenvolvimento de nanocápsulas a partir de polímeros biodegradáveis para nanoencapsulação da cedrelona isolada de *Trichilia catigua*, bem como algumas semi-sínteses com limonoide cedrelona, na busca de análogos a serem ensaiados nas formigas e fungos a fim de potencializar a atividade fungicida e inseticida. Para o isolamento em larga escala da cedrelona, presente em *T. catigua*, a técnica de CCC (cromatografia em contracorrente) se mostrou eficiente, com diferenciais, tais como economia de solvente e tempo, reprodutibilidade e recuperação total das amostras. No desenvolvimento de formulações para nanoencapsulamento da cedrelona, a técnica de nanoprecipitação mostrou-se viável e reprodutível para encapsulamento. Todas as formulações se mostraram estáveis, com alta eficiência de encapsulamento. Para os análogos da cedrelona, foram sintetizados o mesilato de cedrelona, o propionato de cedrelona e o acetato de cedrelona. Dentre eles, o propionato de cedrelona e o acetato de cedrelona foram os que apresentaram grande potencial fungicida/inseticida contra as formigas cortadeiras.

ABSTRACT

BIOMONITORED PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Duguetia lanceolata* AND *Lithraea molleoides* IN AGRICULTURAL PEST CONTROL AND NANOENCAPSULATION PROCESSES

Leafcutter ants and maize weevil are responsible for great losses in Brazilian agriculture due to the difficult control of these pests. Natural products are becoming increasingly important, mainly in the search for non-toxic chemical compounds to humans, animals and environment and that can bio-rationally control agricultural pests' behavior, such as insects and fungi. Different methods and new strategies have been the subject of studies to provide propositions for pest control. Among them, the search in nature for new compounds with insecticide and fungicide potential, as well as a synthesis of natural products derivatives with these properties. Accordingly, this study aimed the search of active fractions and compounds as regards the leafcutter ants *Atta sexdens rubropilosa*, its symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* and *Sitophilus zeamais*, as known as maize weevil. Through bio-monitored phytochemical studies of the extracts of the plant parts of *Duguetia lanceolata* (Annonaceae) and *Lithraea molleoides* (Anacardeaceae), fractions with potential for pest control were found. The present study led to the isolation/identification of 19 substances, including some insecticide and fungicide emphasis. Current studies have been looking for new technologies for active ingredients application and nanoencapsulation seems to be a technique with great potential since systems for controlled release of substances controlling the stability of chemical actives can be found in it. Therefore, the other aspect of this work is related to the development of nanocapsules from biodegradable polymers for the nanoencapsulation of cedrelone, isolated from *Trichilia catigua*, as well as some semi-syntheses with the cedrelone limonoid, in the search of cedrelone derivatives to be tested on ants and fungi in order to enhance their fungicide and insecticide activities. For the large-scale isolation of cedrelone, present in *T. catigua*, the CCC technique (countercurrent chromatography) has proved to be successful, with some advantages, such as solvent and time savings, reproducibility and total sample recovery. During the development of formulations for nanoencapsulation, the nanoprecipitation technique proved to be both viable and reproducible for encapsulation. All formulations were stable and with high encapsulation efficiency. For cedrelone derivatives, cedrelone mesylate, propionate cedrelone and cedrelone acetate were synthesized and cedrelone propionate and cedrelone acetate showed great fungicide/insecticide potential against leafcutter ants.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1.1 Agricultura no Brasil.....	02
1.2 Controle de insetos.....	03
1.3 Formigas Cortadeiras.....	03
1.4 Métodos de controle das formigas.....	06
1.5 <i>Sitophilus zeamais</i>	08
1.6 Ciclo do <i>Sitophilus zeamais</i>	10
1.7 Objetivos.....	11
1.7.1 Objetivos específicos.....	11
1.8 Materiais e métodos.....	12
1.9 Equipamentos.....	12
1.10 Referências Bibliográficas.....	15
CAPÍTULO 2 - ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE <i>Duguetia lanceolata</i>.....	18
2. 1 Ordem, Família Gênero e Espécie.....	19
2.1.1. Ordem Magnoliales.....	19
2.1.2. Família Annonaceae.....	19
2.1.3. Espécie <i>Duguetia lanceolata</i>	21
2.2 Objetivo.....	23
2.3 Procedimentos experimentais.....	24
2.3.1 Preparo do material vegetal e extratos de <i>Duguetia lanceolata</i>	24
2.3.2 Fracionamento dos extratos de <i>D. lanceolata</i>	25
2.3.3 Estudo Fitoquímico do extrato bruto de <i>D. lanceolata</i>	28
2.3.3.1 Estudo do extrato hexânico das folhas de <i>D. lanceolata</i> (DLEF-hex) por coluna cromatográfica sob vácuo.....	28
2.3.3.2 Estudo da Fração Fdl-2.....	28
2.3.3.3 Estudo da Fração Cdl1-14-15.....	29
2.3.3.4 Estudo da Fração Cdl1-44-45.....	30
2.3.3.5 Estudo da Fração Fdl-7.....	31
2.3.3.6 Estudo da Fração Sdl1-10-13 por CLAE (Hp1).....	32

2.3.3.7 Estudo da Fração Sdl1-14-18 por CLAE (Hp2).....	34
2.3.3.8 Estudo da Fração Fdl-5.....	35
2.4 Estudo da partição diclorometano do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia lanceolata</i> (DLEF-dicloro).....	38
2.5 Estudo da partição hexânica do extrato etanólico da casca dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> (DLE Caf-hex).....	39
2.6 Estudo da partição diclorometano do extrato etanólico da casca dos frutos de <i>Duguetia lanceolata</i> (DLE Caf-dicloro).....	41
2.7 Estudo do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i>	44
2.7.1 Preparo do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i>	44
2.7.2 Análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> por CG/EM.....	44
2.8 Ensaios Biológicos nas operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	46
2.8.1 Ensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	46
2.8.2 Ensaios tóxico do Óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> sobre operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	47
2.9 Ensaios realizados com o Fungo simbiote.....	47
2.9.1 Procedimento de manutenção do fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	47
2.9.2 Metodologia do Ensaio de Inibição de <i>L. gongylophorus</i> in vitro pelo método de Incorporação.....	48
2.9.3 Metodologia do Ensaio de Inibição de <i>L. gongylophorus</i> in vitro com o óleo essencial.....	48
2.9.4 Ensaios Frente ao <i>Sitophilus zeamais</i>	49
2.10 Resultados e Discussão	51
2.10.1 Substâncias isoladas e identificadas.....	51
2.10.2 Identificação estrutural do sitosterol (1), estigmasterol (2) e campesterol (3).....	55
2.10.3 Determinação Estrutural 2,4,5-trimetoxiestireno.....	58
2.10.4 Determinação Estrutural 2,4,5-trimetoxifenilamina	65
2.10.5 Alcaloides.....	73
2.10.5.1 Determinação Estrutural da liscamina.....	73
2.10.5.2 Determinação Estrutural da oxoglaucina.....	80
2.10.5.3 Determinação Estrutural da glaucina.....	86

2.10.5.4 Determinação estrutural da mistura das substâncias oxolaurelina e lanuginosina	92
2.10.5.5 Determinação Estrutural da Liriodenina.....	97
2.10.6 Derivado Dihidronafitalenona.....	102
2.10.7 Flavonoides.....	108
2.10.8 Determinação Estrutural da substância 13.....	110
2.11 Estudo do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i>	118
2.11.1 Análise do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> por CG/MS.....	118
2.12 Ensaio com <i>Duguetia lanceolata</i>	128
2.12.1 Ensaio inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> dos extratos <i>Duguetia lanceolata</i>	128
2.12.2 Ensaio inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> das frações da extração Líquido-Líquido de <i>Duguetia lanceolata</i>	130
2.12.3 Ensaio tópico do óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> sobre operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	135
2.12.4 Ensaio Frente ao Fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	136
2.12.4.1 Ensaio dos extratos etanólicos e partições de <i>Duguetia lanceolata</i>	136
2.12.5 Substâncias isoladas- Ensaio de ingestão sobre <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e Frente ao Fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	139
2.12.6 Ensaio do Óleo essencial das folhas de <i>D. lanceolata</i> frente o fungo <i>L. gongylophorus</i>	143
2.12.7 Ensaio à frente <i>S. zeamais</i>	145
2.12.7.1 Ensaio dos extratos de <i>D. lanceolata</i>	145
2.12.7.2 Ensaio das partições do extrato ativo (DLEF).....	146
2.12.7.3 Ensaio das subfrações obtidas do extrato das folhas de <i>D. lanceolata</i> (DLEF).....	146
2.13 Conclusão.....	150
2.14 Referências Bibliográficas.....	153
CAPÍTULO 3. INTRODUÇÃO- ORDEM, FAMÍLIA GÊNERO E ESPÉCIE.....	155
3.1 Ordem sapindales.....	156
3.2 Família Anacardiaceae.....	156

3.3 Espécie <i>Lithraea molleoides</i>	157
3.4 Objetivos.....	158
3.5 Procedimento Experimental.....	158
3.5.1 Preparo do material vegetal e extratos	158
3.6 Fracionamento dos extratos <i>L. molleoides</i>	160
3.7 Estudo fitoquímico de <i>Lithraea molleoides</i>	161
3.7.1 racionamento da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>Lithraea molleoides</i> (LMEF-hex).....	161
3.7.2 Fracionamento da fração Flm-3.....	162
3.7.3 Fracionamento da fração Flm-6.....	164
3.8 Resultados e Discussão.....	165
3.8.1 Determinação estrutural.....	165
3.8.1.1 Determinação estrutural do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno.....	165
3.8.1.2 Determinação estrutural do galato de etila.....	170
3.8.2 Resultados dos ensaios biológicos	172
3.8.2.1 - Incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	172
3.8.2.1.1 Extratos de <i>Lithraea molleoides</i>	172
3.8.2.1.2 Partição dos Extratos de <i>Lithraea molleoides</i>	173
3.8.2.1.3 Ensaios das subfrações de LMEF-hex.....	175
3.9 Ensaio das substâncias isoladas de <i>Lithraea molleoides</i>	176
3.9.1 Ensaios da substância isolada de LMEF-hex.....	176
3.9.2 Ensaios da substância isolada de LMEF-dicloro.....	177
3.9.3 Ensaios Frente ao Fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i>	178
3.9.3.1 Extrato etanólico folhas de <i>L. molleoides</i> (LMEF).....	178
3.9.3.2 Extrato etanólico dos galhos de <i>L. molleoides</i> (LMEG).....	180
3.9.3.3 Ensaio das partições do extrato etanólico das folhas (LMEF).....	180
3.10 Conclusão.....	182
3.11 Referências Bibliográficas.....	184
CAPÍTULO 4 - CEDRELONA: ISOLAMENTO EM LARGA ESCALA, SEMI-SÍNTESES E PROCESSOS DE NANO ENCAPSULAMENTO.....	186
4. Introdução.....	187

4.1 Cromatografia em Contracorrente.....	187
4.2 Nano encapsulamento.....	189
4.3 Ordem Rutales.....	190
4.4 Família Meliaceae.....	190
4.5 O gênero <i>Trichilia</i>	191
4.6 <i>Trichilia catigua</i>	192
4.7 Procedimento Experimental.....	193
4.7.1 Preparo do material vegetal e extrato de <i>T. catigua</i>	193
4.7.2 Estudo do extrato etanólico dos arilos dos frutos de <i>Trichilia catigua</i> (TCEA).....	194
4.7.2.1 Procedimentos para o cálculo do coeficiente de partição (k) dos sistemas de solventes.....	195
4.7.3 Isolamento de cedrelona de <i>Toona Ciliata</i>	196
4.7.4 Mudanças estruturais da cedrelona.....	198
4.7.4.1 Reação de acetilação.....	198
4.7.4.2 Produto de mesilação.....	198
4.7.5 Produto de esterificação com cloreto de propionila.....	199
4.7.6 Análise cromatográfica Qualitativa da cedrelona.....	199
4.7.7 Validação do método analítico para quantificação da cedrelona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	200
4.7.7.1- Preparo da solução padrão para construção da curva de calibração.	200
4.7.7.2- Preparo da solução padrão para validação do método.....	201
4.8 Preparo das nanopartículas de cedrelona.....	202
4.8.1 Escolha do polímero.....	202
4.8.2 Preparo das nanopartículas de PCL com cedrelona.....	203
4.8.3 Preparo das nanopartículas sem o princípio ativo cedrelona – Controle.....	205
4.9 Caracterização físico-química das nanopartículas.....	206
4.9.1 Determinação do pH.....	206
4.9.2 Diâmetro médio de partículas.....	206
4.9.3 Potencial zeta.....	207
4.9.4 Determinação da quantidade total de cedrelona na suspensão coloidal.....	207
4.9.5 Determinação da quantidade de cedrelona encapsulada.....	207
4.10 Morfologia das nanopartículas.....	208

4.11 Resultados e Discussão.....	208
4.11.1 Isolamento da cedrelona por HSCCC.....	211
4.11.2 Determinação estrutural do limonoide isolado e dos produtos das semi-sinteses.....	213
4.11.2.1 Substância isolada de <i>Trichilia catiguá</i> e <i>Toona ciliata</i> : limonoide cedrelona.....	213
4.11.2.2 Substâncias sintetizadas, produto de acetilação da cedrelona.....	217
4.11.2.3 Produto de mesilação.....	224
4.11.2.4 Produto de esterificação com cloreto de propionila.....	231
4.12 Ensaio Biológico dos produtos sintetizados.....	237
4.12.1 Acetato de cedrelona.....	237
4.12.2 Mesilato de cedrelona.....	239
4.12.3 Propionato de cedrelona.....	240
4.13 Processos de nano encapsulamento.....	243
4.13.1 Análise cromatográfica da cedrelona.....	243
4.13.2 Validação do método analítico para quantificação da cedrelona por CLAE.....	244
4.13.3 Incorporação da cedrelona pelo método de nano precipitação.....	246
4.13.4 Medidas de PH.....	250
4.13.5 Cálculo dos efeitos para o planejamento fatorial.....	252
4.13.6 Análise morfológica das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	254
4.14 Ensaio Biológico das Nanopartículas.....	256
4.14.1 Ensaio frente ao fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	256
4.15 Conclusões.....	262
4.16 Referências Bibliográficas.....	263

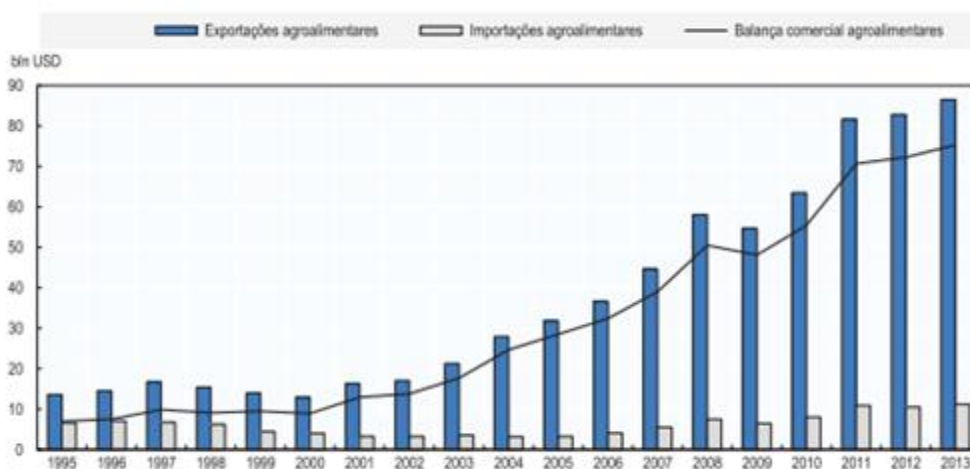
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Agricultura no Brasil

O Brasil encontra-se entre as dez maiores economias mundiais, com um PIB superior a US\$ 2 trilhões em 2013, sendo o setor agrícola, um dos mais importantes no desempenho do país, contribuindo com 17% do PIB. A produção agrícola vem crescendo exponencialmente nos últimos anos, tornando o Brasil o segundo maior exportador de produtos agrícolas e agroalimentares do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos, passando para o quarto lugar no ano 2000 (ONU, 2013).

Nos últimos anos houve um crescente aumento no comércio agrícola (FIGURA 1.1) no que diz respeito a exportações. Os principais responsáveis por este aumento são as culturas agrícolas como soja, milho, citros, cana-de-açúcar. Estas culturas estão também entre as que mais utilizam agrotóxicos (ONU, 2013).



Fonte: Base de dados CoTrade da ONU (2013)

FIGURA 1.1- Comércio Agroalimentar no Brasil 1995-2013. (Fonte: (http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes%20%20versao%20atualizada.pdf)). Acessado em 18-08-2015.

Contudo, estas produções muitas vezes são alvo de pragas, tais como insetos, fungos e plantas daninhas. Para que não haja perdas e prejuízos, o uso de agroquímicos se faz presente, sendo muito empregado neste meio.

Segundo dados da ANVISA, um terço dos alimentos consumidos no dia a dia pelos brasileiros está contaminado por agrotóxicos conforme consta na legislação

vigente, são agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção e armazenamento afim de melhorar a produtividade. Estes podem causar sérios prejuízos aos seres humanos e ao meio ambiente.

Neste sentido, a busca na natureza de compostos com diversas atividades biológicas, vem aumentando. Um grande destaque está nas substâncias oriundas da natureza, que também podem ser usadas como modelo para sintéticos. Os produtos naturais se destacam devido à facilidade de degradação, comparado aos sintéticos e não deixam resíduos, tanto no meio ambiente, quanto nos alimentos.

1.2 Controle de insetos

A eficiência no controle de insetos e a busca de compostos biologicamente ativos estão intimamente relacionados com a sobrevivência do ser humano e constituem importantes aspectos a serem estudados. Os insetos são os maiores competidores dos seres humanos com relação à alimentação, além de serem vetores de inúmeras moléstias.

Grandes esforços têm sido realizados para produzir compostos naturais não tóxicos, principalmente ao homem (CAMPOS, 1988; ARNASON, *et al.* 1987), que possam controlar biorracionalmente o comportamento de insetos pragas.

Diversos metabólitos secundários de plantas estão envolvidos na interação entre inseto-planta, bem como planta-planta e planta-micro-organismos. Tais metabólitos podem interferir no comportamento, crescimento ou no desenvolvimento de outros seres, como por exemplo, a interação entre as neuro secreções cerebrais, ecdisona e hormônio juvenil, na metamorfose de inseto, cujos precursores se originam de metabólitos secundários de planta (WIGGLESWORTH, 1985).

1.3 Formigas Cortadeiras

As formigas pertencem à classe Insecta da ordem Hymenoptera e estão reunidas numa única família Formicidae. Dentro da subfamília Myrmicinae, a tribo Attini reúne as formigas cultivadoras de fungo e entre essas, são consideradas formigas cortadeiras (FIGURA 1.2) as espécies do gênero *Atta*, popularmente

conhecidas como saúvas e do gênero *Acromyrmex*, conhecidas como quenquéns (JUSTI-JUNIOR *et al.*, 1996).

Elas são conhecidas pelo poder de destruição de um grande número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico causado à agricultura (MARICONI, 1970; BERTI FILHO *et al.*, 1992).



FIGURA 1.2 - Formigas Cortadeiras

(Fonte: http://www.uesb.br/ascom/ver_noticia_.asp?id=3219, 16/01/2012, 19:24 h).

Uma colônia de formigas é composta de várias castas de trabalhadores, como observado na FIGURA 1.3. As formigas maiores são responsáveis por cortar as folhas e carregar para o ninho. As de médio porte têm a função de cortar o material vegetal em pedaços menores. As menores, conhecidas como jardineiras, têm a função de cuidar do crescimento do jardim de fungo (BOULOGNE, 2012).

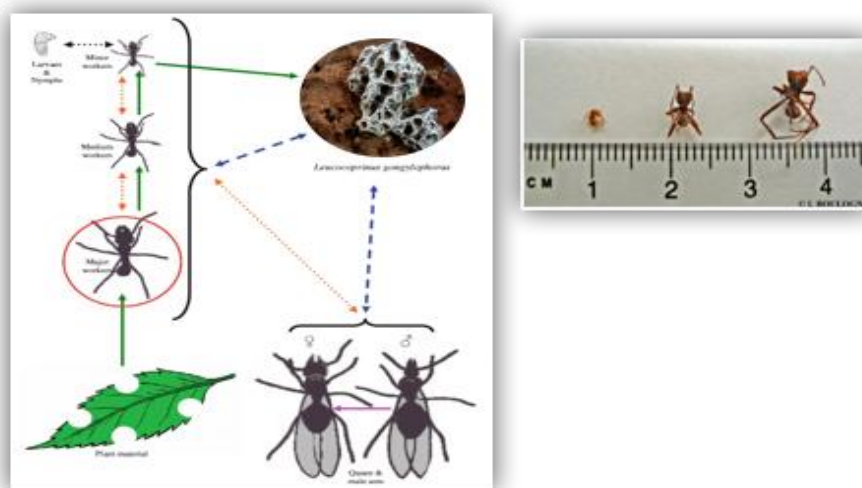


FIGURA 1.3 - Castas das Formigas (Fonte: BOULOGNE, 2012).

Sua distribuição ampla se estende desde o sul dos Estados Unidos até a região central da Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe, não ocorrendo no Chile e nas regiões transandinas da América do Sul e em algumas ilhas das Antilhas (FARJI BRENNER e RUGGIERO, 1994).

A ocorrência de espécies de saúvas na América do Sul está nas regiões tropicais e subtropicais, onde o Brasil é o país com o maior número de espécies, seguido da Argentina e do Paraguai. No Brasil, as saúvas são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná.

São 10 espécies de um total de 15 espécies dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, destas, cinco espécies possuem grande importância econômica: *Atta laevigata*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex disciger*, *Acromyrmex nigere* *Acromyrmex crassipinus*. A subespécie *Atta sexdens rubropilosa*, conhecida como “saúva-limão”, é uma das principais responsáveis pelos prejuízos em terras brasileiras.

Entre várias espécies de plantas atingidas por essas pragas, destaca-se às espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*, principalmente nas fases de pré-corte (áreas de reforma ou condução da floresta) e imediatamente após o plantio, ou no início da condução de brotação (BOARETTO e FORTI, 1997). Em sistemas tropicais, chegam a consumir até 17 % da produção florestal.

A grande devastação causada nessas espécies vegetais, além do prejuízo econômico causado à agricultura e silvicultura brasileira (MARICONI, 1970; BERTI FILHO *et al.*, 1992, ALMEIDA, 2007), está relacionada a sua voracidade de cortar e carregar as folhas e flores para dentro do formigueiro.

O material vegetal cortado é utilizado por elas para cultivar um fungo com o qual possui relação de simbiose (FISHER *et al.* 1994) (FIGURA 1.4).

A ação mutualística entre a formiga *Atta sexdens rupilosa* e o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* é muito forte. O fungo é a principal fonte de alimento para as larvas e rainha, podendo também suprir 9 % da energia requerida por uma formiga adulta (STRADLING e POWELL, 1992; BACCI JR. *et al.* 1998).



FIGURA 1.4 - Simbiose entre as formigas cortadeiras e o fungo *L. gongylophorus*. (Fonte: Cazal, 2010).

A utilização da cultura de fungo é uma maneira de evitar a ingestão de componentes químicos tóxicos dos vegetais pelas formigas. Dessa maneira, os nutrientes palatáveis e os menos palatáveis estão disponíveis para as formigas através da detoxificação realizada pelo fungo (GUERREIRO, 2001).

A relação de simbiose existente entre as formigas cortadeiras e o seu fungo simbionte (*L. gongylophorus*) é relatada em vários estudos (SINGER, 1986, FISHER *et al.*, 1994). RODIONOVA e BEZBORODOV (1997) relataram que as formigas alimentam a cultura fúngica com substrato vegetal que é constituído por polímeros complexos que representam 70 a 90 % m/m do seu peso seco.

As pectinas presentes nos substratos vegetais desempenham funções de agente hidratante e de material cimentador para a rede de fibras de celulose (SAKAI *et al.*, 1993; THAKUR *et al.*, 1997) e representam um terço do peso seco do tecido vegetal de dicotiledôneas e de algumas monocotiledôneas. Para promover a degradação da pectina no tecido vegetal é necessário um complexo enzimático.

Enzimas que degradam os polissacarídeos vegetais em açúcares redutores foram detectadas no fungo simbionte (SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA, 1999; SILVA *et al.*, 2003) e também no líquido fecal de *A. colombica tonsipes* (MARTIN *et al.*, 1975) e de *A. sexdens rubropilosa* (SIQUEIRA, 1997; SILVA, 1999). As formigas utilizam o fungo simbionte para promover esse processo de degradação, uma vez que não são capazes de degradar a pectina diretamente, tornando as pectinases, um alvo factível de controle das formigas.

1.4 Métodos de controle das formigas

Para o controle das formigas são usados vários métodos, dentre eles os métodos mecânicos, biológicos e químicos.

O controle mecânico manual consiste na destruição dos ninhos da área através da escavação do formigueiro que é efetuada até que a rainha seja localizada e morta (BOARETTO e FORTI, 1997). Este tipo de controle praticamente não é utilizado devido a inviabilidade em muitos casos, pois se restringe a pequenas áreas e ninhos com até 4 meses de idade.

O controle biológico clássico consiste no emprego de predadores, parasitoides e microrganismos (bactérias, fungos e vírus) que utilizam formiga cortadeira como

hospedeiro (BOARETTO e FORTI, 1997). Atualmente, consiste em uma área promissora de pesquisa, porém há uma grande necessidade de conhecimentos biológicos básicos para que estratégias de controle para formigas cortadeiras possam ser de fato aplicadas com segurança.

O controle químico geralmente é o mais utilizado, sendo o produto químico aplicado diretamente nos ninhos em formas de iscas granuladas, líquidos termonebulizáveis e formulações em pó ou líquida (FORTI e BOARETTO, 1997).

No controle químico, destaca-se o uso de iscas granuladas, pois permitem a aplicação em formigueiros localizados em áreas de difícil acesso, sem necessidade de mão de obra e equipamentos especializados, além de oferecer maior segurança ao operador (LOECK e NAKANO, 1984). Estas iscas contêm óleo de soja como veículo, polpa cítrica como atraente e um ingrediente ativo como princípio tóxico.

A ação do inseticida formulado em iscas tóxicas deve ocorrer por ingestão e apresentar características particulares, como a ação tóxica retardada, com mortalidade menor que 15% após o primeiro dia e maior que 85% após o décimo quarto dia a partir do oferecimento das iscas; deve ser letal em baixas concentrações e não causar danos ambientais. O inseticida deve ser ainda inodoro e não repelente (FORTI e BOARETTO, 1997).

No Brasil eram utilizadas iscas granuladas com dodecacloro que possui baixo custo e alta eficiência (DELLA LÚCIA, 1997). No entanto, por ser um composto organoclorado e possuir efeitos tóxicos, foi retirado do mercado, aumentando assim a necessidade da busca de novos princípios ativos. Posteriormente foram introduzidas no mercado iscas com o Fipronil (como princípio ativo). Estes atuam no sistema nervoso central, diretamente no receptor ácido gama aminobutírico (GABA) e inibindo-o, causando hiperexcitação neural e morte o inseto (COUTINHO, 2005).

A alta afinidade do fipronil pelos receptores dos insetos quando comparado aos receptores GABA de mamíferos resulta em uma menor toxicidade quando comparados com outros inseticidas que bloqueiam este mesmo canal (MARTINS, 2009; MOHAMED *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2004).

Apesar de menos tóxicos para os mamíferos, foram relatados casos de intoxicação humana pelo praguicida no Sri Lanka, causando suores, tremores, náusea, vômitos e agitação, entre outros sintomas (MARTINS, 2009; MOHAMED *et al.*, 2004). Este princípio ativo já foi proibido em alguns países. Diante destes relatos,

a busca de novos princípios ativos, no controle de insetos, que não causem prejuízos ao homem nem ao meio ambiente vem sendo intensificada.

O desenvolvimento de formas alternativas para o controle de formigas cortadeiras é bastante complexo, por esse motivo, o grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos vem buscando intensamente métodos alternativos para controlar estes insetos, substituindo os agroquímicos tradicionais por inseticidas naturais, provenientes de plantas, que sejam mais específicos, seletivos e que causem menos danos ao meio ambiente (GODOY *et al.*, 2005).

O uso de substâncias naturais como modelo sintético, vem sendo explorado, visto que muitas vezes, uma simples mudança estrutural em um composto de origem natural, pode potencializar seu efeito fungicida/inseticida.

Outra estratégia possível para o controle das formigas cortadeiras é o encapsulamento de substâncias com atividades inseticidas e/ou fungitóxica para serem utilizadas em iscas. Os agroquímicos encapsulados têm sua atividade prolongada através da liberação controlada do princípio ativo.

Há ainda outros benefícios, como a redução da volatilização, da fitotoxicidade e da degradação ambiental. Os inseticidas também são encapsulados para impedir o reconhecimento de compostos ativos por parte dos insetos e principalmente por reduzirem a toxicidade em mamíferos (OHTSUBO *et al.*, 1991).

1.5 *Sitophilus zeamais*

O milho é o cereal mais cultivado e consumido no Brasil. Sua produção cresce a 1,5% ao ano, dando destaque aos produtores no Paraná, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, que juntos são responsáveis por 80,7% da produção nacional (COELHO, 2000).

No Brasil, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), são colhido milhões de toneladas de grãos e grande parte é perdida por falta ou por más condições de armazenagem (COELHO, 2000).

Para se combater os insetos de grãos armazenados, tem-se utilizado o controle químico, por ser efetivo, de baixo custo e de fácil manejo. Dentre as técnicas mais utilizadas está o expurgo com fosfina ou brometo de metila.

Porém, o uso indiscriminado de fosfina pode levar ao desenvolvimento de resistência das pragas devido à alta frequência de aplicações, de dosagens incorretas, e períodos de exposição inadequados.

Esta resistência leva ao uso de dosagens cada vez mais elevadas, ao aumento do tempo de exposição, aos níveis inaceitáveis de resíduos, à possibilidade de intoxicação dos operadores e, conseqüentemente, ao aumento dos custos sociais, ambientais e de produção (COELHO, 2000).

Diante deste problema, a busca por novas substâncias, que sejam mais seletivas, biodegradáveis, com viabilidade econômica e baixo impacto ambiental, é necessária em programas de manejo integrado de insetos-praga de grãos armazenados (MIP Grãos).

Assim, uma estratégia são os produtos naturais para controlar estes insetos, substituindo os agroquímicos tradicionais por inseticidas naturais, provenientes de plantas, que sejam mais específicos, seletivos e que causem menos danos ao meio ambiente.

Estudos recentes (RIBEIRO, 2010) mostram atividades promissoras dos extratos vegetais provenientes de espécies de Annonaceae no controle do gorgulho-do-milho (*S. zeamais* Motschulsky, 1855; Coleoptera: Curculionidae), principal espécie-praga do milho armazenado.

O *S. zeamais*, (FIGURA 1.5), também conhecido como gorgulho do milho, pertence à família Curculionidae, é considerado uma das principais pragas primárias internas do milho, com grande capacidade destrutiva, efetuando a postura no interior dos grãos, onde também as larvas e pupas se desenvolvem.

As perdas ocorridas antes, durante e após a colheita, no transporte, industrialização e armazenamento dos grãos; são influenciadas por diversos fatores, como a precária estrutura das unidades armazenadoras, o alto teor de umidade, impureza dos grãos e a presença de pragas (COITINHO *et al.*, 2010).

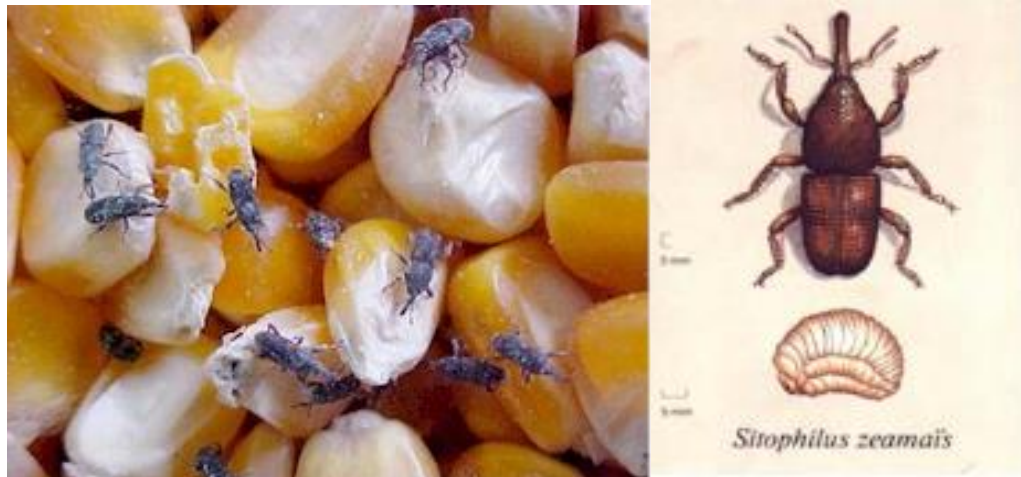


FIGURA 1.5 - *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae).
Fonte: <<http://www.pragas.com.br/pragas/geral/caruncho.php> e
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fonteshtml/milho/cultivodomilho_2ed/colpragas.htm>. Acessado em 18-08-2015.

1.6 Ciclo do *Sitophilus zeamais*

O ciclo biológico (FIGURA 1.6) de *S. zeamais* se inicia quando a fêmea perfura um orifício no grão, utilizando as mandíbulas, depositando um ovo. A cavidade aberta é coberta com uma secreção gelatinosa, produzida pelo órgão ovipositor, selando o ovo no grão (GIMENES, 2013).

A fase embrionária dura em média quatro dias, a 25°C. Após a eclosão, as larvas se desenvolvem no interior do grão, escavando-o à medida que crescem, passando por quatro instares larvais e transformando-se em pupa no interior do próprio grão.

A saída do inseto adulto do grão ocorre através da abertura de um orifício irregular, ocorrendo o acasalamento dois a três dias após a saída e o ciclo biológico é novamente iniciado (RIBEIRO, 2010)

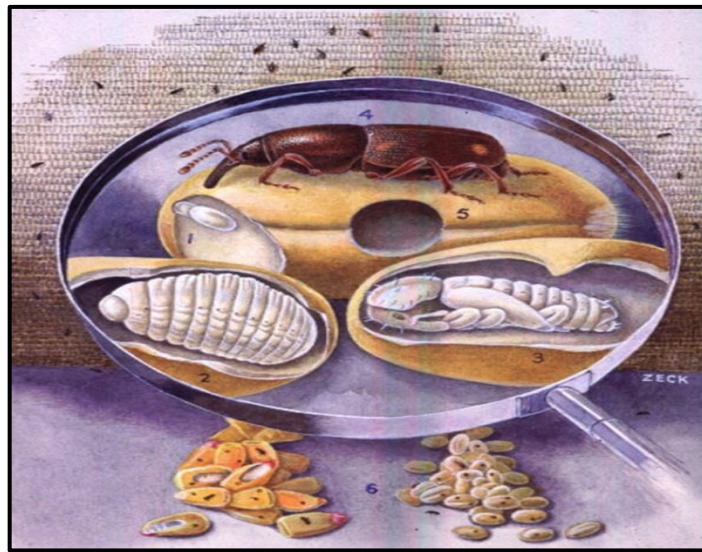


FIGURA 1.6 - Ciclo biológico *Sitophilus zeamais* (Fonte: GIMENES, 2013).

1.7 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é avaliar atividades potenciais de inseticidas e/ou fungicidas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às operárias da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* e ao gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*.

1.7.1 Objetivos específicos

Introdução da problemática no controle de pragas agrícolas;

Estudo biomonitorado de *Duguetia lanceolata*: Avaliar os potenciais inseticidas e/ou fungicidas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às operárias da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* e ao gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*;

Estudo biomonitorado de *Lithraea molleoides*: Avaliar os potenciais inseticidas e/ou fungicidas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às operárias da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*;

Isolamento de cedrelona em larga escala: Desenvolvimento de nanocápsulas de polímeros biodegradáveis com a cedrelona, mudanças estruturais a fim de potencializar o controle de insetos pragas.

1.8 Materiais e métodos

Solventes:

- Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar para obtenção de extratos e fracionamento dos mesmos;
- Solventes grau CLAE;
- Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL - CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, Inc. para obtenção de espectros de RMN.

Fases estacionárias utilizadas para cromatografia em coluna (CC):

- Sílica Gel 60 (70-230 Mesh) da ACROS ORGANICS;
- Sílica Gel 60 (230-400 Mesh) da ACROS ORGANICS;
- Sephadex^R LH 20 da Amersham Pharmacia Biotech AB;
- Florisil^R (200 Mesh) da ALDRICH.

Cromatografia em camada delgada (CCDC):

- Cromatoplaça de sílica gel 60 HF₂₅₄, $\phi = 0,2$ mm) em alumínio (Merck).

Reveladores;

- Radiação de luz ultravioleta (254 e 360 nm);
- Vanilina em ácido sulfúrico.

1.9 Equipamentos

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:

- BRUKER DRX 400 (9,4 Tesla);
- BRUKER ARX 600 (14,1 Tesla).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

- Cromatógrafo à líquido: Shimadzu SCL-10Avp (preparativo), equipado com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem (loop) de 200, 500 e 2000 µL, bombas Shimadzu LC-6AD e detector: UV-VIS, Shimadzu SPD-10vvp.
- Cromatógrafo à líquido Shimadzu SCL-10Avp (analítico), equipado com: degaseificador de membrana Shimadzu DGU-14A, duas bombas Shimadzu LC-10ADvp e detectores de Foto-diodo Shimadzu SPDM10Avp.
- Cromatógrafo à líquido Agilent Technologies modelo 1200 (analítico), equipado com: bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329A e detector de Ultravioleta G1314B. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A sendo os cromatogramas registrados através do *software* EZCrom[®] Elite.
- HSCCC (high-speed counter-current chromatography): Quik Prep/Lab Prep MK 5 equipado com duas bobinas cada uma contendo duas colunas em politetrafluoro (PTFE) com diâmetro interno de 0,5 mm i.d e diâmetro externo de 1,58 mm o.d., capacidade total de aproximadamente 500 ml. A velocidade de rotação é ajustável entre 0 e 1000 rpm e plano de rotação vertical. Aparelho com alça de injeção de 5 ml e sistema equipado com bomba de fluxo contínuo LabAlliance.

Cromatógrafo gasoso acoplado à Espectrômetro de Massas

- GC– 17A Shimadzu, CG-EM – QP 5000 Shimadzu, Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm) filme = 0,25 µm, Ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V). Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura do detector: 280°C; Modo: Split; Volume de injeção: 1 µL.

Espectrômetro de Massas:

Equipamento Applied Biosystems Life Technologies (AB/MSD Sciex), sob a plataforma API[™] 2000.

Potenciômetro:

Qualxtron Mod. 8010;

Evaporadores Rotativos:

BÜCHI, rotavapor R-114, equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

BÜCHI, rotavapor R-200, equipado com banho BUCHI 490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

Centrífuga:

Centrífuga Eppendorf 5810R.

Vórtex:

Vórtex PHOENIX AP56.

Banho de ultrassom:

Unique Ind. Com. Prod. Elet. Ltda. Mod. Maxiclean 1450

SPEEDVAC:

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

Diâmetro BI-FOQELS:

Diâmetro BI-FOQELS (Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering) Brookhaven Instruments Corporation

Potencial Zeta:

ZetaPlus, Zeta Potencial Analyzer –Brookhaven Instruments Corporation

Microscópico Eletrônico de Varredura (MEV):

Philips XL 30 FEG, 30 KV, resolução máxima de 2nm;

1.10 Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, S.S.M.S. Estudo Químico de Plantas com Atividade sobre Insetos Sociais. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.
- ARNASON, J.T.; ISMAN, M.B.; PHILOGENE, B.J.R. AND WADDELL, T.G., Mode of action of the sesquiterpene lactone tenulin from *Helenium amarum* against herbivorous insects. *J. Nat. Prod.*, **54**: 690-695, 1987.
- BACCI, JR. M.; SIQUEIRA, C.G.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. & HEBLING, M.J.A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus* the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Appl. Envir. Microb.* 64: 4820-4822, 1998.
- BERTI FILHO, E.; MARCHINI, L.C.; NAKANO, O. Curso de entomologia aplicada à agricultura. *IN: Formigas cortadeiras e cupins*. Piracicaba, FEALQ. 1992, p. 631-671.
- BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*. 11: 31-46, 1997.
- CAMPOS, F. In: *Insecticidas biorracionales* (ed. X. Bell's). pp.69-86. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. 1988.
- COUTINHO, C.F.B.; TANIMOTO, S.T.; GARBELLINI, G.S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R.B.; MAZO, J.H.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: Mecanismo de Ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Rev Ecotox. Meio Ambiente*. 15: 65-72, 2005.
- DELLA LÚCIA, T.M.C. Leaf-cutting ant control in Brazil: state of the art. *Mirmecologia Tropical. Anais do IV Internacional Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia*. Ilhéus, Bahia, p. 147-151, 1997.
- FARJI-BRENNER, A.G.F.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhibiting Argentina: patters in species richness and geographical range sizes. *J. Biogeography*, 21: 391-399, 1994.
- FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; PEGLER, D.N. Leaf-cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. *Mycologist*. 8: 128-132, 1994.
- GIMENES, L. Estudo Fitoquímico de *Annona sylvatica* (ANNONACEAE). Avaliação das atividades inseticida e fungicidas frente as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote e ao gorgulho do milho. 122 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, São Carlos, 2013.
- GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, A.M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCI JR, M.; DA SILVA,

- M.F.G.F.; VIEIRA, P.C. AND FERNANDES, J.B. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *J. Braz. Chem. Soc.*, 16: 669-672. 2005.
- GUERREIRO, G. Estudo Fitoquímico de *Pilocarpus riedelianus* e sua ação sobre diferentes microorganismos. UFSCar, 2001. 117 p. Mestrado.
- JUSTI-JUNIOR, J.; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.L.; CAMPOS-FARINHA, A.E. C. & ZORZENON, F.J. Formigas Cortadeiras. *Bol. Técn. Inst. Biol.*, 4: 5-31, 1996.
- LOECK, A.E.; NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigatta* (Smith, 1858) (Hymenoptera – Formicidae). *O Solo*: 76: 25-30, 1984.
- MARICONI, F.A.M. *As Saúvas*. São Paulo, Agronômica Ceres, 1970. p. 167.
- MARTINS, A.P. Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. Dissertação de mestrado, 86 p. São Paulo, 2009. Disponível em www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde.../Ana_Paula_Martins.pdf.
- MARTIN, M.M.; BOYD, M. J.; GIESELMANN, M. J.; SILVER, R.G. Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *J. Insect Phys.* 21: 1887-1892, 1975.
- MOHAMED, F.; SENARATHNA, L.; PERCY, A.; ABEYEWADENE, M.; EAGLESHAM, G.; CHENG, R., AZHER, S.; HITTARAGE, A.; DISSABAYAKE, W.; SHERIFF, A.H.R.; DAVIES, W.; BUCKLEY, N.; EDDLESTON, A. Acute human self-poisoning with the N-phenylpyrazole insecticide fipronil-a GABA_A-gates chloride channel blocker. *J. Toxic. Clin. Toxic.* 42: 955-963, 2004.
- OHTSUBO, T.; TSUDA, S.; TSUJI, K. A study of the physical strength of fenitrothion microcapsules. *Polymer*, 32: 2395-2399, 1991.
- RODIONOVA, N.A.; BEZBORODOV, A.M. Localization of enzyme systems that degrade cell wall polysaccharides in higher plants: pectinases (Review). *Appl. Biochem. Microb.* 33: 415-432, 1997.
- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. "Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications". *Adv. App. Microb.* 39: 213-294, 1993.
- SINGER, R. *The agaricales in modern taxonomy*, 4^a ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986, p. 477.
- SIQUEIRA, C.G.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.F.A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4820-4822, 1998.
- SILVA, A. *Participação do fungo Leucocoprinus gongylophorus na Produção de Enzimas Intestinais da Formiga Atta sexdens*. Rio Claro, Instituto de Biociências – UNESP, 1999. Dissertação de Mestrado. 104 p.

- SILVA, A.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *J. Insect Phys.*, 49: 307-313, 2003.
- STRADLING, D.J. & POWELL, R.J. Fungiculture and the choice of substrates by Attine ants. IN: *Biology and Evolution of Social Insects*. BILLEN, J. (Eds), Leuven (Belgium), Leuven University Press, p. 133-143. 1992.
- THARKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin – a Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*. 37: 47-73, 1997.
- WIGGLESWORTH, V.B. In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (ed. G.A. Kerkut and L.I. Gilbert), Vol.7, pp. 1-24. Pergamon Press, Oxford. 1985.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO FITOQUÍMICO
BIOMONITORADO DE *Duguetia*
lanceolata

Capítulo 2 - Estudo Fitoquímico Biomonitorado de *Duguetia lanceolata*

2. 1 Ordem, Família, Gênero e Espécie

2.1.1. Ordem Magnoliales

A ordem Magnoliales é composta pelas famílias: Winteraceae, Degeneriaceae, Himantandraceae, Eupomatiaceae, Austrobaileyaceae, Magnoliaceae, Lactoridaceae, Annonaceae, Myristicaceae e Canellaceae (CRONQUIST, 1981, 1988).

O interesse no estudo de espécies desta ordem deve-se à presença de classes de metabólitos como derivados de fenóis, glicosídeos e flavonas (apigenina, escutellareina, hispidulina e luteolina) ou flavonoides (SANTOS e SALATINO, 2000).

2.1.2. Família Annonaceae

A família Annonaceae compreende uma classe de substâncias aproximadamente com 120 gêneros e 2000 espécies (SANTOS e SALATINO, 2000). A família é composta de árvores, arbustos e trepadeiras lenhosas encontradas principalmente nos trópicos, embora algumas espécies encontrem-se nas regiões temperadas (Encyclopaedia Britannica, 2010).

As espécies de Annonaceae estão distribuídas principalmente pelas regiões tropicais do globo terrestre. Dos gêneros que compõem esta família, 34 podem ser encontrados na América do Sul, onde predominam os gêneros *Annona* L, *Duguetia* St. Hil., *Gutteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil e *Xylopi*a L. No Brasil, ocorrem cerca de 29 gêneros, incluindo *Duguetia* com 50 espécies (FECHINE *et al.*, 2002).

Estudos anteriores mostram a presença de diversos derivados de fenóis, glicosídeos e flavonas (apigenina, escutellareina, hispidulina e luteolina) ou flavonoides (canferol, rhamnocitrin, quercetina, isoramnetina e ramnetinas (SANTOS e SALATINO, 2000).

Outros produtos naturais obtidos de plantas desta família são as chamadas acetogeninas (FIGURA 2.1). Essa classe de compostos é derivada de ácidos graxos de cadeia longa (LIMA *et al.*, 2010).

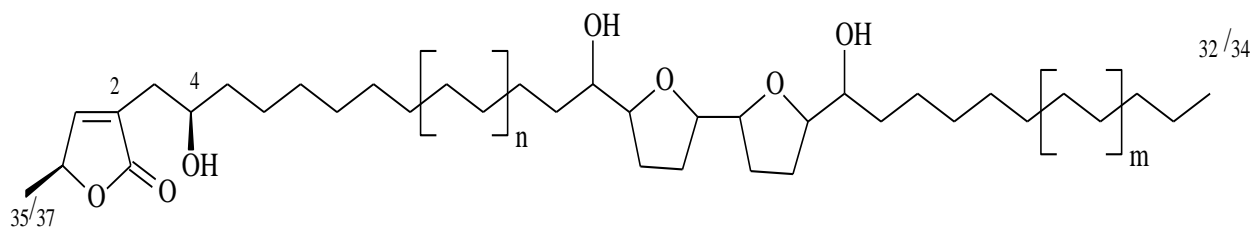


FIGURA 2.1- Estrutura geral das acetogeninas.

As acetogeninas possuem uma ampla gama de propriedades biológicas, tais como citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana (BERMEJO *et al.*, 2005).

Outro destaque na família Annonaceae são as ocorrências de alcaloides (CAVÉ *et al.*, 1985). Os alcaloides são metabolitos secundários encontrados principalmente em plantas e microorganismos. São compostos nitrogenados derivados biossinteticamente de aminoácidos, cuja classificação é feita de acordo com a natureza da estrutura contendo nitrogênio (pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol, etc). (DEWICK, 2009).

Podem ser classificados como verdadeiros ou protoalcaloides. A classificação de alcaloides verdadeiros se dá para as estruturas nas quais há anel heterocíclico, com um átomo de nitrogênio, já nos protoalcaloides, o átomo de nitrogênio não está presente no anel heterocíclico,

Dentre a diversidade de alcaloides, a família Annonaceae se destaca pela ocorrência de alcaloides do tipo isoquinolínico: alcaloides isoquinolínicos simples; benziltetraisoquinolínicos; bisbenziloquinolínicos e bisbenziltetraisoquinolínicos; protoberberínicos e tetrahidroprotoberberínicos; e aporfinoídeos (RABELO, 2014).

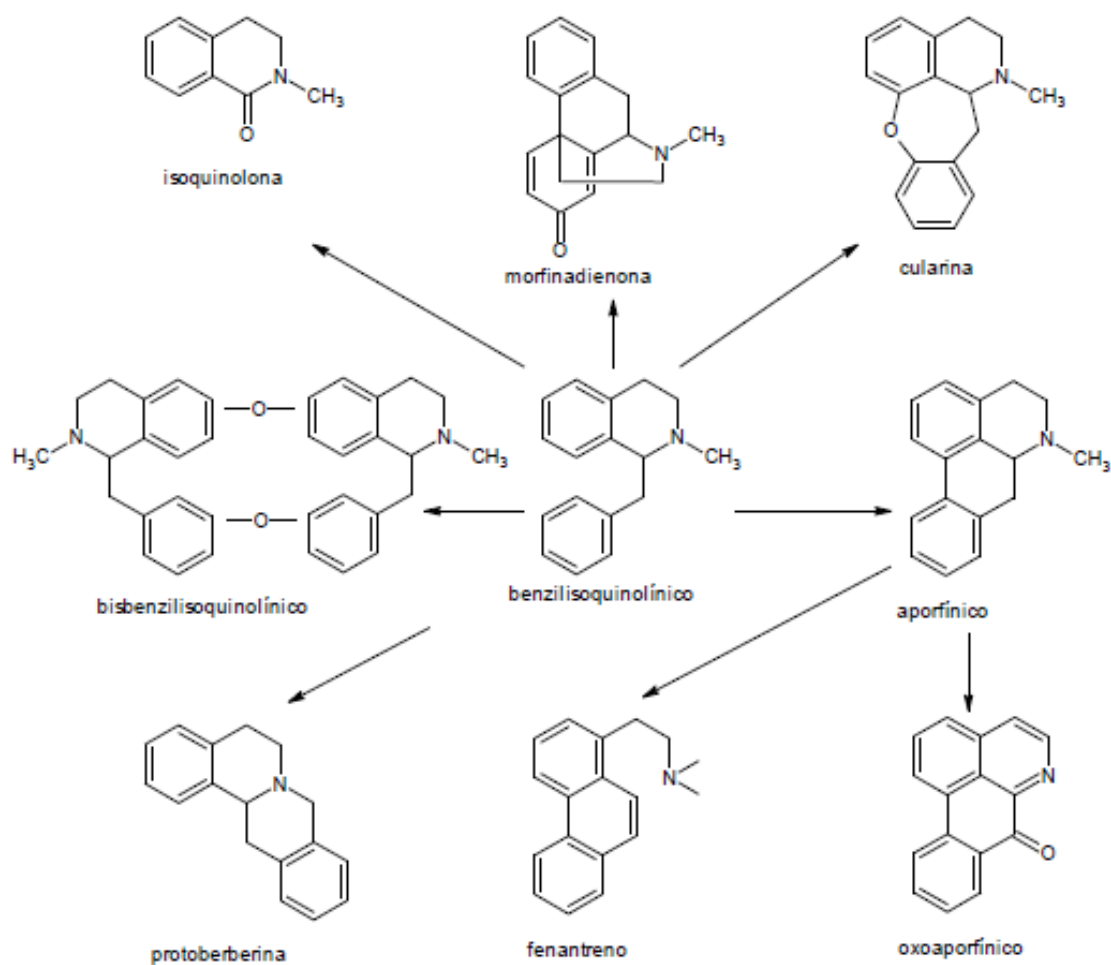


FIGURA 2.2 - Alcaloides isoquinolínicos encontrados na família Annonaceae. Fonte: RABELO, 2014.

2.1.3. Espécie *Duguetia lanceolata*

Poucos estudos foram realizados com a espécie *Duguetia lanceolata* (FIGURA 2.3). Contudo, constituintes de óleos essenciais de plantas do gênero *Duguetia* são citados na literatura (SOUSA *et al.*, 2004).



FIGURA 2.3 - Folhas e frutos de *Duguetia lanceolata* Fonte : <http://www.esalq.usp.br/trilhas/fruti/fr03.php> . Acessado em 22-01-2016 às 19hs43 min.

Estudos realizados com o extrato etanólico de *Duguetia trunciflora* relataram o isolamento de 6 alcaloides das folhas e galhos finos.

Esta espécie mostra-se de grande importância quimiotaxonômica, devido ao grande número de alcaloides isolados de espécies do mesmo gênero estudadas anteriormente. Um levantamento sobre o gênero *Duguetia*, feito no Banco de Dados NAPRALERT, Chemical Abstract e Biological Abstracts, mostrou que nas oito espécies descritas na literatura, todas de ocorrência sul-americana, foram isoladas um total de 79 substâncias, das quais 72 são alcaloides (FECHINE *et al.*, 2002).

Dos extratos etanólicos das folhas de *Duguetia flagellaris* foram isolados 10 alcaloides aporfínicos (FIGURA 2.4), sendo cinco aporfínicos *strictu sensu*: nornuciferina (1), isopilina (2), O-metilisopilina (3), calicinina (4), duguevanina (5) e cinco do tipo 7-hidroxi aporfínicos: pachipodantina (6), oliverolina (7), oliverolina β -N-óxido (8), oliveridina (9) e duguetina (10) (NAVARRO *et al.*, 2001).

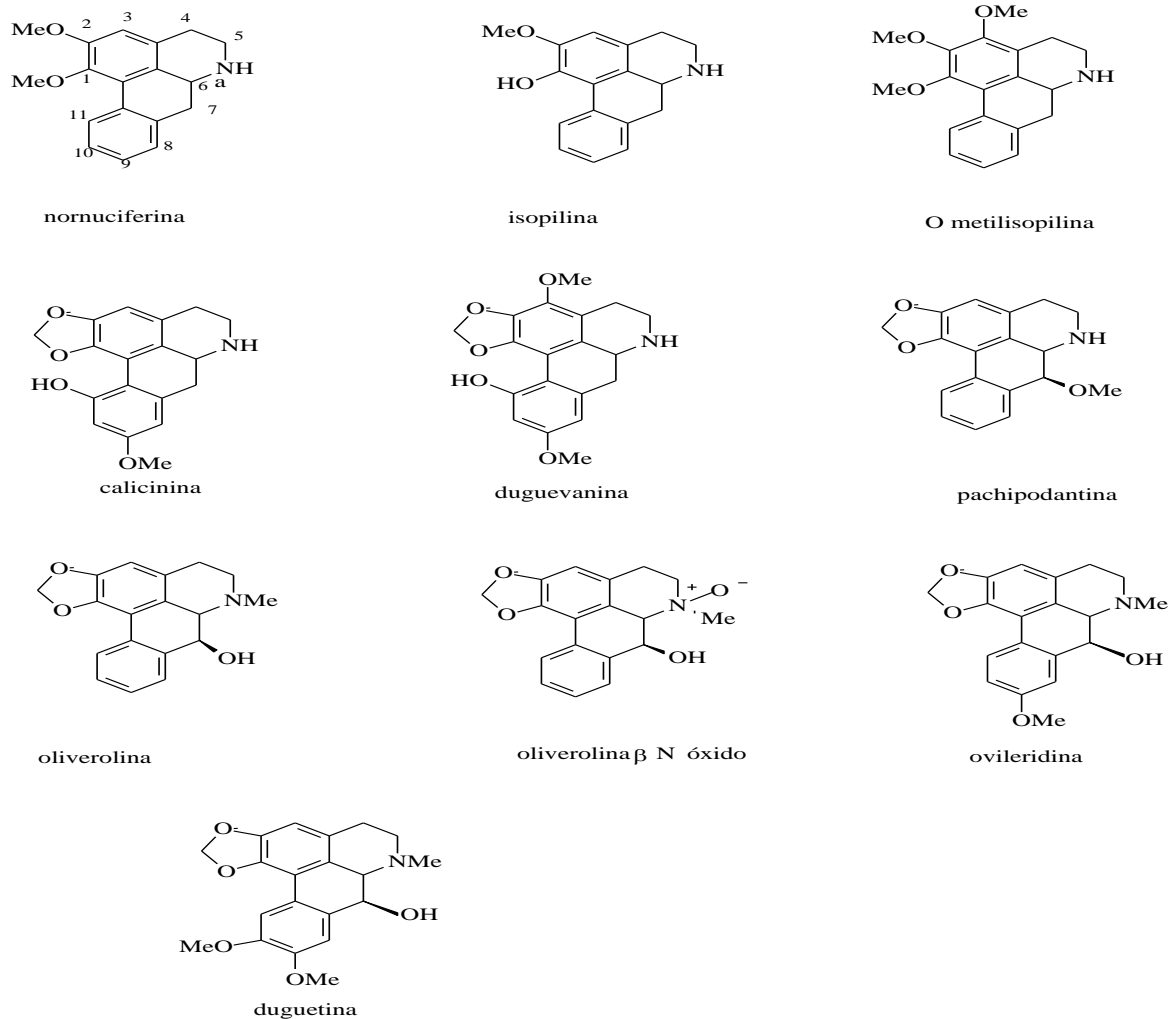


FIGURA 2.4 - Alcaloides de *Duguetia flagellaris*.

A presença desta classe de metabólitos secundários no gênero *Duguetia*, desperta o interesse no estudo fitoquímico de *Duguetia lanceolata* visando a busca de compostos ativos para o controle de insetos pragas.

2.2 Objetivo

Avaliar atividades potenciais de inseticidas e/ou fungicidas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às operárias da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* e ao gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*.

2.3 Procedimentos experimentais

2.3.1 Preparo do material vegetal e extratos de *Duguetia lanceolata*

As folhas, ramos, sementes e casca dos frutos de *Duguetia lanceolata* foram coletadas no Campus da ESALQ na cidade de Piracicaba-SP no dia 25/03/2011 e posteriormente seca sem estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 72 horas e pulverizadas em um moinho tipo Willey.

Em seguida os pulverizados foram submetidos a três extrações consecutivas com etanol, à temperatura ambiente, na proporção (5:1 v/m), com intervalo de três dias entre cada extração, em repouso. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (FIGURA 2.5).

Foram obtidos os extratos apresentados na TABELA 2.1 com suas respectivas massas e rendimentos. O extrato com maior rendimento foi o das folhas.

TABELA 2.1 - Extratos obtidos com seus respectivos códigos e massas

Extrato de <i>Duguetia lanceolata</i>	Material Vegetal (g)	Código	Massa (g)	Rendimento (%)
Ramos (Etanol)	752,0	DLER	47,41	6,25
Folhas (Etanol)	1214,0	DLEF	203,7	16,78
Sementes (Etanol)	598,0	DLES	59,55	9,96
Casca dos frutos (Etanol)	676,0	DLE Caf	24,30	3,59%

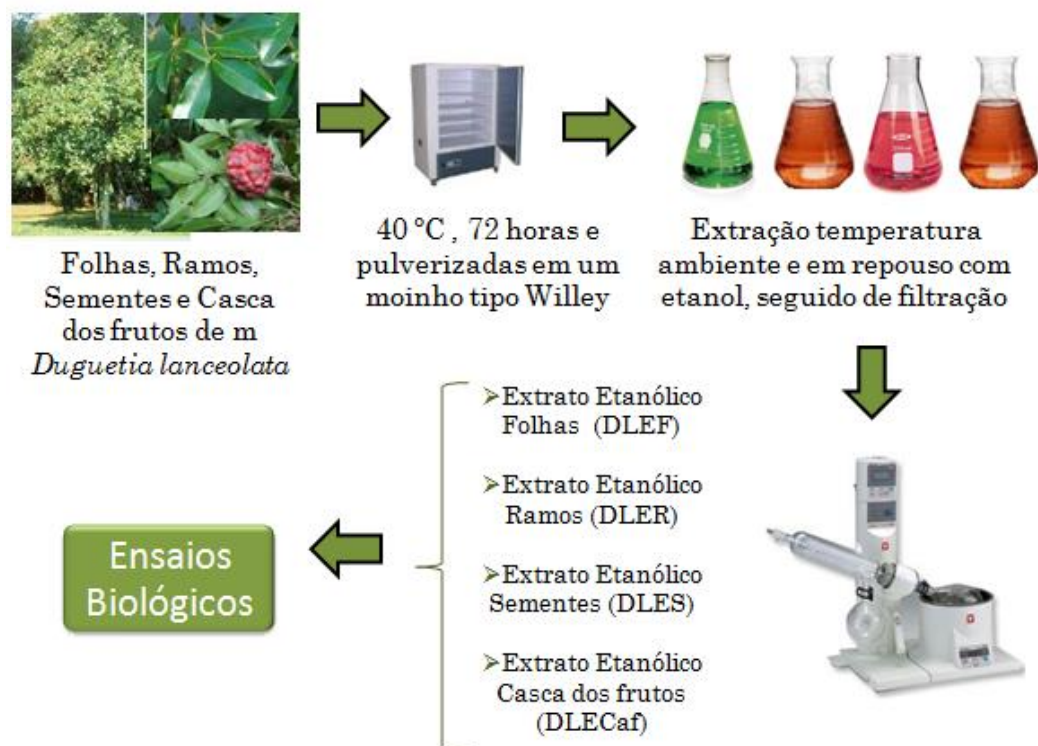


FIGURA 2.5 - Preparo dos extratos de *Duguetia lanceolata*.

Os extratos foram submetidos à ensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operarias de *Atta sexdens rubropilosa*, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP- Rio Claro-SP, descrito no item 2.3.5 deste capítulo e ensaio de inibição de *L. gongylophorus in vitro* pelo método de Incorporação realizado na Universidade Federal de São Carlos, descrito no item 2.3.6 deste capítulo.

2.3.2 Fracionamento dos extratos de *D. lanceolata*

Os extratos DLER, DLEF, DLECaF e DLES foram submetidos a uma extração líquido-líquido utilizando como fase hidroalcolica MeOH: H₂O (1:3). Em um funil de separação adicionou-se o extrato solubilizado em 100 mL de metanol e 300 mL de água.

Em seguida as extrações foram feitas com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila) conforme descrito no fluxograma da FIGURA 2.6, sendo: (1) extração com hexano três vezes de 200 mL; (2) extração

com diclorometano três vezes de 200 mL; (3) extração com acetato de etila três vezes de 200 mL; (4) fração hidroalcoólica (metanol/água).

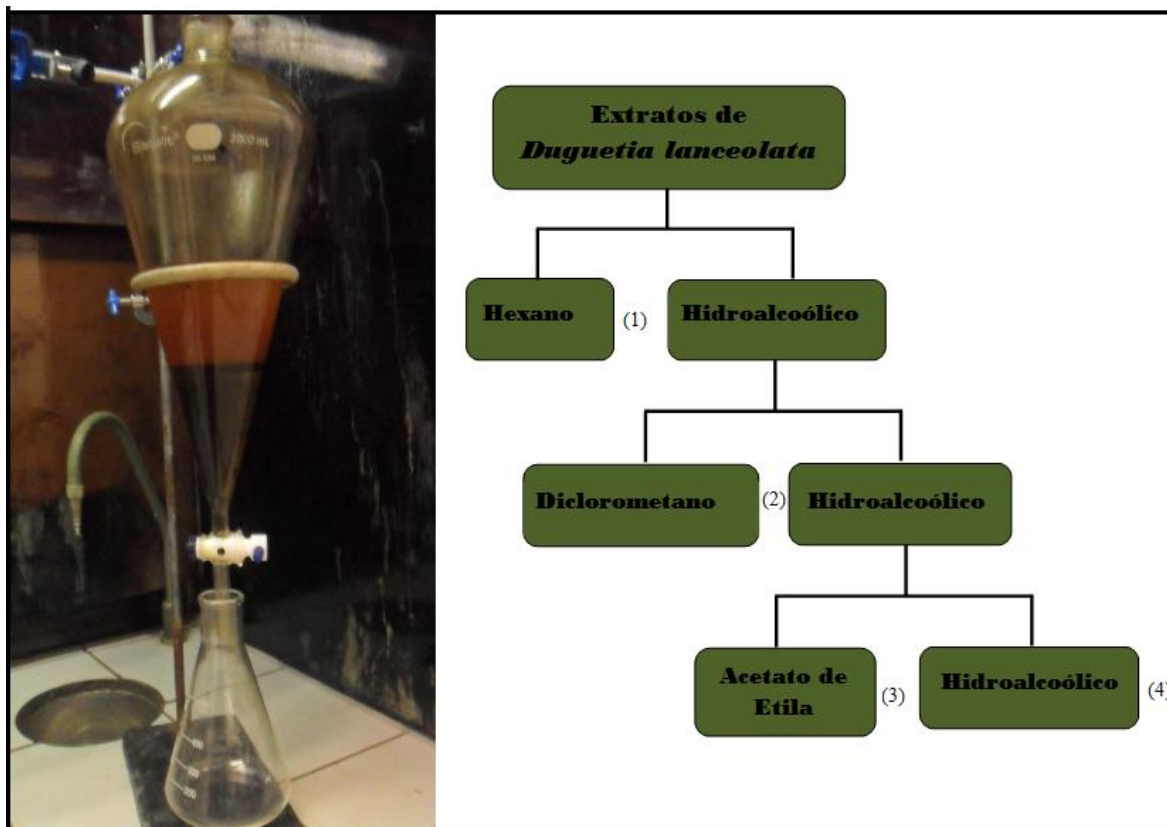


FIGURA 2.6 - Procedimentos gerais de Partição líquido-líquido do extrato etanólico dos ramos de *D. lanceolata*. (1) -Fração de Hexano, (2) -Fração de Diclorometano, (3) - Fração de Acetato de etila e (4) -Fração Hidroalcoólica.

Ao final de cada extração, as frações obtidas foram concentradas em evaporadores rotativos. A TABELA 2.2 apresenta as frações dos extratos obtidos na extração líquido-líquido, com suas respectivas massas.

TABELA 2.2 - Frações dos extratos de *D. lanceolata* após a partição líquido-líquido

Extrato	Partições	Massa (g)
RAMOS	DLER-Hexano	7,51
	DLER-Diclorometano	6,51
	DLER-Acetato de etila	5,87
	DLER-Hidroalcoolica	22,87
FOLHAS*	DLEF-Hexano	17,35
	DLEF-Diclorometano	7,39
	DLEF-Acetato de etila	7,85
	DLEF-Hidroalcoolica	36,21
SEMENTES	DLES-Hexano	38,95
	DLES-Diclorometano	2,19
	DLES-Acetato de etila	2,59
	DLES-Hidroalcoolica	6,49
CASCA DOS FRUTOS	DLECaf-Hexano	2,83
	DLECaf-Diclorometano	0,43
	DLECaf-Acetato de etila	0,55
	DLECaf-Hidroalcoolica	18,91

*a partição das folhas não foi realizada com todo o extrato, apenas com 83,1647 g.

Após a obtenção das frações, estas foram submetidas à análise via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e posteriormente submetidos à ensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operarias de *Atta sexdens rubropilosa*, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP-Rio Claro-SP, descrito no item 2.3.5 deste capítulo e ensaio de inibição de *L. gongylophorus in vitro* pelo método de Incorporação realizado na Universidade Federal de São Carlos, descrito no item 2.3.6 deste capítulo.

2.3.3 Estudo Fitoquímico do extrato bruto de *D. lanceolata*

2.3.3.1 Estudo do extrato hexânico das folhas de *D. lanceolata* (DLEF-hex) por coluna cromatográfica, sob vácuo.

O extrato hexânico das folhas de *D. lanceolata* (DLEF-hex 11,23 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica (70-230 mesh), sob vácuo, utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e metanol água (1:1). Foram obtidas 10 frações as quais foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em 7 frações: Fdl-1 (hexano), Fdl-2, Fdl-3 e Fdl-4 (diclorometano), Fdl-5 (acetato de etila) Fdl-6 (metanol) e Fdl-7 (metanol) (Condição 1). As condições estão detalhadas no fluxograma da FIGURA 2.7. Estas frações foram enviadas para ensaio por ingestão nas formigas cortadeiras (*A. sexdens rubropilosa*) e para o gorgulho do milho *S. zeamais*.

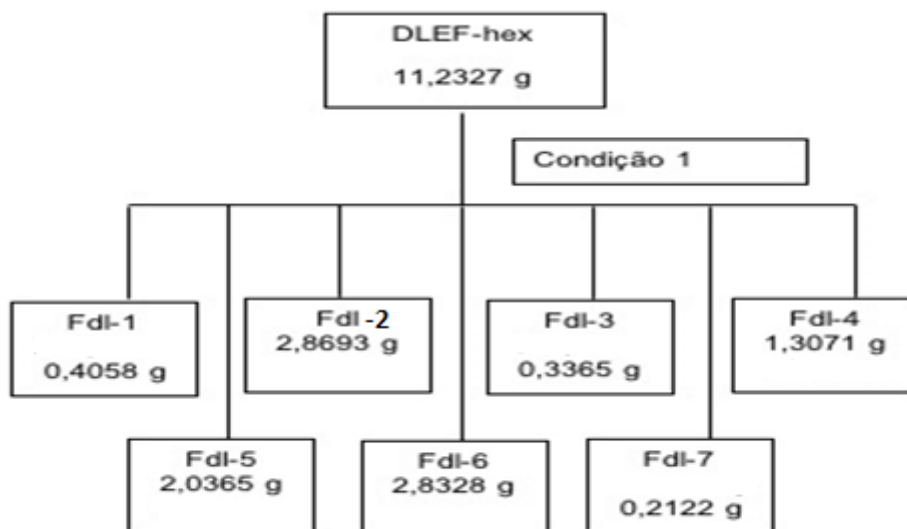


FIGURA 2.7 - Condição 1: Coluna de vidro ($\phi \times h = 5,5 \text{ cm} \times 22 \text{ cm}$); Fase estacionária: Sílica (70-230 mesh); Modo de eluição: gradiente; Solventes: Hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol.

2.3.3.2 Estudo da Fração Fdl-2

A subfração Fdl-2 foi submetida a uma coluna cromatográfica de sílica (230-400 mesh) utilizando-se modo de eluição gradiente, com solventes em ordem

crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol (Condição 2). Foram coletadas 54 frações, as quais, foram comparadas via e CCDC e RMN ¹H, onde o agrupamento foi realizado avaliando a sobreposição dos sinais semelhantes. Foram reagrupadas em 18 frações apresentadas no fluxograma da FIGURA 2.8.

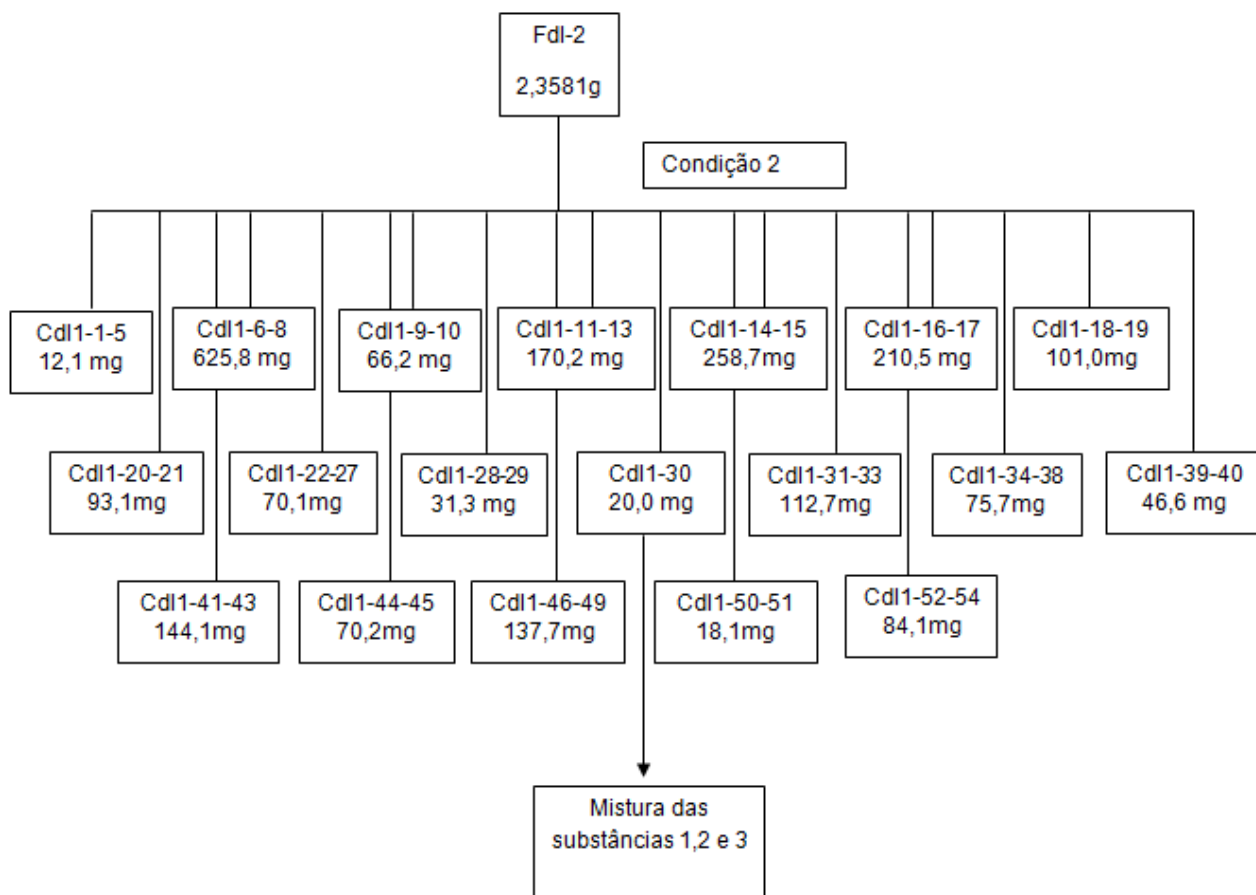


FIGURA 2.8 - Condição 2: coluna de vidro ($\phi \times h = 3,5 \text{ cm} \times 35 \text{ cm}$); fase estacionária: Silica (230-400 mesh); Modo de eluição: gradiente; Solventes: Hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol.

2.3.3.3 Estudo da Fração Cdl1-14-15

A subfração Cdl1-14-15 (massa = 258,7 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20, como fase estacionária e metanol:diclorometano (1:1 v/v) como fase móvel (Condição 3). Foram coletadas 18 frações, as quais, foram comparadas via e CCDC e RMN ¹H, onde o agrupamento foi realizado avaliando a sobreposição dos sinais semelhantes. O reagrupamento gerou 7 novas frações e o isolamento da substância 4, conforme apresentado no fluxograma da FIGURA 2.9.

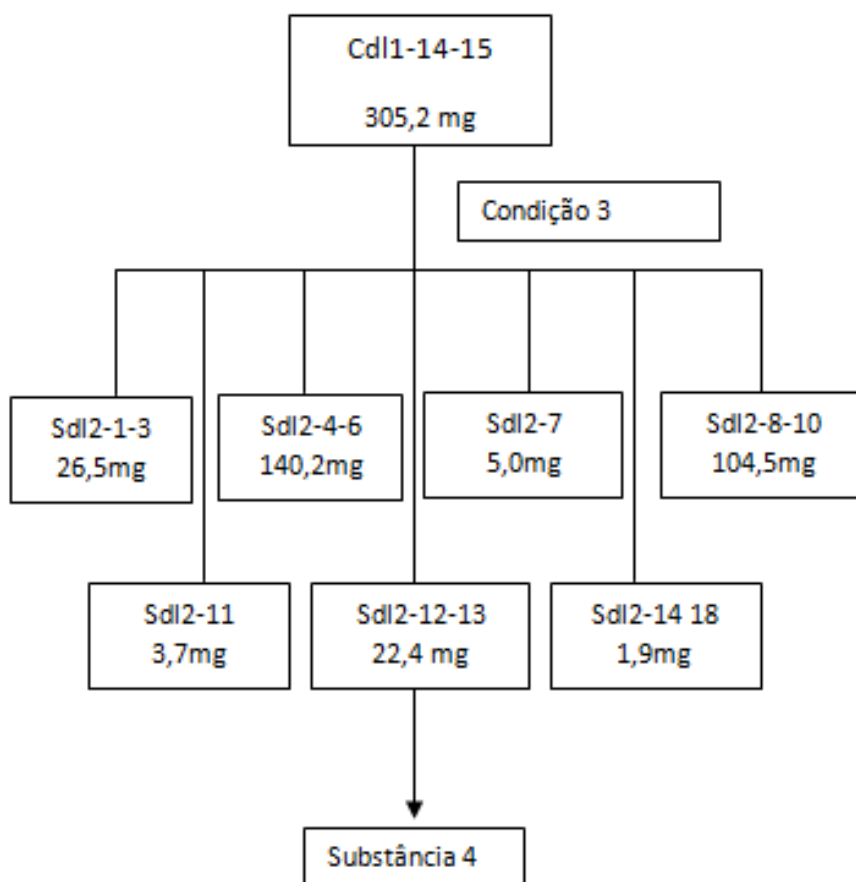


FIGURA 2.9 - Condição 3: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol:diclorometano (1:1 v/v).

2.3.3.4 Estudo da Fração Cdl1-44-45

A subfração Cdl1-44-45 (70,2 mg) foi submetida a cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol: diclorometano (1:1 v/v) como fase móvel (Condição 3). Foram coletadas 16 frações, as quais, foram analisadas via RMN ^1H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em 5 novas frações, dentre elas a substância 5 conforme apresentado no fluxograma da FIGURA 2.10.

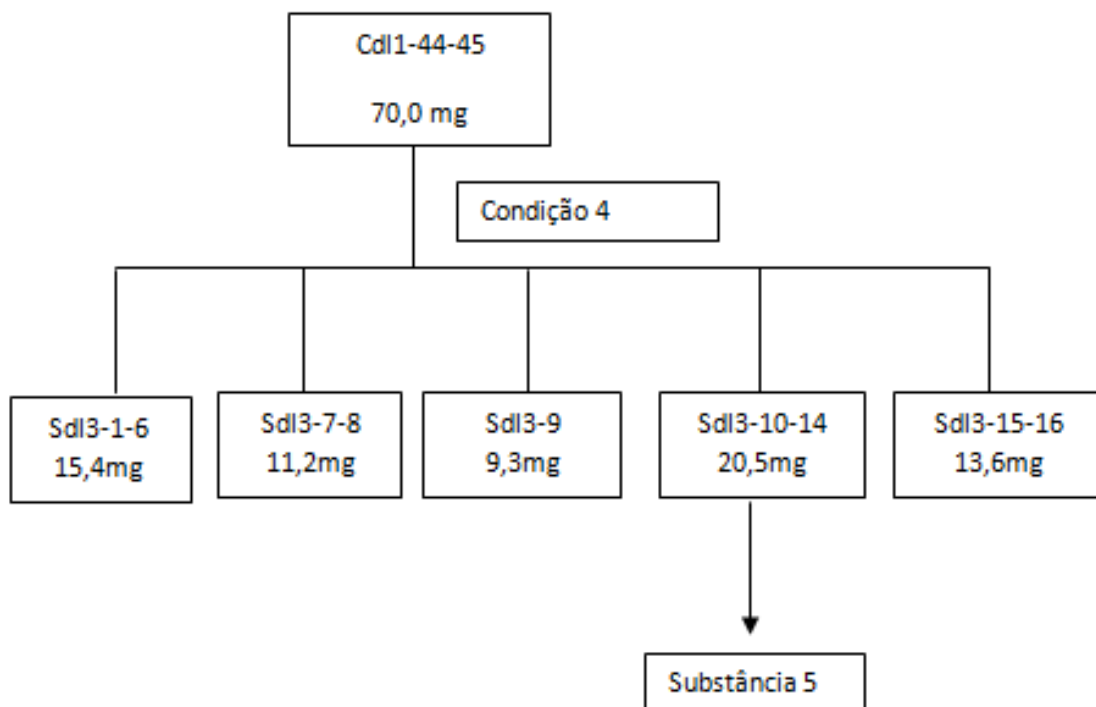


FIGURA 2.10 - Condição 4: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \text{ cm} \times 56 \text{ cm}$); fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol: diclorometano (1:1 v/v).

2.3.3.5 Estudo da Fração Fdl-7

A subfração Fdl7 foi submetida a cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel (condição 5). Foram coletadas 36 frações, as quais, foram analisadas via RMN ^1H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise foram reunidas em 10 novas frações, conforme apresentado no fluxograma da FIGURA 2.11.

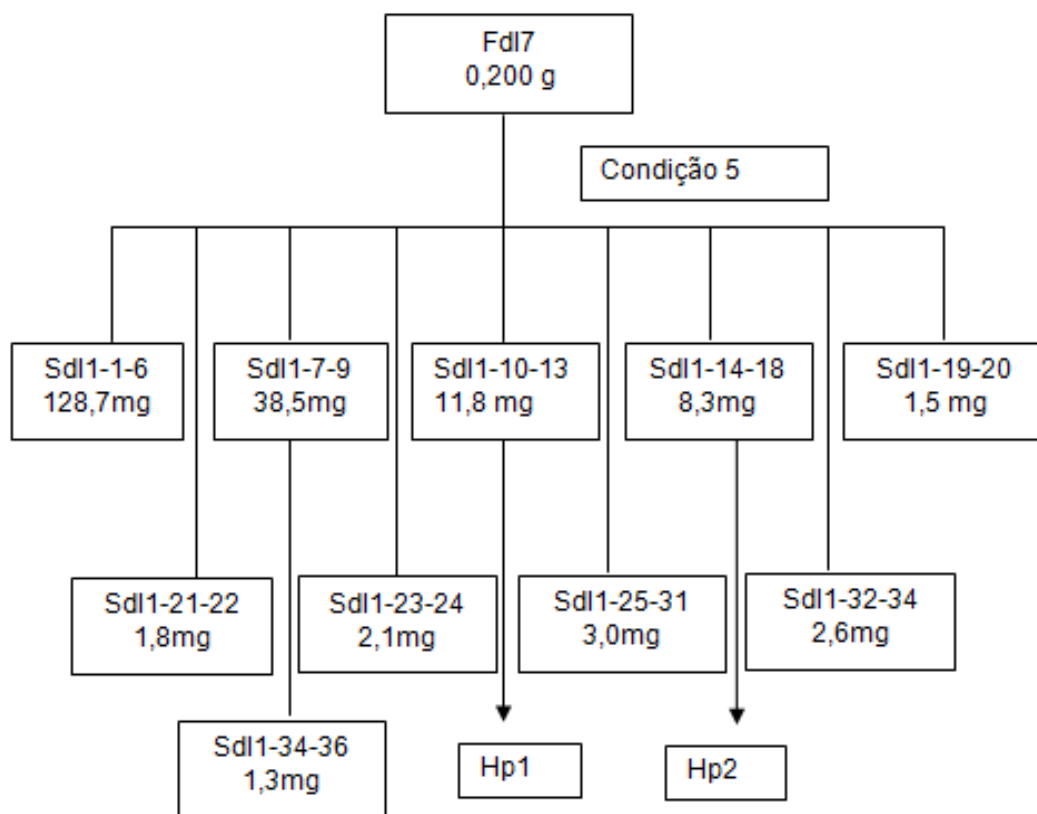


FIGURA 2.11- Condição 5: Coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); Fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol.

2.3.3.6 Estudo da fração Sdl1-10-13 por CLAE (Hp1)

A fração Sdl1-10-13 (11,8 mg) foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, FIGURA 2.12). Inicialmente foi realizada uma análise no modo gradiente na busca do melhor de solventes a ser utilizado no modo semi-preparativo. Para tal utilizou-se uma coluna C18 (25 x 0,46 cm, 10 μm) no modo reverso de eluição, com vazão de 1 ml/min, volume de injeção de 20 μL e detector UV.

Para reproduzir a análise da CLAE no modo analítico para o preparativo fez-se necessário calcular o fator de escalonamento (S).

O escalonamento de uma separação analítica para uma separação semi-preparativa pode ser calculado, usando por base os volumes das colunas analíticas e preparativas pela equação:

$$S = \frac{(d_p)^2 \times \text{comprimento.coluna.preparativa}}{(d_a)^2 \times \text{comprimento.coluna.analitica}}$$

Onde d_p refere-se ao diâmetro da coluna preparativa e d_a o diâmetro da coluna analítica. O fluxo a ser utilizado na preparativa deve ser igual à multiplicação do fluxo analítico por S.

A partir das condições analíticas pré-estabelecidas e o cálculo do escalonamento, foram realizadas as separações, com coluna semi-preparativa C18 (30 x 0,78 cm, 10 μ m); sistema de solvente: MeOH: H₂O (65:35 v/v); vazão de 5 mL/min, volume de injeção de 200 μ L e detector UV. Foram coletadas 07 frações, as quais foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e reagrupadas conforme fluxograma da FIGURA 2.13.

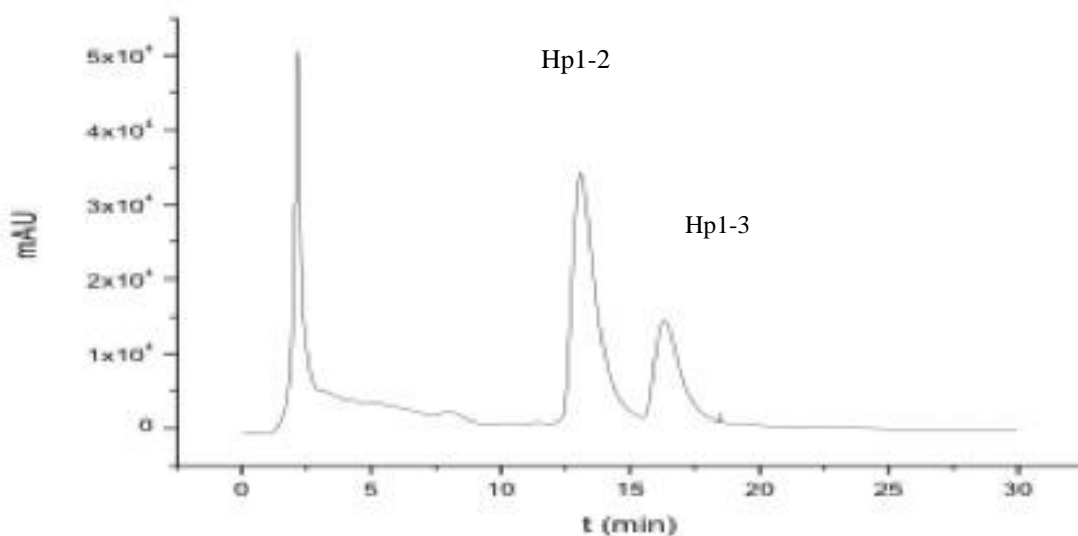


FIGURA 2.12 - Cromatograma da fração Sdl1-10-13 modo analítico. Condições cromatográficas: Coluna Luna C18 (25 x 0,46 cm, 10 μ m), fase móvel MeOH: H₂O (65:35 v/v); vazão de 1,0 mL.min⁻¹ e detector ultravioleta 254 nm.

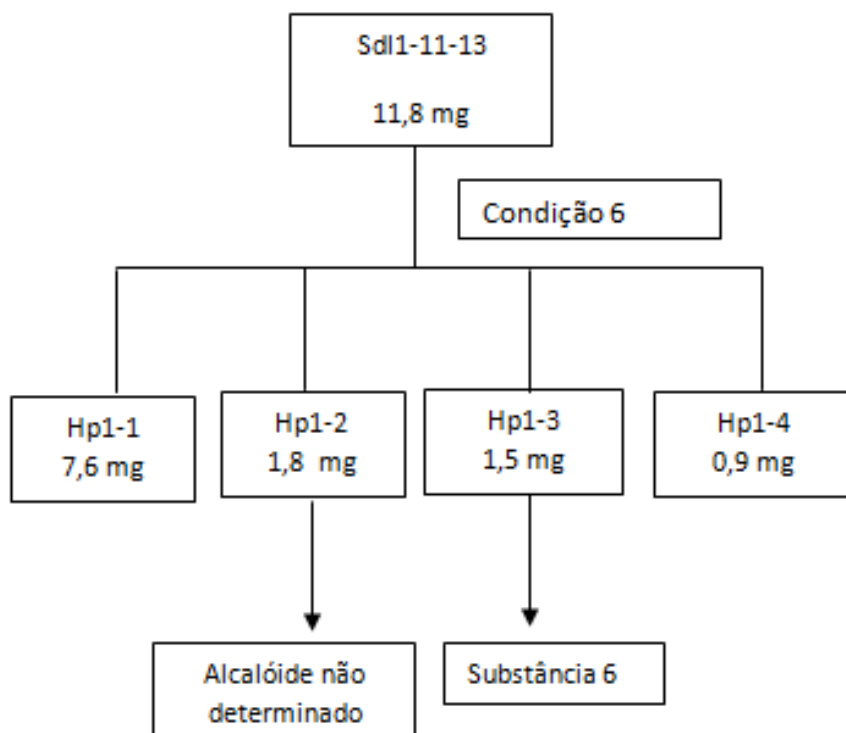


FIGURA 2.13 - Fluxograma do CLAE da fração Sdl1-11-13, Condição 6: Coluna:Luna C18 (25 x 0,46 cm, 10 μ m); fase móvel MeOH:H₂O (65:35 v/v).

Este trabalho levou ao isolamento da substância 6 e um alcaloide não identificados até a presente data.

2.3.3.7 Estudo da Fração Sdl1-14-18 por CLAE (Hp2)

A fração Sdl1-14-18 (8,3 mg) foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Inicialmente foi realizada uma análise no modo gradiente na busca da melhor mistura de solventes a ser utilizado no modo semi-preparativo. Para tal utilizou-se uma coluna C18 (25 x 0,46 cm, 10 μ m) no modo reverso de eluição, com vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L e detector UV, e uma separação analítica para uma separação Fdl-5 (acetato de etila), Fdl-6 (metanol) e Fdl-7 (metanol) as separações, com coluna semi-preparativa C18 (30 x 0,78 cm, 10 μ m); sistema de solvente: ACN: H₂O (45:55 v/v); vazão de 5 mL/min, volume de injeção de 200 μ L e detector UV (de 200 μ L Foram coletadas 9 frações, as quais foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e reagrupadas conforme fluxograma da FIGURA 2.14.

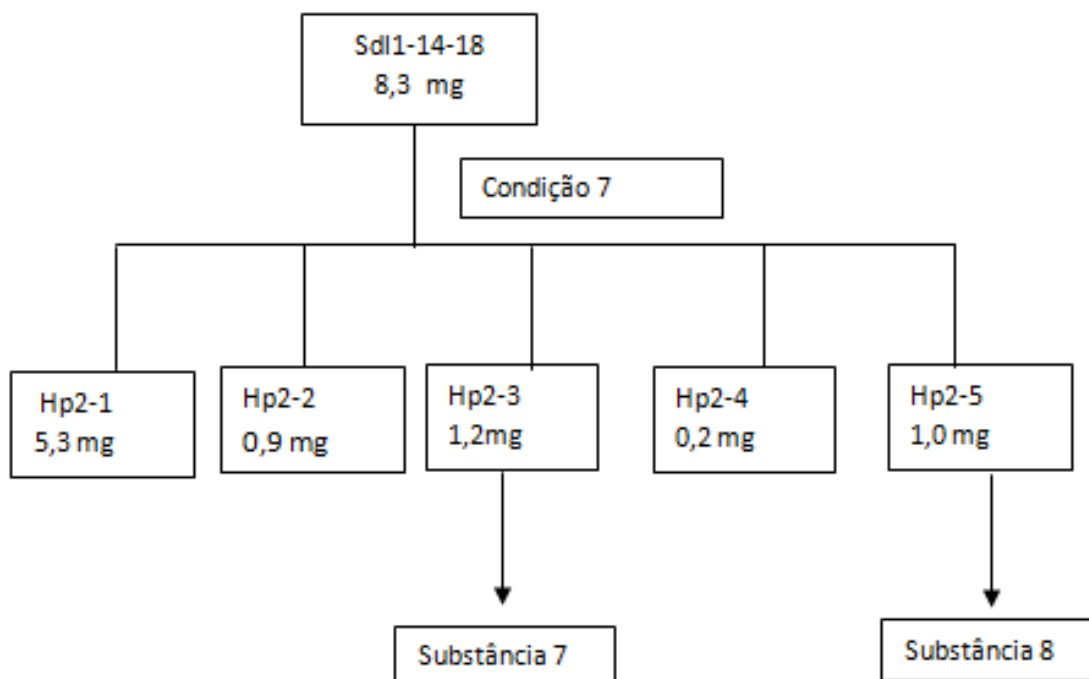


FIGURA 2.14 - Fluxograma da fração Sdl1-14-18 na Condição 7: Coluna C18-Luna (25 x 0,46 cm, 10 μ m); fase móvel ACN:H₂O (45:55 v/v).

Este trabalho levou ao isolamento das substâncias 7 e 8.

2.3.3.8 Estudo da Fração Fdl-5

A subfração Fdl-5 (1,98g) foi submetida a cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20, utilizando metanol como fase móvel (condição 8 da FIGURA 2.14). Foram coletadas 31 frações, as quais foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em 8 novas frações apresentadas na FIGURA 2.15.

Dessas frações, a fração Sdl14:8-12 (178,2 g) foi submetida a fracionamento através da técnica de cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20 como fase estacionária (φ x h = 2,0 cm x 140 cm) e metanol como fase móvel. Deste fracionamento foram obtidas 30 frações que foram analisadas por RMN ¹H e CCDA e reunidas em 8 novas frações.

A subfração SIm17:12-14 (99,7 g) foi submetida a fracionamento com uma coluna de vidro (φ x h = 2,0 cm x 140 cm) utilizando a cromatografia de exclusão com

Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel. Deste fracionamento foram obtidas 21 frações que foram analisadas por RMN ¹H e CCDA e reunidas em 7 novas frações. Dentre elas a Sdl-9-11 que foi submetida a CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

A partir das condições analíticas pré-estabelecidas e o cálculo do escalonamento, foram realizadas as análises, com Coluna Semi Preparativa C18 (30 x 0,78 cm, 10 µm); sistema de solvente: MeOH: H₂O (60:40 v/v); vazão de 5 mL/min, volume de injeção de 200 µl e detector UV (injeção de 200 µL, 30 x 0,78 cm), 10 frações foram obtidas e analisadas por RMN ¹H e CCDA.

Foram coletadas 10 frações, as quais foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e reunidas em 7 novas frações, apresentadas na FIGURA 2.15. Desta fração foram isoladas duas substâncias Hp3-3 (não determinada) e Hp3-6 (substância 12).

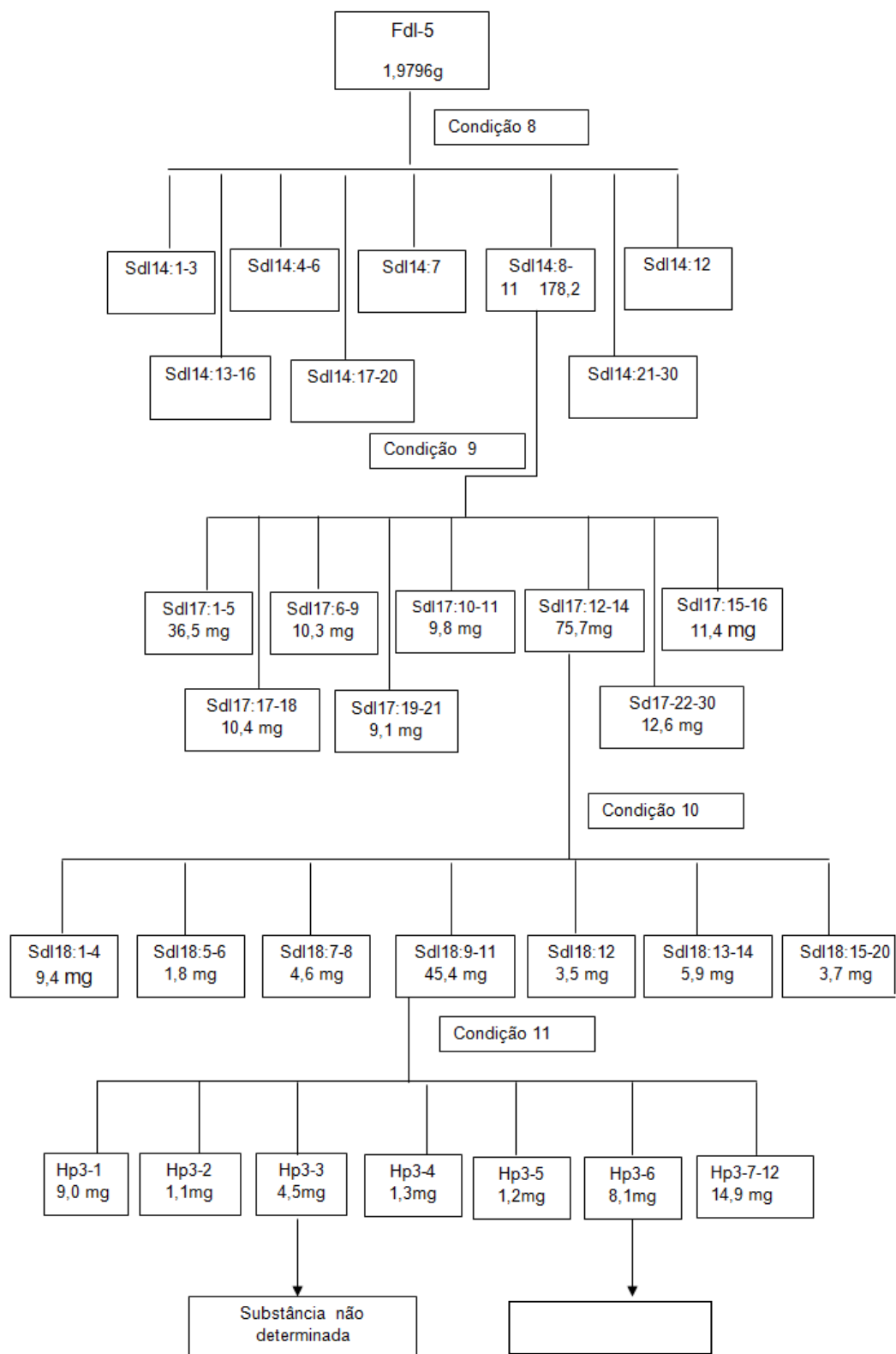


FIGURA 2.15 - Fluxograma - Condição 8: coluna de vidro ($\varphi \times h = 4,0 \times 45$ cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol; Condição 9: Coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \times 140$ cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol; Condição 10: Coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \times 140$ cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol; Condição 11: Coluna-semi-preparativa C18-Luna (30x 0,78 cm, 10 μ m, fase móvel MeOH:H₂O (60:40 v/v).

2.4 Estudo do da partição diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* (DLEF-dicloro)

A partição diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* (DLEF-dicloro) foi inicialmente submetida cromatografia de exclusão, em coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); fase estacionária Sephadex^R LH-20 e fase móvel metanol: diclorometano (1:1 v/v). Este fracionamento levou a obtenção de 30 frações que foram analisadas por CCDA e RMN-¹H e reunidas em 11 novas frações de acordo com suas semelhanças. (FIGURA 2.16).

Dentre as 11 frações, a fração 6 foi fracionada com coluna de vidro ($\varphi \times h = 3,0 \text{ cm} \times 36,5 \text{ cm}$); utilizando como fase estacionária sílica (230-400 mesh) e como fase móvel Hexano: Acetona (2:1 v/v), levando ao isolamento das substâncias 10 e 11. (FIGURA 2.17).

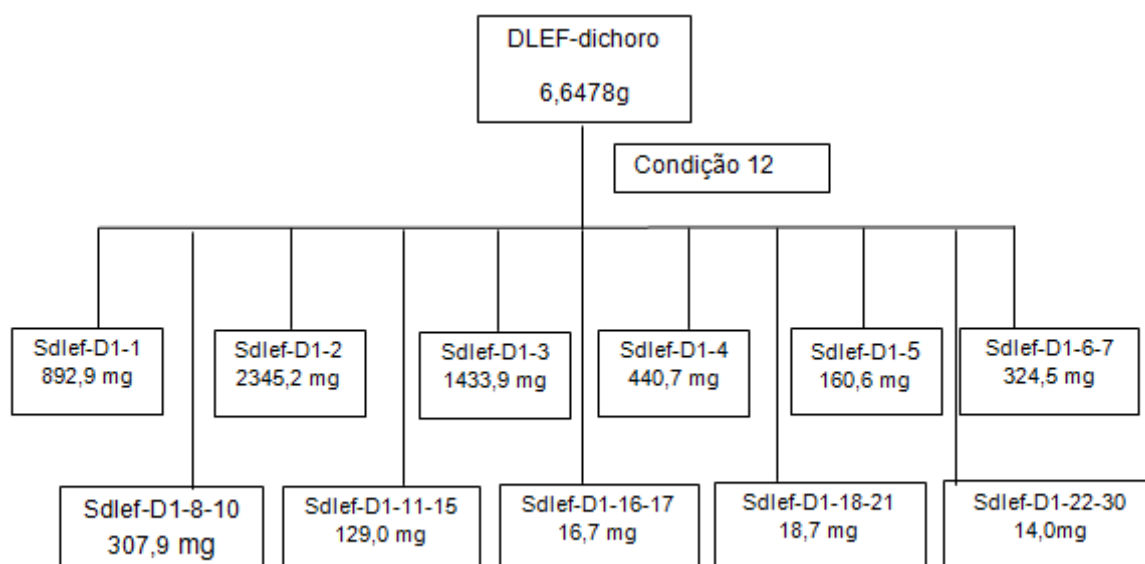


FIGURA 2.16 - Fluxograma da fração diclorometano das folhas de *D. lanceolata*-Condição 12: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); fase estacionária: *Sephadex LH-20*; Solvente: metanol:diclorometano (1:1 v/v).

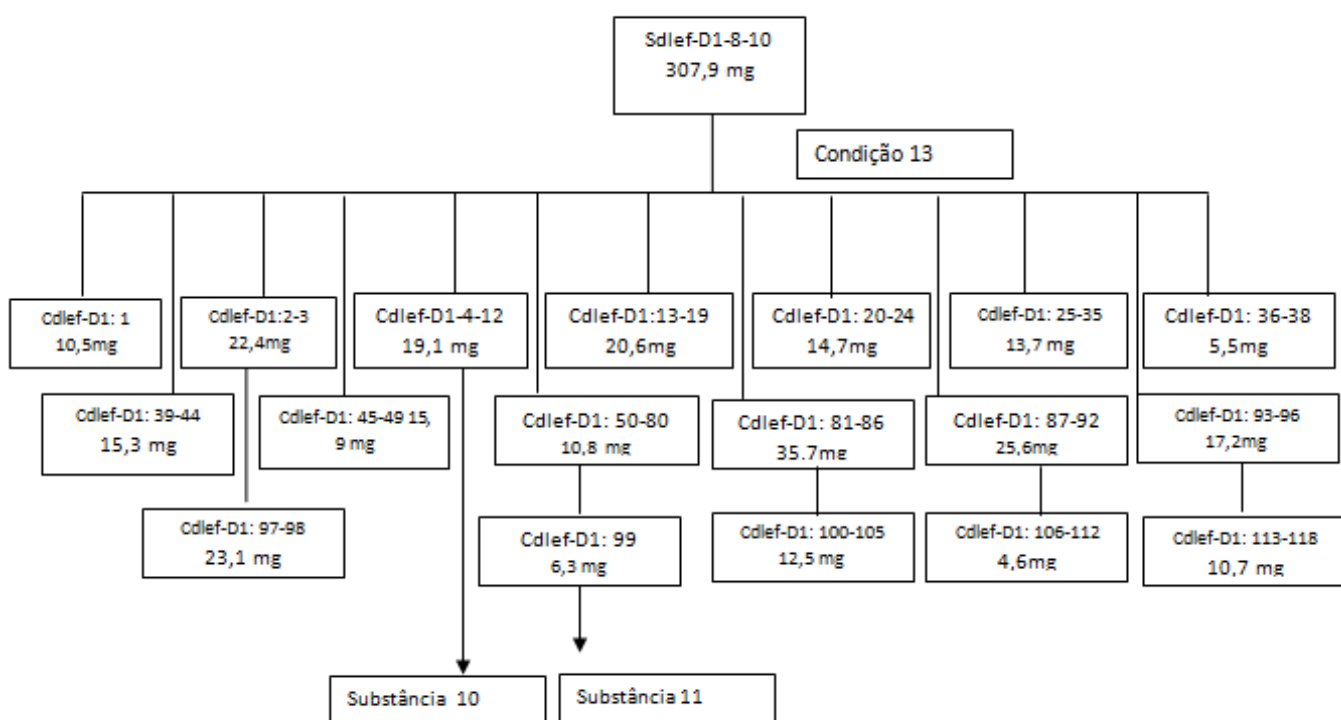


FIGURA 2.17 - Fluxograma 04 - Condição 13: coluna de vidro ($\varphi \times h = 3,0 \text{ cm} \times 36,5 \text{ cm}$); fase estacionária: sílica (230-400 mesh); Modo de eluição: isocrático Solventes: Hexano: Acetona (2:1 v/v).

Este estudo levou ao isolamento das substâncias 10 e 11.

2.5 Estudo da partição hexânica do extrato etanólico da casca dos frutos de *Duguetia lanceolata* (DLECAF-hex)

A partição hexânica do extrato etanólico da casca dos frutos de *D. lanceolata* (DLECAF-hex 2,216 g) foi inicialmente submetida ao fracionamento em coluna de vidro ($\varphi \times h = 3,5 \text{ cm} \times 20,0 \text{ cm}$); fase estacionária sílica (230-400 mesh) e modo de eluição gradiente, hexano:diclorometano (8:2 v/v), aumentando 20% até 100% diclorometano; diclorometano:acetona aumentando 20% até acetona 100% e acetona:metanol (1:1 v/v) e metanol 100%. Este fracionamento levou a obtenção de 83 frações que foram analisadas por CCDA e RMN-¹H e reagrupadas em 30 novas frações de acordo com perfil.

Dentre as 30 frações, a fração 4 (CdICAF-hex1-12-14) foi fracionada com coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \text{ cm} \times 8,0 \text{ cm}$); utilizando como fase estacionária sílica (230-400

mesh) e como fase móvel Diclorometano: acetona (9:0,5 v/v), levando ao isolamento de esteroides (substâncias 1, 2 e 3) encontradas na fração hexânica das folhas.

A fração 20 (CdlCaf-hex-1_52-60) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na busca de melhores condições cromatográficas para purificação da mesma. Diversos experimentos foram realizados e as melhores condições podem ser observadas na TABELA 2.3.

TABELA 2.3 - Métodos analíticos e preparativos utilizados na fração CdlCaf-hex-1_52-60

Método	Coluna		Condições analíticas	Tempo
Gradiente exploratório	C18	Luna	MeOH:H ₂ O 10-90%,	
Analítico	Phenomenex (0,46 x 25 cm)	10 μm	1,0 mL/min, 254 nm	65 min
Isocrático	C18	Luna	MeOH:H ₂ O 60:40,	
Analítico	Phenomenex (0,46 x 25 cm)	10 μm	1,0 mL/min, 254 nm e 365 nm	40 min
Isocrático	C18	Luna	MeOH:H ₂ O 60:40;	
Semi preparativo	Phenomenex (0,78 x 30 cm)	10 μm	5,5 mL/min, 254 nm e 365 nm	40 min

Após escolha do método para semi-preparativo, a amostra CdlCaf-hex-1_52-60 foi analisada por CLAE (Condições: C18 Luna Phenomenex 10 μm (0,46 x 25 cm) eluição isocrática MeOH:H₂O 60:40, fluxo 5,5 mL/min, λ =254 nm e 365 nm). Foram coletadas oito frações descritas na FIGURA 2.18. Este estudo levou dos alcaloides lisicamina e liriodenina.

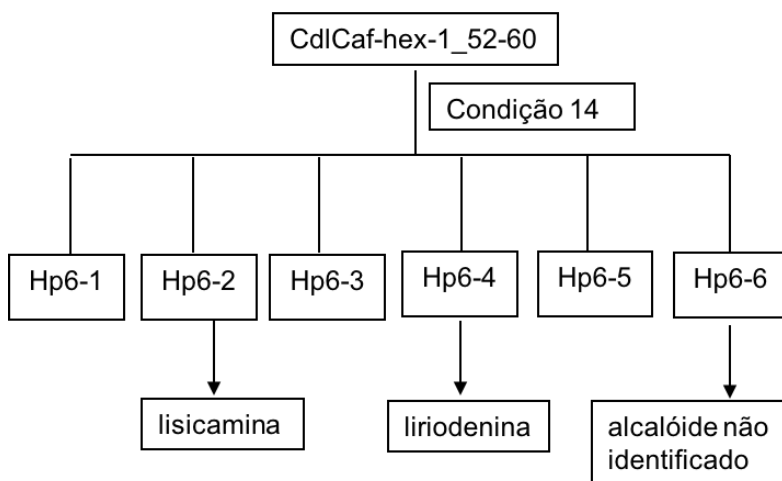


FIGURA 2.18 - Condição 14: C18 Luna Phenomenex^R 10 μ m (0,46 x 25 cm) eluição isocrática semi-preparativa; solvente: MeOH:H₂O 60:40, fluxo 5,5 mL/min, λ =254 nm e 365 nm.

2.6 Estudo da partição diclorometano do extrato etanólico da casca dos frutos de *Duguetia lanceolata* (DLECaf-dicloro)

A partição diclorometano do extrato etanólico (216,5 mg) da casca dos de *Duguetia lanceolata* (DLEF-dicloro) foi inicialmente submetida a cromatografia de exclusão, fracionada em coluna de vidro (φ x h = 2,5 cm x 62 cm); fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel metanol. Este fracionamento levou a obtenção de 20 frações que foram analisadas por CCDA e RMN ¹H reagrupadas em 7 novas frações de acordo com suas semelhanças (FIGURA 2.19).

Dentre as 7 frações, a fração 4 (Sdlef-D1-6) foi fracionada com coluna de vidro (φ x h = 8,0 cm x 1,0 cm); utilizando como fase estacionária sílica (230-400 mesh) e como fase móvel CH₂Cl₂:MeOH (2%), levando ao isolamento da liriodenina.

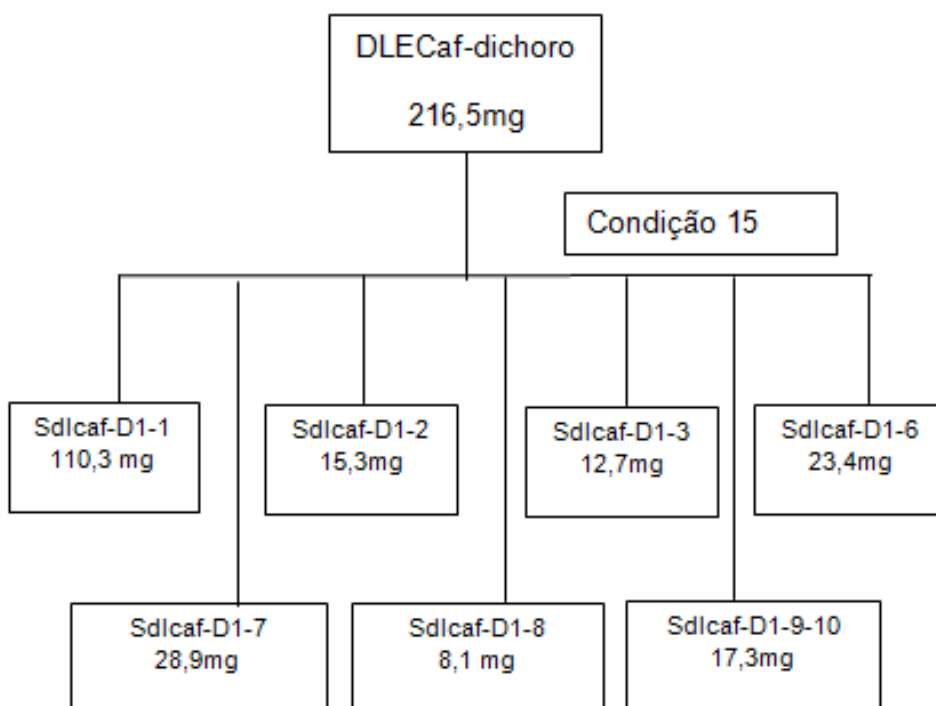


FIGURA 2.19 - Condição 15: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,5 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$); fase estacionária: Sephadex LH-20; Solvente: metanol.

A fração 6 (Sdlcaf-D1-8) foi fracionada com coluna de vidro ($\varphi \times h = 8,0 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm}$); utilizando como fase estacionária sílica (230-400 mesh) e como fase móvel CH_2Cl_2 : MeOH (2%), obtendo-se 10 frações que foram reagrupadas após CCDA e RMN ^1H em 5 novas frações, das quais, encontram-se dois alcaloides, um não identificado e a liriodenina (FIGURA 2.20).

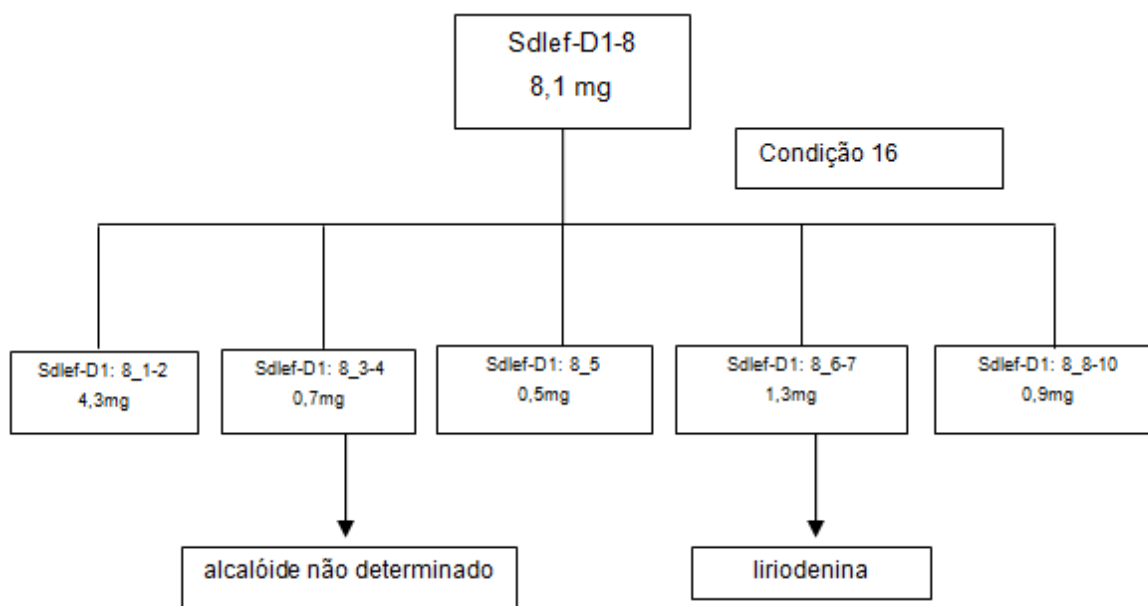


FIGURA 2.20 - Condição 16: coluna de vidro ($\varphi \times h = 8,0 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm}$); fase estacionária: sílica (230-400 mesh); Modo de eluição: isocrático, Solventes: CH_2Cl_2 com 2% de MeOH).

A fração 7 (Sdlef-D1-9-10) foi fracionada com coluna de vidro ($\varphi \times h = 8,0 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm}$); utilizando como fase estacionária sílica (230-400 mesh) e como fase móvel CH_2Cl_2 com 2% de MeOH (FIGURA 2.21) e agrupada em 4 novas frações, das quais, encontram-se a mistura dos alcaloides lanuginosina e oxolaurelina (SdlCaf-1-9-10_3-4).

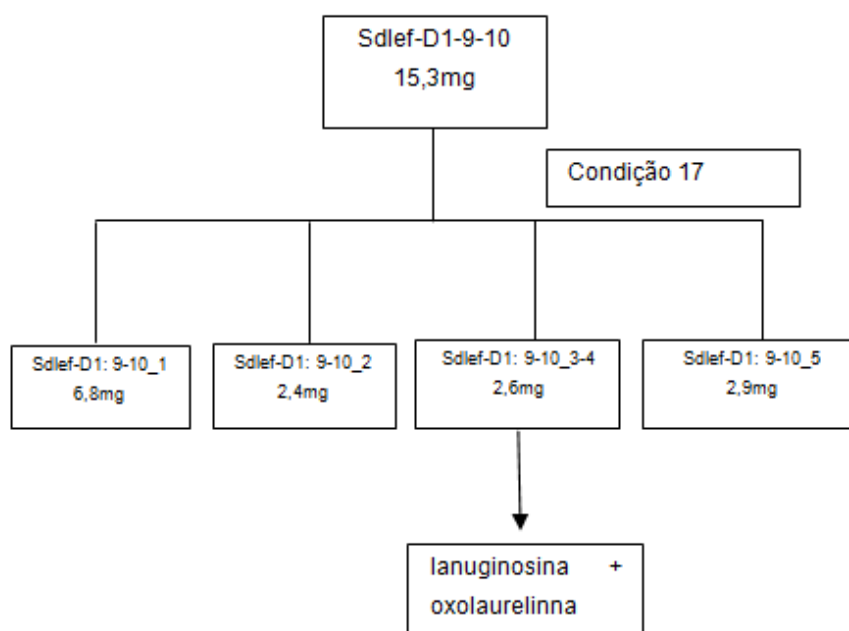


FIGURA 2.21 - Condição 17: coluna de vidro ($\varphi \times h = 8,0 \text{ cm} \times 1,0 \text{ cm}$); fase estacionária: sílica (230-400 mesh); Modo de eluição: *isocrático*-Solventes: CH_2Cl_2 com 2% de MeOH.

2.7 Estudo do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata*

2.7.1 Preparo do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata*

As folhas de *D. lanceolata* foram secas em estufa com circulação de ar a $38 \text{ }^\circ\text{C}$, por um período de 48 horas, moídas em um moinho de facas e submetidas ao processo de hidro destilação utilizando-se um aparelho do tipo Clevenger, por um período de 2 horas à temperatura de $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

A mistura de água + óleo (hidrolato) obtida foi separada por decantação e o óleo essencial seco por meio da adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). O rendimento de extração foi determinado com base na massa seca das folhas (g de óleo/ g de massa seca).

2.7.2 Análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* por CG/EM

Para análise e identificação dos compostos presentes no óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* foi utilizado um cromatógrafo a gás (CG) acoplado a espectrômetro de massas (EM) da marca Shimadzu-QP500.

A identificação dos compostos presentes nas amostras foi realizada através o cálculo do índice de Kovats (IK) de cada componente, através da comparação do tempo de retenção de cada amostra em relação a padrões de *n*-alcanos, também chamado de índice de retenção, proposto por Kovats em 1958, como um parâmetro para a identificação de solutos em cromatogramas (SKOOG, 2002). O IK relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Tais índices permitem uma comparação melhor dos dados sendo calculado pela fórmula:

$$IR = 100i \times \frac{Tr_x - Tr_{HA}}{Tr_{HP} - Tr_{HA}} + 100N$$

Onde: Tr_x = Tempo de retenção do composto problema; Tr_{HA} = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior; Tr_{HP} = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; N = Número de carbonos do hidrocarboneto posterior; i = Diferença entre número de carbono dos hidrocarbonetos, anterior e posterior.

A mistura de padrões de alcanos C₁₄-C₃₀ foi injetada no cromatógrafo à gás nas mesmas condições das análises cromatográficas realizadas no óleo essencial: temperatura inicial de 80°C, taxa de aquecimento de 8°C/min, até atingir 200°C e 12 C/min até atingir 220°C (7 min). A temperatura do injetor utilizada foi de 250°C e a Temperatura interface: 280 °C, com gás de arraste Hélio (1,5 mL/min) e o volume de injeção: 1 µL.

A coluna utilizada foi uma OPTIMA-5 (Diâmetro: 0.25 mm, Comprimento: 30 m, espessura do filme: 0,25 µm). Os índices dos diferentes compostos foram determinados e comparados com os descritos na literatura (ADAMS, 2007)

2.8 Ensaios biológicos nas operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

2.8.1 Ensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios inseticidas por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP –Rio Claro/SP sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Neste ensaio inseticida, as operárias foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada dieta sólida artificial constituída por 5,0% glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% extrato de levedura e 1,0% Agar bacteriológico dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Após a mistura destes componentes, a dieta foi levada ao forno de microondas por 4 min e em seguida, à autoclave por 15 min, a uma temperatura de 120°C e 1 atm. A dieta ainda líquida foi transferida para placas de Petri de 10 cm de diâmetro e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subsequentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização do experimento de toxicidade.

A dieta para manutenção das formigas (controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser avaliado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 h a dieta era renovada. O material a ser testado foi pesado, dissolvido no mesmo solvente em que ocorreu a extração e incorporado na dieta na concentração de 2 mg/mL para os extratos e 1 mg/mL para as frações obtidas das partições (BUENO *et al.*, 1997).

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de 25° ± 1 °C e umidade relativa acima de 70%. Diariamente foi realizada a avaliação da mortalidade das formigas e ao final do experimento (25 dias) verificou-se o percentual dos sobreviventes em relação ao grupo controle (BUENO *et al.*, 1989; BUENO *et al.*, 2005). A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico logrank ($p < 0,05$), utilizando-se o software GraphPad, aplicativo Prisma 3.0.

2.8.2 Ensaio tópico do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* sobre operárias de *A. sexdens rubropilosa*

As formigas coletadas foram imobilizadas, com o auxílio de uma pinça entomológica, para a aplicação das substâncias testadas, que foram colocadas no pronoto de cada operária, utilizando uma pipeta de precisão. Foram feitos dois controles: em um deles não ocorreu aplicação tópica de nenhuma substância; no outro, houve a aplicação de 1 µL de acetona (solvente utilizado). Foram testados dois tratamentos de óleo essencial de *D. lanceolata*, nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.

Os ingredientes ativos foram dissolvidos em acetona nas concentrações estipuladas. Após a aplicação, as formigas foram depositadas em uma bandeja até se recuperarem de seu estado de torpor provocado pelo vapor da solução. Posteriormente, foram colocadas nas placas. Durante os 25 dias de experimento, as formigas foram alimentadas com dieta pura.

2.9 Ensaio com o fungo simbiote

Os ensaios frente ao fungo simbiote foram realizados no Departamento de Química, da Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão da Dra. Ana Paula Terezan e da Técnica de nível superior Msc Dorai Periotto Zandonai.

2.9.1 Procedimento de manutenção do fungo simbiote *L. gongylophorus*

O fungo simbiote *L. gongylophorus* foi isolado de um ninho de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio de cultura.

O preparo do meio de cultura (MEA LP) para a repicagem do fungo simbiote *L. gongylophorus* foi realizado adicionando-se 20 g de extrato de malte (Merck), 2 g de extrato de levedura, 5 g peptona bacteriológica (Difco), 20 g ágar (Difco) em 1000 mL água destilada. Em seguida, o meio de cultura e as placas de Petri (separadas em saquinhos plásticos) foram autoclavados. Após a esterilização, adicionou-se 25 mL do meio de cultura em cada placa de Petri. A adição do meio de cultura foi realizada

dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta.

2.9.2 Metodologia do ensaio de inibição de *L. gongylophorus in vitro* pelo método de Incorporação

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporadas ao meio de cultura e dissolvidas em água destilada, obtendo concentração final igual a 1000 µg/mL para extratos, 300 µg/mL para fração e 100 µg/mL para substâncias puras. Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/amostra.

Os tubos de ensaio com o meio de cultura/amostra e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavados nas condições 120 °C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos nas placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta.

Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*. Cada extrato foi analisado em quintuplicata, havendo um número idêntico de réplicas para o controle geral (meio de cultura e fungo simbiote).

Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 °C, foram realizadas as medidas de cinco diâmetros diferentes em cada placa das amostras testadas (adaptação MIYASHIRA, 2007). As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbiote dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbiote.

2.9.3 Metodologia do ensaio de inibição de *L. gongylophorus in vitro* com o óleo essencial

Os ensaios com o óleo essencial foram realizados de acordo com a metodologia descrita com algumas mudanças em relação à incorporação das substâncias à dieta.

Devido à impossibilidade de se autoclavar os tubos de ensaio que continham o meio de cultura acrescidos das amostras a serem testadas, as amostras, que foram previamente filtradas em filtros estéreis, foram adicionadas sobre um pequeno suporte redondo ($\varnothing = 1$ cm) já autoclavado, e então colocado em cima do meio de cultura, após sua solidificação, dentro das placas de Petri.

O suporte foi colocado no canto de cada placa de Petri, o mais distante possível do centro da placa, para evitar alguma possível interferência no crescimento do fungo. As placas foram então, fechadas e cobertas com plástico parafilm, e a inibição do crescimento do fungo simbiote se deu pela exposição dos voláteis presentes no óleo.

2.9.4 Ensaio frente ao *Sitophilus zeamais*

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas no Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) – Piracicaba/SP pelo Dr. Leandro do Prado Ribeiro sob orientação do Prof. Dr. José Djair Vendramim.

Os bioensaios foram realizados em condições laboratoriais controladas (Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, U.R.: $60 \pm 10\%$, fotofase: 14 horas) utilizando-se como inseto modelo o gorgulho-do-milho (*S. zeamais*) em grãos de milho (híbrido AG 1051), como substrato para realização dos testes.

Para realização deste ensaio, foram utilizadas caixas plásticas (6,0 cm de diâmetro e 2,0 cm de altura) contendo amostras de 10 g de milho tratadas, separadamente, com os respectivos extratos vegetais, fração da extração líquido-líquido e subfrações, além de uma testemunha, onde foi mantido apenas o substrato de criação tratado com o respectivo solvente utilizado nas ressuspensões dos extratos.

As amostras foram diluídas em acetona:metanol 1:1 e aplicadas sobre grãos de milho utilizando-se um microatomizador de baixa pressão, com um volume de calda de 10 L/t. Após a pulverização, a mistura dos grãos com as amostras foi feita manualmente em sacos plástico. Após o tratamento, os grãos tratados foram deixados por um período de 72 h em uma capela para evaporação do solvente utilizado. Para

este ensaio, foi utilizado como controle, amostras de milho tratadas com mistura acetona: metanol 1:1.

Posteriormente, cada caixa plástica foi infestada por 20 adultos, não sexados e com idade entre 10 e 20 dias, utilizando-se 10 repetições por tratamento. A sobrevivência dos adultos foi avaliada ao décimo dia após a infestação. Para análise, foram considerados mortos os indivíduos cujas extremidades estavam completamente distendidas e que não apresentavam reação ao contato com um pincel, durante um minuto de observação.

Os extratos que apresentaram os resultados mais promissores foram testados para estimar a CL50 (concentração necessária para matar 50% da população dos gorgulhos). Para essas estimativas, foram realizados testes preliminares com as referidas amostras para estimar as concentrações básicas que provocam mortalidade de adultos de 95% e mortalidade semelhante à obtida na testemunha. Com base nessas concentrações, foram estabelecidas as concentrações a serem testadas, através da fórmula:

$$q = \sqrt[n+1]{\frac{a_n}{a_1}},$$

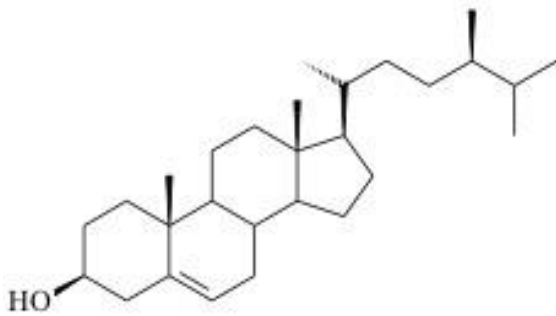
onde: q = razão de progressão geométrica (p.g.); n = número de concentrações a extrapolar; a_n = limite superior da p.g. (concentração que provoca mortalidade de cerca de 95%, estimada através de teste preliminar); a_1 = limite inferior da p.g. (concentração que provoca mortalidade semelhante ao controle, estimada através de teste preliminar). A CL50 foi estimada através de análise de Probit.

Os extratos foram testados nas concentrações de 1.500 e 3.000 ppm, e para aqueles promissores, foi determinada a CL50. Para as demais frações, foram testadas em concentração igual à CL50 da amostra de origem.

2.10 Resultados e discussão

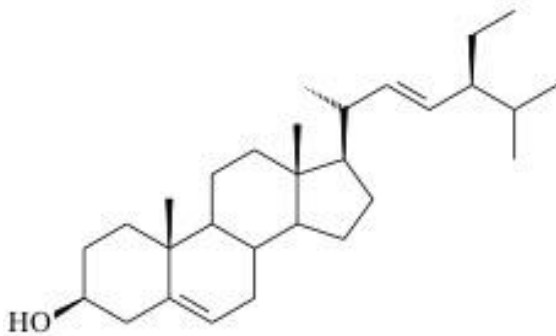
2.10.1 Substâncias isoladas e identificadas

O estudo fitoquímico da planta *D. lanceolata* possibilitou o isolamento e identificação das substâncias a seguir:



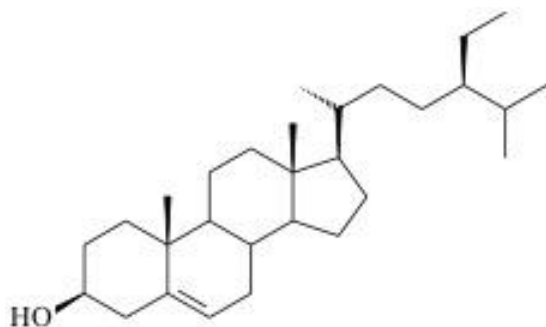
Campesterol (1)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



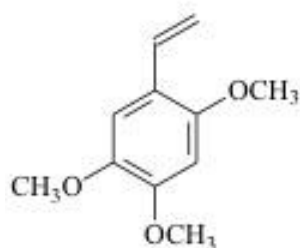
Stigmasterol (2)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



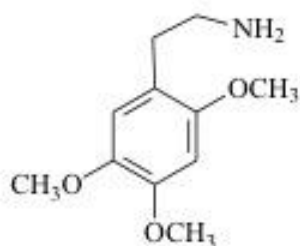
β - sitosterol (3)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



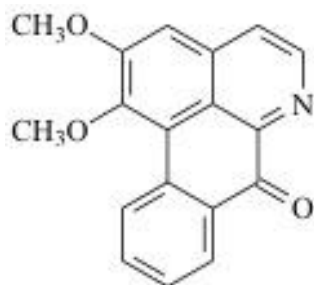
2,4,5-trimetoxiestireno (4)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* e identificada no óleo essencial das folhas.



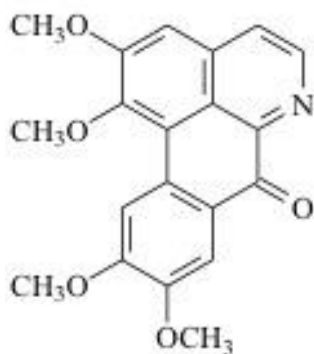
2,4,5-Trimetoxifenilamina (5)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*



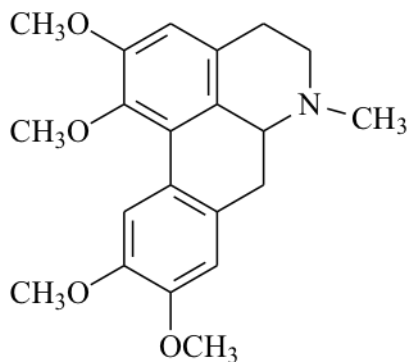
Lisicamina (6)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



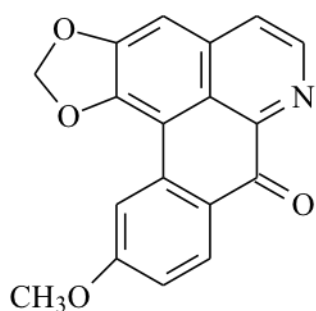
Oxoglaucina (7)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



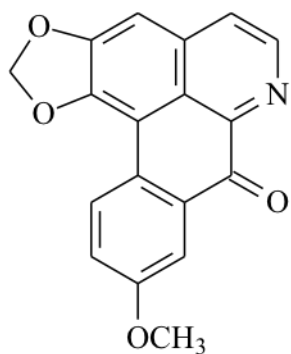
Glaucina (8)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



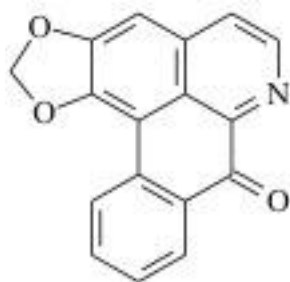
oxolaurelina (9)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*



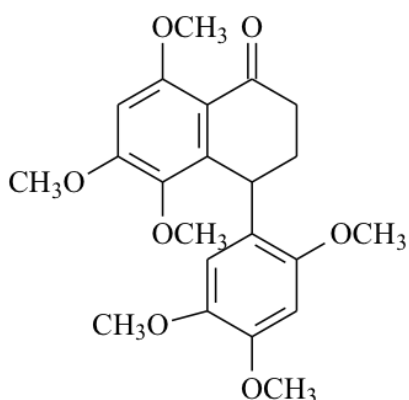
lanuginosina (10)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



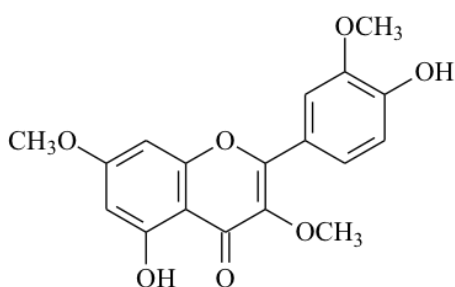
Liriodenina (11)

Procedência: Partição hexânica e diclorometano do extrato etanólico da casca dos frutos *Duguetia lanceolata*.



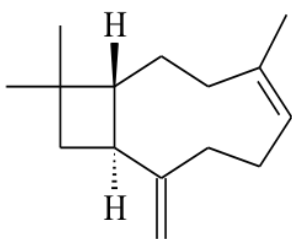
5,6,8-Trimethoxy-4-(2,4,5-trimethoxyfenil) - 3,4-dihidro-1 (2H)-nafitalenona (12)

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*



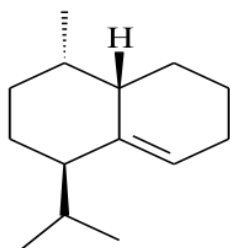
Flavonóide (13)

Procedência: Partição diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata*.



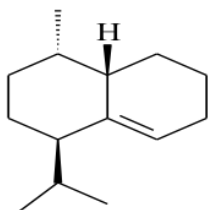
β -cariofileno (14)

Procedência: Óleo essencial das folhas de *Duguetia lanceolata*.



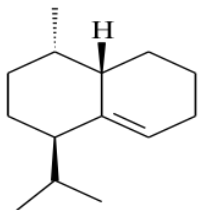
Trans-muurola-4,(14),5-dieno (15)

Procedência: Óleo essencial das folhas de *Duguetia lanceolata*



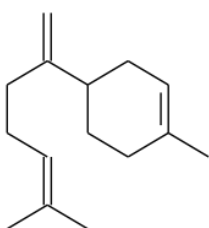
Trans-muurola-4,(14),5-dieno (15)

Procedência: Óleo essencial das folhas de *Duguetia lanceolata*



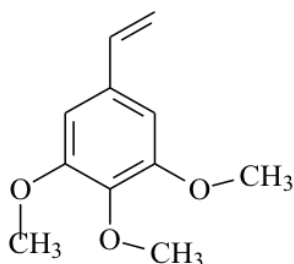
Trans-muurola-4,(14),5-dieno (15)

Procedência: Óleo essencial das folhas de *Duguetia lanceolata*



β -bisaboleno (16)

Procedência: Óleo essencial das folhas de *Duguetia lanceolata*



3,4,5-trimetoxiestireno (17)

Procedência: Óleo essencial das folhas de *Duguetia lanceolata*

2.10.2 Identificação estrutural do sitosterol (1), estigmasterol (2) e campesterol (3)

Esteroides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14 (DEWICK, 2009). Muitos possuem diversas atividades biológicas e são frequentemente utilizados na medicina. Os esteroides mais encontrados em plantas, fungos, e algas são o campesterol e sitosterol (DEWICK, 2009).

Os esteroides campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (FIGURA 2.22) foram obtidos em mistura no extrato hexânico das folhas de *D. lanceolata* e caracterizados por RMN¹H (FIGURA 2.23), RMN ¹³C (FIGURA 2.24) e por CG/EM (FIGURA 2.25).

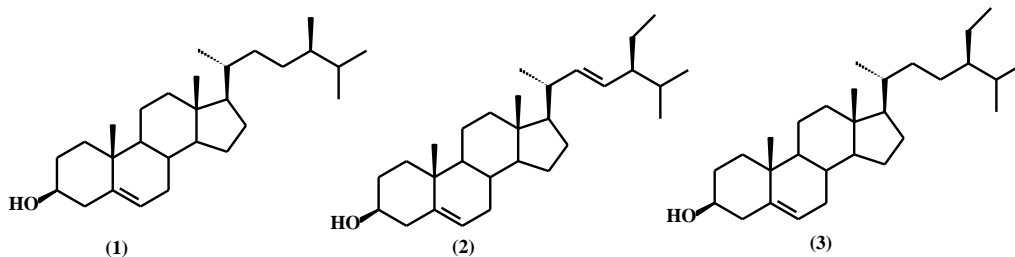


FIGURA 2.22 - Campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3).

Os dados foram comparados com a literatura (SUGA & KONDO, 1974; GOULART et al., 1993, SIQUEIRA et al., 1998). Os sinais de deslocamentos químicos (daqui para frente indicados apenas como sinais) nas regiões entre δ 0,66 a 2,30 (RMN¹H) e δ 11,86 a 56,77 (RMN¹³C) são referentes aos prótons e carbonos metínicos, metilênicos e metílicos indicam a existência de um esqueleto esteroidal.

Os sinais em δ 5,00 a δ 5,14 foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos da cadeia lateral do estigmasterol. O duplete largo em δ 5.33 e um multiplete em δ 3,51 foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente.

A mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) foi confirmada por CG-EM (FIGURA 2.25), onde os picos do íon molecular em m/z 400, 412 e 414 conferiram com as fórmulas moleculares C₂₉H₅₀O, C₂₉H₄₈O e C₂₈H₄₈O, respectivamente (FIGURAS 2.26 a 2.28).

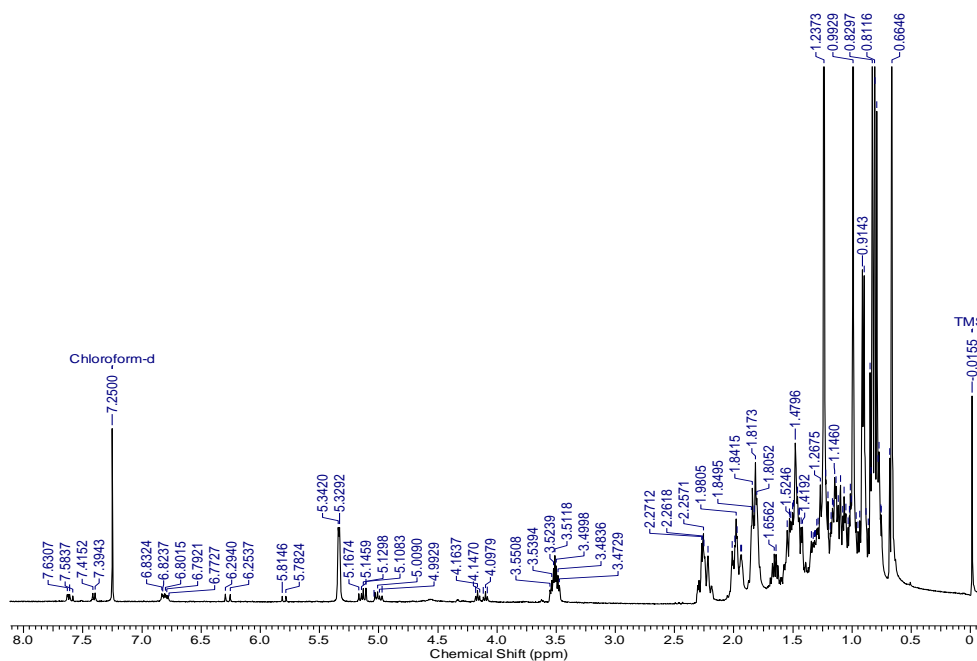


FIGURA 2.23 - Espectro de RMN¹H da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl₃, 400 MHz).

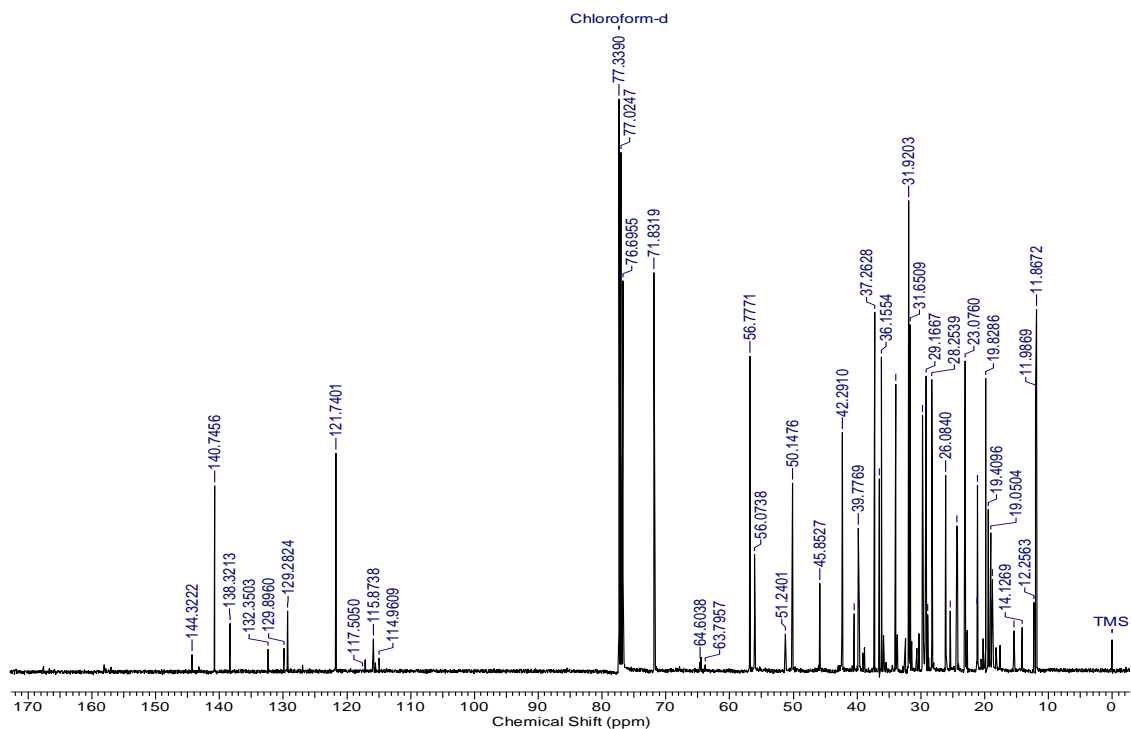


FIGURA 2.24 - Espectro de RMN¹³C da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl₃, 400 MHz).

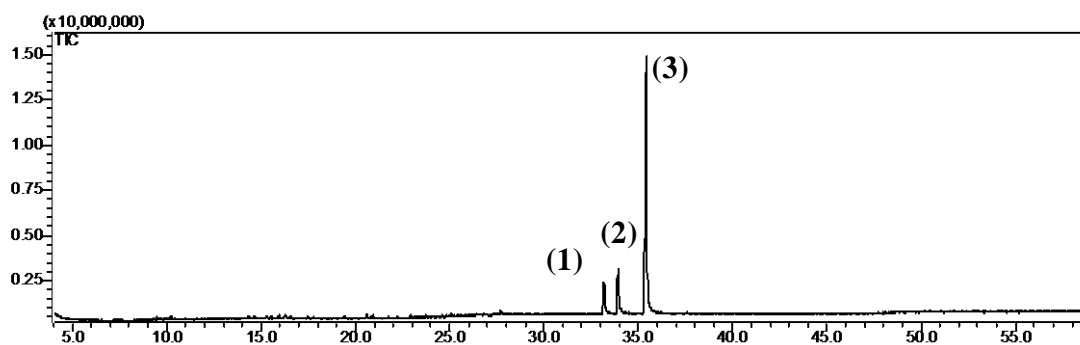


FIGURA 2.25 - Cromatograma obtido no GC-EM. Condições: Gás de arraste: Hélio; Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura do detector: 280°C; Modo de injeção Split; Volume de injeção: 1 µl. Programação: temperatura inicial de 150°C; permanecendo durante 5 min; a temperatura da coluna aumentou de 6°C/min. até 280°C, permanecendo nesta temperatura por 20 min; a temperatura da coluna aumentou de 5°C/min. até 290°C, permanecendo nesta temperatura por 10 min. A coluna utilizada foi uma DB-5 (Diâmetro: 0.25 mm, comprimento: 30 m, espessura do filme: 0,25 µm).

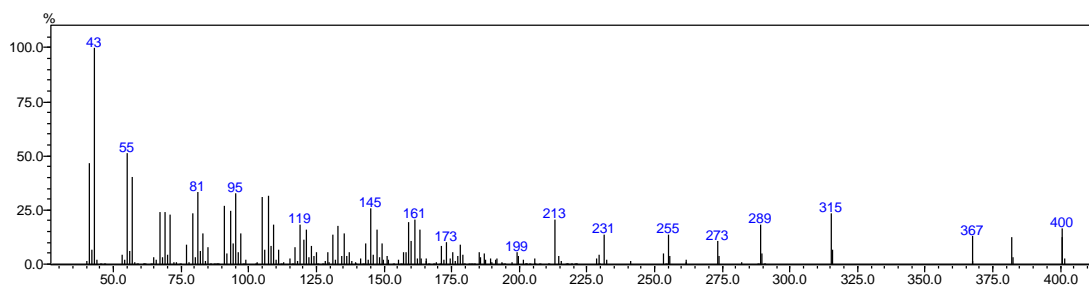


FIGURA 2.26 - Espectro de massas do campesterol (1) (IE = 70 eV).

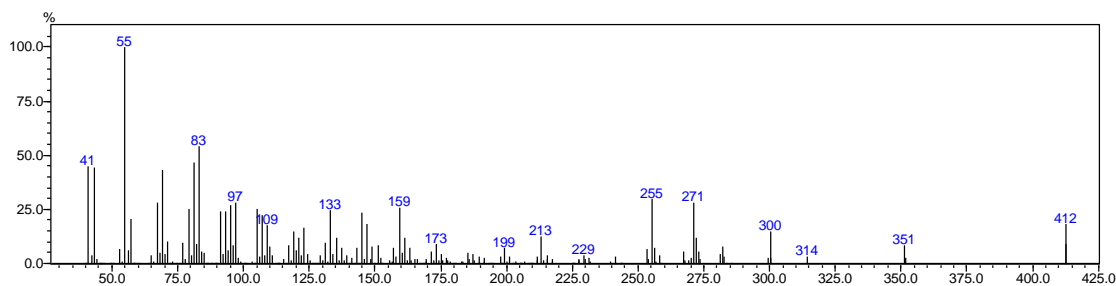


FIGURA 2.27 - Espectro de massas do estigmasterol (2) (IE = 70 eV)

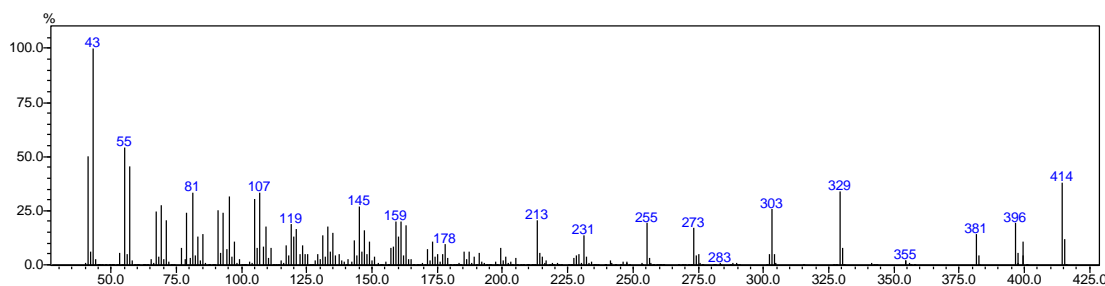


FIGURA 2.28- Espectro de massas do sitosterol (3) (IE = 70 eV)

2.10.3 Determinação estrutural 2,4,5-trimetoxiestireno

O composto 2,4,5-trimetoxiestireno (substância 4) (FIGURA 2.29) foi isolada do extrato etanólico da partição hexânica das folhas de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, ¹³C, HMBC, HSQC e CG-EM.

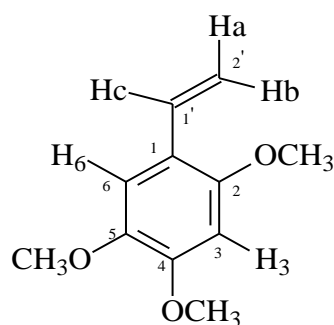


FIGURA 2.29 - Estrutura do composto 2,4,5-trimetoxiestireno.

A análise do espectro de RMN¹H (FIGURA 2.30 a 2.32) e da TABELA 2.4 indicou a presença de um composto aromático. Os sinais em δ 6,97 (1H, s) e δ 6,47 (1H, s) característicos de hidrogênios aromáticos indicam que o anel aromático se encontra substituído nas posições C-1, C-2, C-4 e C-5. Os singletos em δ 3,85 (3 H), δ 3,84 (3 H), δ 3,74 (3 H), característicos de metoxilas, sugerem ser estas os substituintes dos C-2, C-4 e C-5 do anel aromático.

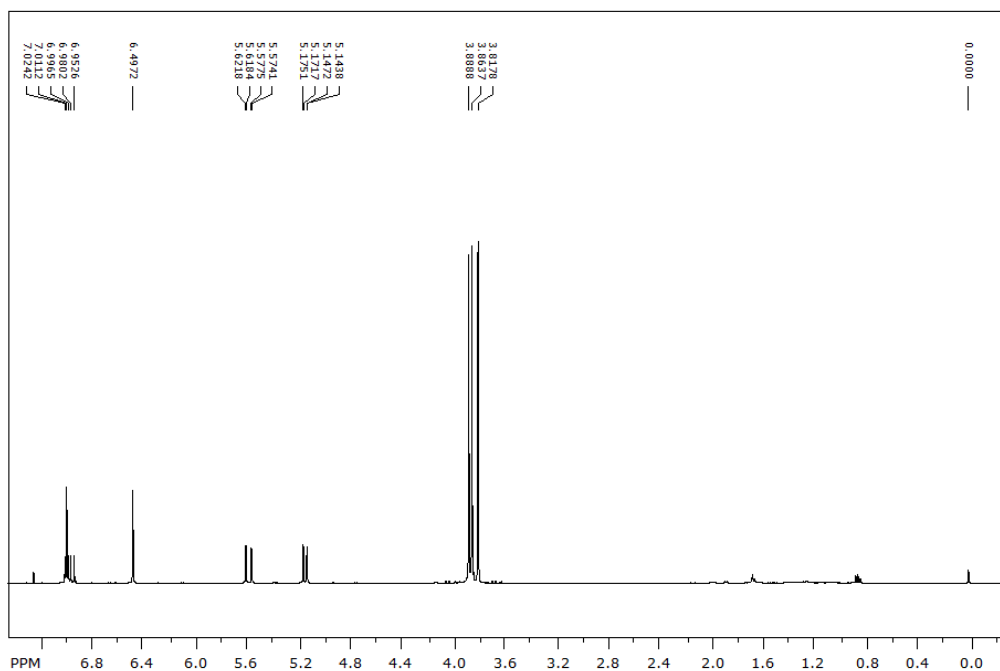


FIGURA 2.30 - Espectro de RMN ¹H da substância 4 (400 MHz, CDCl₃).

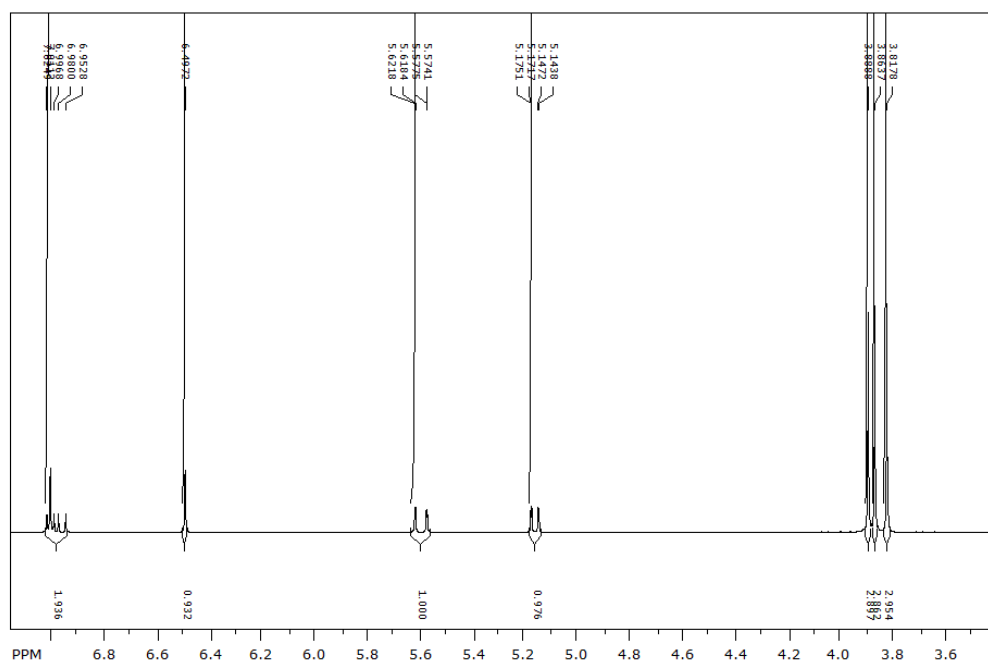


FIGURA 2.31 - Expansão do espectro de RMN ¹H da substância 4, com integração dos picos (400 MHz, CDCl₃).

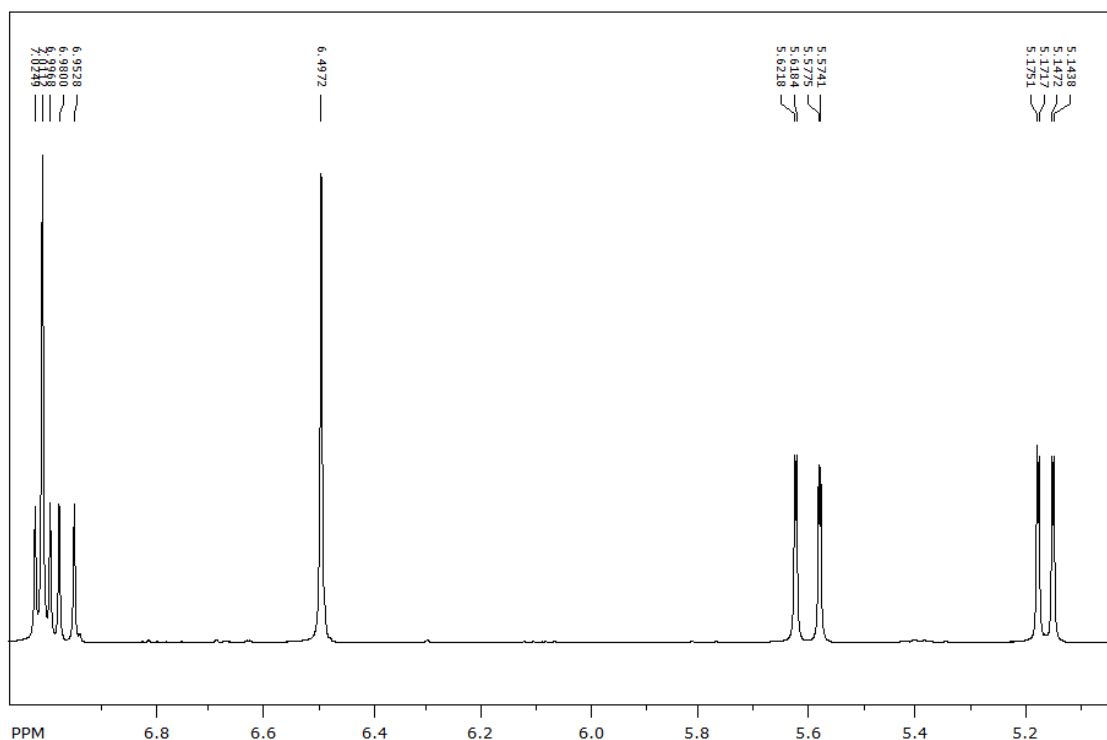


FIGURA 2.32 -Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 4 (400 MHz, CDCl_3).

TABELA 2.4 - Dados de RMN ^1H da substância 4 (400 MHz, CDCl_3) comparados com literatura

H	Substância 4 (CDCl_3 , 400 MHz)	WATERMAN, 1976 e SILVA, 2007 (CDCl_3)
H 1'a	5,16 (1H, dd, $J_{ba} = 1,3$ e $J_{cb} = 11,1$ Hz)	5.20 (1H, dd, $J_{ab} = 2$ e $J_{ac} = 10$ Hz)
H 1'b	5,60 (1H, dd, $J_{ba} = 1,3$ e $J_{bc} = 17,7$ Hz)	5.65 (1H, dd, $J_{ba} = 2$ e $J_{bc} = 18$ Hz)
H 1'c	6,98 (1H, dd, $J_{ca} = 11,1$ e $J_{cb} = 17,7$ Hz)	7,05 (1H, dd, $J_{ca} = 10$ e $J_{cb} = 18$ Hz)
H-3	6,49 (1H, s, H-Ar)	6,58 (1H, s, H-Ar)
H-6	7,01 (1H, s, H-Ar)	7.10 (1H, s, H-Ar)
OCH_3	3,81 (3H, s)	3,85 (3H, s)
OCH_3	3,86 (3H, s)	3,90 (3H, s)
OCH_3	3,88 (3H, s)	3,95 (3H, s)

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 2.33) apresenta sinais de 11 carbonos.

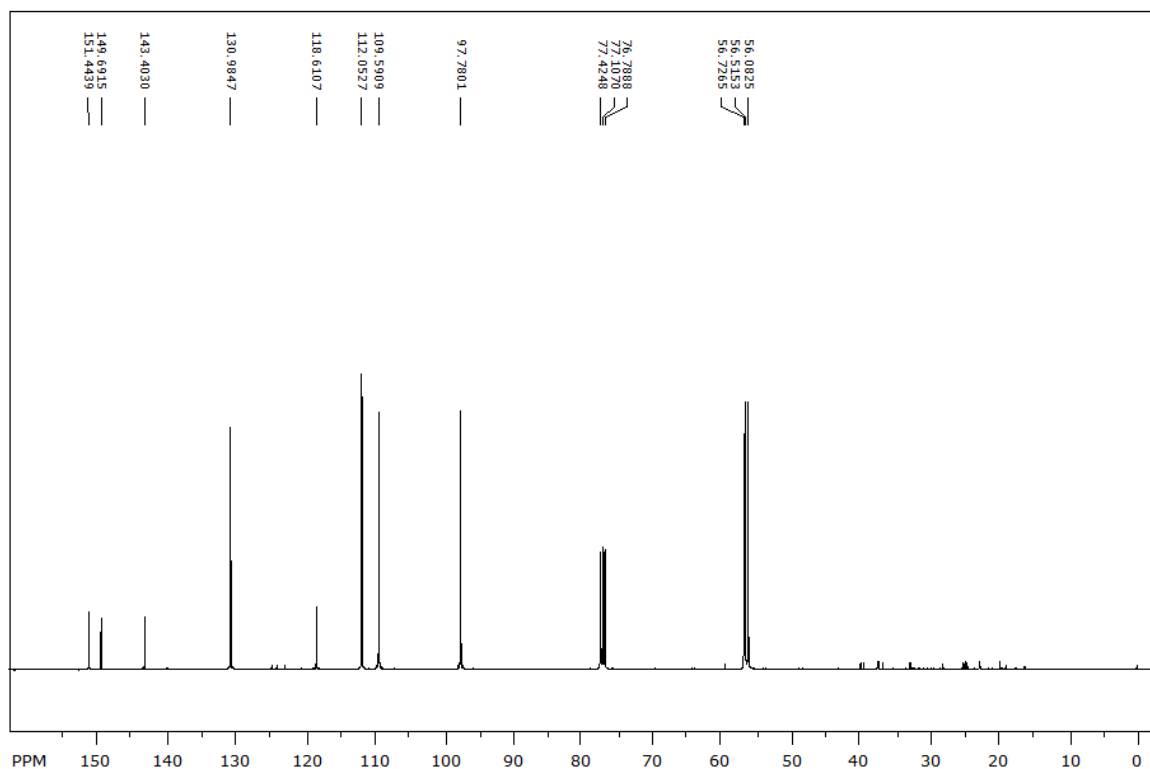


FIGURA 2.33 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 4 (100 MHz, CDCl_3).

No espectro de HSQC e suas expansões (FIGURAS 2.34 e 2.35) os sinais dos hidrogênios aromáticos mostram correlação a 1J dos hidrogênios H-3 δ 6,49 (s) com C-3 em δ 97,8 e H-6 δ 7,01 (s) com C-6 em δ 109,3.

Os sinais dos hidrogênios da dupla ligação, Ha em δ 5,16 (dd) e Hb em δ 5,60 correlacionam-se com carbono em δ 112,1 e o Hc em δ 6,98 (dd) correlaciona-se com carbono em 130,9. A metoxila δ 3,88 (s) mostra correlação com o carbono em δ 56,2. A metoxila em δ 3,86(s) com o carbono em δ 56,5 e a metoxila em δ 3,81(s) mostra correlação com o carbono em δ 56,7.

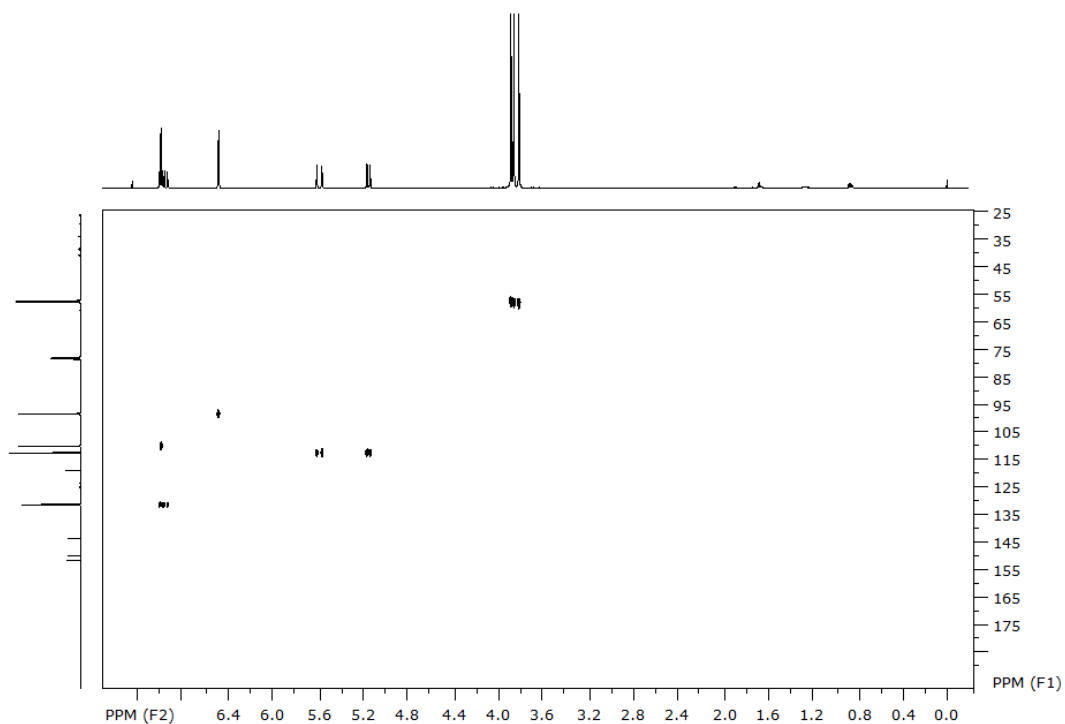


FIGURA 2.34 - Mapa de contorno de HSQC da substância 4 (400 MHz, CDCl_3)

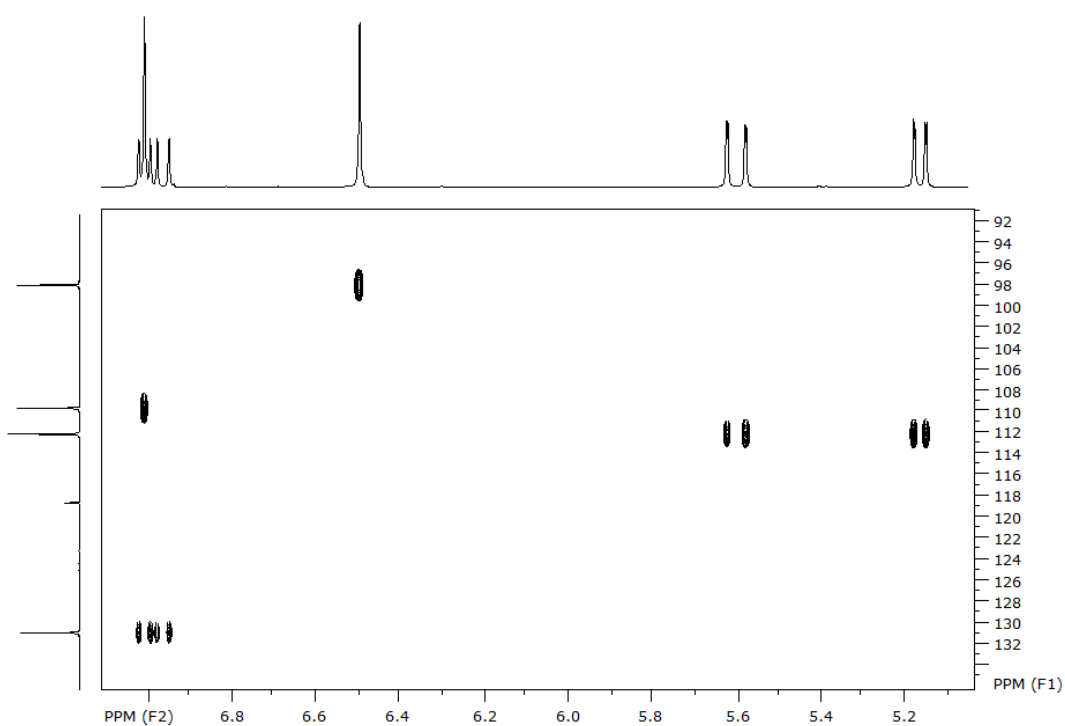


FIGURA 2.35 - Ampliação do mapa de contorno de HSQC da substância 4 (400 MHz, CDCl_3).

No espectro de HMBC e suas expansões (FIGURAS 2.36 a 2.38) o hidrogênio aromático H-3 (δ 6,49) mostra correlação com C-2 em δ 151,8, com C-1 em δ 118,1,

com C-4 em δ 143,6. O hidrogênio aromático H-6 (δ 7,01) mostra correlação com C-1 em δ 118,1, com C-1' em δ 130,9, com C-4 em δ 143,6. As correlações nos sinais correspondentes as metoxilas podem ser observadas na FIGURA 2.36. A metoxila em δ 3,81 mostra correlação com um sinal em δ 151,8 atribuído ao carbono C-2.

A metoxila em δ 3,86 mostra correlação com um sinal em δ 143,6 atribuído ao carbono C-4. A metoxila em δ 3,88 mostra correlação com um sinal em δ 150,1 atribuído ao carbono C-5. Na FIGURA 2.37 é possível observar a correlação dos hidrogênios H-2'a (δ 5,16) e H-2'b (δ 5,59) com sinal em δ 118,1, atribuído ao carbono C-1. O hidrogênio H-2'b (δ 5,59) mostra ainda correlação com o sinal em δ 130,9, atribuído ao C-1'.

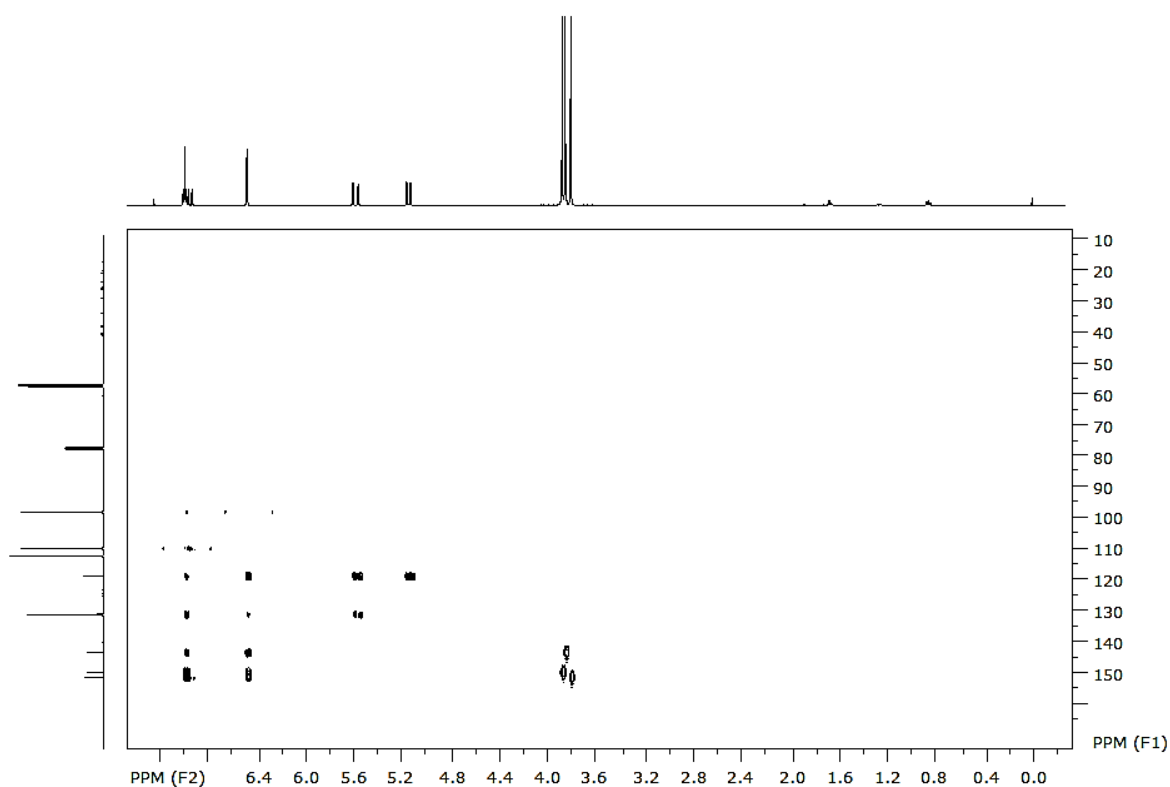


FIGURA 2.36 - Mapa de contorno de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl_3).

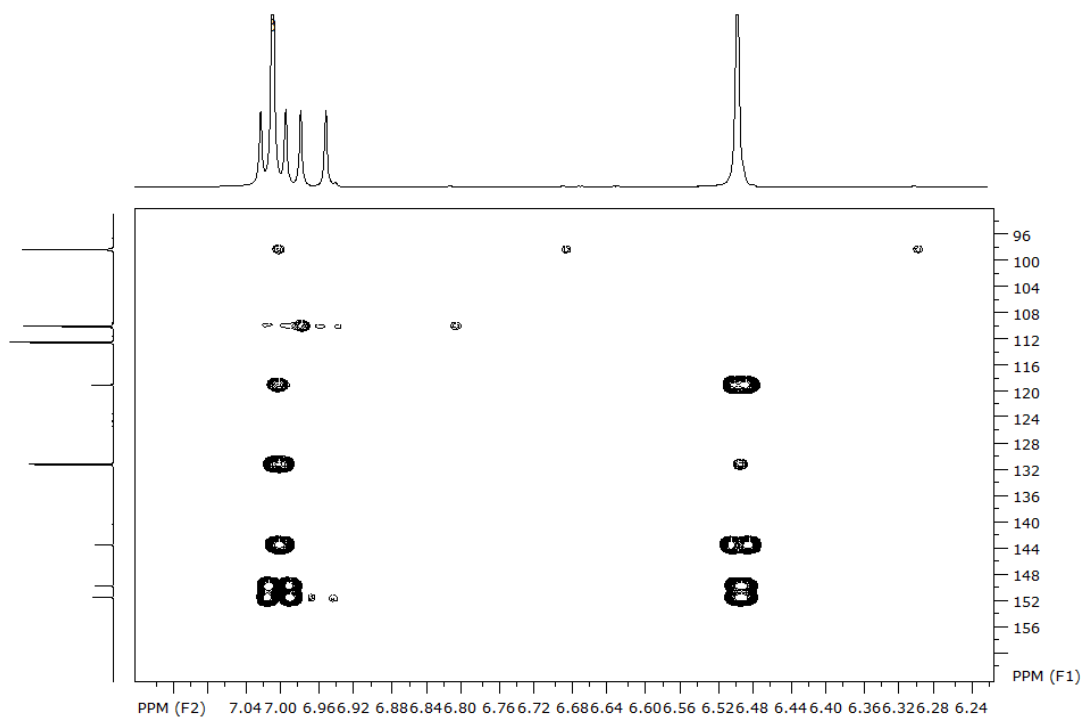


FIGURA 2.37 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl₃).

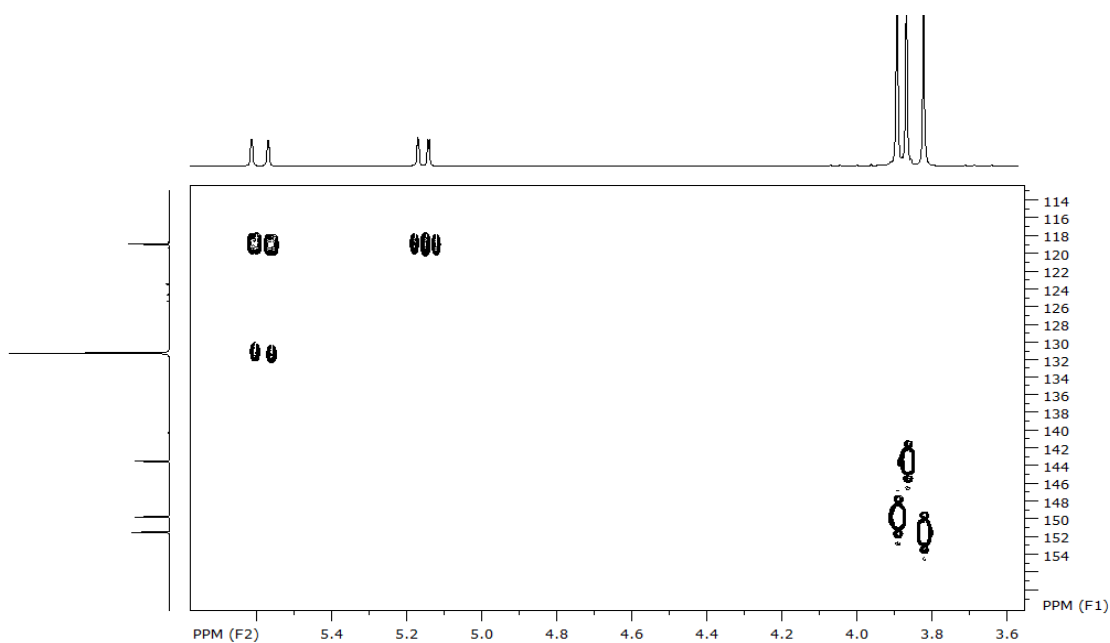


FIGURA 2.38 - Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 4 (400 MHz, CDCl₃).

Esta amostra foi injetada no cromatógrafo a gás nas seguintes condições: temperatura inicial de 80 °C, taxa de aquecimento de 8 °C/min, até atingir 200 °C e 12 °C/min até atingir 220 °C (7 min). A Temperatura do injetor utilizada foi de 250 °C e a

Temperatura interface: 280 °C, com gás de arraste Hélio (1 ml/min) e o volume de injeção: 1 µl. A coluna utilizada foi uma OPTIMA-5 (Diâmetro: 0.25 mm, comprimento: 30 m, espessura do filme: 0,25 µm). O cromatograma obtido pode ser observado na FIGURA 2.39 e seu espectro de massas na FIGURA 2.40.

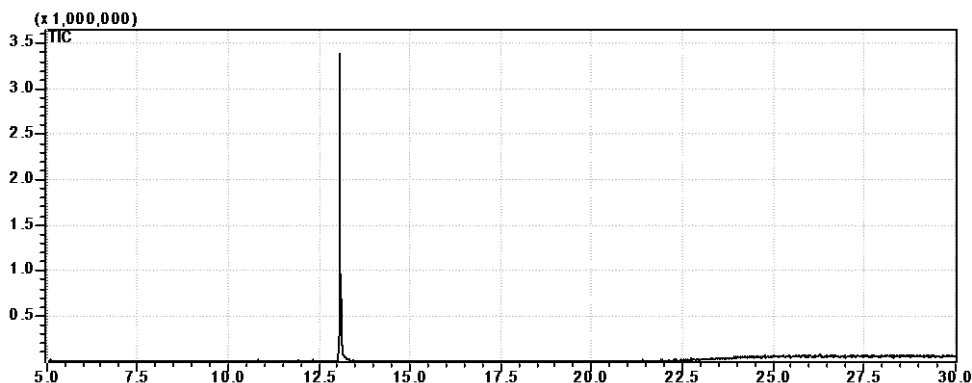


FIGURA 2.39 - Cromatograma obtido no GC-MS da substância 4. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 80 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 8 °C/min. até 200 °C, aumentou de 12 °C/min. até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 7,0 min.

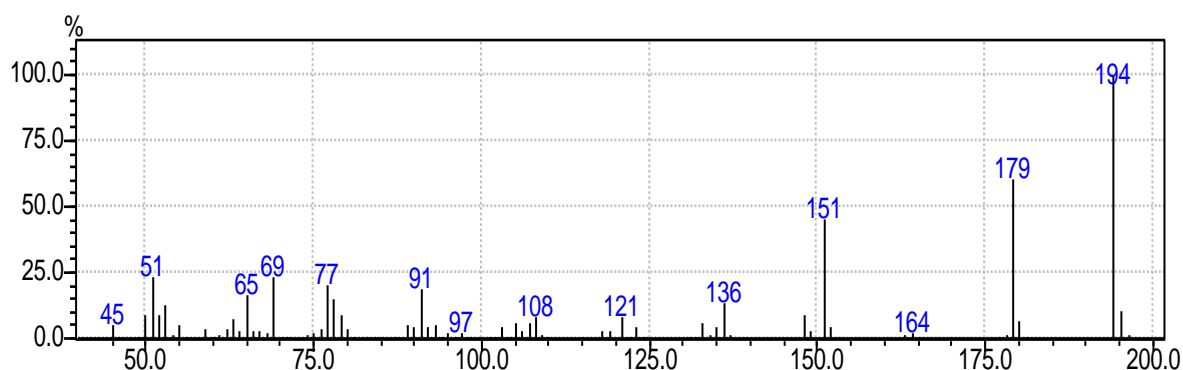


FIGURA 2.40 - Espectro de massas da substância 4 (IE = 70 eV).

Estes dados confirmam a massa da substância 4, com o pico do íon molecular 194 m/z que corresponde a massa do composto $C_{11}H_{14}O_3$, conhecido como 2,4,5-trimetoxiestireno.

2.10.4 Determinação estrutural 2,4,5-trimetoxifenilamina

A substância 5, identificada como 2,4,5-trimetoxifenilamina (FIGURA 2.41), foi isolada do extrato etanólico da partição hexânica das folhas de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, ¹³C, HMBC, HSQC.

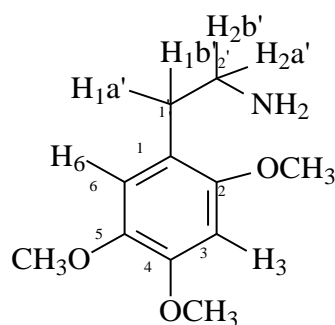


FIGURA 2.41 - Estrutura do composto 2,4,5-trimetoxifenilamina.

A análise do espectro de RMN¹H e suas expansões (FIGURA 2.42 e 2.43) e da TABELA 2-5, indicou a presença de um composto aromático. Os sinais em δ 6,97 (1H, s) e δ 6,47 (1H, s) característicos de hidrogênios aromáticos indicam que o anel aromático se encontra substituído nas posições C-1, C-2, C-4 e C-5. Os singletos em δ 3,85 (3 H), δ 3,84 (3 H), δ 3,74 (3 H), característicos de metoxilas, sugerem ser estas, os substituintes dos C-2, C-4 e C-5 do anel aromático. Os multipletos δ 2,31 (1H) e δ 1,93 (1H) caracterizam sinais referentes aos hidrogênios CH₂.

O multipletos δ 3,89 (1H) referente aos H-2' não é observado claramente no espectro de ¹H, porém ao integrar este junto com o sinal da metoxila em δ 3,85, observa-se uma integração para 4 hidrogênios, e no espectro de HSQC, observa-se a correlação deste hidrogênio com carbono δ 40,4 como será discutido posteriormente.

O espectro de RMN ¹³C (FIGURA 2.44) apresenta sinais de 11 carbonos, cujos valores podem ser observados na TABELA 2.5. O espectro de DEPT-135 (FIGURA 2.45) confirma que o carbono C-1' com deslocamento químico de δ 27,1 é um CH₂ e os sinais dos carbonos C-2', C-3 e C-6 com deslocamentos em δ 40,4, δ 111,9, δ 97,8 respectivamente são referentes a carbonos com apenas um hidrogênio ligado aos mesmos. O sinal do carbono C-2' com deslocamento em δ 40,4, típico de carbonos sp³ ligados a átomos eletronegativos (SILVERSTEIN *et al.*, 2000, PAVIA *et al.* 2010), indica a presença de um carbono ligado a um nitrogênio, mais precisamente um NH₂.

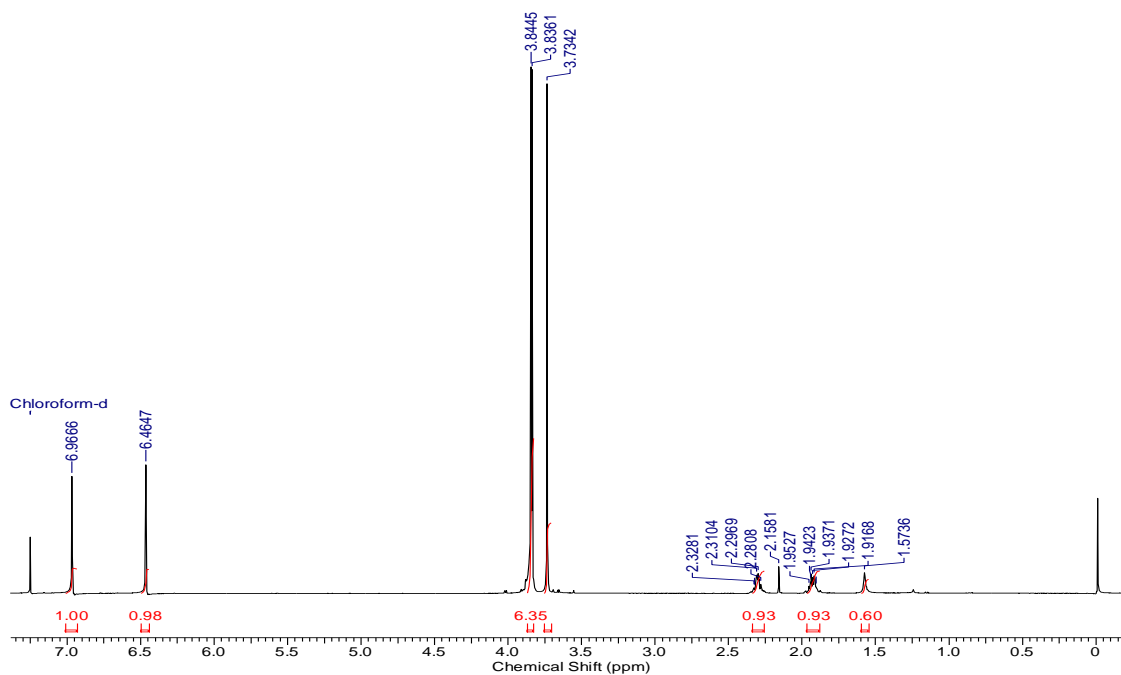


FIGURA 2.42 - Espectro de RMN ^1H da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

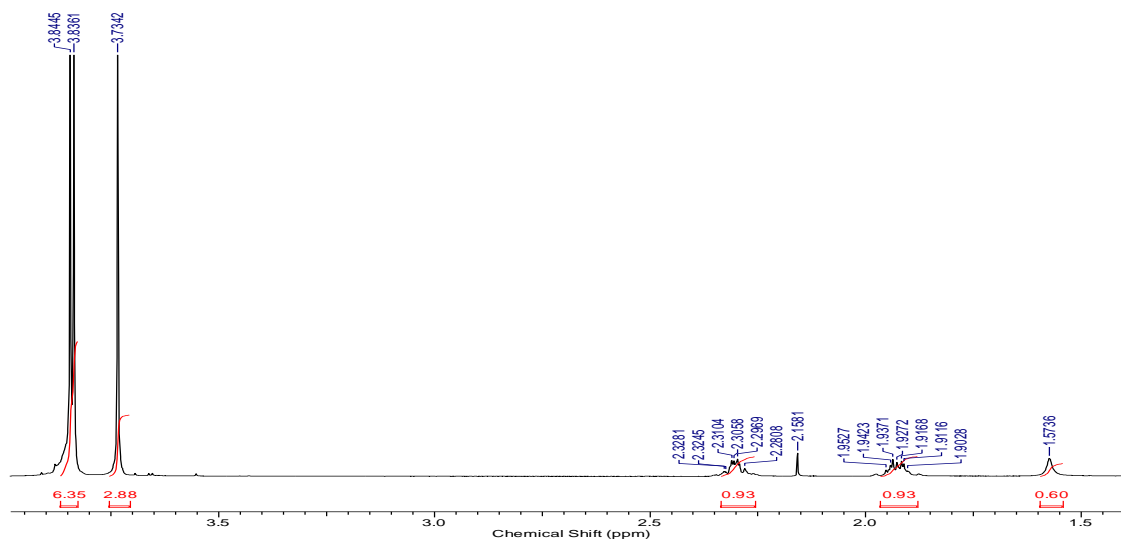


FIGURA 2.43 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

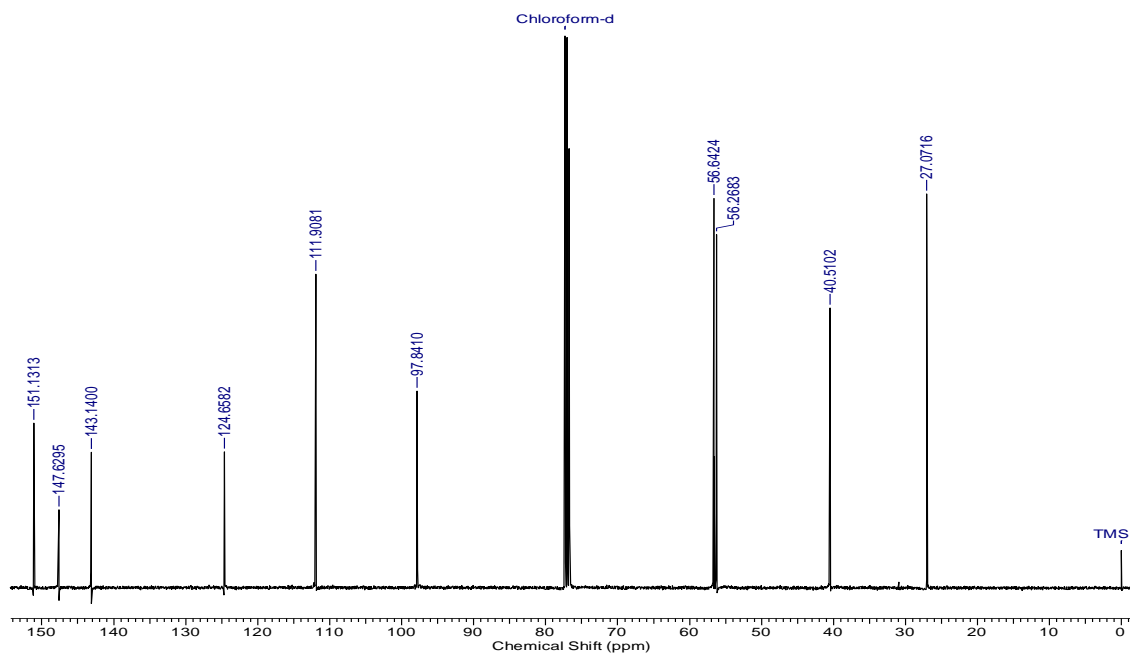


FIGURA 2.44 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 5 (100 MHz, CDCl_3).

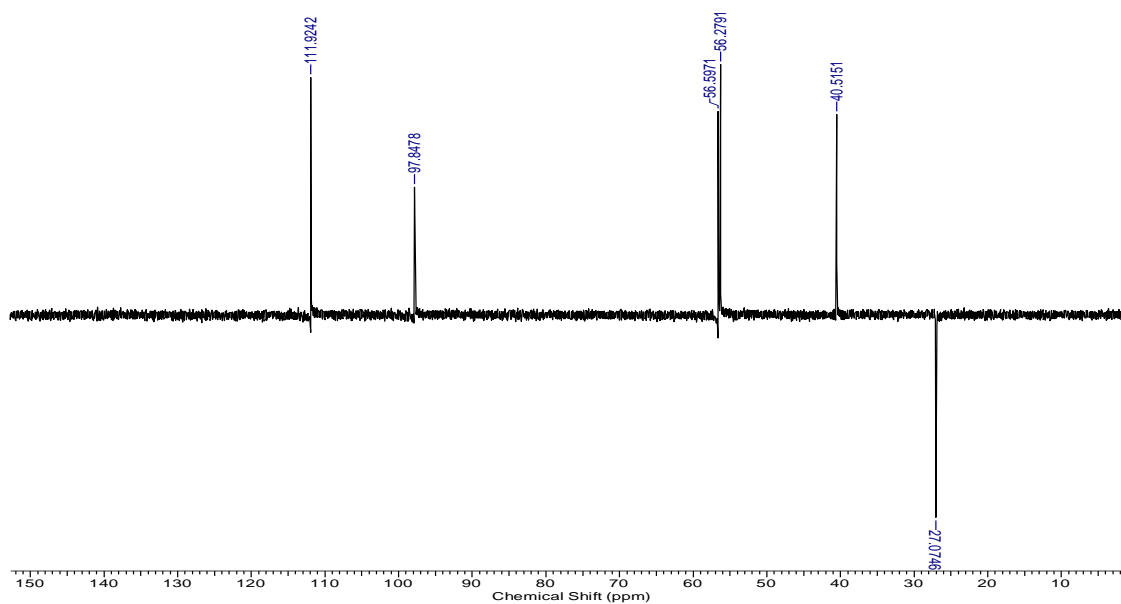


FIGURA 2.45 - Espectro de RMN DEPT-135 da substância 5 (400 MHz, CDCl_3)

TABELA 2.5 - Dados de RMN¹H,¹³C e indicação DEPT-135 da substância 5

H	Substância 5 (CDCl ₃ , 400 MHz)	BAILEY, 1983 (CDCl ₃)	C	Substância 5 (CDCl ₃ , 400 MHz)	BAILEY, 1983 (CDCl ₃)
1	-	-	1	124,6 C	221,10
2	-	-	2	151,1 C	152,4
3	6,97 (1H, s)	6,88 (1H, s)	3	111,9 CH	112,5
4	-	-	4	147,6 C	148,6
5	-	-	5	143,1 C	143,5
6	6,47 (1H, s)	6,39 (1H, s)	6	97,8 CH	98,6
1a'	1,93 (1H, m)	1,88 (1H, m)	1a'	27,1 CH ₂	29,4
1b'	2,31 (1H, m)	2,26 (1H, m)	1b'	27,1	29,4
2'	3,89 (1H, m)	3,81 (1H, m)	2'	40,4 CNH ₂	42,3
OCH ₃	3,85 (3H, s)	3,85 (3H, s)	OCH ₃	56,2 CH ₃	56,3
OCH ₃	3,84 (3H, s)	3,84 (3H, s)	OCH ₃	56,5 CH ₃	56,4
OCH ₃	3,74(3H, s)	3,74(3H, s)	OCH ₃	56,6 CH ₃	56,9

No mapa de contorno HSQC e suas expansões (FIGURAS 2.46 e 2.47) os sinais dos hidrogênios aromáticos mostram correlação a ¹J dos H-3 em δ 6,97 (s) com C-3 em δ 111,9 e de H-6 em δ 6,47 (s) com C-6 em δ 97,8. A metoxila ligada ao carbono C-2 em δ 3,74 (s) mostra correlação com o carbono em δ 56,2.

A metoxila ligada ao carbono C-4 em δ 3,85 (s) mostra correlação com o carbono em δ 56,6. A metoxila ligada ao carbono C-5 em δ 3,84 (s) mostra correlação com o carbono em δ 56,5. Os hidrogênios H-1'a (δ 2,31, m) e H-1'b (δ 1,93, m) mostram correlações com C-1' em δ 27,1 sendo estes descritos como um CH₂.

Os hidrogênios H-2' δ 3,89 (m) mostram correlação com C-2' em δ 40,4. Este sinal não é observado nitidamente no espectro de hidrogênio, pois ele está junto com o sinal de uma das metoxilas. Porém no espectro de HSQC observa-se a correlação do mesmo com seu respectivo carbono.

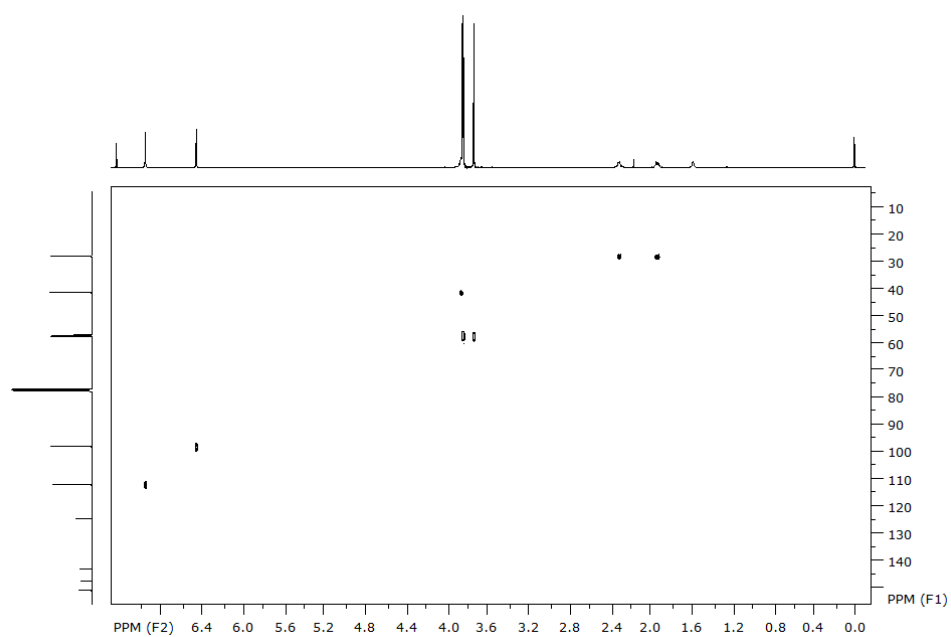


FIGURA 2.46 - Mapa de contorno de HSQC da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

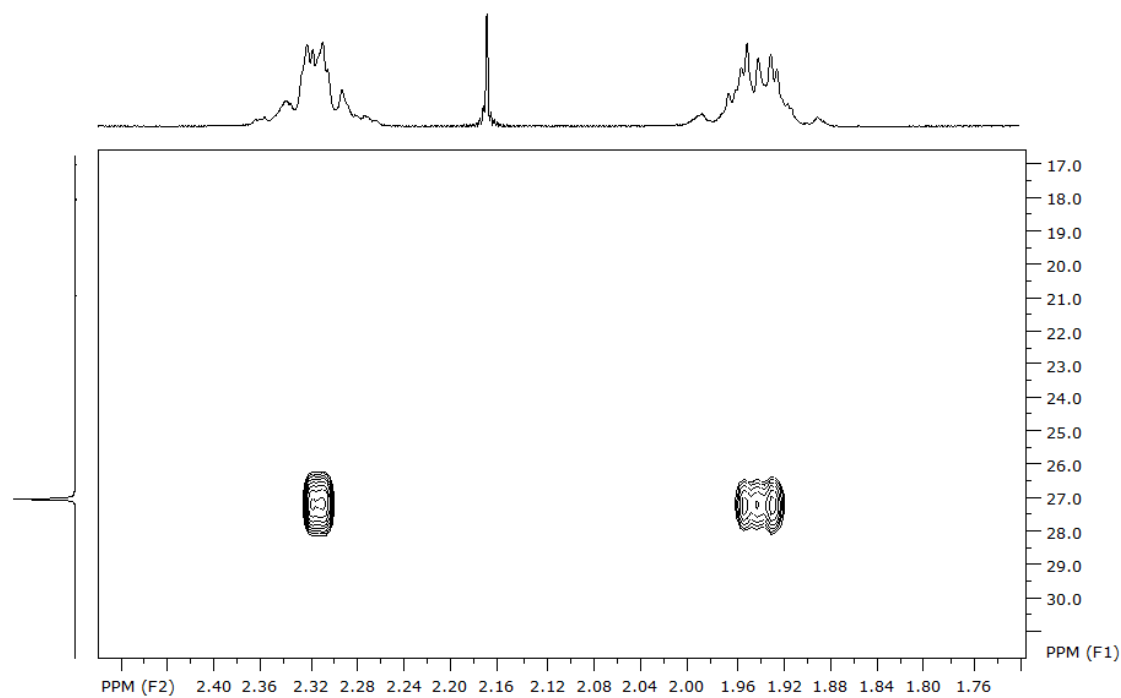


FIGURA 2.47 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

O espectro de HMBC e suas expansões (FIGURAS 2.48 e 2.49) mostra correlações do hidrogênio aromático H-3 (δ 6,97) com C-2 em δ 151,1, com C-4 em δ 147,6, com C-5 em δ 143,1 e com C-1' em δ 40,4.

O hidrogênio aromático H-6 (δ 6,47) correlaciona-se com C-1 em δ 124,6, com C-2 em δ 151,1, com C-4 em δ 147,6, com C-5 em δ 143,1 e com C-1' em δ 40,4.

As correlações dos sinais correspondentes as metoxilas e podem ser observados na expansão do espectro (FIGURA 2.48).

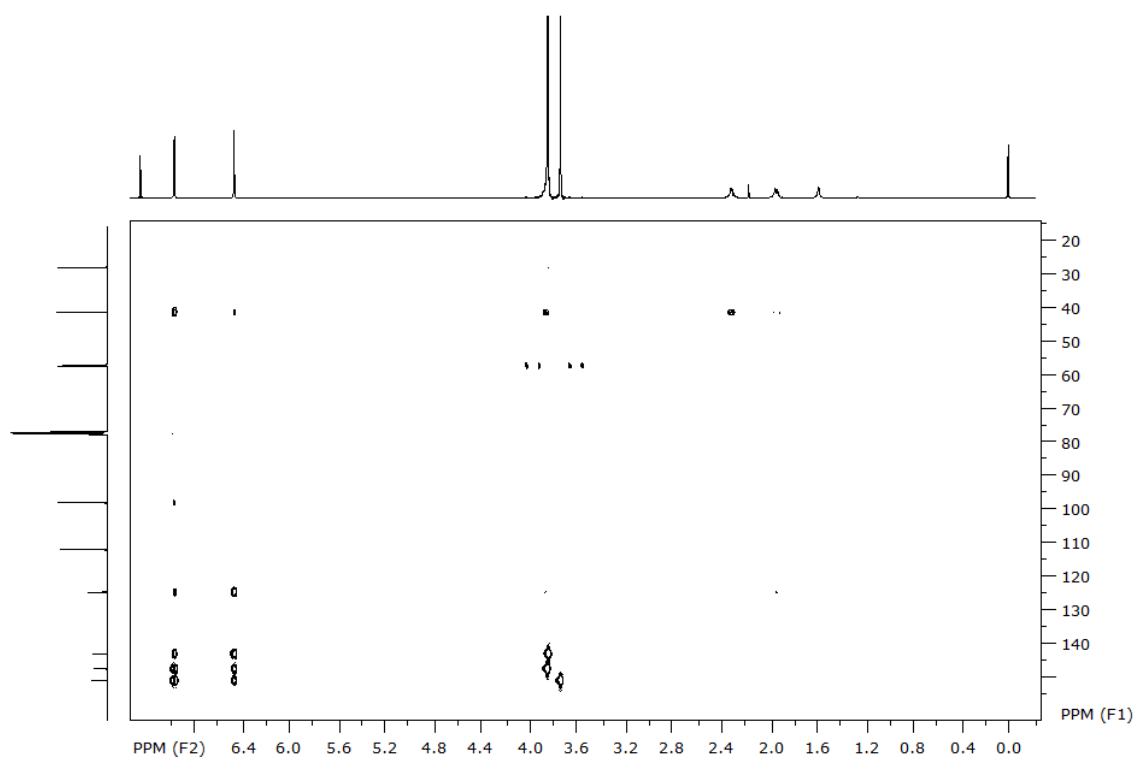


FIGURA 2.48 - Mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

A metoxila em δ 3,85 mostra correlação com um sinal em δ 147,6 atribuído ao carbono C-4. A metoxila em δ 3,84 mostra correlação com um sinal em δ 143,1 atribuído ao carbono C-5. A metoxila em δ 3,74 mostra correlação com um sinal em δ 151,1 atribuído ao carbono C-2. Na FIGURA 2.50 é possível observar as correlações dos hidrogênios H-2'a (δ 2,31) e H-2'b (δ 1,93) com C-1' em δ 40,4.

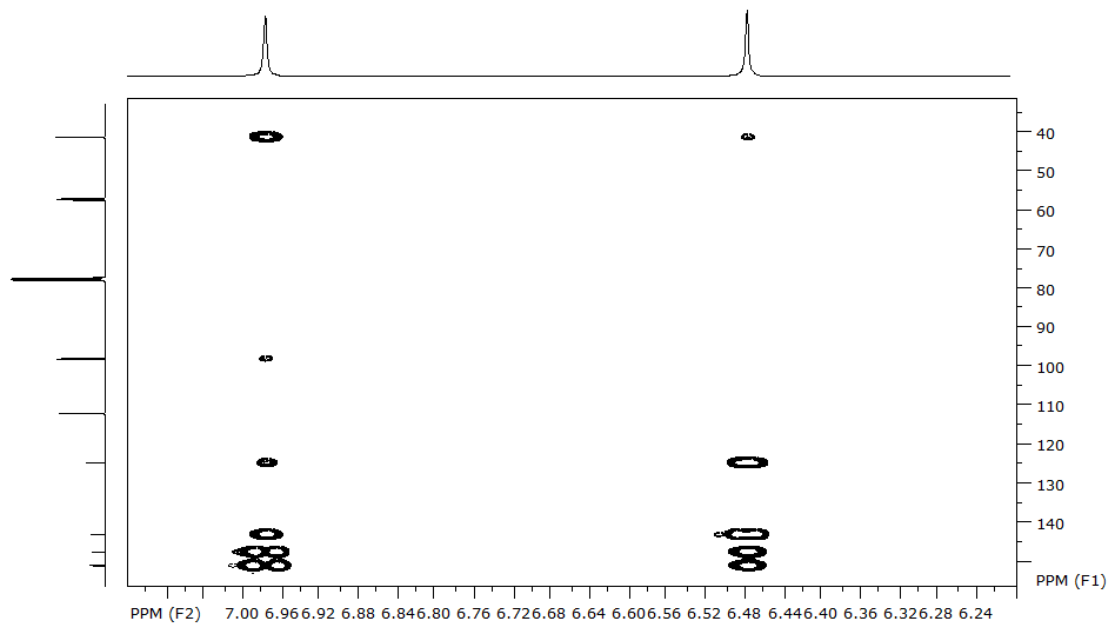


FIGURA 2.49 - Expansão mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

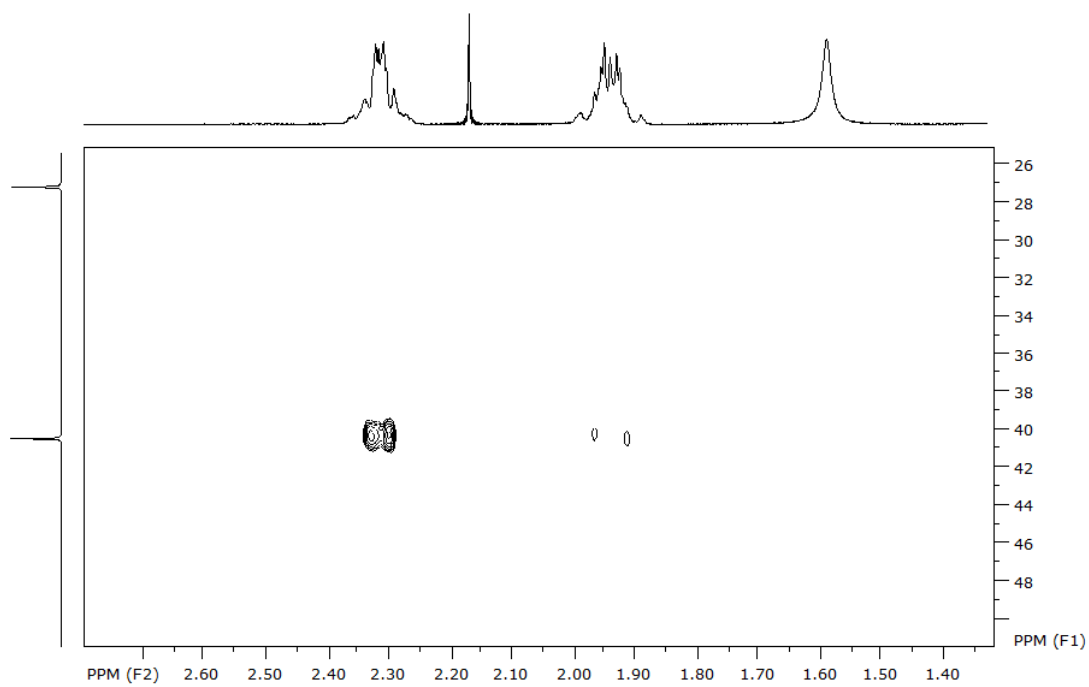


FIGURA 2.50 - Expansão mapa de contorno de HMBC da substância 5 (400 MHz, CDCl_3).

2.10.5 Alcaloides

Dentre os alcaloides isoquinolínicos, os aporfinoídes representam um grupo grande, com mais de 500 alcaloides isolados de mais de 90 gêneros de plantas e/ou sintetizados. Na família Annonaceae, vários alcaloides aporfinoídes são comumente encontrados.

2.10.5.1 Determinação estrutural da lisicamina

A substância 6, lisicamina (FIGURA 2.51) foi isolada do extrato etanólico da partição hexânica das folhas e da partição hexânica da casca dos frutos de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, RMN¹³C, HMBC, HSQC e EM e comparação com a literatura (NACIMENTO, et al., 2008; SIQUEIRA et al., 1998).

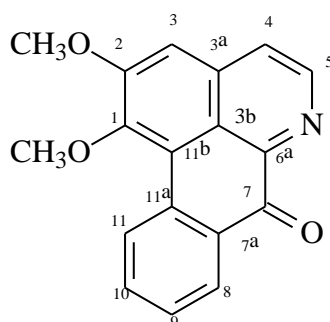


FIGURA 2.51 - Estrutura da lisicamina.

A análise do espectro de RMN¹H e suas expansões (FIGURAS 2.52 a 2.54) indicaram semelhança estrutural com a lisicamina, um alcaloide oxoaporfínico, já relatado na família Annonaceae, porém descrito pela primeira vez na espécie *D. lanceolata*. Os singletos em δ 4,04 (3H), δ 4,13 (3H) correspondem aos H das metoxilas, ligados aos C-1 e C-2 respectivamente.

Os sinais na região de δ 9,21 a 7,26 indicam a presença de hidrogênios ligados a carbonos de anéis aromáticos (daqui para frente indicados apenas como Hidrogênio aromático ou carbono aromático). O sinal δ 9,21 (1H, d, $J = 8,5\text{Hz}$) corresponde ao H-11; δ 8,61 (1H, dd, $J = 7,8$ e $1,6$ Hz) corresponde ao H-8; δ 7,79 (1H, ddd; $J = 8,5, 7,8$ e $1,1\text{Hz}$) corresponde ao H-10 e δ 7,60 (1H; dd, $J = 7,8$ e $1,1\text{Hz}$) corresponde ao H-

9. Os sinais δ 8,93 (d; $J = 5,3\text{Hz}$); δ 7,83 (d; $J = 5,3\text{Hz}$) e δ 7,26 (1H, s) correspondem aos H-5, H-4 e H-3. Estes valores estão descritos na TABELA 2.6.

O espectro de RMN¹³C (FIGURAS 2.52), mostra a presença de 18 carbonos, sendo dois atribuídos as metoxilas em 1 e 2 em δ 60,6 e δ 56,2, respectivamente e um com deslocamento em δ 182,7, atribuído à carbonila da molécula. Os demais dados estão descritos na TABELA 2.7.

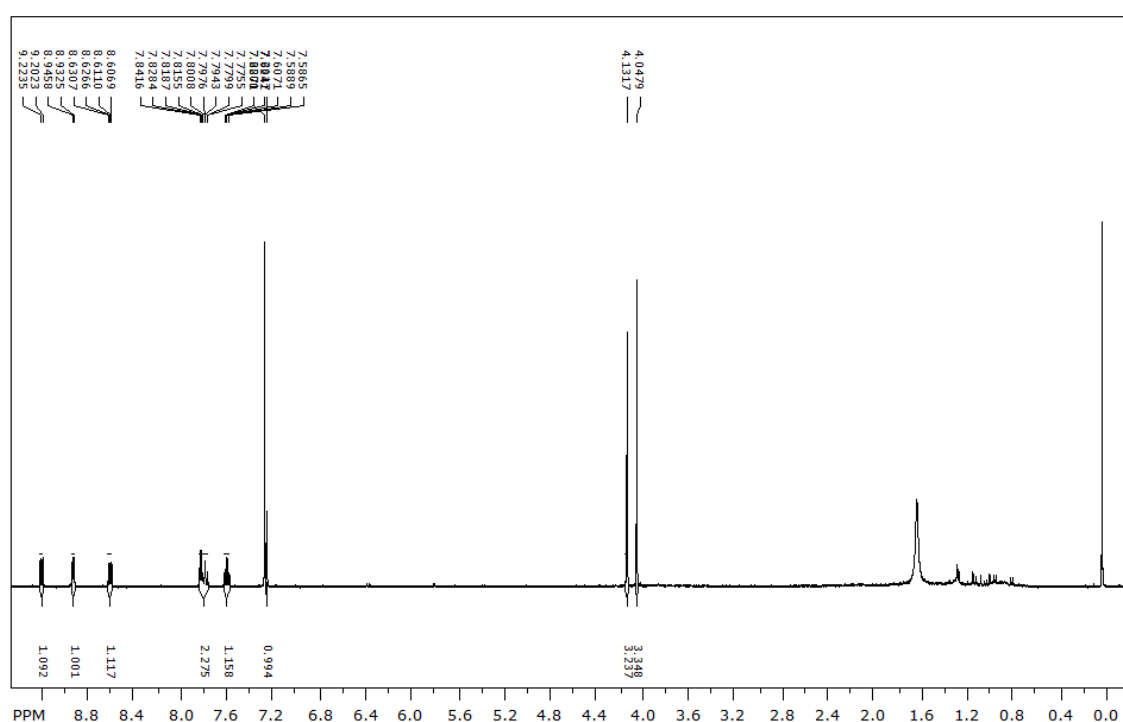


FIGURA 2.52 - Espectro de RMN¹H da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz).

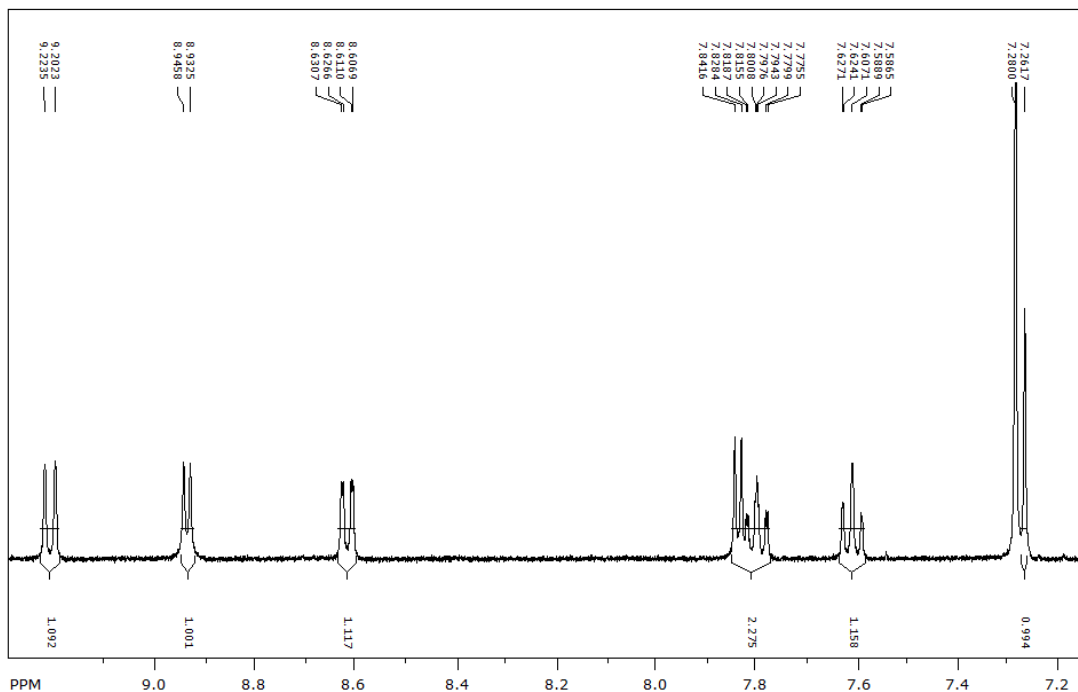


FIGURA 2.53 - Expansão do espectro de RMN¹H da substância 6 (CDCl₃, 400 MHz).

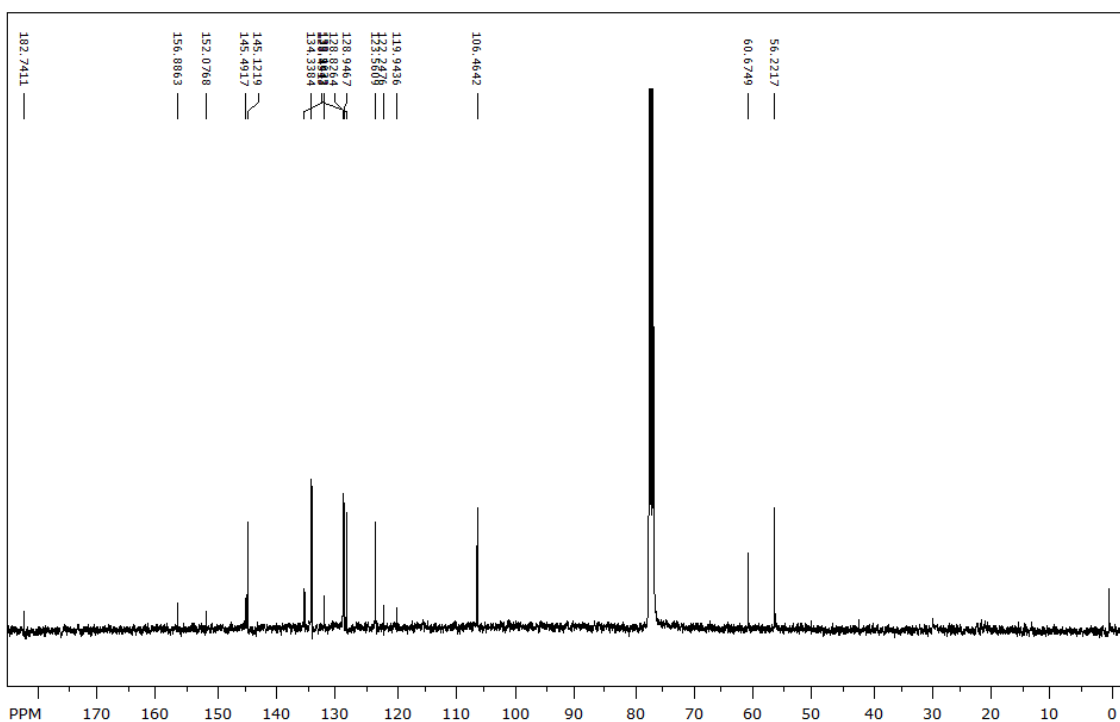


FIGURA 2.54- Espectro de RMN¹³C da substância 6 (CDCl₃, 100 MHz).

TABELA 2.6 - Comparação RMN ¹H da substância 6 com literatura

H	(CDCl₃, 400 MHz)	NASCIMENTO, 2008 (CDCl₃, 400 MHz)
H-3	7,26 (s)	7,28 (s)
H-4	7,83 (d; <i>J</i> = 5,3Hz)	7,82 (d; <i>J</i> = 5Hz)
H-5	8,93 (d; <i>J</i> = 5,3Hz)	8,93 (d; <i>J</i> =5Hz)
H-8	8,61 (dd; <i>J</i> = 7,8 e 1,6Hz)	8,60 (dd; <i>J</i> = 7,7 e 1,5Hz)
H-9	7,60(dd; <i>J</i> = 7,8 e 1,1Hz)	7,59 (dd; <i>J</i> = 7,7 e 1,1Hz)
H-10	7,79 (ddd; <i>J</i> = 8,5, 7,8 e 1,1Hz)	7,78 (ddd; <i>J</i> = 8,1, 7,8e 1,1Hz)
H-11	9.21 (d; <i>J</i> = 8,5Hz)	9.20 (d; <i>J</i> = 8,1Hz)
1-OCH ₃	4,04 (s)	4,03 (s)
1-OCH ₃	4,13 (s)	4,12 (s)

TABELA 2.7 - Comparação RMN ¹³C da substância 6 com literatura

C	(CDCl₃, 100 MHz)	NASCIMENTO, 2008 (CDCl₃, 100 MHz)
1	152,0	151.0
2	156,3	155.8
3	106,4	105.4
3 ^a	135,5	134.5
3b	122,2	121.2
4	123,5	122.6
5	145,1	144.0
6 ^a	145,4	144.3
7	182,7	181.7
7 ^a	134,3	133.3
8	128,8	127.8
9	128,9	127.9
10	134,3	133.4
11	128,4	127.4
11 ^a	132,1	131.04
11b	119,9	118.8
1-OCH ₃	60,6	59.7
2-OCH ₃	56,2	55.2

O espectro de HSQC e suas expansões (FIGURA 2.55) mostram correlação a 1J dos H e C ligados diretamente. Os sinais dos hidrogênios aromáticos mostram correlação a 1J dos H-3 em δ 7,26 (s) com C-3 em δ 106,4, H-4 em δ 7,83 (d) com C-4 em δ 123,5, H-8 em δ 8,61 (dd) com C-8 em δ 128,8, H-9 em δ 7,60 (dt) com C-9 em δ 128,9, H-10 em δ 7,79 (dt) com C-10 em δ 134,3 e H-11 em δ 9,21 (dt) com C-11 em δ 128,4. Os sinais das metoxilas δ 4,13 e δ 4,04 correlacionam com carbonos em δ 56,2 e δ 60,6 respectivamente.

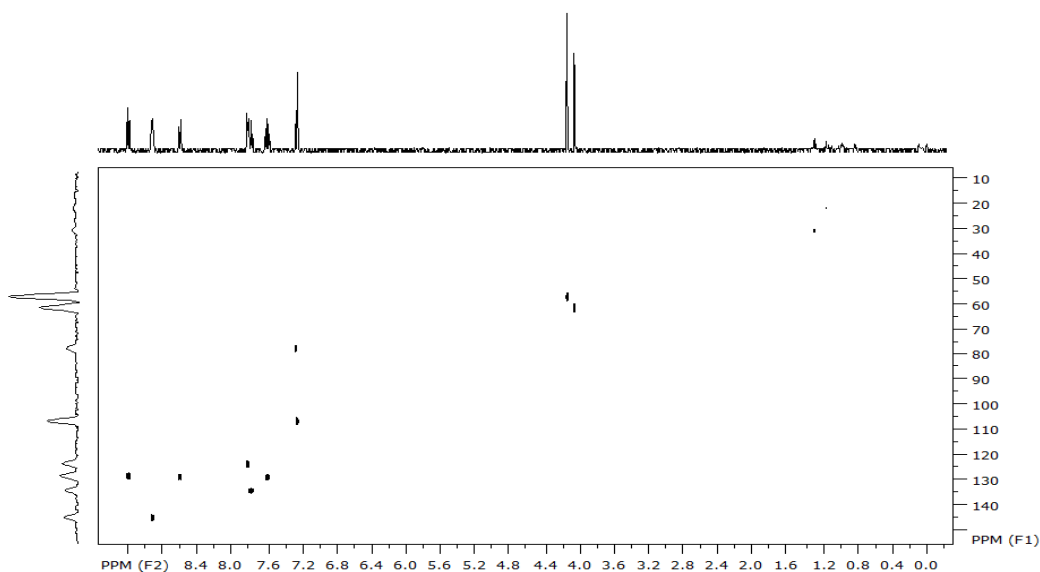


FIGURA 2.55 - Mapa de correlação HSQC da mistura da substância 6 (CDCl_3 , 400 MHz).

O espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (FIGURA 2.56) mostra as correlações entre os hidrogênios. Ao analisá-lo observou-se que o sinal em δ 9,27 que foi atribuído ao H-11 acopla com o sinal em δ 7,84 (H-10). O sinal em δ 8,77 que foi atribuído ao H-5 acopla com o sinal do em δ 8,07 (H-4) e o sinal em δ 8,48 que foi atribuído ao H-8 acopla com o sinal do em δ 7,62 (H-9).

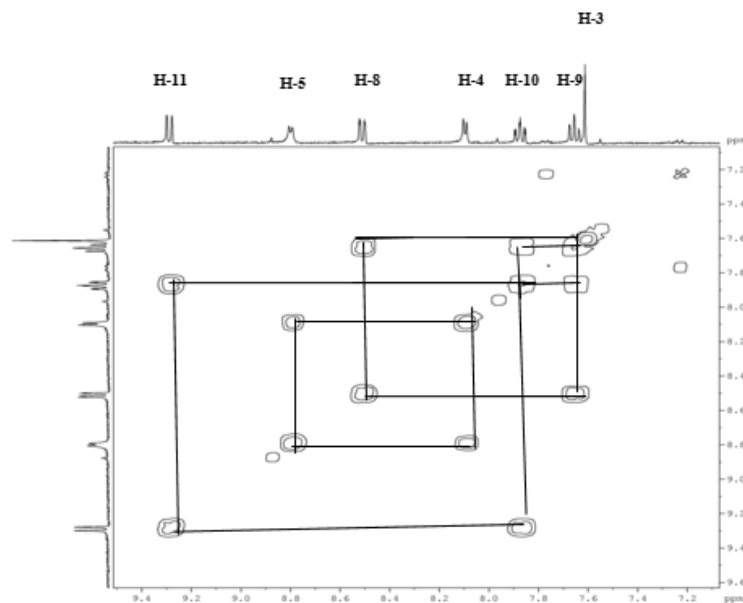


FIGURA 2.56 - Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **6** (400 MHz, MeOD).

Posteriormente, foi realizado análise por espectrometria de massas por inserção direta. O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo positivo (FIGURA 2.57) apresentou um o íon pseudomolecular m/z 292,2- $[\text{M}+\text{H}]^+$ comprovando a massa molecular do composto de 291,2.

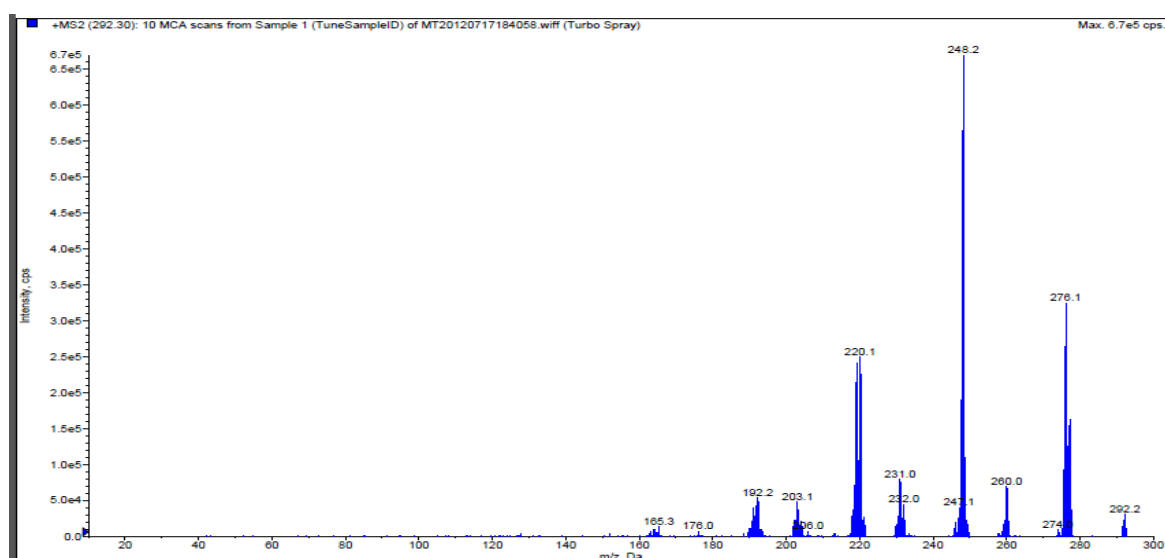


FIGURA 2.57 - Espectro de massas (ESI) no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ com o íons pseudomolecular da liscamina.

O espectro de massas (FIGURA 2.57) mostra o íon pseudomolecular $[M+H]^+$ m/z 292,2 e seus fragmentos. O fragmento m/z 276,1 confirma uma perda neutra de metano ($-CH_4$). O fragmento m/z 248,2 é oriundo da perda consecutiva de metano ($-CH_4$) e um dióxido de carbono ($-CO$).

Já o fragmento m/z 260,0 pode ser atribuído a perda de um metanol (CH_3OH) a partir do íon pseudomolecular $[M+H]^+$ m/z 292,2. A proposta de fragmentação pode ser observada na FIGURA 2.58.

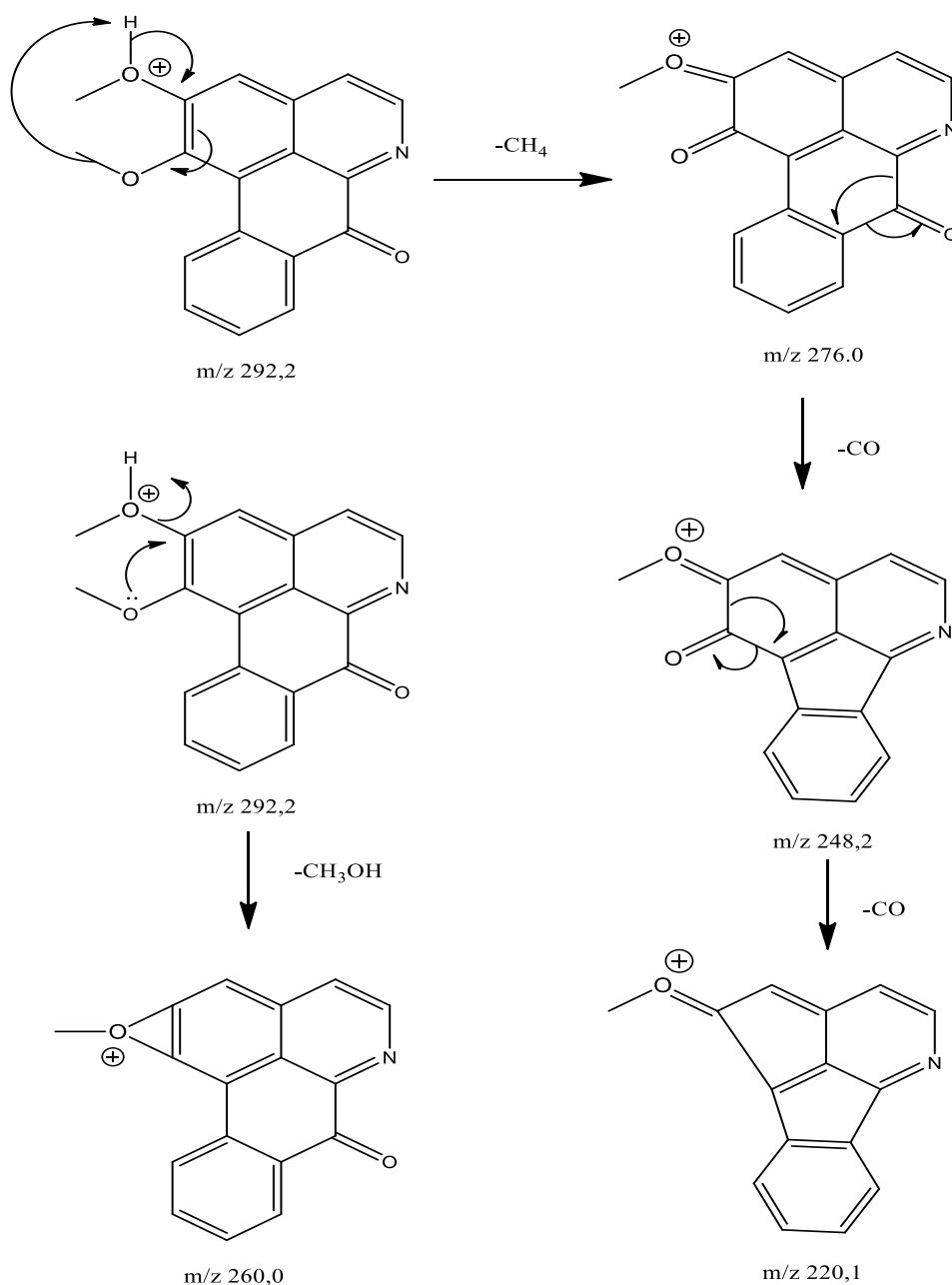


FIGURA 2.58 - Proposta de fragmentação da lisicamina (ESI, modo positivo).

2.10.5.2 Determinação estrutural da oxoglaucina

A substância 7, identificada como oxoglaucina (FIGURA 2.59) foi isolada do extrato etanólico da partição hexânica das folhas de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, HMBC, HSQC e EM. Devido à pouca massa da amostra não foi possível realizar o experimento de RMN¹³C.

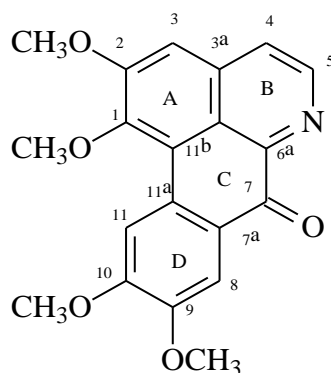


FIGURA 2.59 – Estrutura da oxoglaucina.

A análise do espectro de RMN¹H e suas expansões (FIGURA 2.60 e 2.61) indicou a presença de um alcaloide oxoaporfínico. Os singletos em δ 4,00 (3H), δ 4,05 (3H), δ 4,08 (3H) e δ 4,11 (3H), são característicos de metoxilas. Os sinais na região de δ 8,84 a 7,51 indicam a presença de hidrogênios aromáticos. Estes hidrogênios sendo singletos, sugerem as metoxilas como substituintes nos C-1, C-2, C-9 e C-10.

Os sinais δ 8,84 (1H, s) corresponde ao H-11; δ 7,93 (1H, s) corresponde ao H-8, característicos de hidrogênios presentes no anel D do esqueleto oxoaporfínico, com substituintes em C-9 e C-10. Já o sinal em δ 7,51 (1H, s) corresponde ao H-3 do anel A. O par de sinais com deslocamentos químicos em δ 8,01 (1H, d, $J = 5,3$ Hz); δ 8,74 (1H, d, $J = 5,3$ Hz) correspondem aos hidrogênios α e β do anel piridínico (anel B), atribuídos aos H-4, H-5, respectivamente.

No espectro de COSY ¹H-¹H 45° (FIGURAS 2.62 e 2.63) observou-se que o sinal em δ 8,01 que foi atribuído ao H-4 acopla com o sinal em δ 8,74 (H-5).

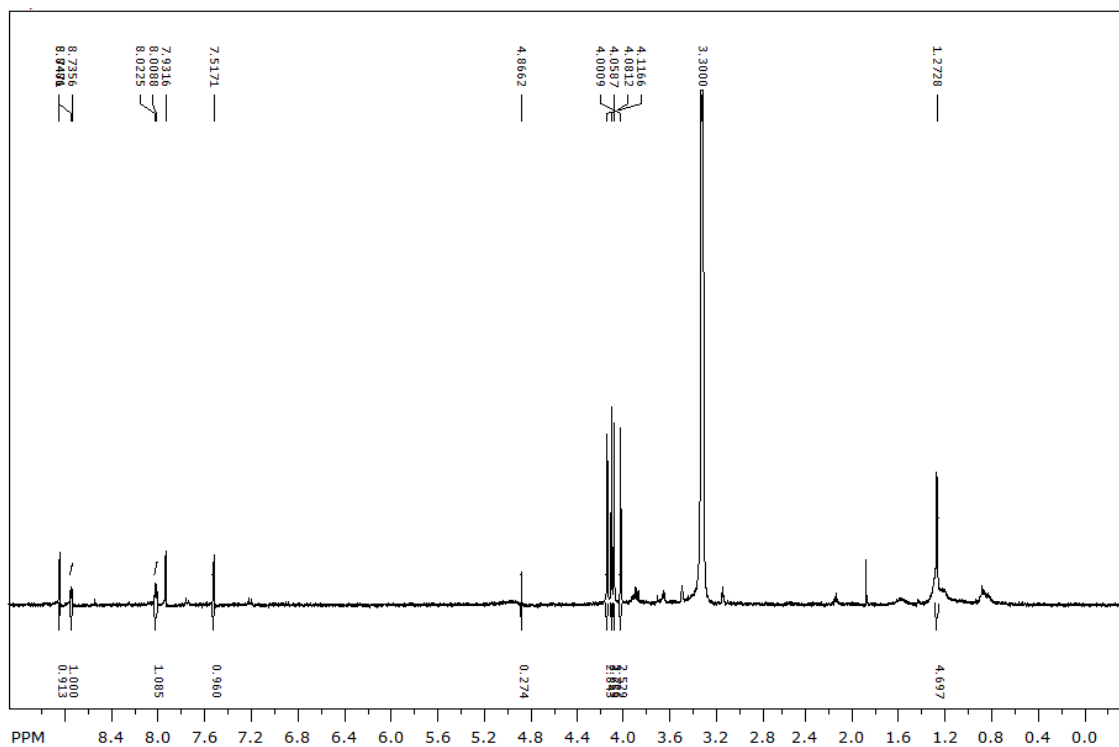


FIGURA 2.60 - Espectro de RMN¹H da substância 7 (MeOD, 400 MHz).

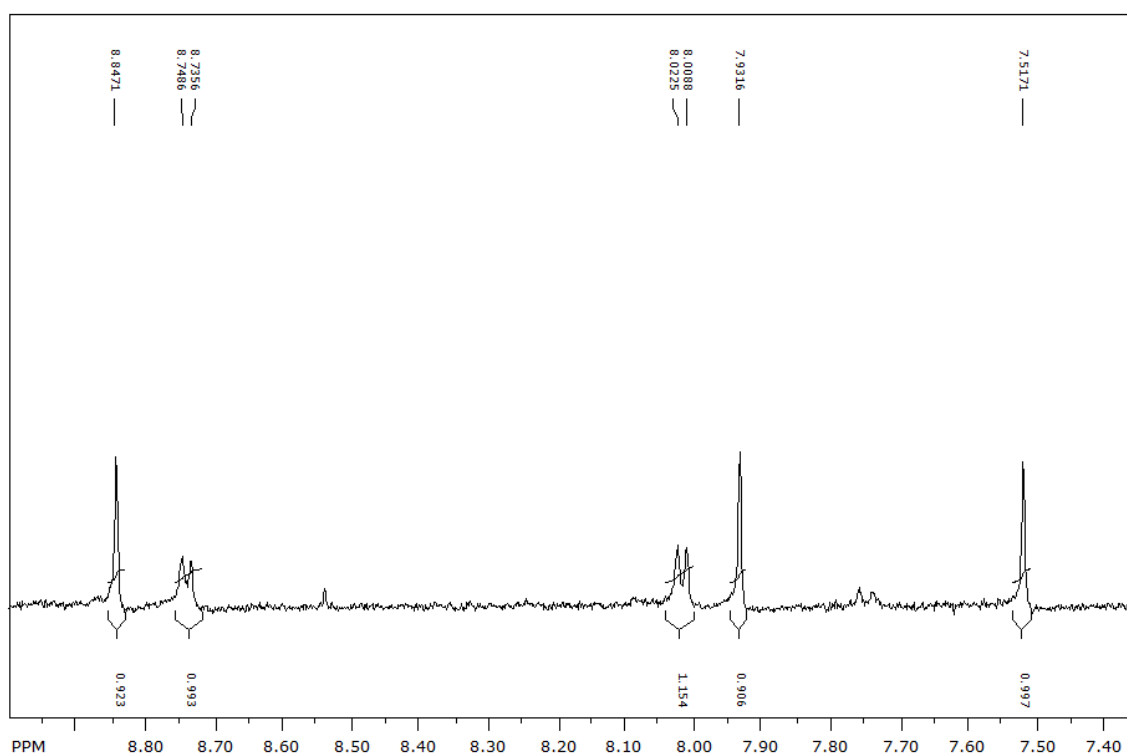


FIGURA 2.61 - Expansão do espectro de RMN¹H da substância 7 (MeOD, 400 MHz).

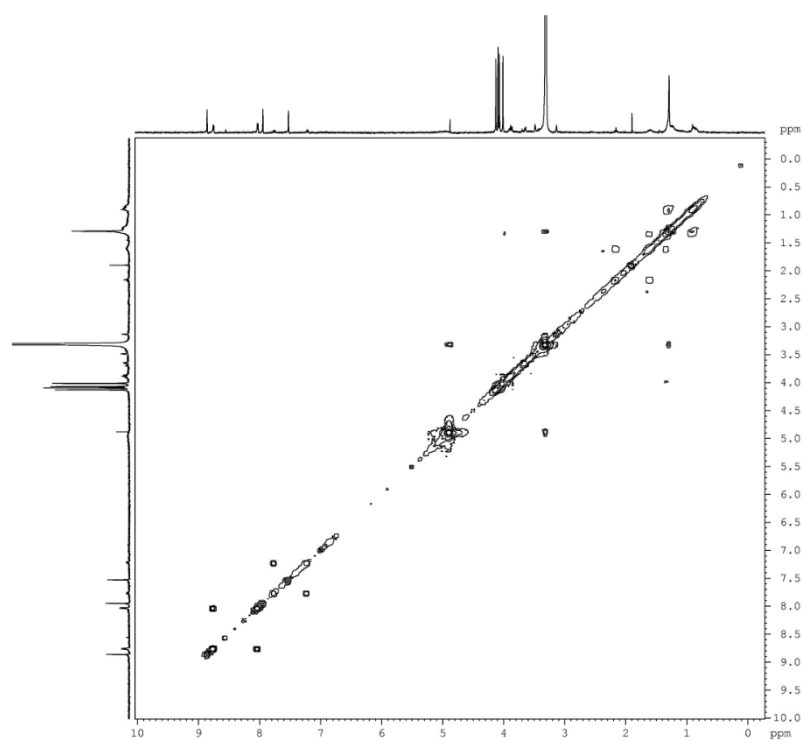


FIGURA 2.62 - Espectro de COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ 45° da substância 7 (400 MHz, MeOD).

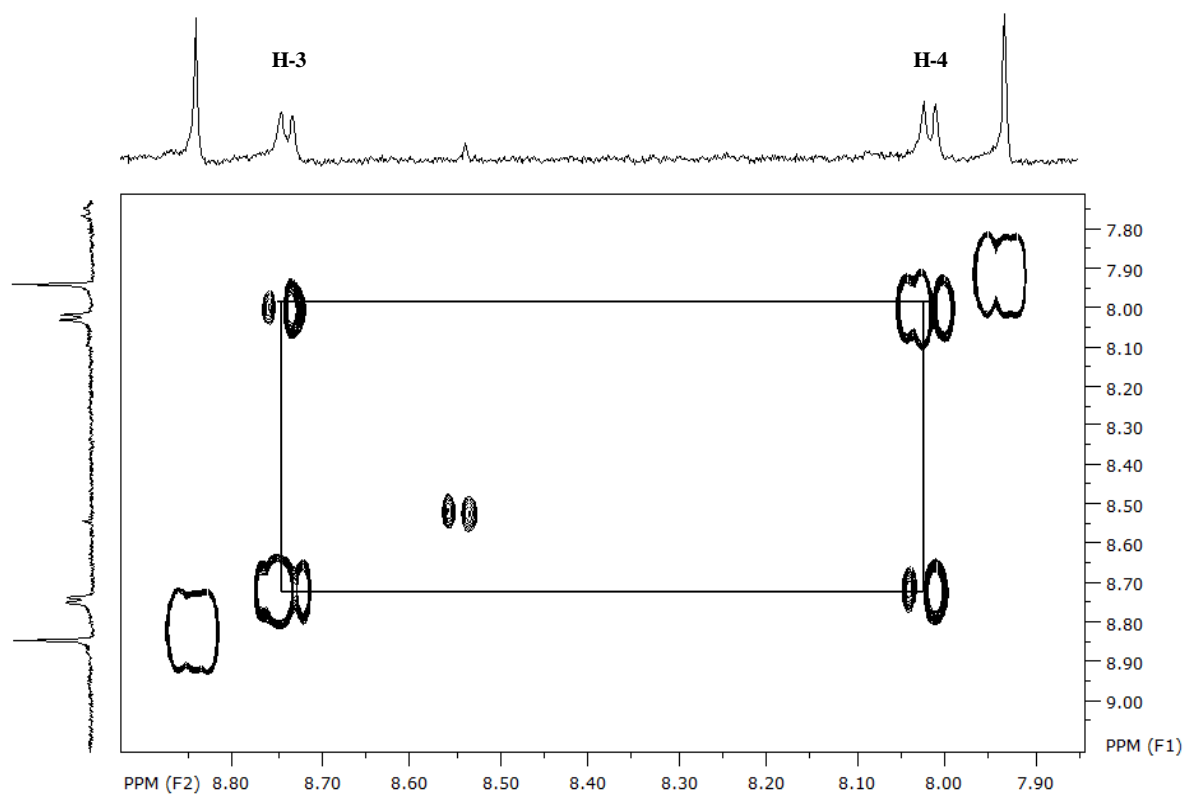


FIGURA 2.63 - Expansão do espectro de COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ 45° da substância 7 (400 MHz, MeOD).

No mapa de contorno HSQC e suas expansões (FIGURA 2.64 e 2.65), os sinais dos hidrogênios aromáticos mostram correlação a ^{13}C dos H-3 em δ 7,51 (s) com C-3 em δ 107,97; H-4 em δ 8,01 (d) com C-4 em δ 125,4, H-5 em δ 8,74 (d) com C-4 em δ 144,7, H-8 em δ 7,93 (s) com C-8 em δ 128,7, H-11 em δ 8,84 (s) com C-9 em δ 111,5. Os sinais das metoxilas δ 4,00 (s), δ 4,05 (s), δ 4,08 (s), δ 4,11 (s) correlacionam com carbonos em δ 56,2, δ 56,4, δ 61,0, δ 56,7, respectivamente.

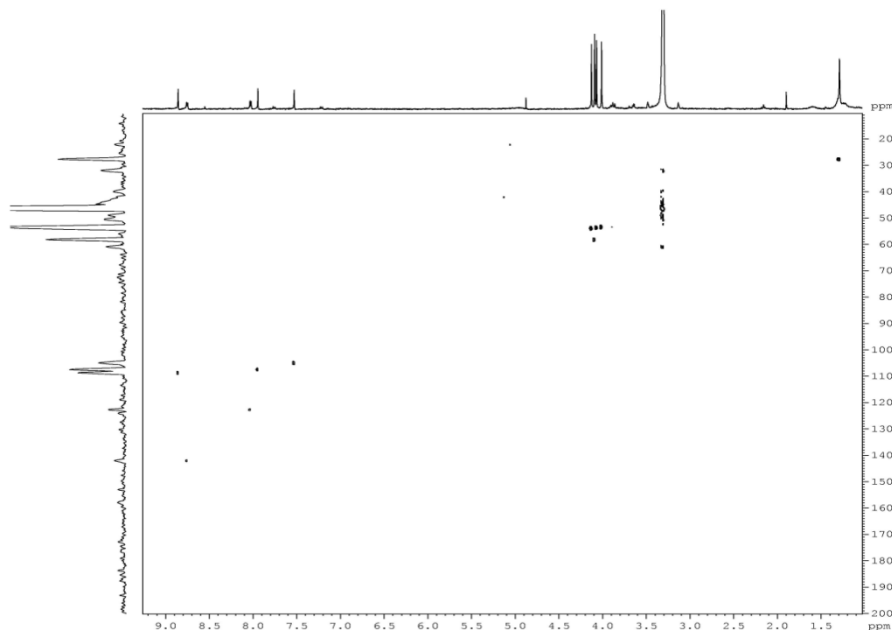


FIGURA 2.64 - Mapa de contorno de HSQC da substância 7 (400 MHz, MeOD).

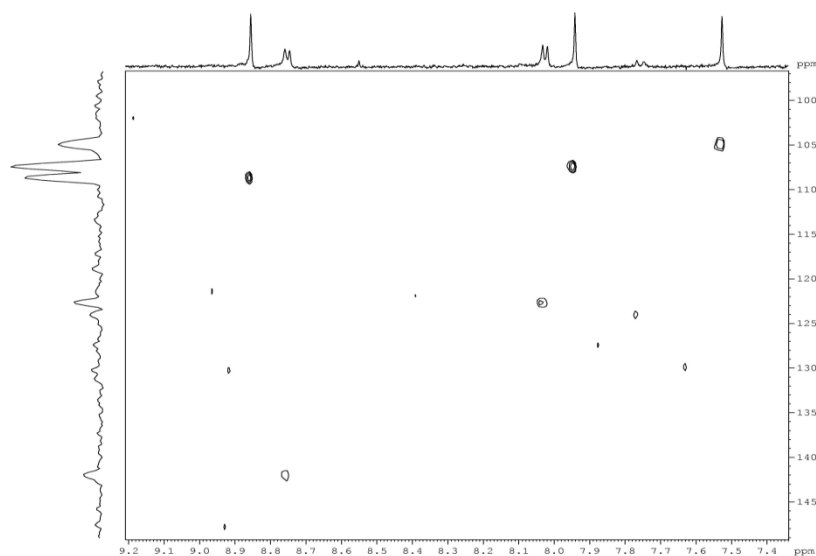


FIGURA 2.65 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 7 (400 MHz, MeOD).

A análise do mapa de contorno HMBC (FIGURA 2.66) mostra sinais das metoxilas em δ H 4,00 (3H), δ H 4,05 (3H), δ H 4,08 (3H), e δ H 4,11(3H) correlacionam-se com carbonos δ 149,7, δ 154,4, δ 152,1 e δ 157,5 atribuídos aos carbonos C-2, C-10, C-1 e C-9, respectivamente.

Outras correlações observadas mapa de contorno de HMBC foram δ H 7,51 (s) atribuído ao H-3 correlacionando-se com carbonos δ 152, δ 125,4 δ 121,1 que foram atribuídos ao C-1, C-4 e C-3b respectivamente.

O sinal δ H 7,93, atribuído ao H-8, correlaciona-se com os carbonos em δ 154,4, δ 129,6, δ 180,9, que corresponde aos carbonos C-10 e C-7a e C-7 (carbono carboxílico), respectivamente. O sinal δ 8,84, atribuído ao H-11, correlaciona-se com os carbonos em δ 154,4, δ 119,1 e δ 149,6 que correspondem aos carbonos C-10, C-11b e C-9, respectivamente.

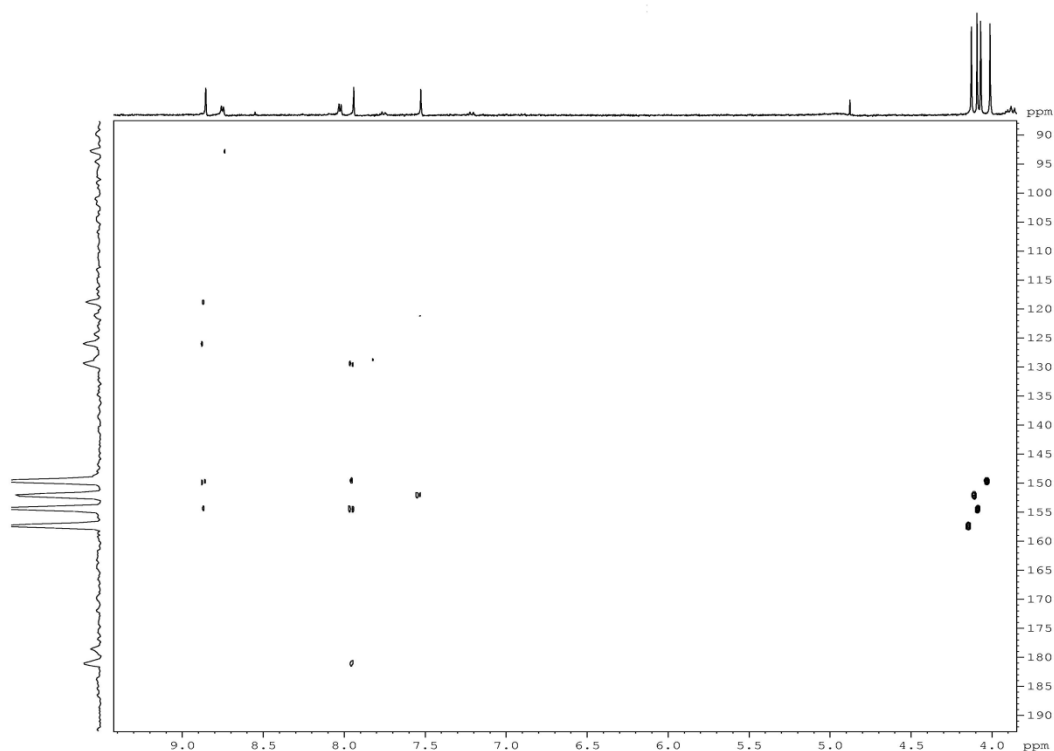


FIGURA 2.66 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 7 (400 MHz, MeOD).

Foi realizado também análise por espectrometria de massas por de inserção direta, no modo positivo. O espectro de massas por electrospray (ESI) (FIGURA 2.67) mostra o íon pseudomolecular $[M+H]^+$, m/z 352,0, que confirma a massa molecular do composto 351,0. Proposta de fragmentação é mostrada na FIGURA 2.68.

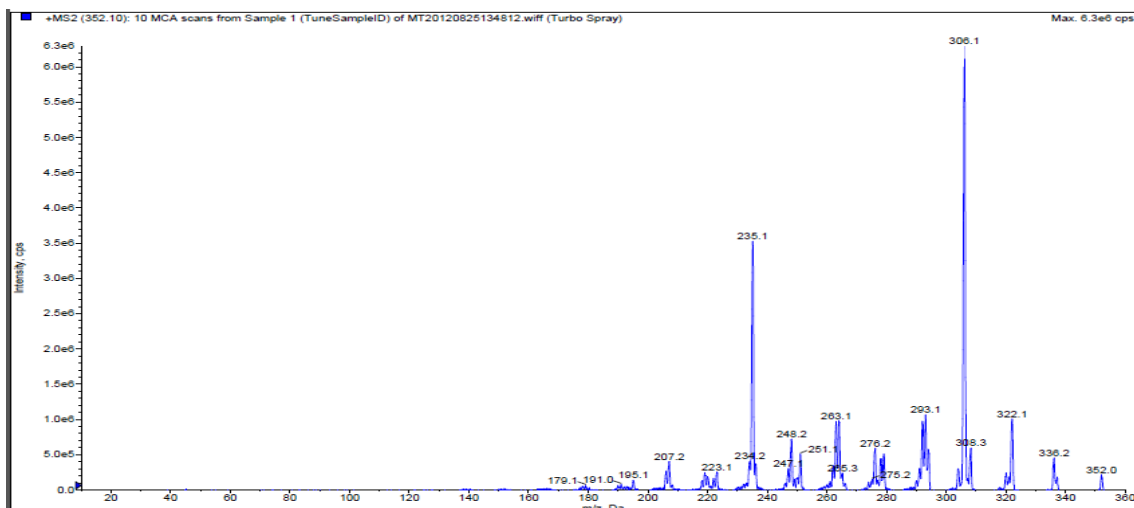
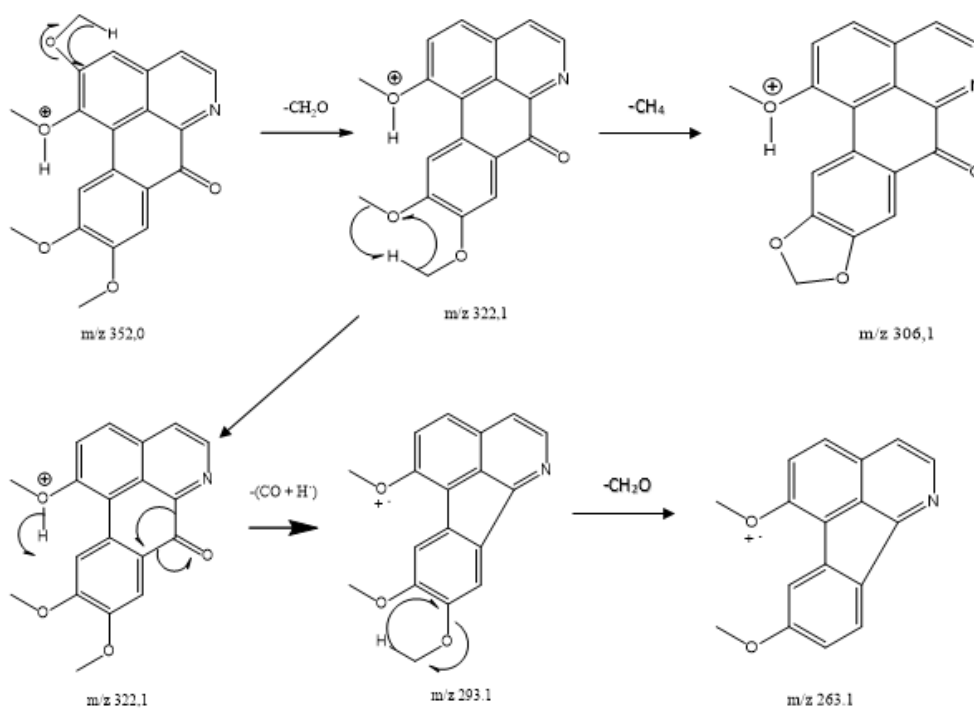


FIGURA 2.67 - Espectro de massas (ESI) no modo positivo $[M+H]^+$ com o íons pseudomolecular da oxoglucina.



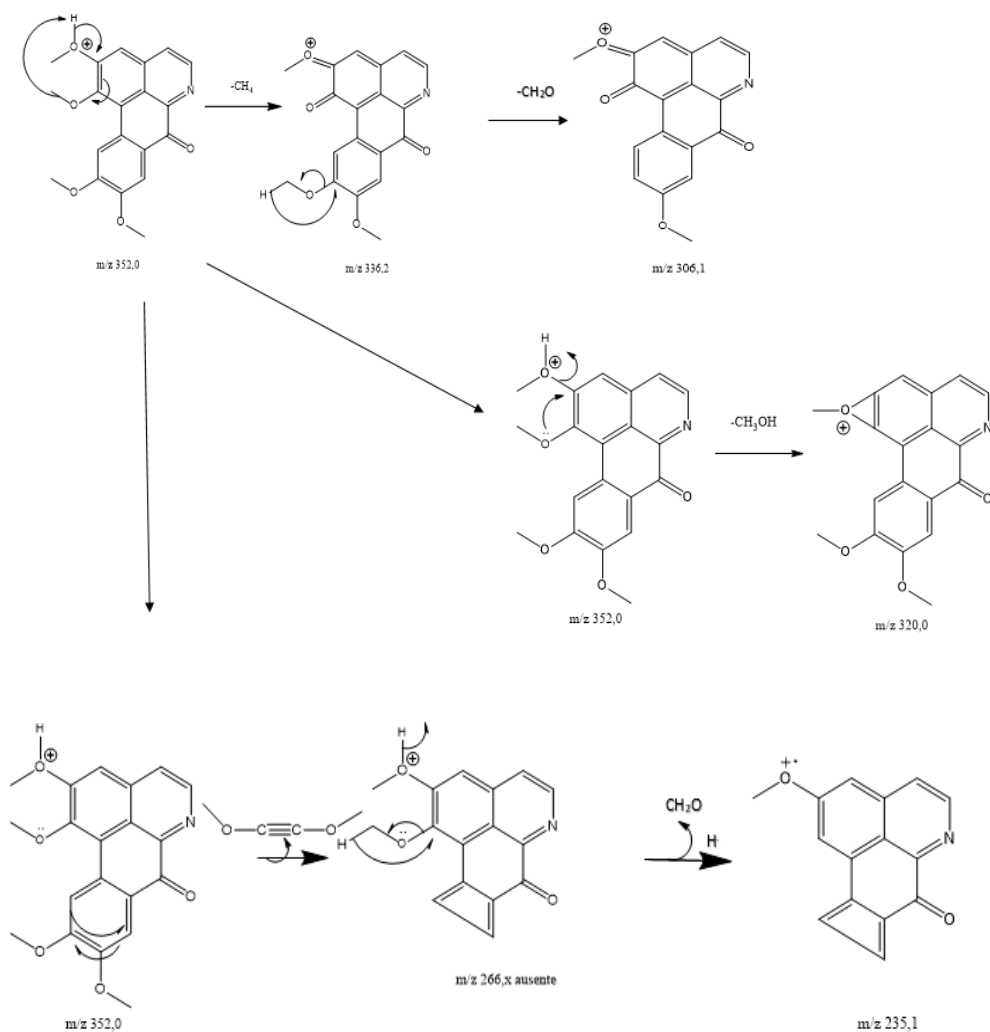


FIGURA 2.68 – Proposta de fragmentação da oxoglaucina (ESI, modo positivo).

2.10.5.3 Determinação Estrutural da glaucina

A substância 8, denominada glaucina (FIGURA 2-69) foi isolada do extrato etanólico da partição hexânica das folhas de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, HMBC, HSQC e EM. Devido à pouca massa da amostra não foi possível realizar o experimento de RMN¹³C.

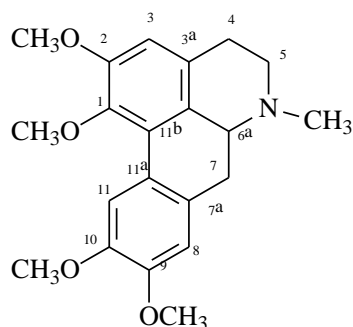


FIGURA 2.69 - Estrutura da glaucina.

A análise do espectro de RMN¹H e suas expansões (FIGURA 2.70 a 2.72) indicou a presença de um alcaloide aporfínico. Os singletos em δ 3,87 (3H), δ 3,85 (3H), δ 3,84 (3H) e δ 3,61 (3H), são característicos de metoxilas. Os singletos na região de δ 7,98 a 6,71 indicam a presença de hidrogênios aromáticos de anéis substituídos nos C-1, C-2, C-9 e C-10.

Os sinais δ 7,98 (1H, s) corresponde ao H-11; δ 6,91 (1H, s) corresponde ao H-8, característicos de hidrogênios presentes no anel D do esqueleto oxoporfínico, com substituintes em C-9 e C-10. Já o sinal em δ 6,71 (1H, s) corresponde ao H-3, do anel A, com substituintes no C-1 e C-2. O singlete δ 2,55 (3H, s) é característico de metila ligada ao nitrogênio N-CH₃). Os sinais atribuídos aos hidrogênios CH₂ ligados no C-4, C-5 e C-7 estão na região de δ 3,10 a δ 2,60.

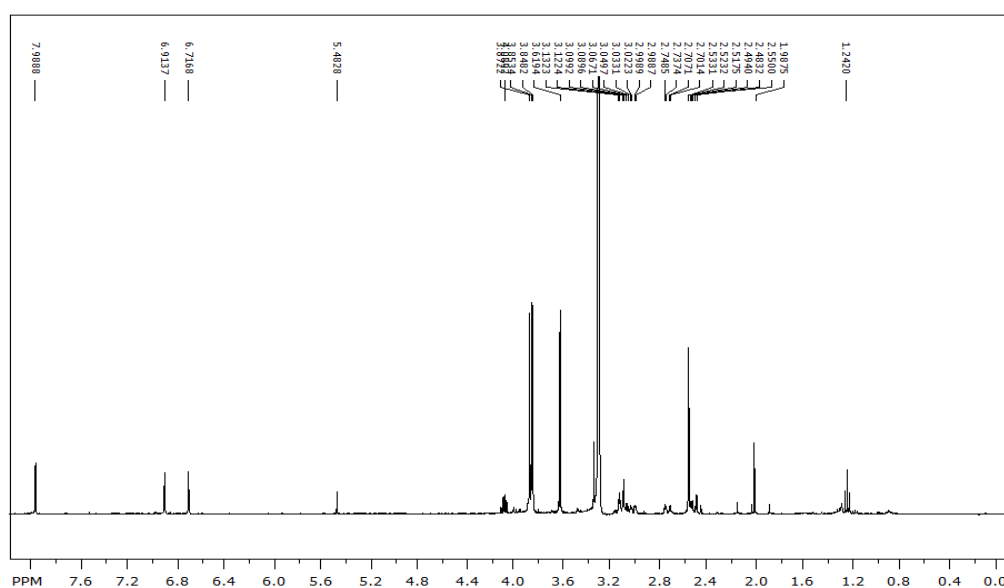


FIGURA 2.70 - Espectro de RMN¹H da substância 8 (MeOD, 400 MHz).

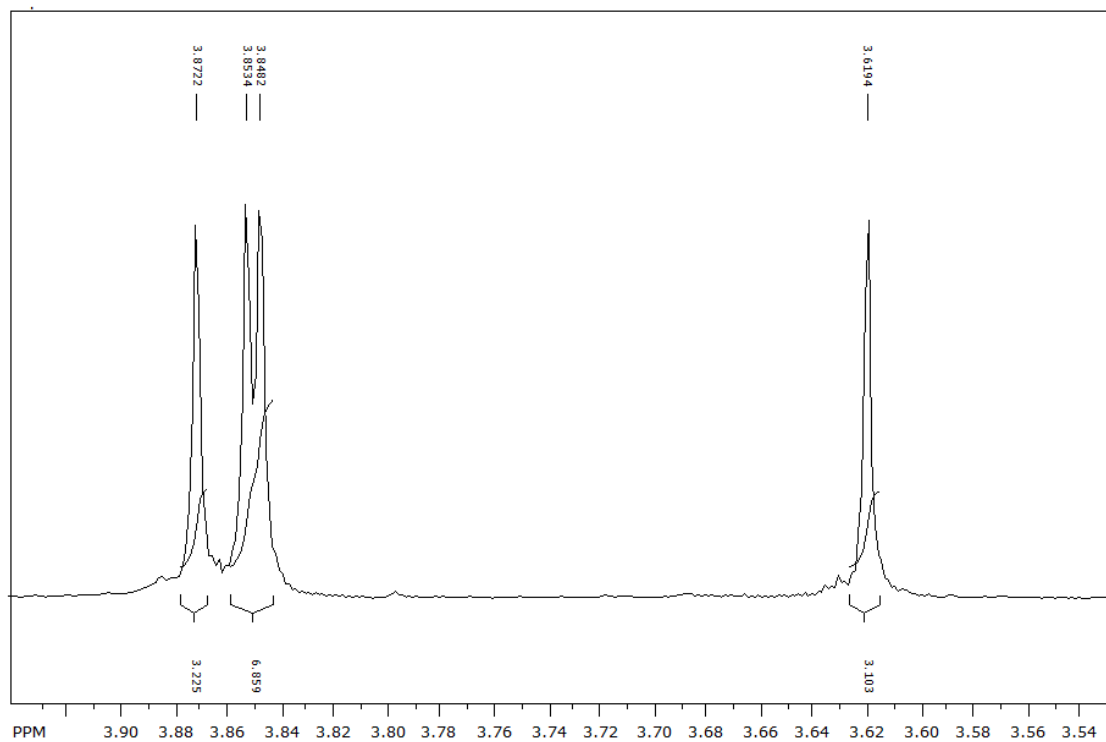


FIGURA 2.71 - Expansão do espectro de RMN¹H da substância 8 (MeOD, 400 MHz).

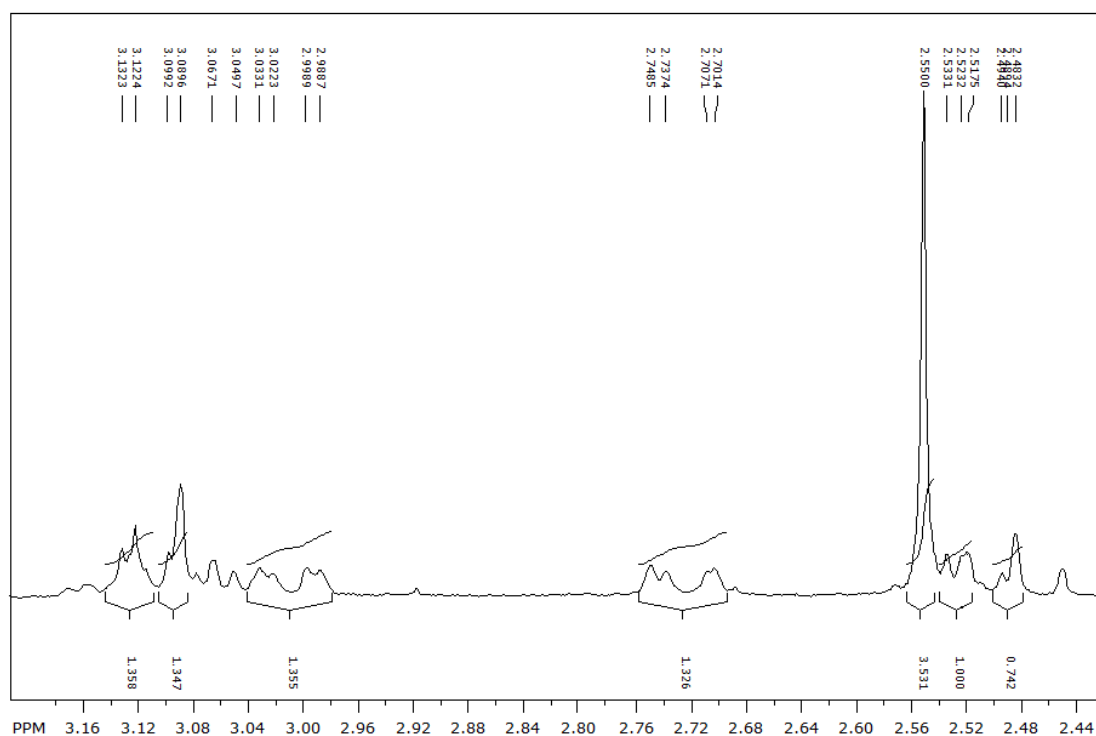


FIGURA 2.72 - Expansão do espectro de RMN¹H da substância 8 (MeOD, 400 MHz).

No espectro de HSQC e suas expansões (FIGURA 2.73 e 2.74) os sinais dos hidrogênios aromáticos mostram correlação a 1J dos H-3 em δ 6,71 (s) com C-3 em δ 110,5, H-8 em δ 6,91 (s) com C-8 em δ 111,2, H-11 em δ 7,98 (s) com C-11 em δ 112,1.

Os sinais referentes ao hidrogênios CH₂ do C-4, C-5 e C-7 mostram as seguintes correlações: H-7' δ 3,10 (1H, *m*), H-7' δ 2,48 (1H, *m*) correlacionam com o carbono C-4 δ 33,5; o H-5' δ 3,08 (1H, *m*), H-5'' δ 2,53 (1H, *m*) correlacionam com o carbono C-5 δ 52,7; o H-4' δ 3,11 (1H, *m*), H-4'' δ 2,17 (1H, *m*) correlacionam com o carbono C-5 δ 52,7.

Os sinais das metoxilas δ 3,87, δ 3,85, δ 3,84 e δ 3,61 correlacionam com carbonos em δ 55,3 δ 55,2 δ 55,1 e δ 59,2, respectivamente. O sinal δ 2,55 (1H, *s*) referente aos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio (N-CH₃), correlaciona-se com o carbono em δ 42,7.

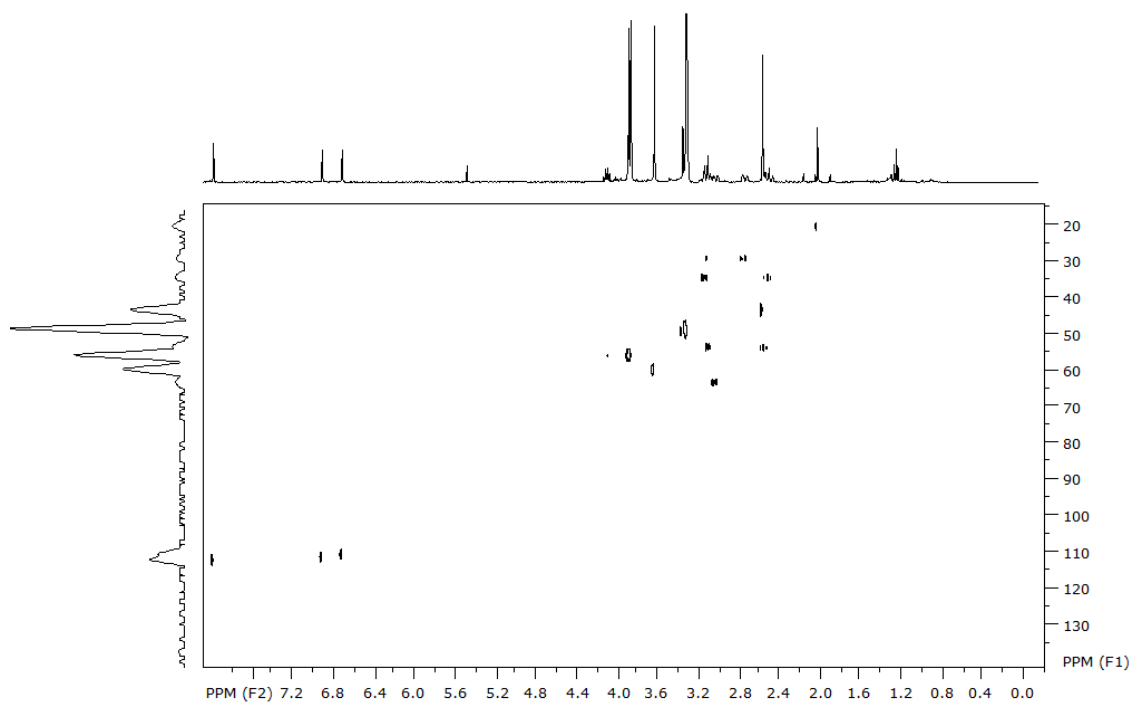


FIGURA 2.73 - Mapa de contorno de HSQC da substância 8 (400 MHz, MeOD).

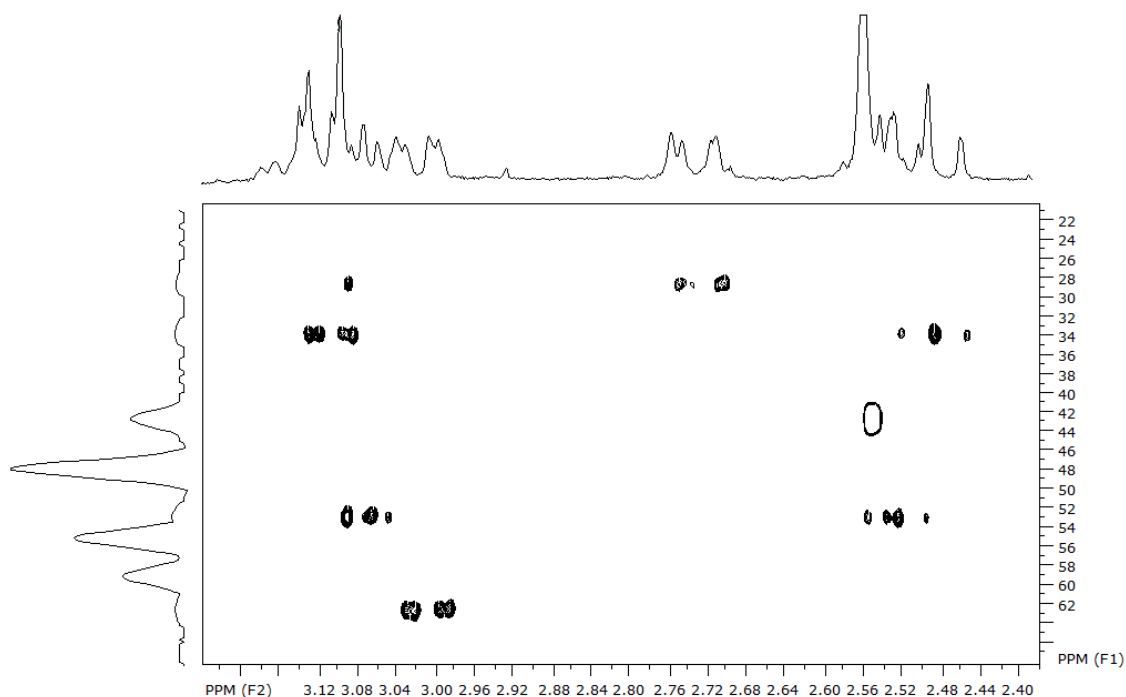


FIGURA 2.74 - Expansão do mapa de contorno de HSQC da substância 8 (400 MHz, MeOD).

A análise do mapa de contorno de HMBC e suas expansões (FIGURA 2.75 e 2.76) mostra as correlações entre hidrogênios e os carbonos que, com estas informações, foi possível atribuir corretamente à posição das metoxilas na molécula.

Os sinais das metoxilas em δ 3,87 (3H), δ 3,85 (3H), δ 3,84 (3H) e δ 3,61 (3H) correlacionam-se com carbonos δ 148,6, δ 147,7, δ 152,5 e δ 144,0 atribuídos aos carbonos C-9, C-10, C-2 e C-1 respectivamente.

Outras correlações observadas mapa de contorno de HMBC foram δ 6,71(1H, s), atribuído ao H-3, correlaciona-se com os carbonos em δ 28,2, δ 126,4, δ 144,5 e δ 152,3 que correspondem aos carbonos C-4 (CH₂), C-3b e C-1, respectivamente.

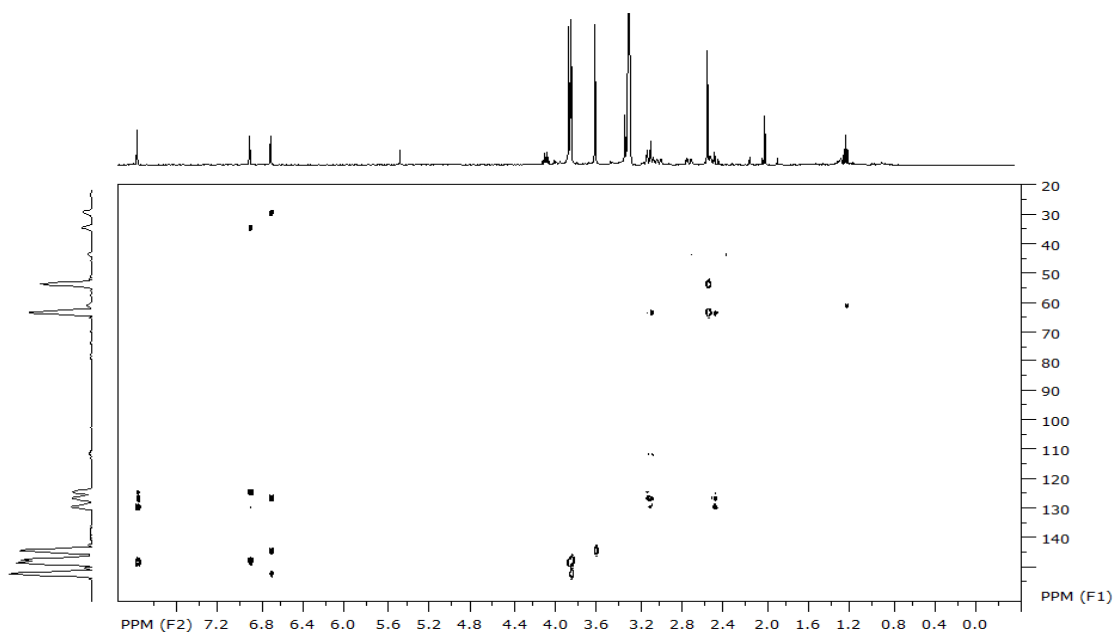


FIGURA 2.75 - Mapa de contorno de HMBC da substância 8 (400 MHz, MeOD).

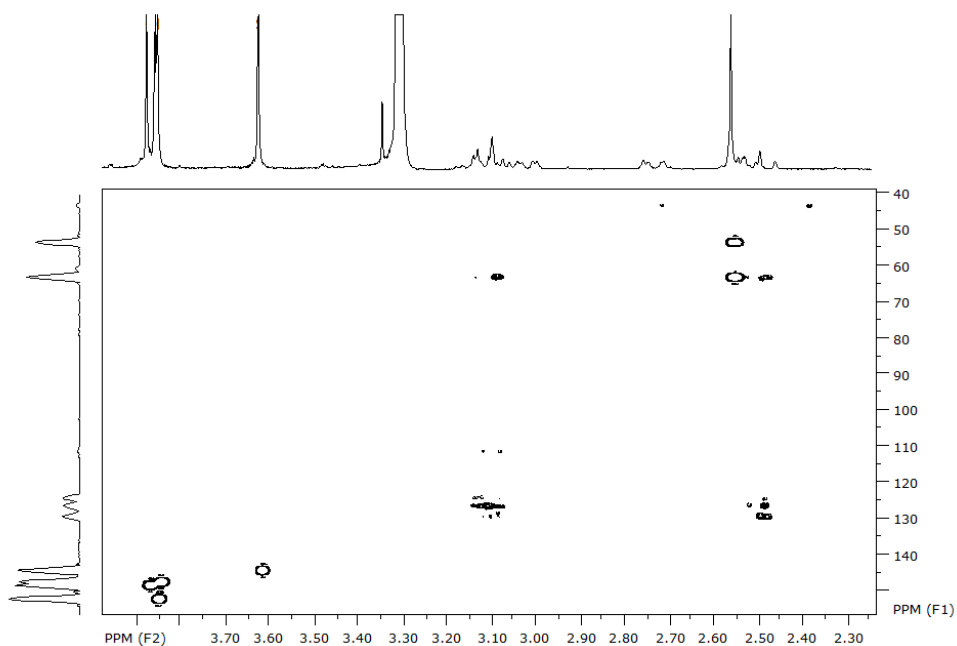


FIGURA 2.76 - Expansão do mapa de contorno de HMBC da substância 8 (400 MHz, MeOD).

O sinal δ H 6,91 (1H, s), atribuído ao H-8 correlacionando-se com carbonos δ 147,7, δ 124,1 δ 33,5 que foram atribuídos ao C-10, C-7b e C-7 (CH₂), respectivamente. O sinal δ H 7,98 (1H, s) atribuído ao H-11, correlaciona-se com o carbono em δ 147,7, que corresponde ao carbono C-10 e os sinais δ 129,4, δ 125,6 dos carbonos C-11a e C-11b respectivamente.

Foi realizado posteriormente um experimento de inserção direta por massas. O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo positivo (FIGURA 2.77) da glaucina que apresentou um o íon pseudomolecular m/z 356,9, $[M+H]^+$ comprovando a massa molecular do composto 355,9.

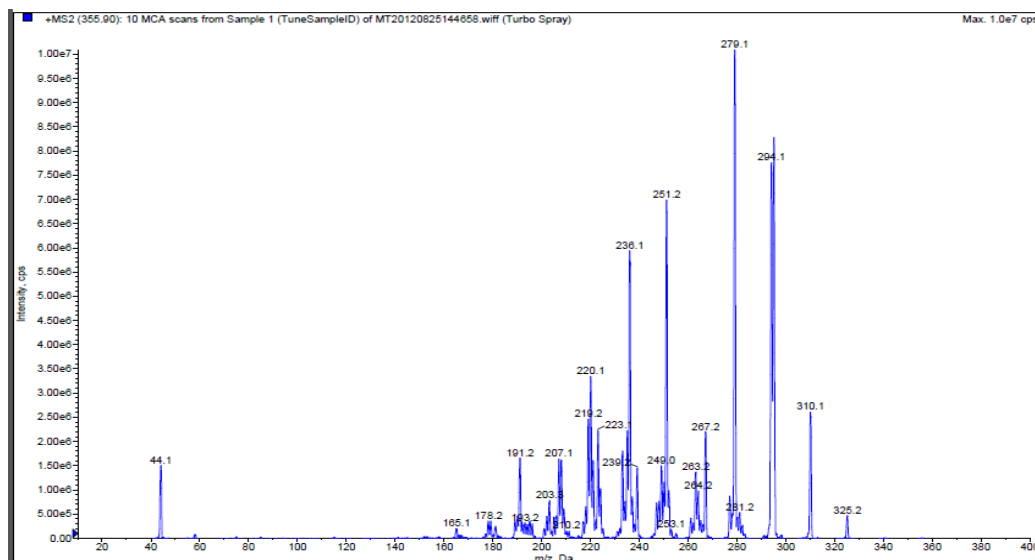


FIGURA 2.77 - Espectro de massas (ESI) no modo positivo $[M+H]^+$ com íons pseudomolecular da glaucina.

2.10.5.4 Determinação estrutural da mistura das substâncias oxolaurelina e lanuginosina

A mistura das substâncias 9 (oxolaurelina) e 10 (lanuginosina) (FIGURA 2.78) foi isolada do extrato etanólico da partição diclorometano da casca dos frutos de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, HMBC, HSQC e CG-MS e comparação com a literatura (NACIMENTO *et al.*, 2008).

A análise do espectro de RMN¹H e suas expansões (FIGURAS 2.79 a 2.81) indicou semelhança estrutural com a oxolaurelina (9) e a lanuginosina (10), alcaloides oxoaporfínicos, já relatados na família Annonaceae, porém descrito pela primeira vez na espécie *D. lanceolata*.

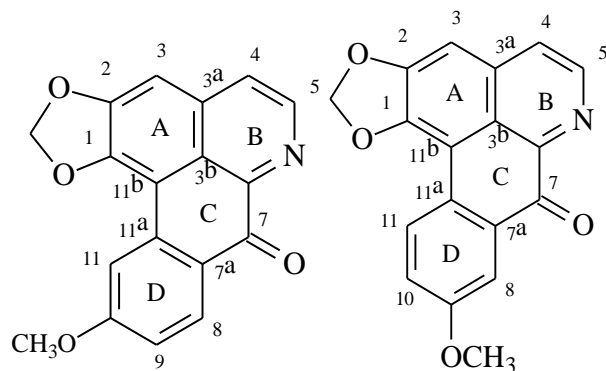


FIGURA 2.78 - Substâncias 9 e 10.

Os espectros de RMN¹H (FIGURAS 2.79 a 2.81) exibem sinais de hidrogênios aromáticos na região de em δ 7,17 a δ 8,90 característicos dos alcaloides oxoaporfínicos. Através da integração dos sinais observa-se que a proporção das substâncias é de 3:1 da lanuginosina e oxolaurelina, respectivamente.

Os singletos em δ 6,35 (2H) e δ 6,38 (2H) foram atribuídos aos hidrogênios metilenodioxidos (OCH₂O) da lanuginosina e oxolaurelina respectivamente. Já os singletos em δ 7,17 (1H) e δ 7,22 (1H) foram atribuídos aos hidrogênios H-3 do anel A das respectivas moléculas. Os dados de ambas as substâncias foram descritos e comparados com a literatura na TABELA 2.8. Estes dados foram confirmados através dos mapas de correlações HSQC e HMBC, FIGURAS 2.82 e 2.83.

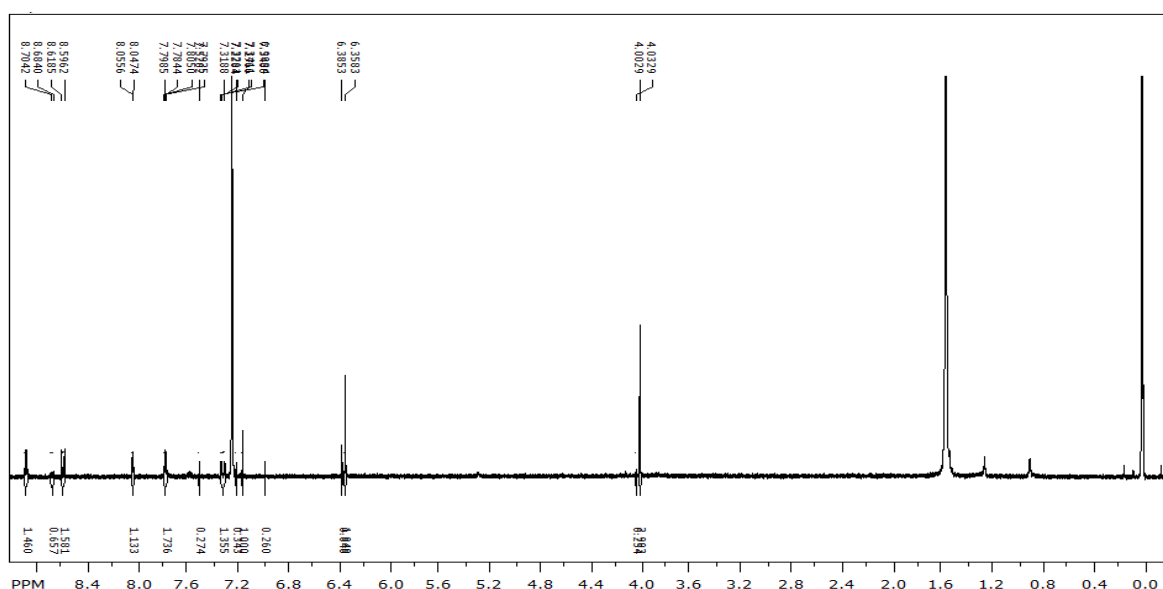


FIGURA 2.79 - Espectro de RMN¹H das substâncias 9 e 10 (CDCl₃, 600 MHz).

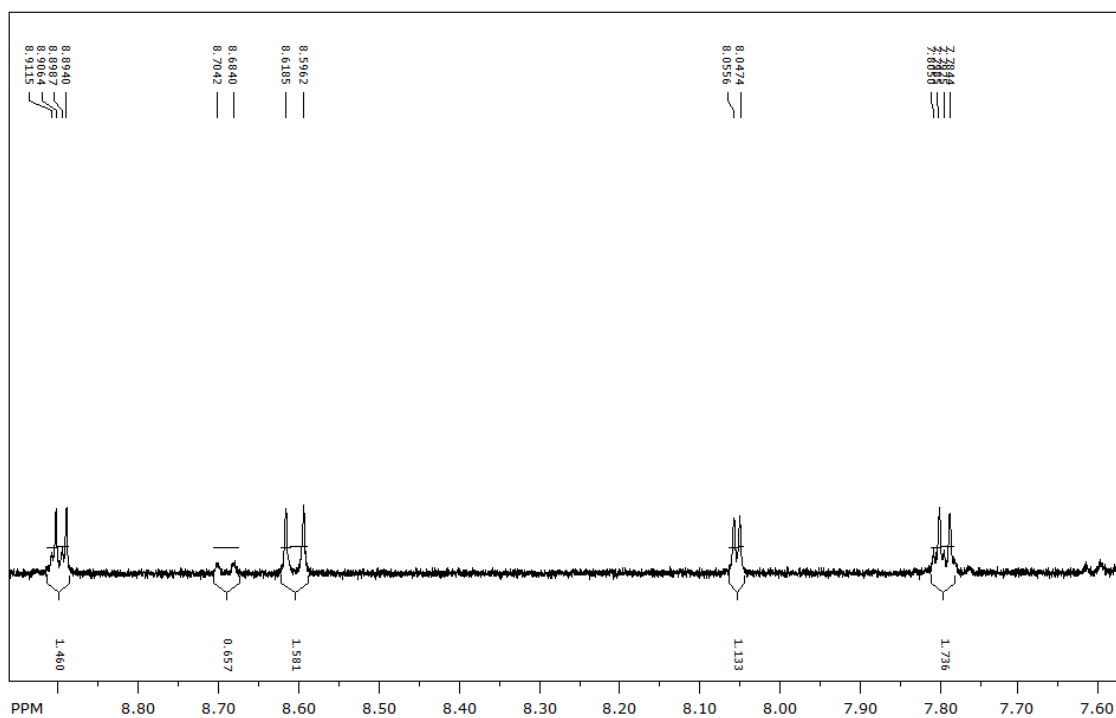


FIGURA 2.80 - Espectro de RMN¹H das substâncias 9 e 10 (CDCl₃, 600 MHz).

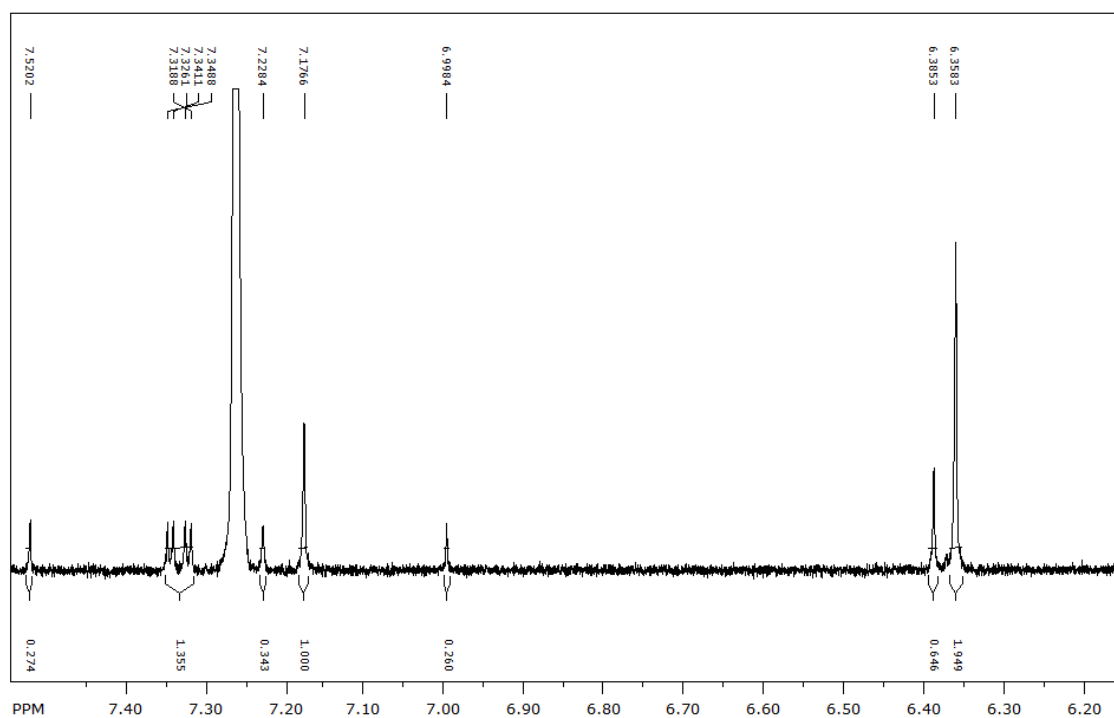


FIGURA 2.81 - Espectro de RMN¹H das substâncias 9 e 10 (CDCl₃, 600 MHz).

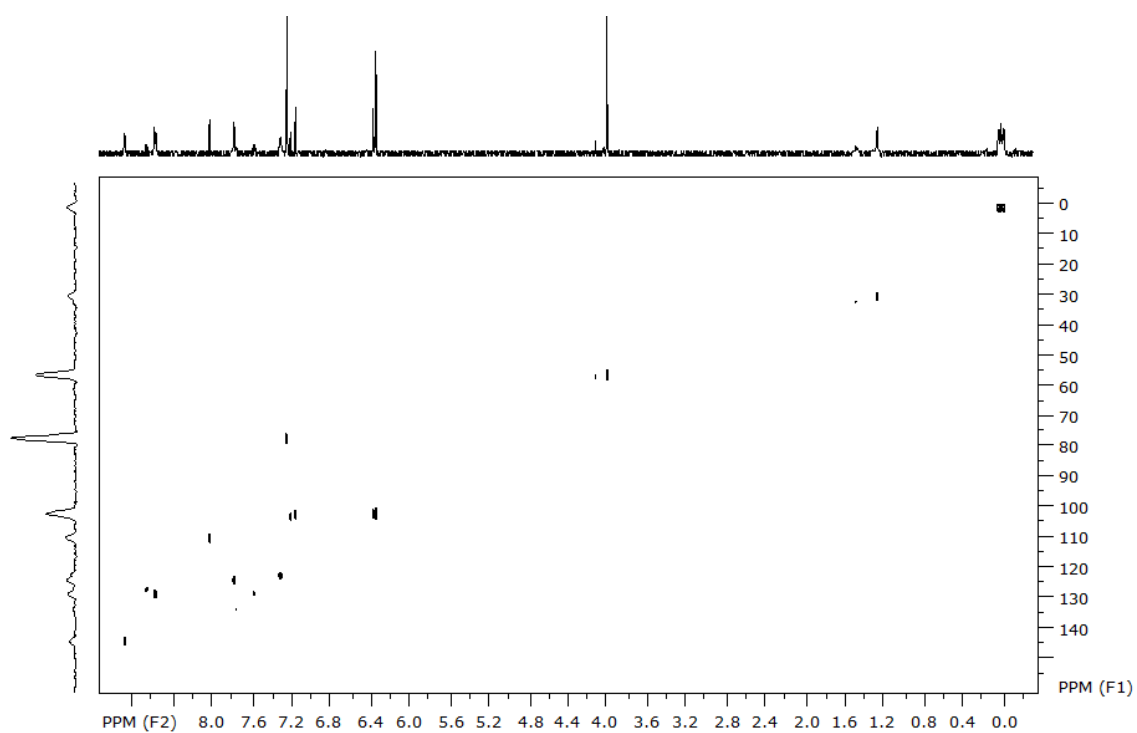


FIGURA 2.82 - Mapa de correlação HSQC da mistura das substâncias 9 e 10 (CDCl₃, 600 MHz).

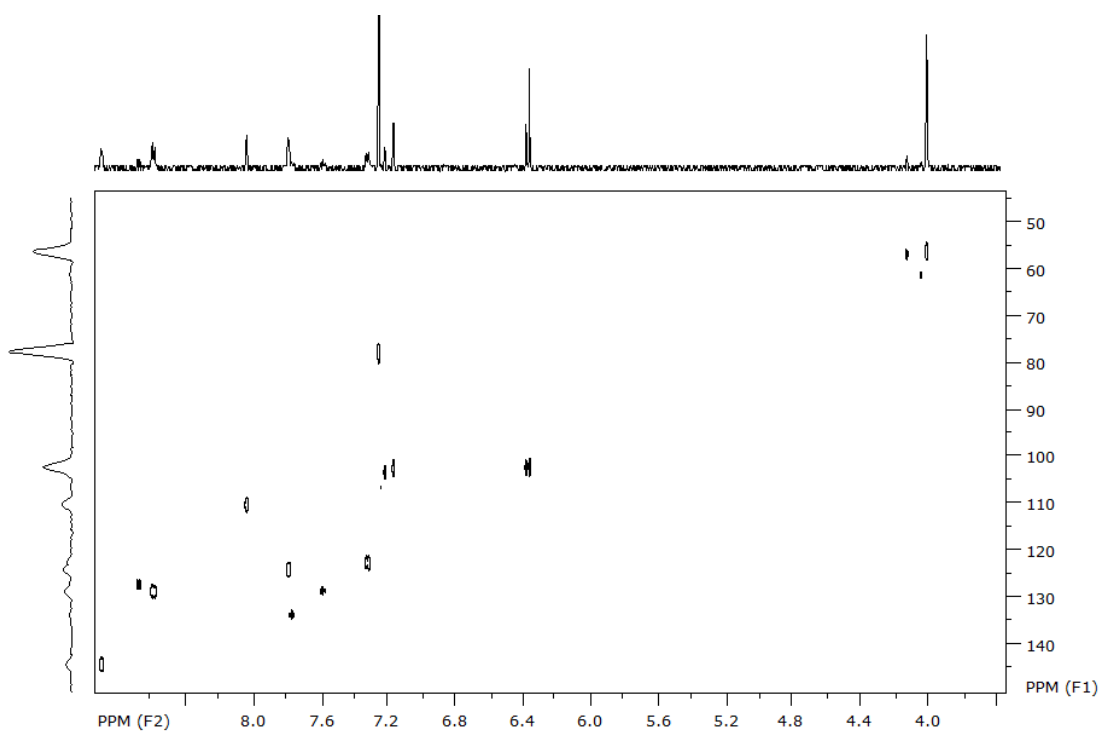


FIGURA 2.83 - Mapa de correlação HSQC ampliado da mistura das substâncias 9 e 10 (CDCl₃, 600 MHz).

TABELA 2.8 - Comparação de RMN ¹H da mistura das substâncias 9 e 10 com literatura

H	Substância 9 (CDCl ₃ , 600 MHz)	Oxolaurelina NASCIMENTO, 2008 (CDCl ₃ ,400 MHz)	Substância 10 (CDCl ₃ , 600 MHz)	Lanuginosina NASCIMENTO, 2008 (CDCl ₃ ,400 MHz)
H-3	7,22(s)	7,23(s)	7,17(s)	7,14(s)
H-4	7,79 (d; J = 5Hz)	7,76 (d; J = 5Hz)	7,80(d; J = 5Hz)	7,80 (d; J = 6Hz)
H-5	8,90 (d; J = 5Hz)	8,89 (d; J = 5Hz)	8,90 (d; J = 5Hz)	8,89 (d; J = 6Hz)
H-8	8,60 (d; J = 8,9Hz)	8,58 (d; J = 9Hz)	8,05 (d; J = 3Hz)	8,03 (d; J = 3Hz)
H-9	7,33 (dd; J = 8,9 e 3,0 Hz)	7,11 (dd; J = 9 e 2 Hz)	-	-
H-10	-	-	7,33 (dd; J = 9,1 e 3,0 Hz)	7,17 (dd; J = 9 e 3,99 Hz)
H-11	8,05 (d; J = 3Hz)	8,14 (d; J = 2Hz)	8,60 (d; J = 8,9Hz)	8,62 (d; J = 9Hz)
OCH ₃	4,03 (s)	3,99 (s)	4,00 (s)	3,99 (s)
OCH ₂ O	6,38(s)	6,37(s)	6,35(s)	6,35(s)

Esta amostra foi injetada no cromatógrafo gasoso nas seguintes condições: temperatura inicial de 80 °C, taxa de aquecimento de 8 °C/min, até atingir 200 °C e 12 °C/min até atingir 220 °C (7 min). A Temperatura do injetor utilizada foi de 250 °C e a Temperatura interface: 280 °C, com gás de arraste Hélio (1 mL/min) e o volume de injeção: 1 µL.

A coluna utilizada foi uma OPTIMA-5 (Diâmetro: 0,25 mm, comprimento: 30 m, espessura do filme: 0,25 µm). O cromatograma obtido pode ser observado nas FIGURAS 2.84 e 2.85 e seus espectros de massas nas FIGURAS 2.86 e 2.87.

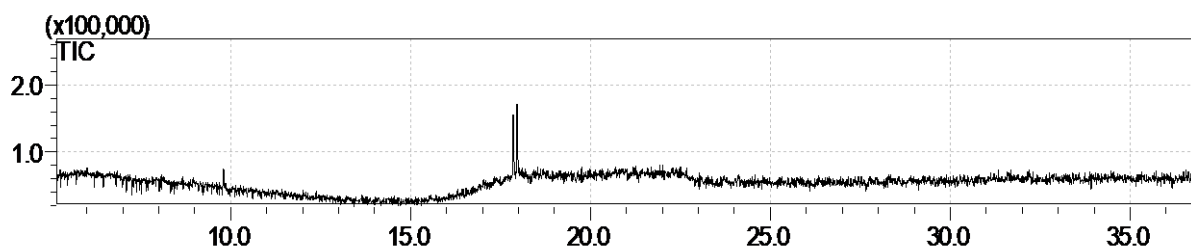


FIGURA 2.84 - Cromatograma obtido no GC-MS da mistura de 9 e 10. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 80 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 8 °C/min. até 200 °C, aumentou de 12 °C/min. até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 7,0 min.

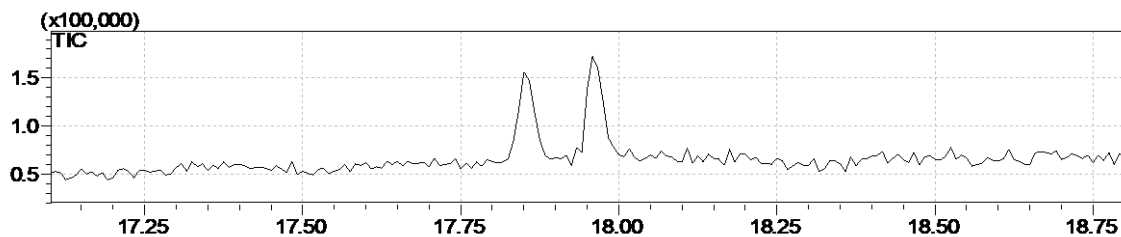


FIGURA 2.85 - Expansão do cromatograma obtido no GC-MS da mistura de 9 e 10. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 80 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 8 °C/min. até 200 °C, aumentou de 12 °C/min. até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 7,0 min.

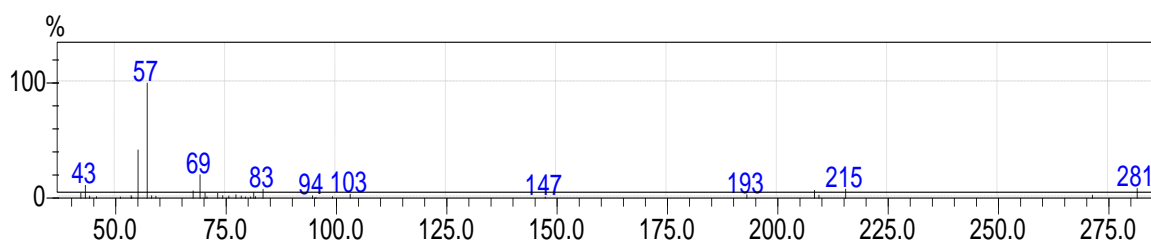


FIGURA 2.86 - Espectro de massas do pico 01 (IE = 70 eV).

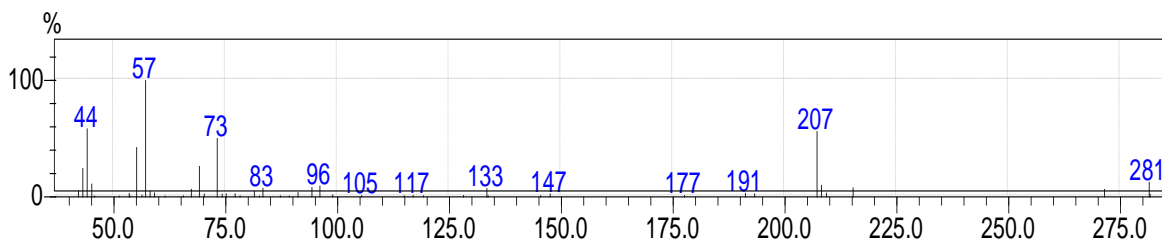


FIGURA 2.87 - Espectro de massas do pico 02 (IE = 70 eV).

2.10.5.5 Determinação estrutural da liriodenina

A substância 11, identificada como liriodenina (FIGURA 2.88) foi isolada do extrato etanólico da partição diclorometano da casca dos frutos de *D. lanceolata* e caracterizada por RMN¹H, HMBC, HSQC e EM e comparação com a literatura (NACIMENTO *et al.*, 2008).

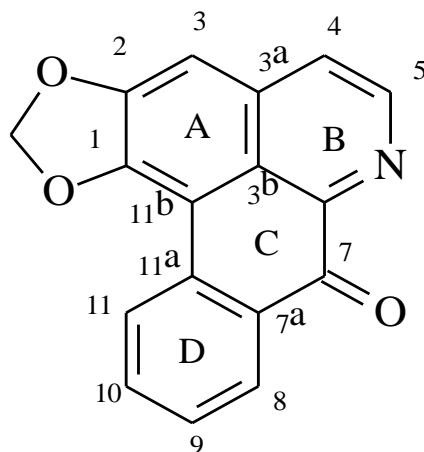


FIGURA 2.88 - Estrutura da liriodenina.

A análise do espectro de RMN¹H e suas expansões (FIGURAS 2.89 a 2.92) indicou semelhança estrutural com a liriodenina, um alcaloide oxoaporfínico já relatado na família Annonaceae, porém descrito pela primeira vez na espécie *D. lanceolata*.

O espectro de RMN¹H exibe sinais de hidrogênios aromáticos na região de δ 8,89 a δ 6,37. O sinal δ 8,58 (1H, dd, $J = 8,2$ Hz e $1,2$ Hz) corresponde ao H-11; δ 8,63 (1H, dl, $J = 8,1$) corresponde ao H-8; δ 7,75 (1H, dt, $J = 8,1$ e $1,2$ Hz) corresponde ao H-10 e δ 7,57 (1H, dt, $J = 8,1$ e $1,2$ Hz) corresponde ao H-9, caracterizando o anel D não substituído.

O singleto em δ 6,37 (2H) foi atribuído aos hidrogênios metilenodioxí (OCH₂O). Já o singleto em δ 7,18 (1H) foi atribuído ao hidrogênio H-3 do anel A. O par de sinais com deslocamentos químicos em δ 7,77 (1H, d, $J = 5,3$ Hz); δ 8,89 (1H, d, $J = 5,3$ Hz) correspondem aos hidrogênios α e β do anel piridínico (anel B), atribuídos aos H-4, H-5, respectivamente.

A TABELA 2.9 apresenta estes dados comparados com a literatura. A FIGURA 2.93 mostra o espectro de RMN¹³C e as TABELAS 2.9 e 2.10 os dados obtidos comparados com a literatura.

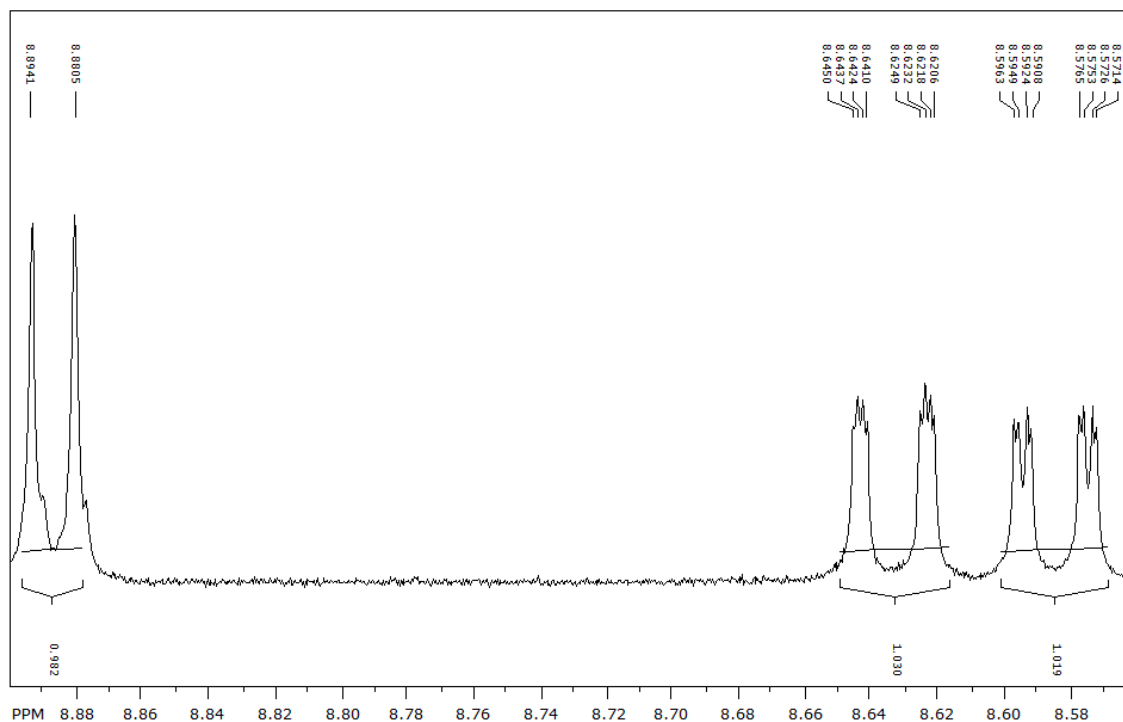


FIGURA 2.91 - Expansão do espectro de RMN¹H da substância 11 (CDCl₃, 400 MHz).

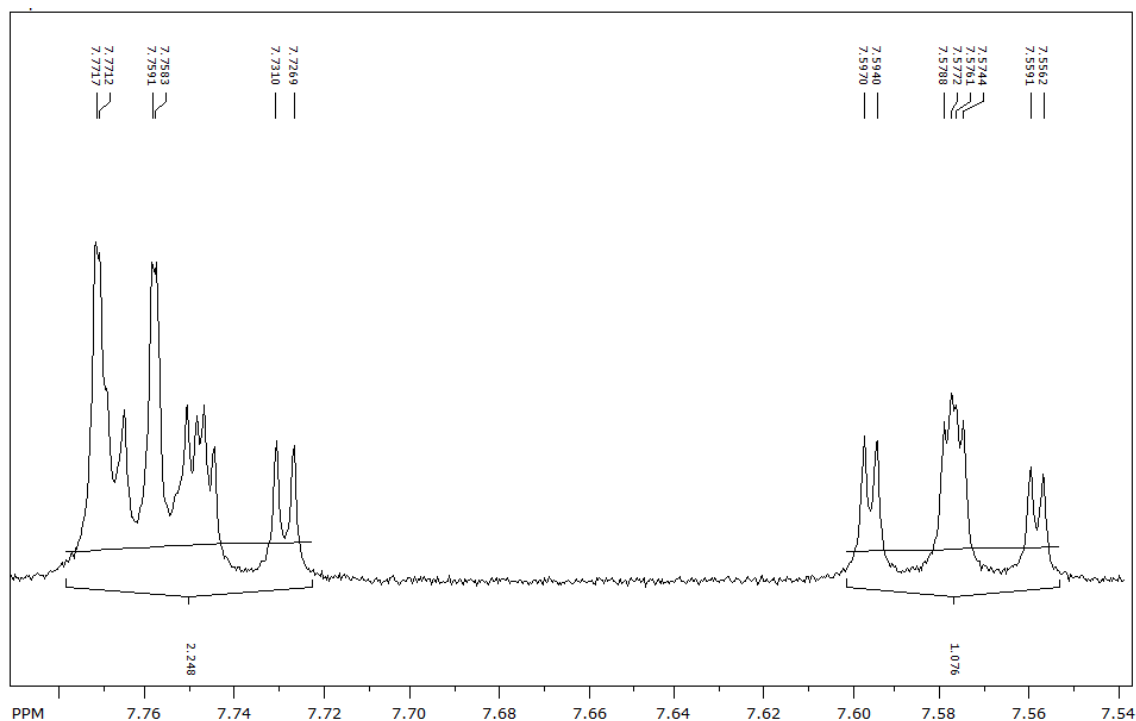


FIGURA 2.92 - Expansão do espectro de RMN¹H da substância 11 (CDCl₃, 400 MHz).

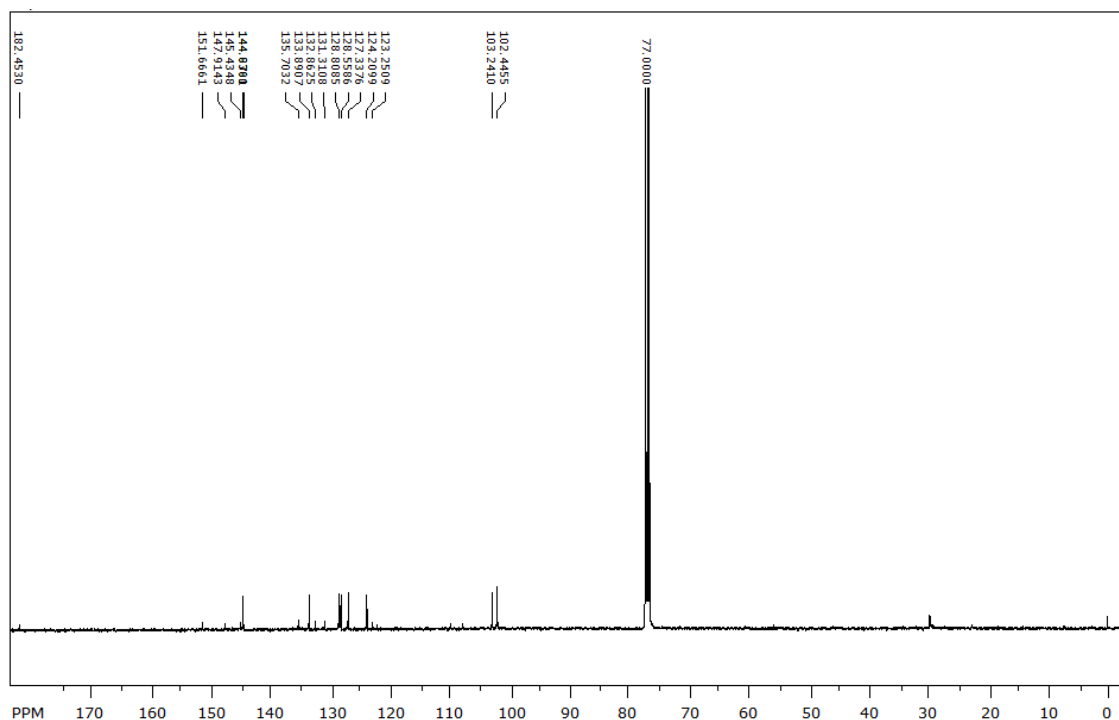


FIGURA 2.93 - Espectro de RMN¹³C da substância 11 (CDCl₃, 100 MHz).

TABELA 2.9 - Comparação de RMN ¹H da substância 11 com a literatura

H	(CDCl ₃ , 400 MHz)	NASCIMENTO, 2008 (CDCl ₃ , 400 MHz)
H-3	7,18 (s)	7,19 (s)
H-4	7,77 (d; <i>J</i> = 5,3 Hz)	7,77 (d; <i>J</i> = 5,1 Hz)
H-5	8,89 (d; <i>J</i> = 5,3 Hz)	8,89 (d; <i>J</i> = 5,1 Hz)
H-8	8,63 (dl; <i>J</i> = 8,0Hz)	8,65 (dl; <i>J</i> = 8,0Hz)
H-9	7,57 (dt; <i>J</i> = 8,0 e 1,2Hz)	7,58 (dt; <i>J</i> = 8,0 e 1,5Hz)
H-10	7,75 (dt; <i>J</i> = 8,0 e 1,2Hz)	7,75 (dt; <i>J</i> = 8,0 e 1,5Hz)
H-11	8,58 (dd; <i>J</i> = 8,0 e 1,2Hz)	8,58 (dd; <i>J</i> = 8,0 e 1,5Hz)
OCH ₂ O	6,37 (s)	6,38 (s)

TABELA 2.10 - Comparação de RMN ¹³C da substância 11 com literatura

C	(CDCl₃, 100 MHz)	NASCIMENTO, 2008 (CDCl₃, 100 MHz)
1	147,91	147,93
2	151,66	151,74
3	103,24	103,26
3a	135,70	135,73
3b	144,87	144,89
4	124,20	124,24
5	144,93	144,95
6a	145,43	145,45
7	182,45	182,47
7a	132,86	132,90
8	128,80	128,84
9	128,55	128,59
10	133,89	133,91
11	127,33	127,36
11a	135,70	135,78
11b	131,31	131,32
OCH ₂ O	102,44	102,44

2.10.6 Derivado dihidronafitalenona

A substância 12, identificada como dihidronafitalenona (FIGURA 2.94) foi isolada da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* (DLEF-hex). Sua estrutura foi identificada através de análises de RMN¹H, RMN¹³C, HMBC, HSQC, COSY e comparação com a literatura (TABELAS 2.11 e 2.12).

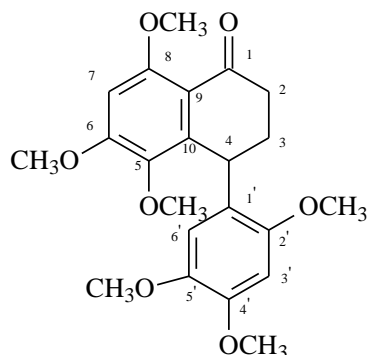


FIGURA 2.94 - Estrutura da dihidronafitalenona.

A análise do espectro de RMN¹H (FIGURAS 2.95 a 2.97) indicou a presença de um derivado dihidronafitalenona. Os singletos em δ 6,58 (1H, s), δ 6,49 (1H, s) e δ 6,20 (1H, s) correspondem aos hidrogênios aromáticos H-3', H-7 e H-6' respectivamente. O duplo dubleto em 5,04 (1H, dd, $J = 2,6$ Hz, $J = 4,7$ Hz), foi atribuído ao H-4.

Os multipletos em δ 2,23 (2H, m) e δ 2,46 (2H, m), foram atribuídos aos H-3 e H-2, referente aos hidrogênios metilênicos.

Os singletos na região δ 3,37 a δ 3,96 foram atribuídos as metoxilas ligadas aos anéis aromáticos: δ 3,37 (3H, s, 5-OCH₃), δ 3,57 (3H, s, 5'-OCH₃), δ 3,87 (3H, s, 4'-OCH₃), δ 3,91 (3H, s, 2'-OCH₃), δ 3,93 (3H, s, 6-OCH₃), e δ 3,96 (3H, s, 8-OCH₃).

TABELA 2.11 - Comparação RMN ¹H da substância 12 com literatura

H	(CDCl ₃ , 400 MHz)	XU, et al, 2006 (CDCl ₃ , 300 MHz)
H-2	2.46 (2H, m)	2.43 (2H, m)
H-3	2.23 (2H, m)	2.16 (2H, m)
H-4	5.04 (1H, m)	5.03 (1H, m)
H-6	6.20 (1H, s)	6.19 (1H, s)
H-7	6.49 (1H, s)	6.48 (1H, s)
H-3'	6.58 (1H, s)	6.57 (1H, s)
5-OCH ₃	3.37 (3H, s)	3.36 (3H, s)
6-OCH ₃	3.93 (3H, s,)	3.92 (3H, s,)
8-OCH ₃	3.96 (3H, s)	3.95 (3H, s)
2'-OCH ₃	3.91 (3H, s)	3.89 (3H, s)
4'-OCH ₃	3.87 (3H, s)	3.86 (3H, s)
5'-OCH ₃	3.57 (3H, s)	3.56 (3H, s)

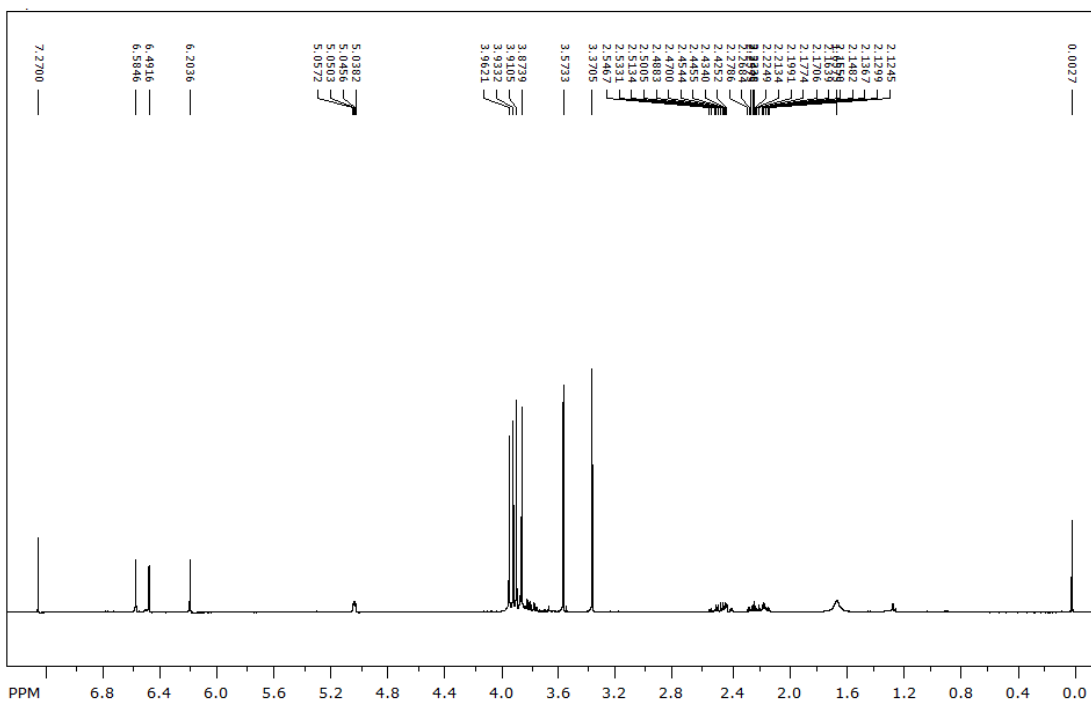


TABELA 2.12 - Comparação RMN ^{13}C da substância 12 com literatura

C	(CDCl_3 , 400 MHz)	XU, et al, 2006 (CDCl_3 , 300 MHz)
1	197,6	197,6
2	35,9	35,9
3	27,6	27,6
4	32,4	32,5
5	139,2	139,3
6	158,5	158,5
7	95,8	95,9
8	157,8	157,8
9	116,5	116,6
10	141,1	142,1
1'	123,1	123,1
2'	151,6	151,7
3'	98,3	98,3
4'	148,5	148,5
5'	142,7	142,7
6'	114,3	114,4
5-OCH ₃	60,7	60,7
5'-OCH ₃	57,3	57,3
2'-OCH ₃	56,7	56,7
8-OCH ₃	56,5	56,6
4'-OCH ₃	56,3	56,4
6-OCH ₃	55,9	55,9

No espectro de HSQC (FIGURA 2.99) observa-se a correlação dos hidrogênios com os carbonos diretamente ligados. Os hidrogênios em δ 6,58 (1H, s), δ 6,49 (1H, s) e δ 6,20 (1H, s), referentes aos H-3', H-7 e H-6' correlacionam-se com os carbonos C-3', C-7 e C-6' em δ 98,2, δ 95,8 e δ 114,1, respectivamente.

O duplo dubleto em 5,04 (1H, *dd*, $J = 2,6$ Hz, $J = 4,7$ Hz), correlaciona com o carbono δ 32,4 C-4 e os multipletos em δ 2,23 (2H, m) e δ 2,46 (2H, m), correlacionam com os carbonos C-3 e C-2 em δ 27,4 e δ 35,7 respectivamente.

Os singletos em δ 3,37 (3H, s), δ 3,57 (3H, s), δ 3,87 (3H, s), δ 3,91 (3H, s), δ 3,93 (3H, s), e δ 3,96 (3H, s), correlacionam com os carbonos δ 60,7, δ 57,3, δ 56,7, δ 56,5, δ 56,3 e δ 55,9, respectivamente.

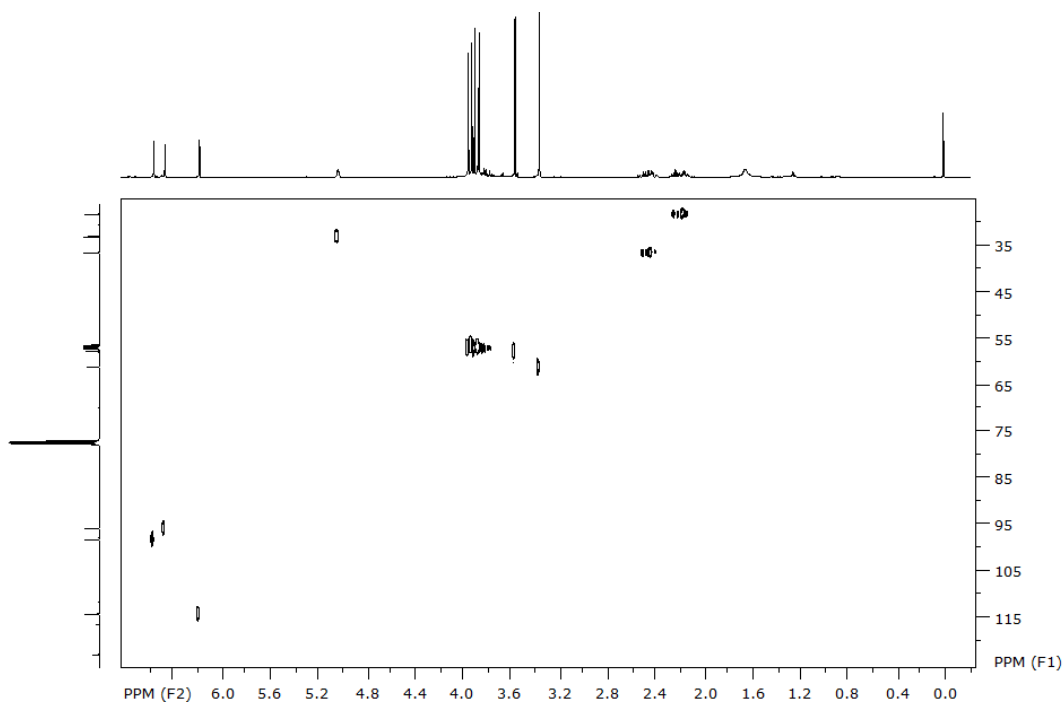


FIGURA 2.99 - Mapa de contorno HSQC da substância 12 (400 MHz, CDCl_3).

No mapa de contorno HMBC (FIGURA 2.100), os hidrogênios em δ 6,58 e δ 6,20 apresentam as mesmas correlações com os carbonos em δ 32,4 (C-4), δ 123,1 (C-1'), δ 142,7 (C-5'), δ 148,5 (C-4') e δ 151,6 (C-2'). O hidrogênio em δ 6,49 (1H, s) correlaciona-se apenas com os carbonos δ 116,5 (C-9) e δ 158,5 (C-6).

O duplo dubleto em 5,04 (1H, *dd*, $J = 2,6$ Hz, $J = 4,7$ Hz), correlaciona-se com os carbonos em δ 27,6 (C-3), δ 35,9 (C-2), δ 114,3 (C-6'), δ 123,1 (C-1'), δ 139,2 (C-5), δ 141,1 (C-10) e δ 151,6 (C-2'). O multiplete em δ 2,23 (2H, m) apresenta correlação com os carbonos δ 123,1 (C-1'), δ 141,1 (C-10), δ 197,6 (C-1), δ 35,9 (C-2) e δ 32,4 (C-4). Já o sinal em δ 2,46 (2H, m), correlaciona-se com os carbonos δ 27,4 (C-3), δ 32,4 (C-4) e δ 197,6 (C-1).

Os singletos em δ 3,37 (3H, s), δ 3,57 (3H, s), δ 3,87 (3H, s), δ 3,91 (3H, s), δ 3,93 (3H, s) e δ 3,96 (3H, s) correlacionam-se com os carbonos δ 139,2 (C-5), δ 142,6 (C-5'), δ 148,5 (C-4'), δ 151,6 (C-2') e 158,5 (C-6) respectivamente.

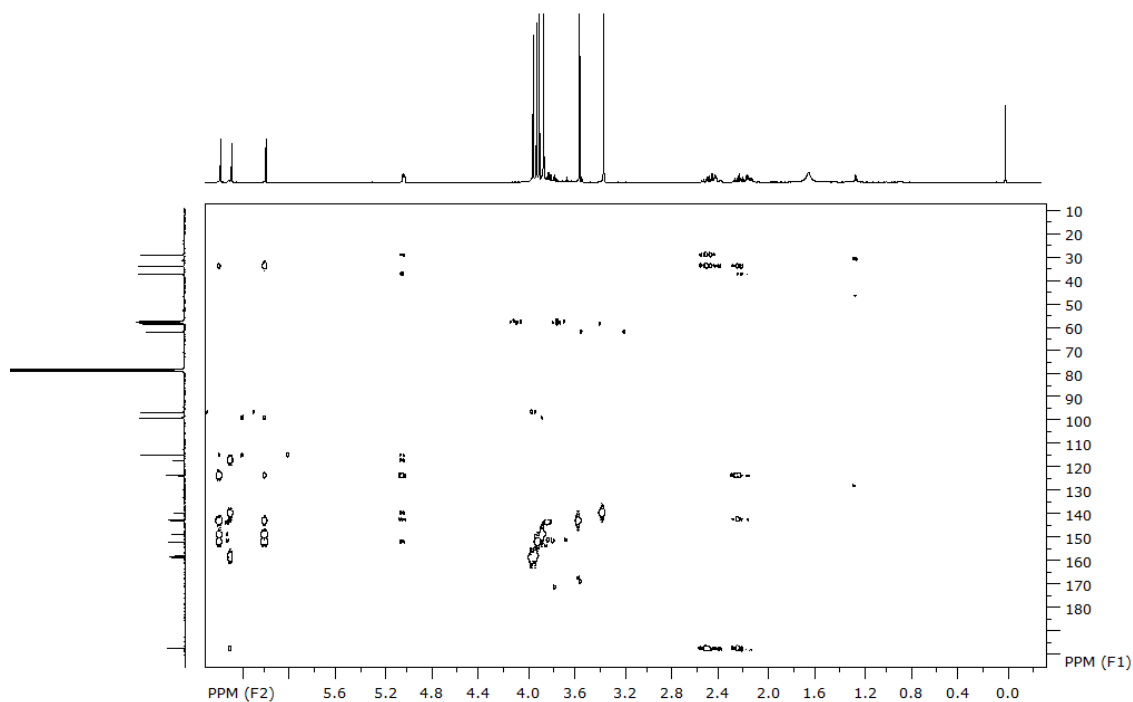


FIGURA 2.100 - Mapa de contorno HMBC da substância 12 (400 MHz, CDCl₃).

2.10.7 Flavonoides

Flavonoides constituem uma classe de metabólitos secundários amplamente encontrados na natureza (ZHANG *et al.*, 2007; GATTUSO *et al.*, 2007). O interesse no estudo de tais substâncias está relacionada as diversas propriedades biológicas e farmacológica que elas apresentam, tais como antioxidante, anti-inflamatórias, antimicrobiana, dentre outras (GATTUSO *et al.*, 2007; HARBONE e WILLIAMS, 2000, GUERRA, *et al.*, 2000).

São heterosídeos com quinze carbonos em seu esqueleto básico, sendo substâncias fenólicas do tipo C₆-C₃-C₆ e apresentam-se como sólidos de coloração amarelada ou ainda incolores (DEWICK, 2001).

Estão divididos em nove subclasses: flavonas, flavonóis, flavonas, flavanas, isoflavonas, antocianidinas, flavononóis (flavan-3-ol ou catequinas), chalconas e dihidrochalconas que são diferenciadas a partir de variações no arranjo estrutural e nas posições dos grupos funcionais (LIN *et al.*, 2008, NEBO, 2013).

O esqueleto flavonoídico é composto por dois anéis aromáticos, sistema benzopirânico, a partir do qual é iniciada a numeração dos carbonos e se determinada a nomenclatura sistemática oficial da IUPAC. Na nomenclatura usual

(MARKHAN,1982) os anéis são designados como A, B e C (FIGURA 2.101) e os carbonos são numerados com algarismos arábicos para os anéis A e C e algarismos marcados com linha (') para o anel B.

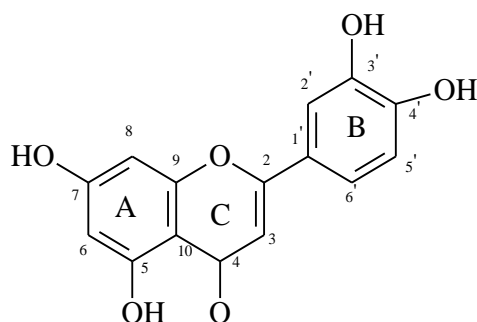


FIGURA 2.101 - Nomenclatura usual dos flavonoides: designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono.

O núcleo da estrutura dos flavonoides consiste, portanto, de dois anéis fenólicos A e B e um anel C, que pode ser um pirano heterocíclico, como no caso de flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona, como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonoides FIGURA 2.102.

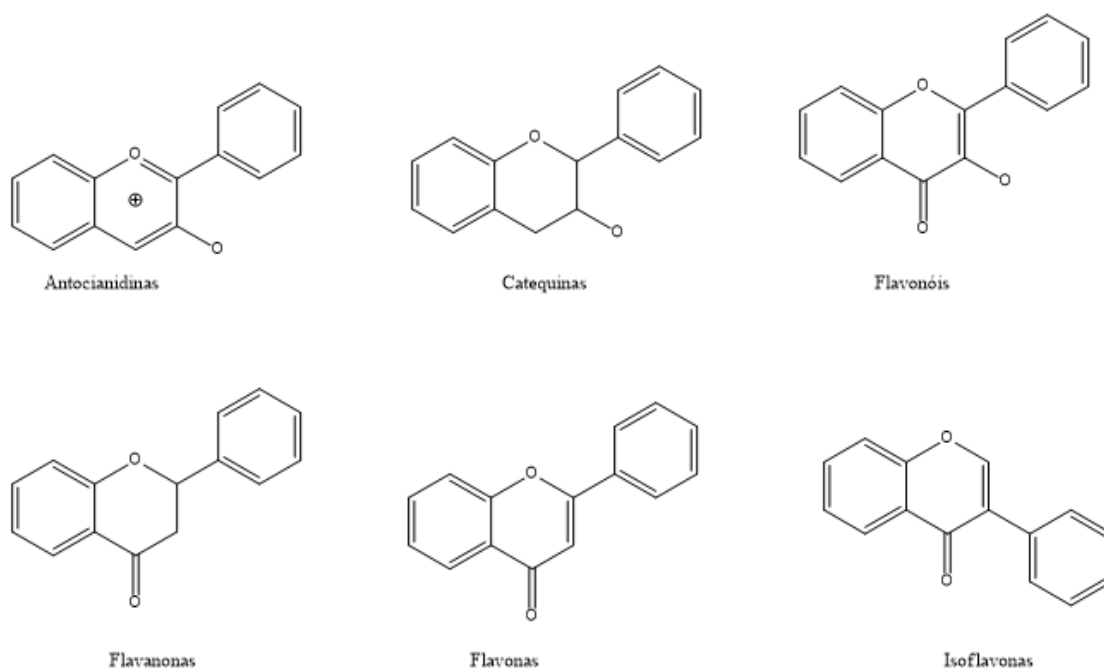


FIGURA 2.102 - Principais tipos de flavonoides.

2.10.8 Determinação estrutural da substância 13

A substância 13 (FIGURA 2.103) foi identificada como o flavonoide paquipodol (HUONG, 2004), e foi isolada da partição diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* (DLEF-dicloro).

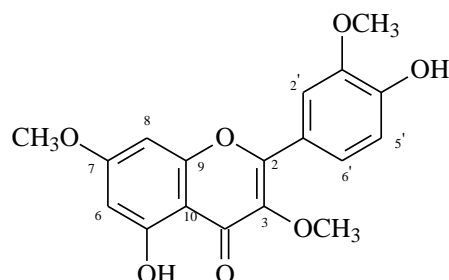


FIGURA 2.103- Estrutura do paquipodol.

A análise do espectro de RMN¹H (FIGURAS 2.104 a 2.106, Tabela 2.13) indicou a presença de um flavonoide do tipo flavona. O anel A foi caracterizado pela presença dos dubletos em δ 6,67 (1H, *d*, J_{meta} = 2,0 Hz) e δ 6,31 (1H, *d*, J_{meta} = 2,0 Hz) referentes aos hidrogênios H-6 e H-8, indicando um sistema de acoplamento meta. Estes sinais apresentam correlações no espectro de COSY ¹H-¹H (FIGURAS 2.107 e 2.108).

Os sinais em δ 7,78 (1H, *d*, J_{meta} = 2,5 Hz), δ 7,00 (1H, *d*, J_{orto} = 8,5 Hz) e δ 7,70 (1H, *dd*, Hz, J_{meta} = 2,5 Hz J_{orto} = 8,5 Hz) indicam um sistema de substituição 3'4' no anel B, dos hidrogênios, H-2', H-5' e H-6' respectivamente. A multiplicidade destes sinais mostra o acoplamento orto entre os hidrogênios H-5' e H-6' e acoplamento meta entre os hidrogênios H-2' e H-6'.

A correlação entre H-5' e H-6' em δ 7,00 e δ 7,70, respectivamente, pode ser observada do no espectro de COSY ¹H-¹H (figuras 14 e 15). Os singletos que integram para três hidrogênios em δ 3,96 (3H, *s*), δ 3,93 (3H, *s*), δ 3,91 (3H, *s*) foram atribuídos as metoxilas nos carbonos C-7, C-3' e C-3 respectivamente.

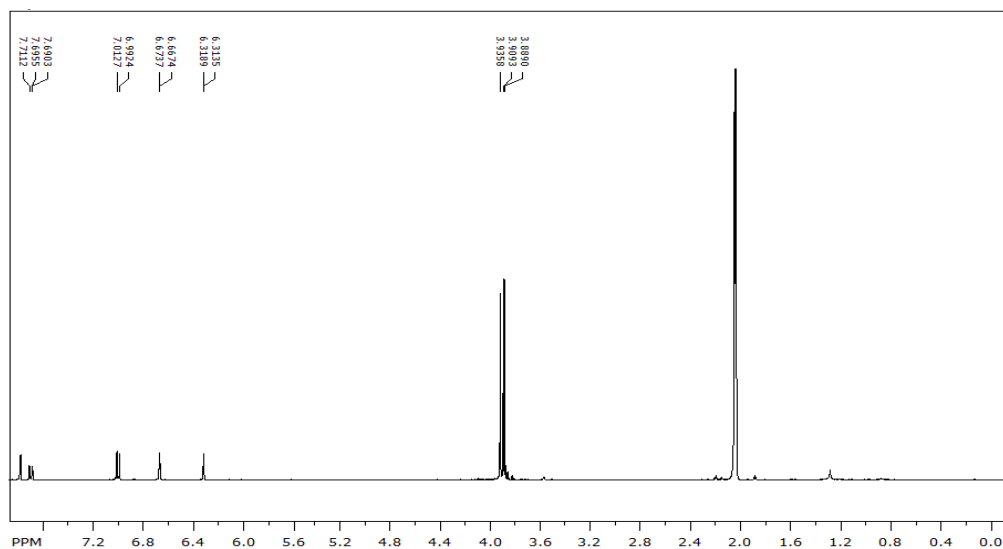


FIGURA 2.104 - Espectro de RMN ^1H da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

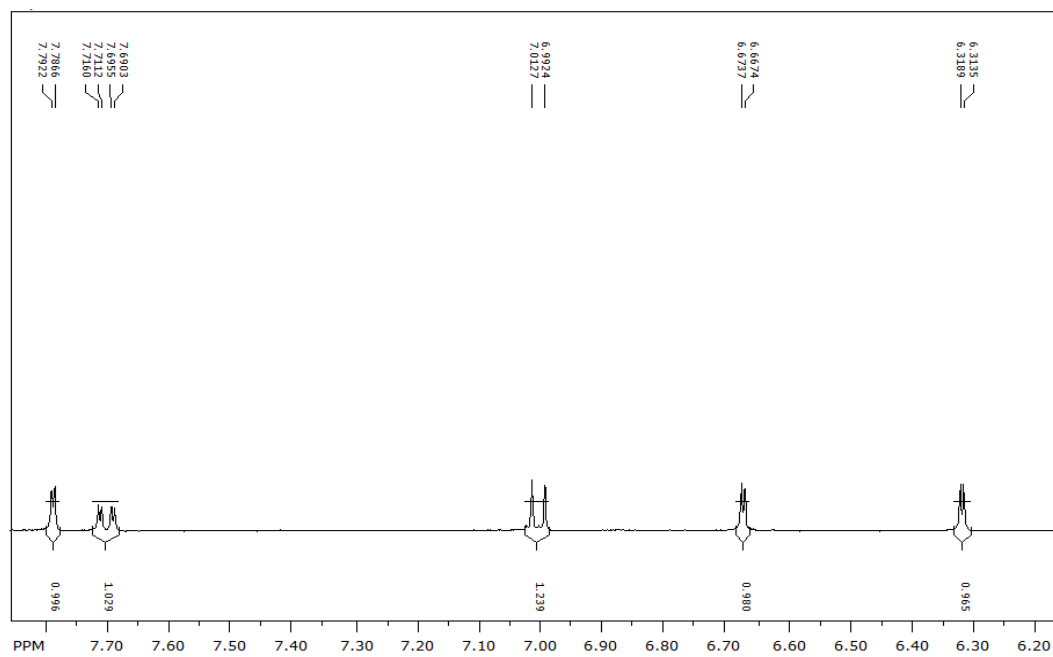


FIGURA 2.105 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

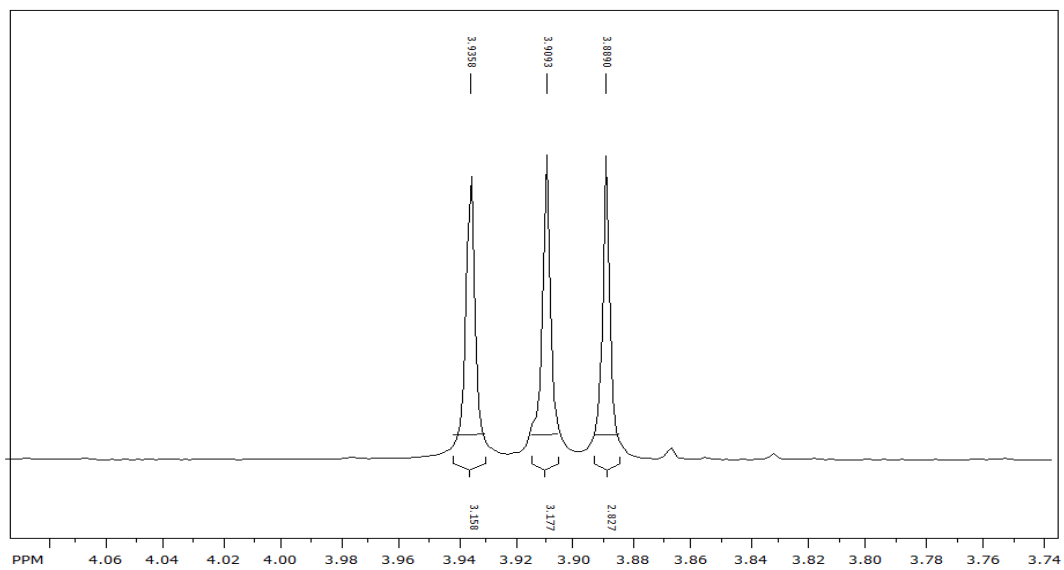


FIGURA 2.106 - Expansão do espectro de RMN ^1H da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

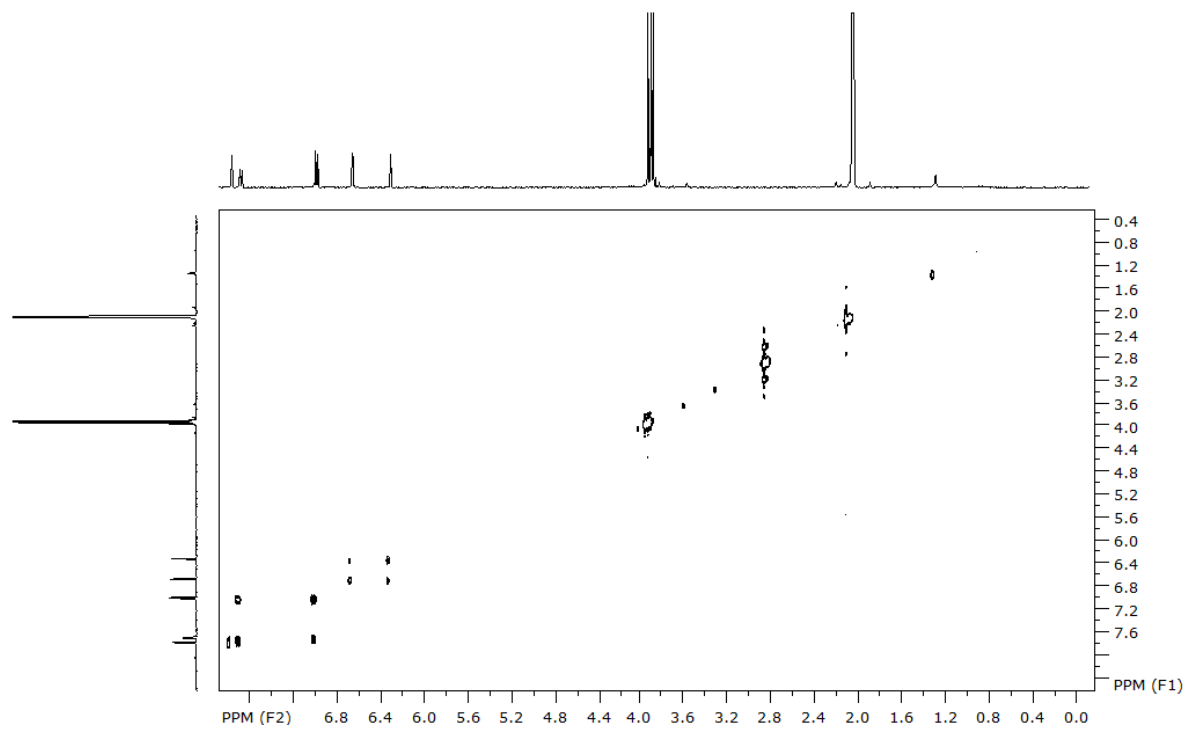


FIGURA 2.107 - Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

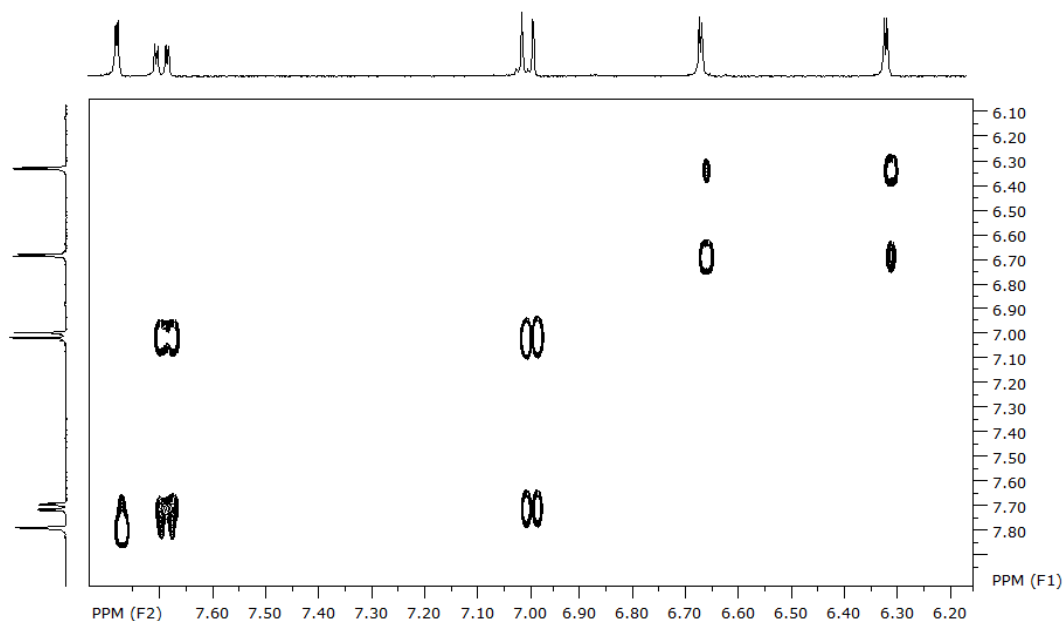


FIGURA 2.108 - Expansão do espectro de COSY ^1H - ^1H da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

No espectro de carbono (FIGURA 2.109, Tabela 2.13) observa-se a presença de 17 sinais, dos quais o sinal em δ 55,6 refere-se a dois carbonos de duas metoxilas que são equivalentes. O sinal em δ 178,7 foi atribuído ao carbono carbonílico.

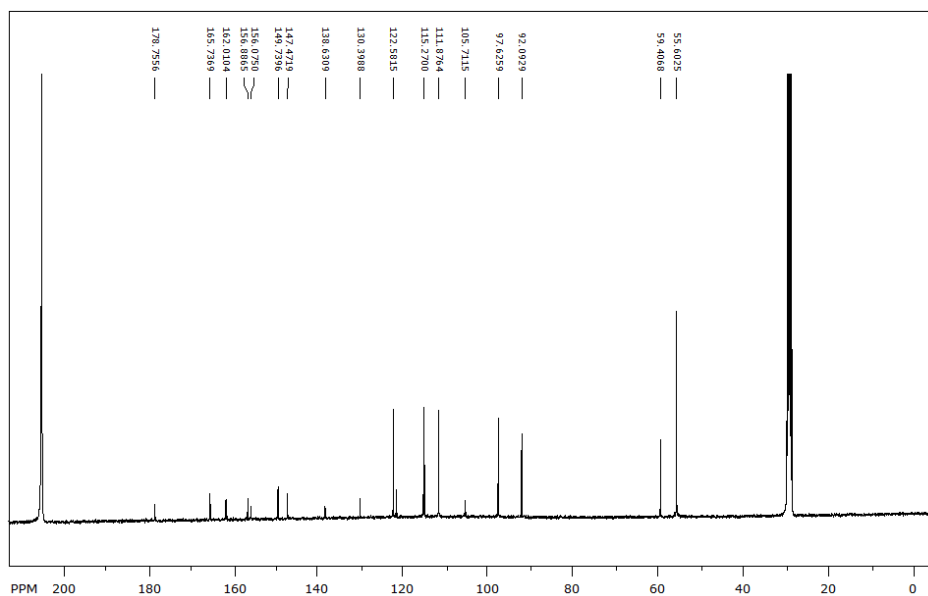


FIGURA 2.109 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

No espectro de HSQC (FIGURAS 2.110 a 2.112), observa-se dubletos em δ 6,67 e δ 6,31 referentes aos hidrogênios H-6 e H-8, correlacionam com os carbonos em δ 92,1 e δ 97,6, atribuídos aos C-6 e C-8 do anel A.

Os sinais em δ 7,78, δ 7,00 e δ 7,70 atribuídos aos H-2', H-5' e H-6' respectivamente, apresentam correlação com os carbonos em δ 111,8, δ 115,3, δ 122,5 atribuídos aos C-2', C-5' e C-6', respectivamente.

Os singletos em δ 3,96 (3H, s), δ 3,93 (3H, s), δ 3,91 (3H, s) foram atribuídos as metoxilas e mostram correlação com os carbonos em δ 59,40, atribuído ao C-3 e δ 55,60 referentes aos carbonos C-5, e C-4', que mostraram equivalência química.

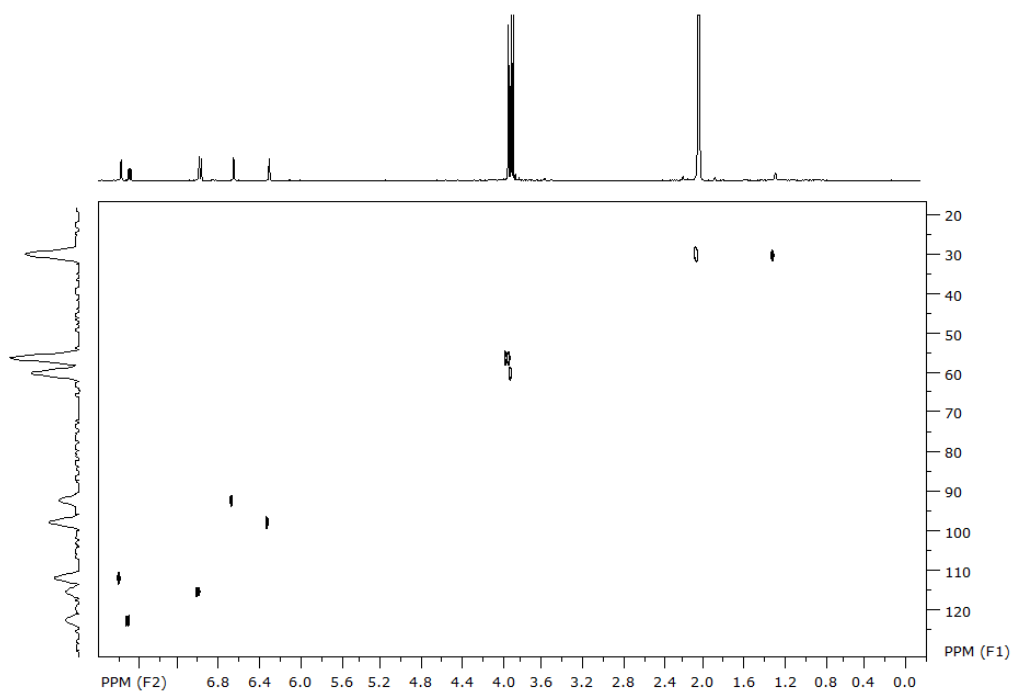


FIGURA 2.110 - Mapa de contorno HSQC da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

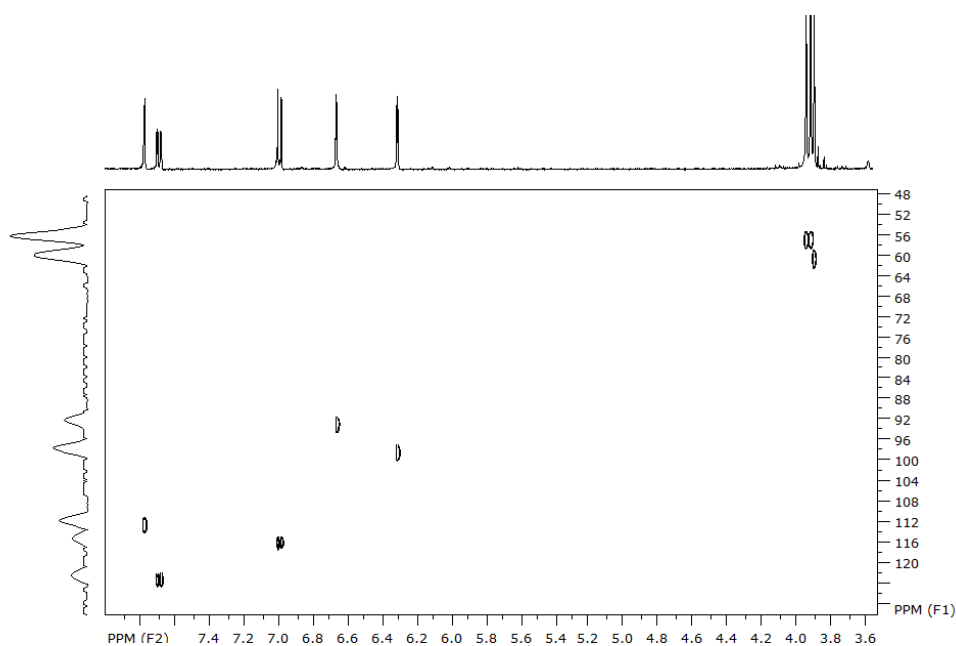


FIGURA 2.111 - Expansão do mapa de contorno HSQC da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

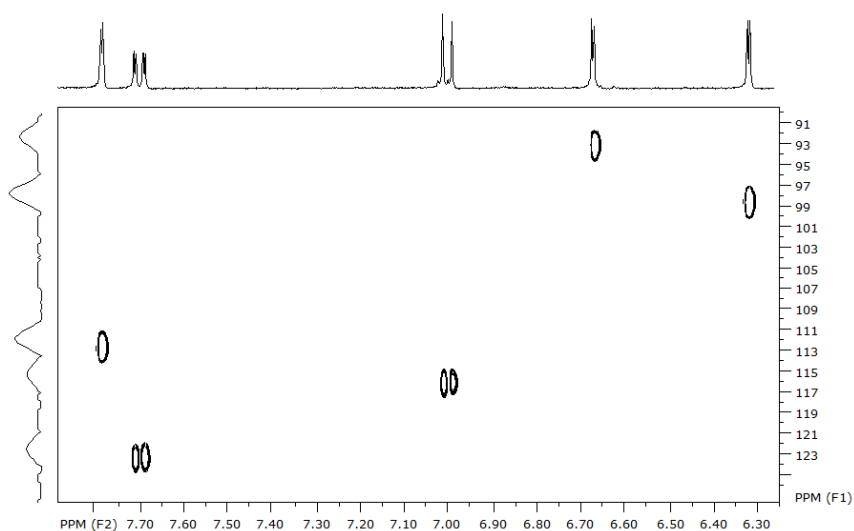


FIGURA 2.112 - Expansão do mapa de contorno HSQC da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

No mapa de correlações de HMBC (FIGURAS 2.113 a 2.115), observamos correlações de carbonos e hidrogênios a duas ou três ligações. Nota-se a correlação do hidrogênio em δ 6,67 (H-8) com os carbonos em δ 156,8, δ 105,7 e δ 97,6, atribuídos aos C-9, C-10 e C-6 respectivamente.

O sinal do H-6, em δ 6,31, mostrou correlação com os carbonos δ 105,7 e δ 92,1, que foram atribuídos aos C-10 e C-8.

O H-2' em δ 7,78 mostra correlações com os carbonos em δ 122,6, δ 149,7 e δ 156,1, atribuídos aos C-6', C-4' e C-2. Já o H-5' em δ 7,00 mostra correlações com os carbonos em δ 122,6, δ 147,5 e δ 149,7, atribuídos aos C-6', C-3' e C-4'.

O sinal em δ 7,70, referente ao H-6', apresenta correlação com os carbonos em δ 111,8 e δ 149,7 atribuídos aos C-2' e C-4' respectivamente.

Os singletos em δ 3,96, δ 3,93 e δ 3,91 mostram correlação com os carbonos em δ 147,7, δ 165,7 e δ 138,6, atribuídos aos C-3', C-7 e C-3 respectivamente.

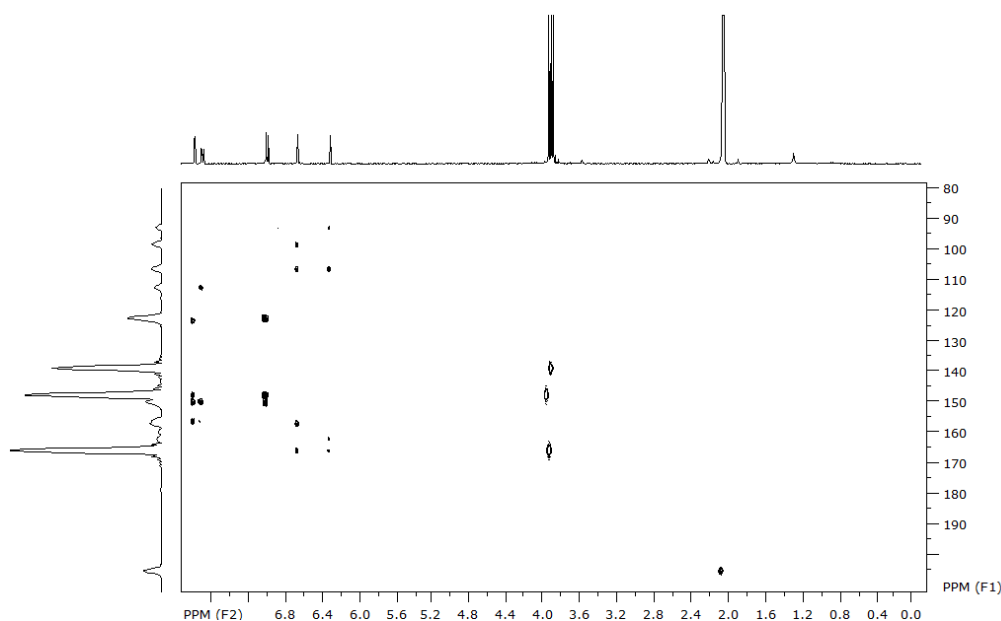


FIGURA 2.113 - Mapa de contorno HMBC da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

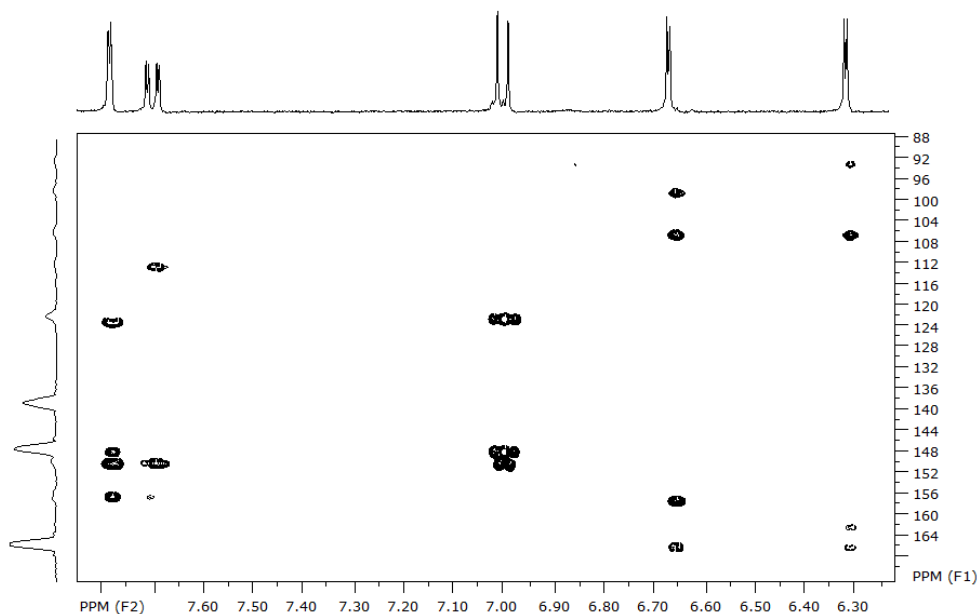


FIGURA 2.114 - Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

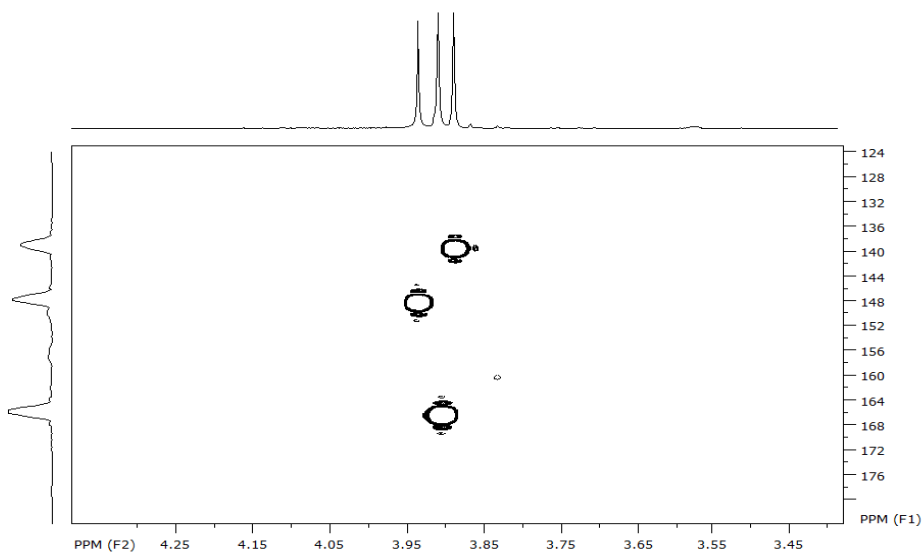


FIGURA 2.115 - Expansão do mapa de contorno HMBC da substância 13 (400 MHz, Acetona-*d*).

TABELA 2.13 - Comparação de RMN ¹H e RMN ¹³C do flavonoide paqipodol com literatura (HUONG,2005)

H	400 MHz, Acetona- <i>d</i>	HUONG,2005 Acetona- <i>d</i>	C	400 MHz, Acetona- <i>d</i>	HUONG,2005 Acetona- <i>d</i>
1	-	-	1	-	-
2	-	-	2	156,1	157,7
3	-	-	3	138,6	139,5
4	-	-	4	178,7	179,6
5	-	-	5	161,8	162,9
6	6,67(1H, d, J=2,0 Hz)	6,64(1H, d, J=2,1 Hz)	6	97,6	98,5
7	-	-	7	165,7	166,6
8	6,31(1H, d, J=2,0 Hz)	6,30(1H, d, J=2,1 Hz)	8	92,1	92,9
9	-	-	9	156,8	156,9
10	-	-	10	105,7	106,6
1'	-	-	1'		
2'	7,78 (1H, d, J=2,5 Hz)	7,78 (1H, d, J=2,0 Hz)	2'	111,8	122,8
3'	-	-	3'	147,5	147,9

4'	-	-	4'	149,7	150,6
5'	7,00 (1H,d, J=8,5 Hz)	7,00 (1H, d, J=8,4 Hz)	5'	-	116,5
6'	7,70(1H,dd, J=8,5 e J=2,5 Hz)	7,70(1H, dd, J=8,4 e J=2,0 Hz)	6	122,6	123,4
OCH ₃	3,96 (3H, s)	3,95 (3H, s)	OCH ₃	59,4	60,3
OCH ₃	3,93 (3H, s)	3,91 (3H, s)	OCH ₃	55,6	56,5
OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	OCH ₃	55,5	56,4

Portanto, conclui-se que o flavonoide em questão possui fórmula molecular C₁₈H₁₆O₇. Foi realizado análise por espectrometria de massas por de inserção direta, no modo negativo. O espectro de massas (FIGURA 2.116) o íon pseudomolecular [M+H]⁻, m/z 343,3 comprovando a massa molecular do composto 344,3 Da.

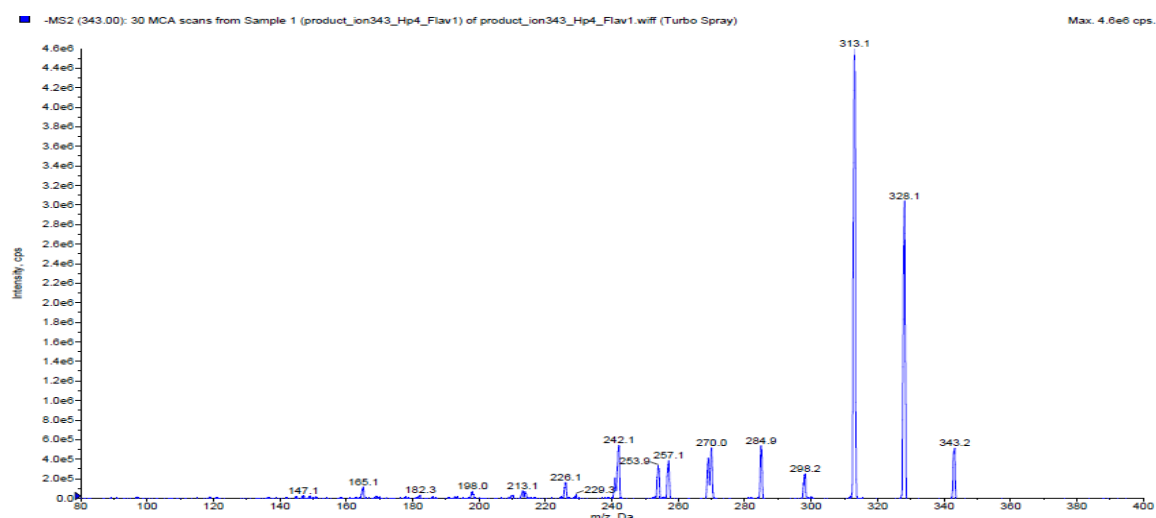


FIGURA 2.116- Espectro de massas (ESI) no modo negativo da [M-H]⁻ com o íons pseudomolecular do flavonoide paquipodol.

2.11 Estudo do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata*

2.11.1 Análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* por CG/MS

O rendimento em óleo essencial a partir da hidrodestilação das folhas de *D. lanceolata* foi de 0,32% (m/m), levando-se em consideração a massa seca do material vegetal.

A identificação dos compostos presentes na amostra foi realizada através o cálculo do índice de Kovats (IK) de cada componente, através da comparação do tempo de retenção de cada amostra em relação a padrões de n-alcenos. A mistura de padrões de alcanos foi injetada no cromatógrafo gasoso nas mesmas condições da análise do óleo essencial. O cromatograma e sua expansão podem ser observados nas FIGURAS 2.117 a 2.119.

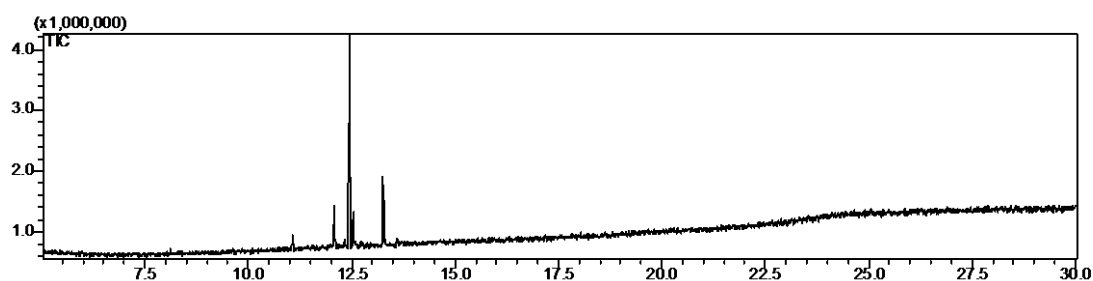


FIGURA 2.117 - Cromatograma obtido no GC-MS do óleo essencial das folhas de *D. Lanceolata*. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 80 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 8 °C/min. até 200 °C, aumentou de 12 °C/min. até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 7,0 min.

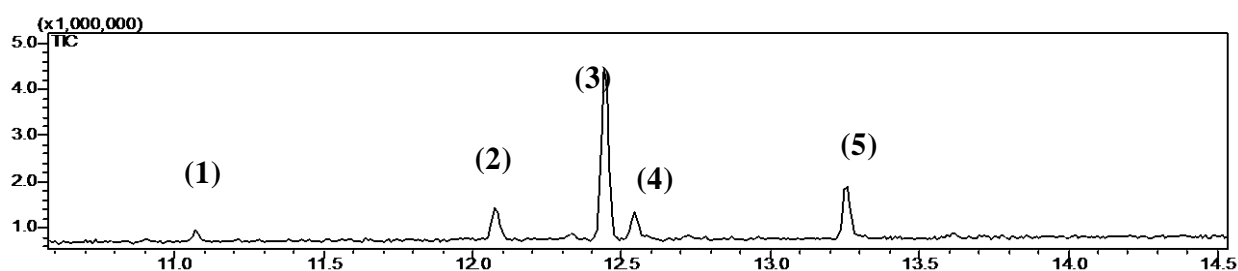


FIGURA 2.118 - Expansão do cromatograma obtido no GC-MS do óleo essencial das folhas de *D. Lanceolata*. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 80 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 8 °C/min. até 200 °C, aumentou de 12 °C/min. até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 7,0 min.

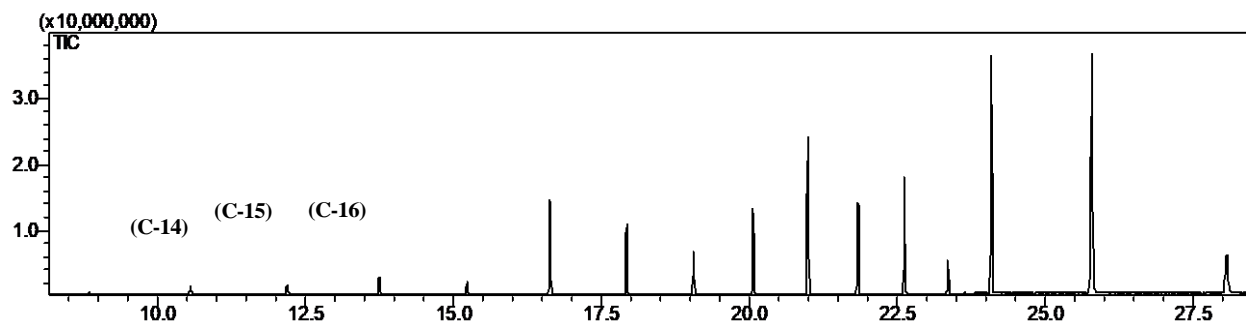


FIGURA 2.119 - Cromatograma obtido no GC-MS padrão de hidrocarbonetos C14-C30. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 80 °C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 8 °C/min. até 200 °C, aumentou de 12 °C/min. até 220 °C permanecendo nesta temperatura por 7,0 min.

Para avaliação e cálculo, foram utilizados apenas as informações dos picos dos hidrocarbonetos C14, C15 e C16 (TABELA 2.14) que são os que estão dentro da faixa do tempo de retenção da amostra analisada.

TABELA 2.14 - Picos dos hidrocarbonetos utilizados no cálculo do índice de Kovats com seus respectivos tempos de retenção e massa molecular.

Pico	Nome	Tempo de Retenção	Massa molecular
1	Tetradecane (C ₁₄)	10,570	198,40
2	Pentadecane (C ₁₅)	12,208	212,42
3	Hexadecane (C ₁₆)	13,762	226,45

Os índices de Kovats calculados para cada pico do cromatograma da amostra analisada foram comparados com os descritos na literatura (ADAMS, 2007). Estes valores podem ser observados na TABELA 2.15.

TABELA 2.15 - Identificação dos picos do cromatograma do óleo essencial de *D. lanceolata*

Pico	Tempo de retenção	%	I.K. calculado	I.K. literatura	Identificação	Massa molecular (g/mol)	Fórmula molecular
1	11,071	3,78	1430,586	1419	β -cariofileno	204	C ₁₅ H ₂₄
2	12,076	12,23	1491,941	1493	Trans-muurola-4, (14),5-dieno	204	C ₁₅ H ₂₄
3	12,444	56,24	1515,187	1505	β -bisaboleno	204	C ₁₅ H ₂₄
4	12,547	8,61	1521,557	--	3,4,5-trimetoxi-estireno*	194	C ₁₁ H ₁₄ O ₃
5	13,225	19,14	1565,444	--	2,4,5-trimetoxi-estireno*	194	C ₁₁ H ₁₄ O ₃

* foram identificados via RMN H¹

Os espectros de massas referentes a cada um dos picos do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* podem ser observados nas FIGURA 2.120 a 2.124.

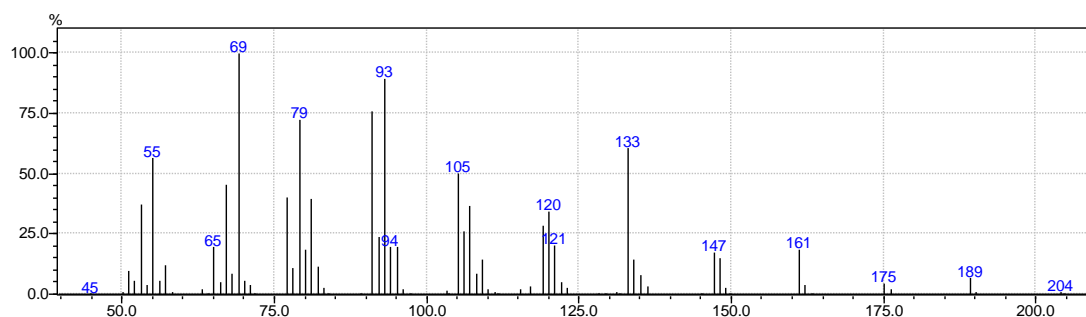


FIGURA 2.120 - Espectro de massas referente ao pico 1 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* (IE = 70 eV).

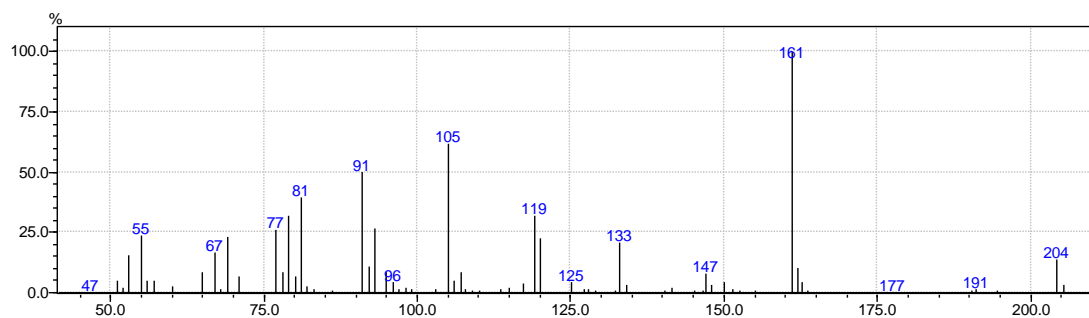


FIGURA 2.121 - Espectro de massas referente ao pico 2 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* (IE = 70 eV).

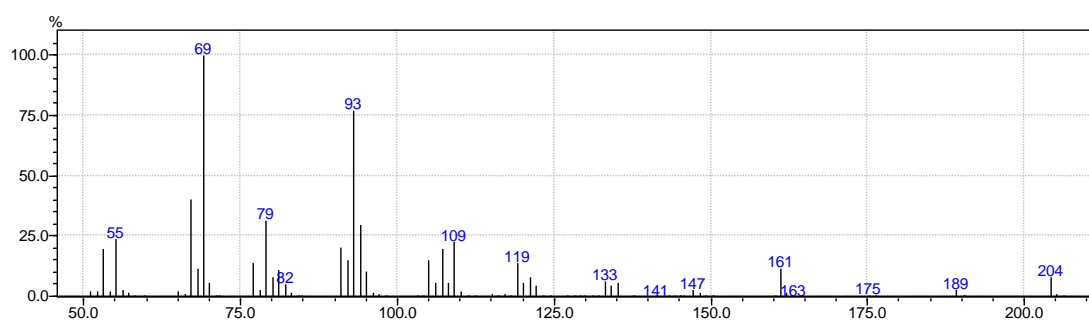


FIGURA 2.122 - Espectro de massas referente ao pico 3 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* (IE = 70 eV).

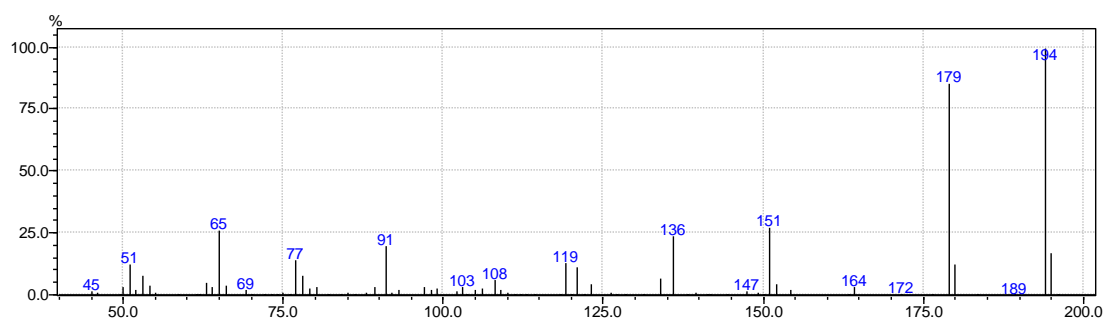


FIGURA 2.123 - Espectro de massas referente ao pico 4 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* (IE = 70 eV).

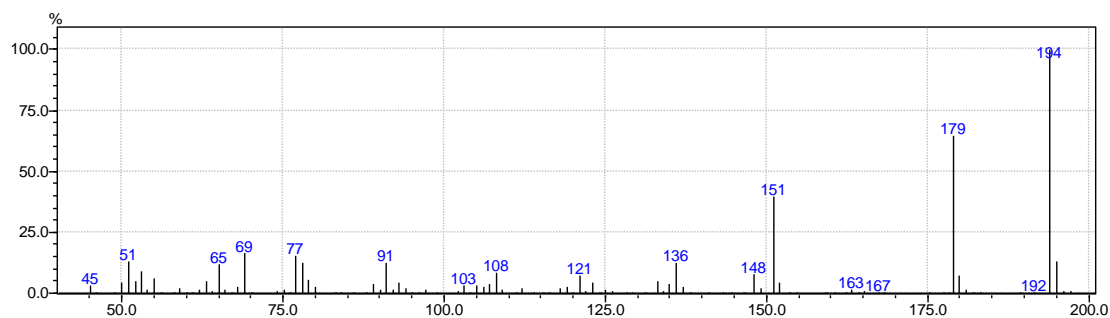


FIGURA 2.124 - Espectro de massas referente ao pico 5 do cromatograma da análise do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* (IE = 70 eV).

Os índices de Kovatz e os espectros de massas dos picos 4 e 5 foram comparados com a literatura também, porém não foi observado nenhuma semelhança com os descritos na literatura. Devido a semelhança do espectro de massa desses picos com o da substância 4 isolada anteriormente, foi realizada uma análise de RMN ^1H da amostra do óleo essencial para confirmar a presença deste composto no óleo essencial.

O óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* apresentou cinco compostos (TABELA 2.14 e FIGURAS 2.125 a 2.127, sendo o composto majoritário o β -bisaboleno (56,24%). Em seguida apresentou β -cariofileno (3,78%), o Trans-muuro-la-4(14),5-dieno (12,23%) e os compostos 3,4,5-trimetoxiestireno (8,61%) e 2,4,5-trimetoxiestireno (19,14%) que não foram identificados por índice de kovats, devido a ausência dos mesmos na literatura. Estes compostos foram identificados por RMN ^1H , e RMN-2D.

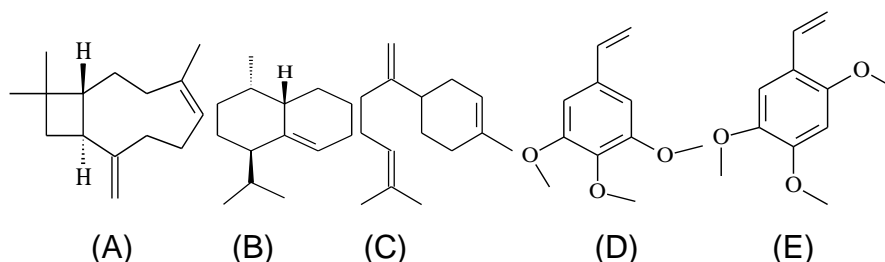


FIGURA 2.125 - Estruturas química dos compostos identificados no óleo essencial de *Duguetia lanceolata*: A) β -cariofileno ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$), B) Trans-muuro-la-4,(14),5-dieno ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) e C) β -bisaboleno ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$), D) 3,4,5-trimetoxiestireno ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$), E) 2,4,5-trimetoxiestireno ($\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$).

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 2.128 a 2.130) indicou a presença de dois compostos aromático e através das integrais, observou-se que os mesmos estão na proporção 2:1 (2,4,5-trimetoxiestireno: 3,4,5-trimetoxiestireno).

Para o composto 2,4,5-trimetoxiestireno os sinais em δ 6,65 (1H, s) e δ 6,50 (1H, s) característicos de hidrogênios aromáticos, indicam que o anel aromático se encontra substituído nas posições C-1, C-2, C-4 e C-5 (FIGURA 2.126).

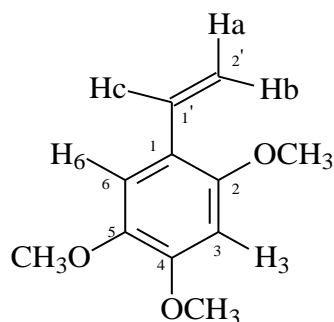


FIGURA 2.126 – Estrutura do 2,4,5-trimetoxiestireno.

No mapa de correlações HSQC (FIGURAS 2.131 e 2.132), observa-se a correlação dos hidrogênios em δ 6,65 e δ 6,50 com os carbonos em δ 103,27 e δ 97,4, respectivamente, que foram atribuídos aos carbonos C-6 e C-3.

Os singletos em δ 3,89 a δ 3,82 (3 H), característicos de metoxilas, sugerem ser estas os substituintes dos C-2, C-4 e C-5 do anel aromático.

Os sinais dos hidrogênios da dupla ligação correspondem respectivamente aos Ha em δ 5,15 (dd) e H-2'b em δ 5,57 (dd) correlacionam-se entre si e o H-1' em δ 6,98 (dd). No mapa de correlações HSQC, observa-se correlação dos hidrogênios H-2'a em δ 5,15 e Hb em δ 5,57 com o carbono em δ 111,8, atribuído ao C-2' e Hc em δ 6,98 com o carbono em δ 130,8, atribuído ao C-1'.

Para o composto 3,4,5-trimetoxiestireno (FIGURA 2.127) o sinal em δ 7,03 (1H, s), foi atribuído a dois hidrogênios equivalentes no anel aromático.

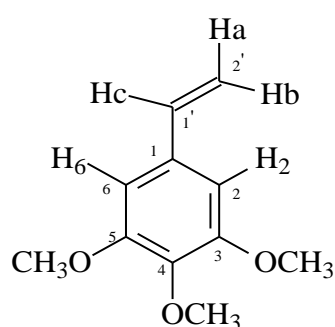
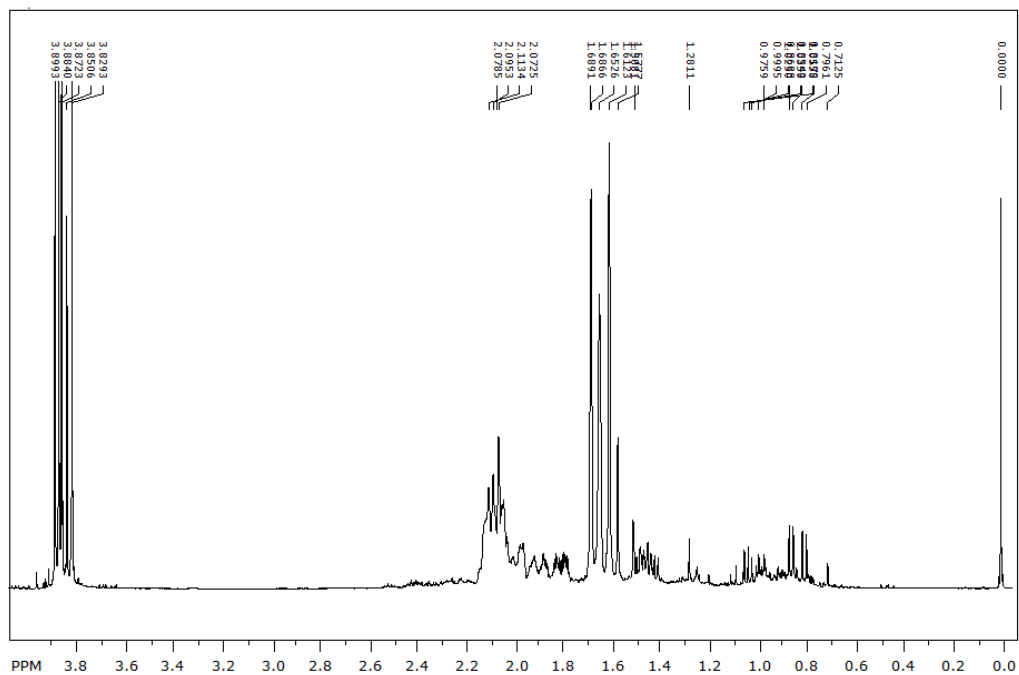


FIGURA 2.127 – Estrutura do 3,4,5-trimetoxiestireno.

Este sinal indica que o anel aromático se encontra substituído nas posições C-1, C-3, C-4 e C-5. No mapa de correlações HSQC (FIGURAS 2.131 e 2.132), observa-se a correlação dos hidrogênios em δ 7,03 com dois carbonos em δ 109,4, atribuídos aos carbonos equivalentes C-2 e C-6.



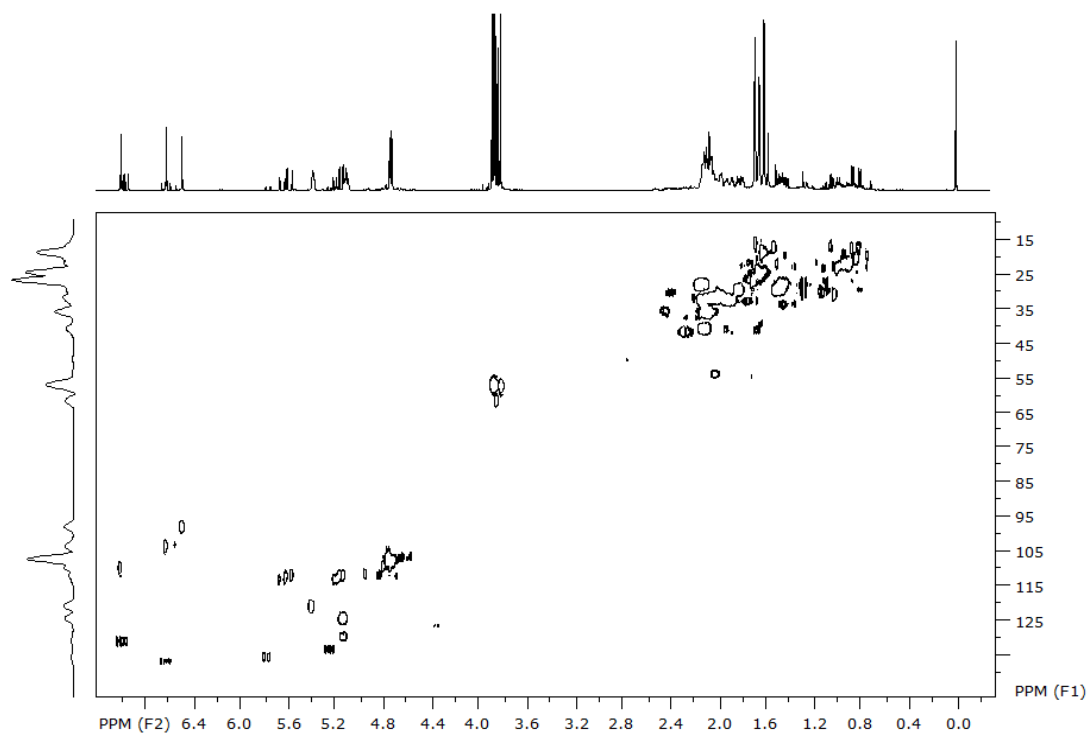


FIGURA 2.131 - Mapa de contorno HSQC do óleo essencial de *D. lanceolata* (400 MHz, CDCl₃).

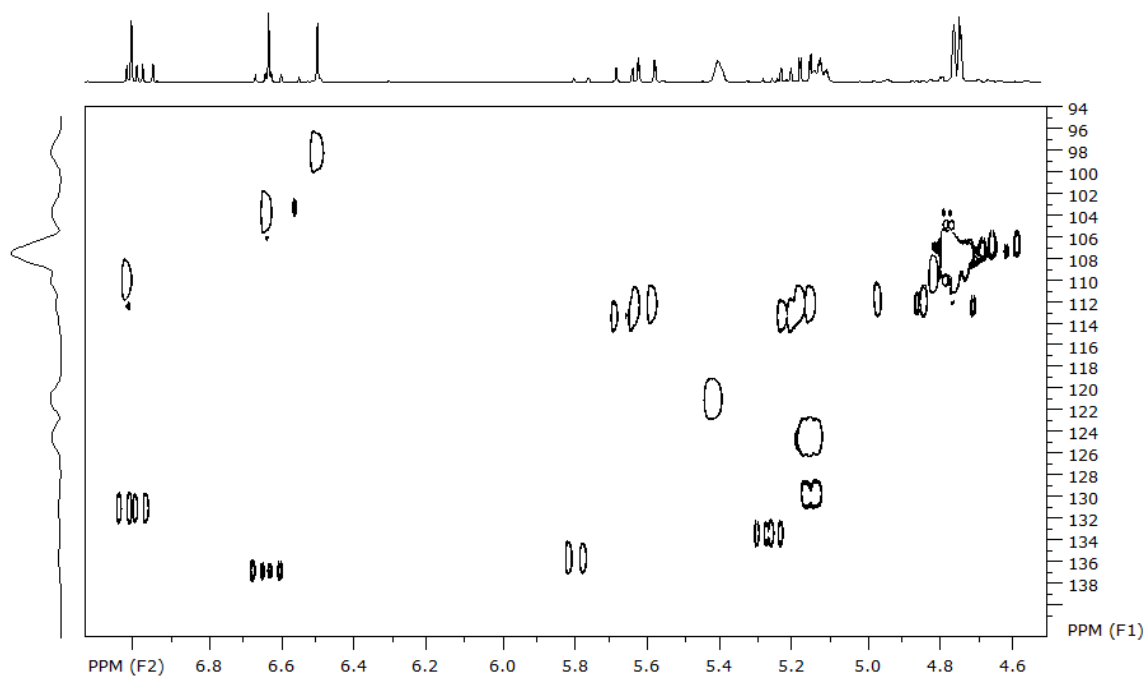


FIGURA 2.132 - Expansão do mapa de contorno HSQC do óleo essencial de *D. lanceolata* (400 MHz, CDCl₃).

Este é o primeiro relato da composição química do óleo essencial obtido das folhas de *D. lanceolata*.

2.12 Ensaio com *Duguetia lanceolata*

Os extratos (de folhas, caule, casca do fruto e ramos), frações e substâncias de *D. lanceolata* foram ensaiados pelo método de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *A. sexdens rubropilosa* seguindo o procedimento descrito na parte experimental.

Os resultados foram avaliados com base na análise estatística dos resultados obtidos após um período de 25 dias de experimento, onde foi empregado o teste “log-rank”, comparando as curvas de sobrevivência de formigas submetidas ao tratamento (extratos/frações/substâncias) com aquelas dos controles (dieta pura).

2.12.1 Ensaio inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* dos extratos *Duguetia lanceolata*

Para os extratos das folhas, caule, casca do fruto e ramos de *D. lanceolata* houve aumento gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia no decorrer do experimento. Todos apresentaram diferença significativa em relação ao controle (sobrevivência mediana das operárias no 18º dia de experimento e 78% de mortalidade acumulada no 25º dia), indicando uma toxicidade para as formigas cortadeiras.

O extrato das folhas (DLEF), apresentou uma sobrevivência mediana de 54% das operárias no 10º dia de experimento e 98% no 25º dia. Já o extrato dos ramos (DLER), apresentou uma mortalidade superior a 50% das operárias no 10º dia de experimento e ao final do experimento, no 25º dia, observou-se uma mortalidade de 96%.

Os extratos das cascas dos frutos (DLECAF) e sementes (DLES), também apresentaram atividade frente as operárias, com 86% e 98% de mortalidade acumulada ao final do experimento e 50% no 12º e 8º dia respectivamente. Estes dados podem ser observados no gráfico de sobrevivência FIGURA 2.133 e na TABELA 2.16 com os dados referentes à Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md).

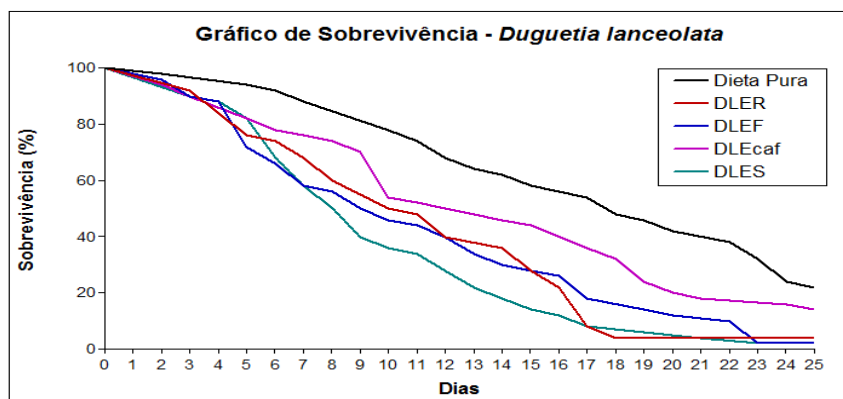


FIGURA 2.133 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Duguetia lanceolata* concentração de 2 mg/mL.

TABELA 2.16 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Duguetia lanceolata* na concentração de 2 mg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	8	12	22	38	46	58	78	18 a
DLER - Ramos	0	0	8	26	40	50	64	92	96	96	10,5 b
DLEF - Folhas	0	4	10	34	44	54	70	82	88	98	9,0 b
DLEcaf - Casca fruto	0	6	10	22	26	46	54	64	82	86	12 b
DLES - Sementes	0	0	10	32	50	64	82	92	96	98	8,5 b

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

Diante destes resultados dos ensaios e análise do perfil cromatográfico destes extratos, apenas o extrato dos ramos de *D. lanceolata* não foi estudado, pois apesar de sua atividade significativa, seu perfil cromatográfico se assemelha bastante com o extrato das folhas. Os demais extratos foram submetidos a extração líquido-líquido.

2.12.2 Ensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* das frações da extração líquido-líquido de *Duguetia lanceolata*

As frações obtidas da extração líquido-líquido dos extratos das folhas, sementes e casca dos frutos de *D. lanceolata* também foram ensaiados pelo método de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *A. sexdens rubropilosa* seguindo o procedimento descrito na parte experimental. Os resultados são observados nas FIGURAS 2.129 a 2.131 e TABELA 2.17 a 2.19.

A FIGURA 2.134 mostra as curvas de sobrevivência de operárias submetidas ao tratamento por ingestão com as frações das folhas (DLEF): fração hexânica (DLEF-1), fração diclorometano (DLEF-2), fração acetato de etila (DLEF-3) e fração hidroalcolica (DLEF-4).

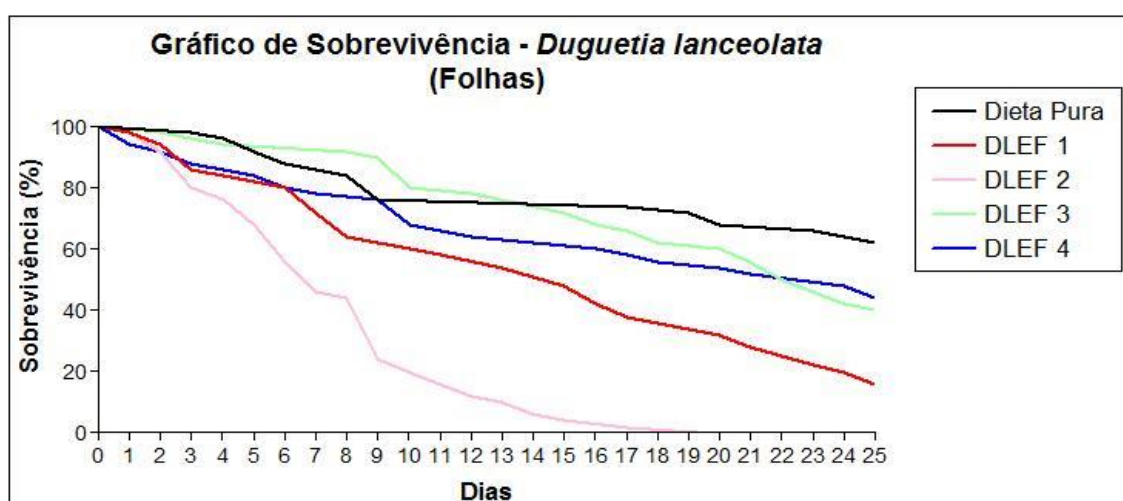


FIGURA 2.134 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de *Duguetia lanceolata*.

TABELA 2.17 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos foliares de *Duguetia lanceolata*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 a
DLEF 1 (Hex)	2	6	14	20	36	40	56	62	72	84	15 b
DLEF 2 (Dicloro)	2	8	20	44	56	80	94	98	100	100	7 b
DLEF 3 (Ac. Etila)	0	2	4	6	8	20	22	34	44	60	22 a
DLEF 4 (Hidro)	6	8	12	20	22	32	36	42	48	56	24 a

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

Observa-se que dentre as frações obtidas na extração líquido-líquido das folhas de *D. lanceolata* ensaiados, apenas a fração hexânica (DLEF-1) e diclorometano (DLEF-2) apresentaram atividade significativa, com uma mortalidade acima de 50% (Md) das operárias no 15º dia e 7º dia de experimento, respectivamente. Ao final do experimento, no 25º dia, observa-se uma mortalidade de 84% para DLEF-1 e 100% para DLEF-2.

O extrato hexânico das folhas de *D. lanceolata* (DLEF-hex) apresentou atividade em todos os ensaios realizado, por esse motivo, esta fração foi submetido à cromatografia em coluna de sílica comum (70-230 mesh), sob vácuo, e suas frações foram ensaiadas na busca de compostos puros com atividade frente às formigas.

Os resultados deste ensaio podem ser observados nas FIGURA 2.135 e na TABELA 2.18.

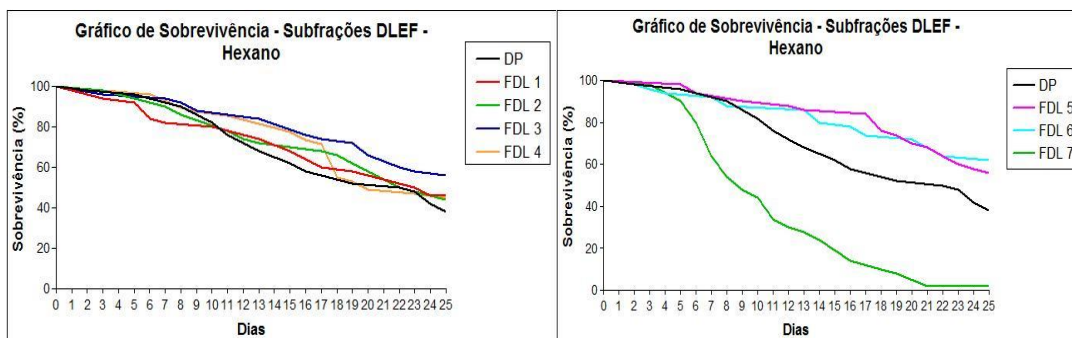


FIGURA 2.135 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos folhas de *Duguetia lanceolata*.

TABELA 2.18 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com subfrações dos extratos hexânicos das folhas de *Duguetia lanceolata*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	4	10	18	32	44	48	62	22,5 a
FDL 1	0	0	6	16	18	20	26	40	46	54	23 a
FDL 2	0	0	2	6	14	14	28	32	46	52	23 a
FDL 3	0	0	4	4	8	12	16	26	34	44	> 25 a
FDL 4	0	0	0	4	10	12	20	28	50	54	20 a
FDL 5	0	0	0	6	6	10	14	16	32	44	> 25 b
FDL 6	0	2	4	6	12	12	20	26	28	38	> 25 b
FDL 7	0	0	2	20	46	52	76	86	98	98	9 b

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

Para o ensaio frente as operárias, apenas a fração Fdl-7 apresentou atividade significativa, com Md=9 dias e 98% de mortalidade acumulada ao final do experimento. As demais frações tiveram sobrevivência mediana (Md) entre 20 e 25 dias e um mortalidade acumulada de 38 a 62% ao final do experimento.

Para as frações oriundas das partições do extrato das sementes (DLES) apenas a fração diclorometano (DLES-2) apresentou resultado significativo, com Md=

10 dias e 100% de mortalidade ao 21º dia de experimento. Estes dados podem ser analisados na TABELA 2.19 e FIGURA 2.136.

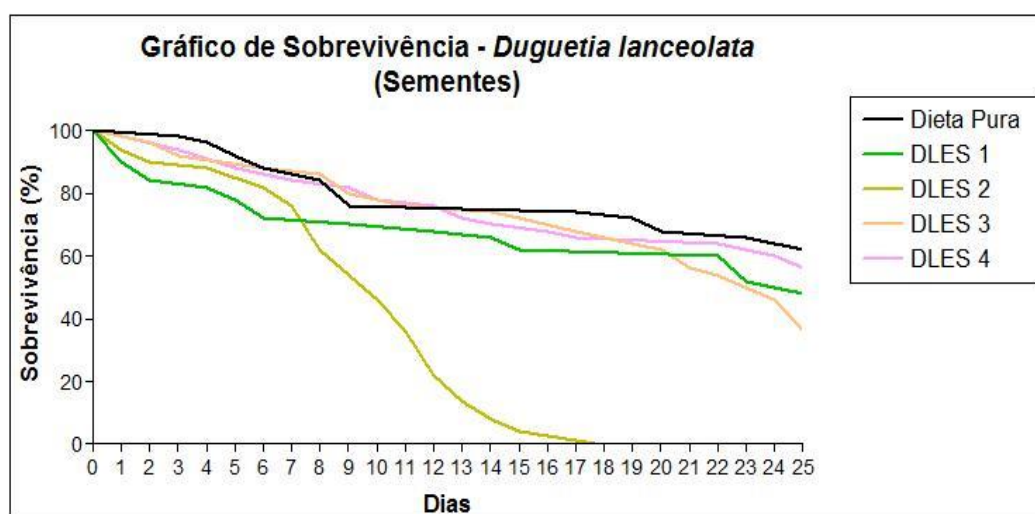


FIGURA 2.136 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de *Duguetia lanceolata*.

TABELA 2.19 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos das sementes de *Duguetia lanceolata*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 a
DLES 1 (Hex)	10	16	16	28	28	30	34	38	38	52	25 a
DLES 2 (Dicloro)	6	10	10	18	38	54	92	96	100	100	10 b
DLES 3 (Ac. Etila)	2	4	8	12	14	22	26	32	44	64	24 b
DLES 4 (Hidro)	2	2	6	12	16	22	30	34	34	44	> 25 a

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

Os resultados dos ensaios das extrações líquido-líquido do extrato das cascas dos frutos (DLE Caf) estão na TABELA 2.20 e FIGURA 2.137. A FIGURA 2.137 mostra as curvas de sobrevivência de operárias submetidas ao tratamento por ingestão com as frações: fração hexânica (DLE Caf-1), fração diclorometano (DLE Caf-2), fração acetato de etila (DLE Caf-3) e fração hidroalcolica (DLE Caf-4).

Apenas as frações hexanica (DLE Caf-1) e fração diclorometano (DLE Caf-2) apresentaram atividade significativa de acordo com o teste “log rank” ($p < 0,05$). Estas apresentaram 96% e 90% de mortalidade acumulada ao final do experimento e Md=18 e Md=17 dias respectivamente.

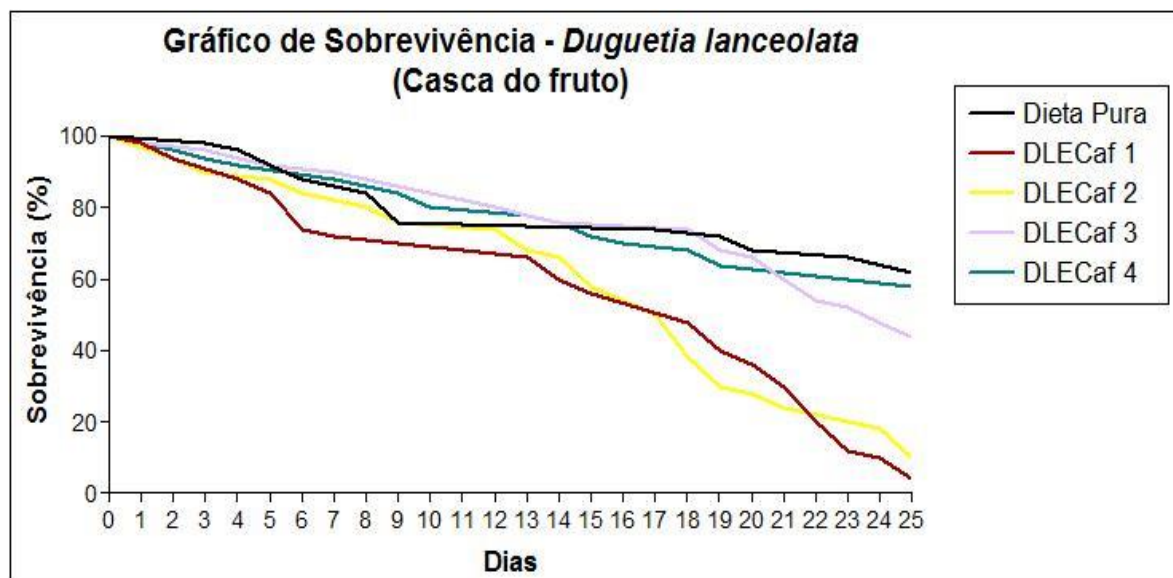


FIGURA 2.137 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*.

TABELA 2.20 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os extratos da casca do fruto de *Duguetia lanceolata*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	2	4	16	24	24	26	32	38	> 25 a
DLE Caf 1 (Hex)	2	6	6	26	28	28	40	44	70	96	18 b
DLE Caf 2 (Dicloro)	0	6	10	16	20	24	34	50	76	90	17 b
DLE Caf 3 (Ac. Etila)	2	2	4	8	12	16	24	24	40	56	24 a
DLE Caf 4 (Hidro)	2	4	6	8	14	20	24	30	38	42	> 25 a

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

2.12.3 Ensaios ensaio tópico sobre operárias de *A. sexdens rubropilosa*

O óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* foi submetido ao ensaio tópico sobre operárias de *A. sexdens rubropilosa* de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Este ensaio foi realizado nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL e os resultados obtidos podem ser observados na TABELA 2-21 e FIGURA 2.138.

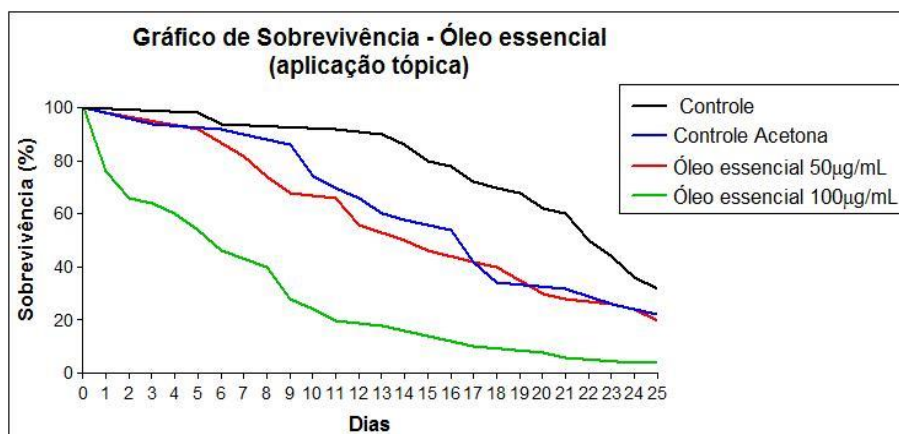


FIGURA 2.138 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de *D. lanceolata* nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL.

TABELA 2.21 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio tópico com óleo essencial de *D. lanceolata* nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	6	6	6	14	28	40	68	22a
Controle Acetona	0	0	6	8	12	26	42	58	68	78	17b
Óleo Essencial (50µg/mL)	2	2	2	8	26	32	50	58	72	80	14,5a
Óleo Essencial (100µg/mL)	24	34	36	54	60	76	82	90	94	96	6,0b

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

Observa-se que o óleo essencial apresentou uma mortalidade acumulada de 80% ao final do experimento na concentração de 50 µg/mL e 96% na concentração

de 100 µg/mL. De acordo com a sobrevivência mediana (Md) de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à bioensaios, diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle dieta pura = 22 dias e Md-controle acetona = 17 dias) foram observadas apenas para o óleo essencial na concentração 100 µg/mL de Md-óleo 100 µg/mL = 6 dias.

2.12.4 Ensaios frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus*

2.12.4.1 Ensaio dos extratos etanólicos e partições de *Duguetia lanceolata*

Os extratos de *D. lanceolata* foram submetidos a ensaios *in vitro* sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus* de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

Apenas o extrato de casca dos frutos, DLEcaf apresentou resultados significativos, com 86% de inibição no crescimento micelial na concentração de 1000 µg/mL ao final do experimento. Os demais extratos apresentaram inibição de 5% para as folhas (DLEF), 14% para os ramos (DLER) e 1% para as sementes (DLES) (FIGURAS 2.139 a 2.142 e TABELA 2.22).

TABELA 2.22 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* após 30 dias do experimento, com os extratos de *D. lanceolata*

Réplicas	DLEcaf	DLEF	DLER	DLES	Controle ¹
1	1,41	9,18	7,25	7,94	8,76
2	1,37	8,04	6,42	7,74	7,45
3	1,09	8,04	8,14	9,29	8,97
4	0,95	8,04	7,64	8,97	9,62
5		7,54	7,54	8,86	8,24
Média	1,21	8,17	7,40	8,56	8,61
SD	0,22	0,61	0,63	0,68	0,81
RSD	18,30	7,42	8,56	7,94	9,46
Inibição	86 %	5 %	14 %	1 %	

Controle referente à amostra; concentração da amostra: CIC: 1000 µg/mL; SD = desvio padrão e RSD = desvio padrão relativo.

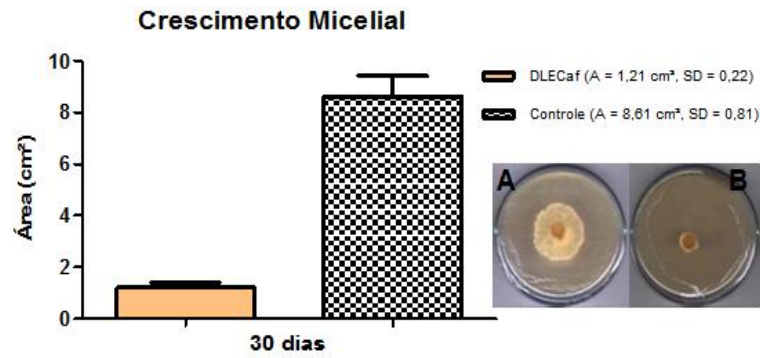


FIGURA 2.139 - Efeito do extrato DLE Caf (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. As imagens referem-se ao fungo na presença do controle (A) e extrato DLE Caf (1000µg/mL) (B).

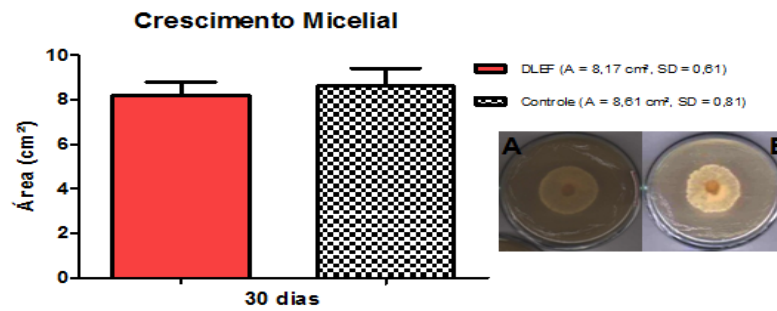


FIGURA 2.140 - Efeito do extrato DLE F (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. Imagens do fungo simbiote na presença do extrato DLE F (1000µg/mL) (A) e controle (B).

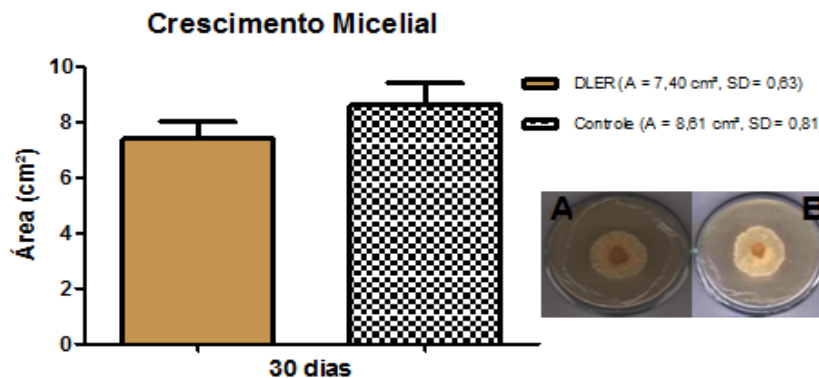


FIGURA 2.141 - Efeito do extrato DLE R (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Imagens do fungo simbiote na presença do extrato DLE R (1000 µg/mL) (A) e controle (B).

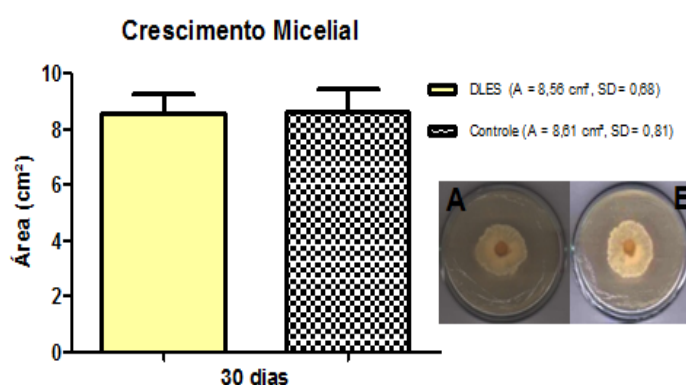


FIGURA 2.142 - Efeito do extrato DLES (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. Imagens do fungo simbiote na presença do extrato DLES (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) e controle (B).

O único extrato que apresentou inibição do crescimento micelial do fungo *L. gongylophorus*, foi o extrato da casca dos frutos (DLE Caf), portanto, apenas as frações hexânica (DLE Caf-1), fração diclorometano (DLE Caf -2), fração acetato de etila (DLE Caf -3) e fração hidroalcolica (DLE Caf -4) foram ensaiadas novamente (TABELA 2.23, FIGURA 2.143).

TABELA 2.23 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* após 30 dias do experimento, com os as frações da partição do extrato da casca dos frutos de *D. lanceolata*

Réplicas	DLE Caf Hexano	Controle Hexano	DLE Caf Dicloro	Controle Dicloro	DLE Caf AcoEt	DLE Caf Hidro	Controle MeOH
1	3,2031	10,6308	0,9499	10,1736	5,5543	7,4468	7,1595
2	3,2031	11,5753	0,9499	9,8373	4,5216	8,2406	9,0746
3	3,2031	10,8631	0,785	10,5155	5,5543	6,8778	7,4468
4	3,1400	10,6308	1,1304	9,7265	-	7,2547	8,8623
5	3,0775	9,3977	1,0930	9,5067	-	9,8373	8,4453
Média	3,1654	10,6195	0,9816	9,9519	5,2101	7,9315	8,1977
SD	0,0562	0,7852	0,1371	0,3966	0,5963	1,1759	0,8535
RSD	1,7756	7,3936	13,9704	3,9847	11,4442	14,8256	10,4111
Inibição	70		90		36	3	

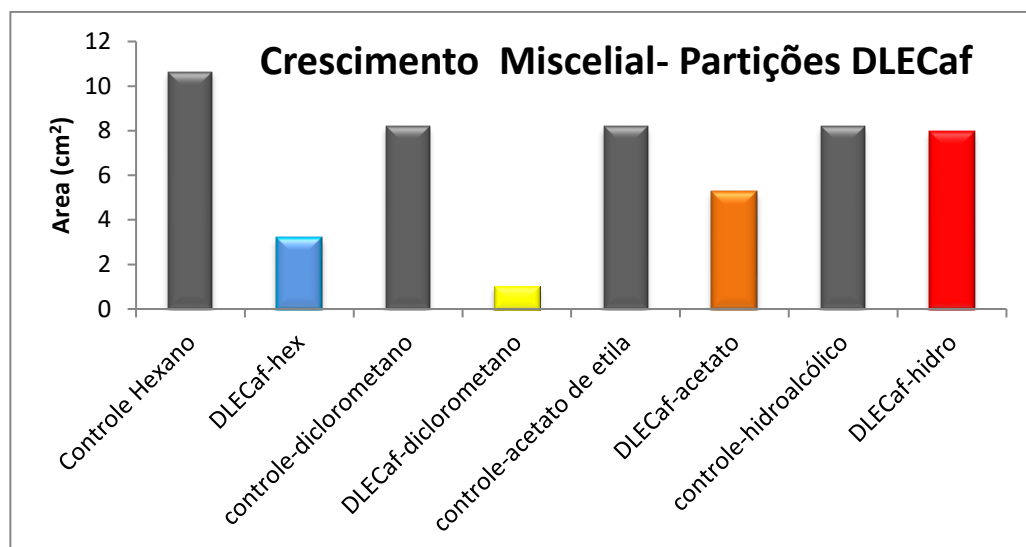


FIGURA 2.143 - Efeito das partições dos extratos (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte *L. gongylophorus*.

Observa-se na TABELA 2.23 e na FIGURA 2.143, os resultados do ensaio das frações da extração líquido-líquido do extrato das cascas dos frutos de *D. lanceolata*. A fração hexânica (DLECaF-Hexano) apresentou 70% de inibição do micélio e a fração diclorometano (DLECaF-dicloro), 90% de inibição.

Estas frações foram alvo de estudo, na busca de isolamento de compostos, porém devido a pouca quantidade isolada destes compostos (liriodenina, lisicamina, lanuginosina e oxolaurelina) e de massa, as substâncias isoladas não foram ensaiadas.

2.12.5 Substâncias isoladas- Ensaio de injeção sobre *Atta sexdens rubropilosa* e frente ao fungo simbionte *L. gongylophorus*

O Composto 2,4,5-trimetoxiestireno, isolado da partição hexânica das folhas de *D. lanceolata*, foi ensaiado em ambos os ensaios, os resultados obtidos não foram tão satisfatórios. No ensaio de injeção diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle = 25 dias e) foram observadas na concentração 0,1 mg/mL de Md-trimetoxi = 19 dias e apenas 56% de mortalidade acumulada.

Já o flavonoide (Cdlef-D1 4-7), substância 13, isolado da partição diclorometano das folhas (DLEF-dicloro) não foi observado diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle = 25 dias), na concentração de 0,1

mg/mL Md-flavonoide paQUIPODOL= 25 dias, sendo sua mortalidade de 30%, ou seja, menor que controle. Estes dados são observados na TABELA 2.24 e FIGURA 2.144 abaixo.

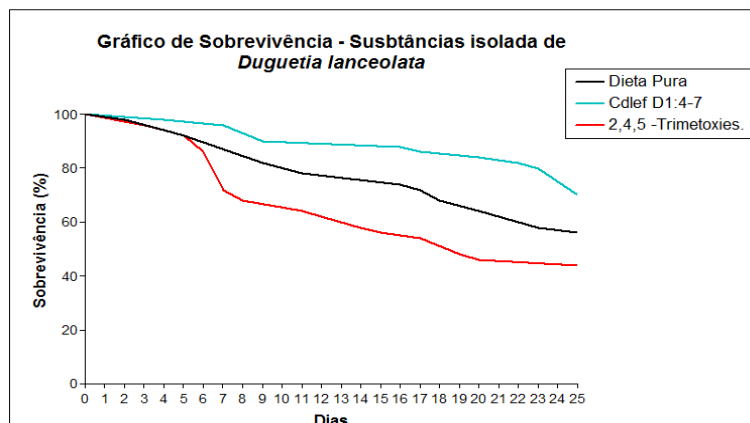


FIGURA 2.144 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de *Duguetia lanceolata* (Cdlef – D – 1:4-7 (flavonoide paQUIPODOL) e 2,4,5-trimetoxiestireno), ambas na concentração de 0,1 mg/mL.

TABELA 2.24 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de *Duguetia lanceolata* (Cdlef-D-1_4-7-flavonoide paQUIPODOL e 2,4,5-trimetoxiestireno), ambas na concentração de 0,1 mg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	8	8	18	22	28	36	44	>25 ^a
Cdlef-D-1:4 (Flavonoide PaQUIPODOL)	0	0	0	2	4	10	10	14	16	30	>25 ^a
2,4,5- Trimetoxiestireno	0	0	4	14	32	32	42	46	54	56	19 ^a

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

Com relação ao ensaio frente ao fungo simbiote, o composto 2,4,5-trimetoxiestireno apresentou 46% inibição do crescimento micelial, enquanto o flavonoide apresentou apenas 35% quando comparados aos seus respectivos controles. Estes dados estão na TABELA 2.25.

TABELA 2.25 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento

Réplicas				
Ensaio	2,4,5-trimetoxi-estireno	Controle ¹ Acetona 500µL	Flavonoide Paquipodol	Controle ² Acetona 500 µL
1	4,750506	8,862336	8,54865	12,56
2	4,90625	9,0746	7,159514	12,31006
3	4,372136	8,652584	8,0384	12,56
4	4,90625	8,968154	8,968154	12,56
5	4,90625	8,968154	8,0384	12,56
Média	4,7683	8,9052	8,1506	12,5100
SD	0,2315	0,1599023	0,6772	0,1117784
RSD	4,85482223	1,79561244	8,30826806	0,89351123
Inibição	46 %	-----	35 %	-----

¹ controle, 100% acetona_500µL, referente a amostra: 2,4,5- trimetoxiestireno.

² controle, 100% acetona_500µL, referente a amostra: flavonoide paquipodol.

O composto 2,4,5-trimetoxifenilamina (Sdl16_10), isolado da partição hexânica das folhas de *D. lanceolata*, foi ensaiado nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/ml. Os resultados são observados na TABELA 2.26 e FIGURA 2.145. No ensaio de ingestão diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md- controle = 25 dias e) foram observadas de Md-0,1 mg/mL = 19,5 dias e Md-0,2 mg/mL = 18,5 dias, com 56% e 64% respectivamente de mortalidade acumulada.

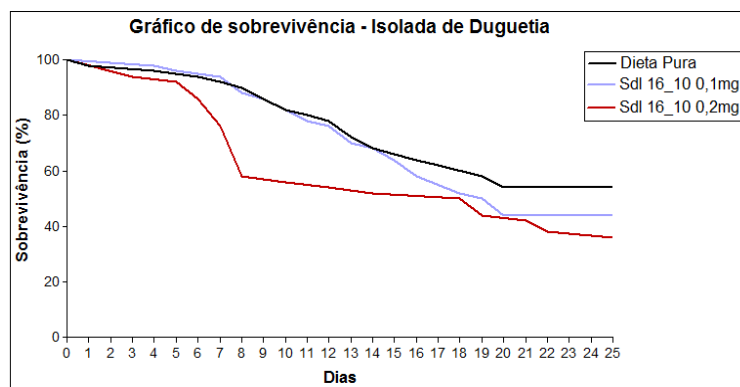


FIGURA 2.145 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com 2,4,5-trimetoxifenilamina isolado da partição hexânica das folhas de *Duguetia lanceolata* na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.

TABELA 2.26 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com 2,4,5-trimetoxifenilamina isolado da partição hexânica das folhas de *Duguetia lanceolata* na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	6	10	18	32	38	46	46	>25a
2,4,5- Trimetoxifenilamina 0,1mg/ml	0	2	0	4	12	18	32	42	56	56	19,5a
2,4,5- Trimetoxifenilamina 0,2mg/ml	0	0	6	14	42	44	48	48	58	64	18,5b

Com relação ao ensaio frente ao fungo simbiote, o composto 2,4,5-trimetoxifenilamina não apresentou resultado significativo, com apenas 8% de inibição do crescimento micelial, quando comparados ao controle. Estes dados estão na TABELA 2.27.

TABELA 2.27 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento

Réplicas		
Ensaio	2,4,5-trimetoxifenilamina	*Controle Acetato de etila 500µL
1	10,40094	10,74665
2	10,28695	11,3354
3	10,40094	11,3354
4	10,40094	11,21639
5	10,06087	11,21639
Média	10,3101	11,1700
SD	0,1478	0,244051
RSD	1,433735	2,1848734
Inibição	8%	-

*Controle, 100% Acetato de etila _500µL,

2.12.6 Ensaios do óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* frente o fungo *L. gongylophorus*.

O óleo essencial das folhas de *D. lanceolata* foram submetidos a ensaios *in vitro* sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus* de acordo com a metodologia descrita anteriormente (FIGURA 2.146 e TABELA 2.28).

Nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Observa-se que na concentração de 50 µg/mL, a inibição do crescimento micelial foi de 46%, já na concentração de 100 µg/mL tivemos uma inibição de 52%.

Tal fato pode indicar que há inibição, porém não nas concentrações testadas, os resultados indicam que possivelmente, em maiores concentrações, poderíamos obter uma maior inibição do fungo. O ensaio em concentrações maiores não foi realizado, devido à escassez de material.

TABELA 2.28 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento para o óleo essencial de *D. lanceolata*

Réplicas			
Ensaio	Óleo duguetia 50 µL	Óleo duguetia 100 µL	Controle
1	6,420986	6,331496	12,68591
2	7,159514	5,807744	12,56
3	6,971114	5,064506	12,56
4	6,971114	6,971114	13,19585
5	6,693224	-	12,56
Média	6,8432	6,0437	12,7124
SD	0,2888	0,8078	0,2757275
RSD	4,219711	13,36525	2,168973
	24	78	
Inibição	46 %	52 %	-

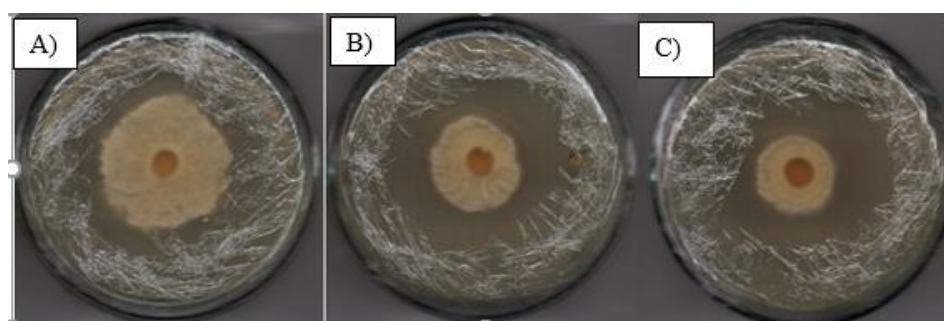


FIGURA 2.146 - Imagens do fungo simbiote na presença do controle (A), 50 µg/mL de óleo essencial de *D. lanceolata* (B) e 100 µg/mL de óleo de *D. lanceolata* (C).

2.12.7 Ensaios à frente *S. zeamais*

2.12.7.1 Ensaio dos extratos de *D. lanceolata* frente *S. zeamais*

Para o ensaio dos extratos brutos de *D. lanceolata* sobre *S. zeamais* expostos em amostras de milho, foram utilizadas duas concentrações (1500 e 3000 ppm, TABELA 2.29) estabelecidas com base em estudos prévios (RIBEIRO, 2010).

TABELA 2.29 - Mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com extratos etanólicos de *D. lanceolata* (Annonaceae) (1500 ppm e 3000 ppm). Temp.: 25 ± 2 °C; U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 h

Extrato	Estrutura Vegetal	Mortalidade (%) ¹
1.500 ppm		
<i>Etanólico de Duguetia lanceolata</i>	Casca dos Frutos	0,00 \pm 0,00
	Folhas	4,00 \pm 1,24
	Ramos	0,00 \pm 0,00
	Sementes	1,50 \pm 1,50
Testemunha (acetona:metanol, 1:1)	--	1,50 \pm 0,76
3.000 ppm		
<i>Etanólico de Duguetia lanceolata</i>	Casca dos frutos	0,50 \pm 0,50
	Folhas	37,50 \pm 4,60
	Ramos	1,00 \pm 0,66
	Sementes	0,50 \pm 0,50
Testemunha (acetona:metanol, 1:1)	--	0,00 \pm 0,00

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

Apenas extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* apresentou resultados significativos. Na concentração de 1500 ppm houve uma mortalidade dos adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho de 4,00 \pm 1,24% ao 10º dia (\pm erro padrão). Já na concentração de 3000 ppm, a mortalidade foi de 37,50 \pm 4,60%.

Estes dados levaram ao interesse em se estudar o extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* na busca de compostos ativos.

2.12.7.2 Ensaio das partições do extrato ativo (DLEF) frente *S. zeamais*

Para o ensaio das frações extração líquido-líquido sobre *S. zeamais* expostos em amostras de milho foram calculadas a CL₅₀ e CL₉₀ a partir da mortalidade obtida no ensaio do extrato, quando há mortalidade expressiva. No entanto, o extrato de folhas de *D. lanceolata* não atingiu 50% de mortalidade, por isso, as frações da extração líquido-líquido foram testadas mesma concentração empregada no ensaio dos extratos brutos (1500 ppm). Os dados deste ensaio podem ser observados na TABELA 2.30 e FIGURA 2.147.

TABELA 2.30 - Mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com partições do extrato etanólico de folhas de *D. lanceolata* (Annonaceae) (1500 ppm). Temp.: 25 \pm 2 °C; U.R.: 60 \pm 10% e fotofase de 14 h

Partição do extrato etanólico das folhas de <i>Duguetia lanceolata</i>	Mortalidade (%)*
DLEF-Hexano	74,0 \pm 4,76a
DLEF-Diclorometano	6,0 \pm 3,48b
DLEF-Acetato de etila	2,5 \pm 1,53b
DLEF-Hidroálcoolica	4,0 \pm 1,45b
Controle (Acetona: Metanol (1:1))	3,5 \pm 1,30 b

* Aplicadas com um volume de calda de 30 L t⁻¹.

* Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si com base nas comparações múltiplas de Tukey (GLM com distribuição. Quase-binomial, p>0,05).

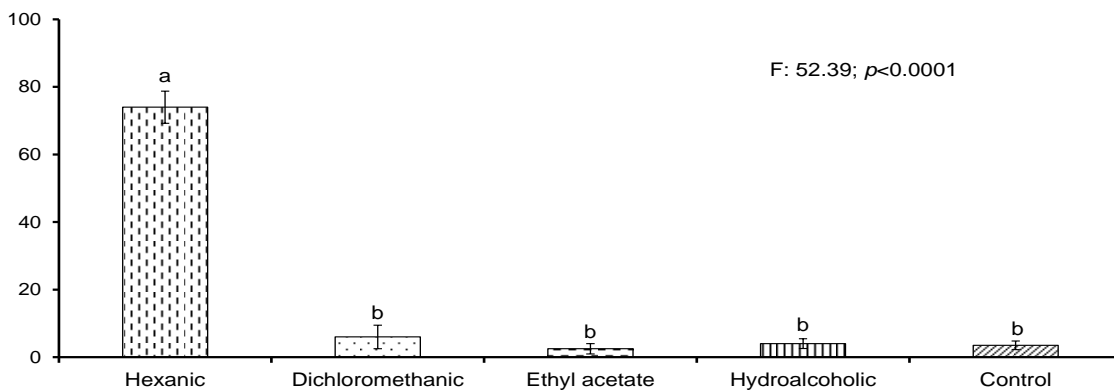


FIGURA 2.147 - Percentagem de mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com partições do extrato etanólico de folhas de *D. lanceolata* (Annonaceae) (1500 ppm). Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Os resultados mostram que a fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* apresentou 74 % de mortalidade de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho, ao 10º dia, demonstrando assim a atividade desta fração sobre a inseto praga.

2.12.7.3 Ensaio das subfrações obtidas do extrato das folhas de *D. lanceolata* (DLEF) frente *S. zeamais*

Para os ensaios sobre *S. zeamais* expostos em amostras de milho as subfrações obtidas da fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* foram testadas na concentração de 300 ppm (1/5 da concentração utilizada para as frações oriundas da extração líquido-líquido) e 750 ppm. Estes dados podem ser observados na TABELA 2-31 e FIGURA 2-148 e 2-149.

TABELA 2.31 - Mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com subfrações da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* (Annonaceae) (300 ppm). Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 h

Subfrações	Mortalidade (%)*
FDL1	4,50 \pm 1,38
FDL2	0,50 \pm 0,50
FDL3	2,00 \pm 1,10
FDL4	2,00 \pm 1,10
FDL5	2,50 \pm 1,11
FDL6	1,66 \pm 1,11
FDL7	0,50 \pm 0,50
Controle (Acetona)	1,50 \pm 0,76
Controle (Metanol: água (1:1))	0,50 \pm 0,50

* Diferença não significativa entre os tratamentos (GLM com distribuição. Quase binomial, $p > 0,05$).

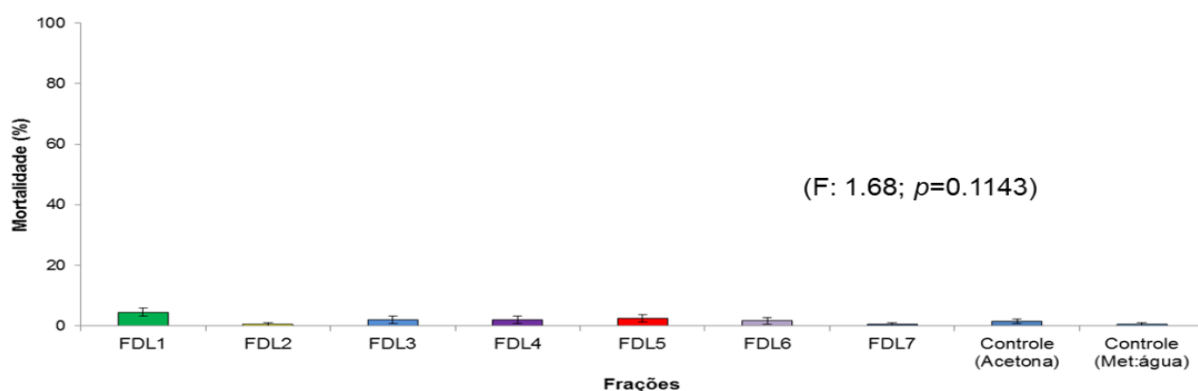


FIGURA 2.148 - Percentagem de mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com subfrações da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* (Annonaceae) (300 ppm). Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 h.

Os resultados mostram que nenhuma das subtrações apresentaram porcentagem significativa de mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S.*

zeamais expostos em amostras de milho na concentração de 300 ppm. Diante dos resultados, estas foram submetidas ao ensaio na concentração de 750 ppm, onde a fração a subfração Fdl-2 e Fdl-6 causaram mortalidades significativas para *S. zeamais*. Estes resultados estão na Figura 2-149.

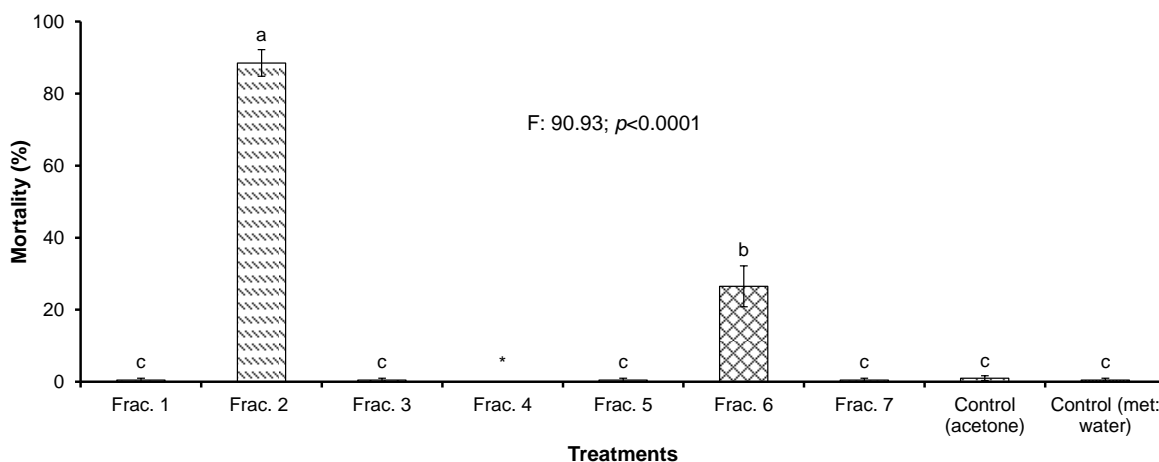


FIGURA 2.149 - Percentagem de mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com subfrações da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* (Annonaceae) (750 ppm). Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Barras seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuições quase binomiais, seguido por um teste posthoc de Tukey, $p < 0,05$). * Não incluído na análise (variância nula).

As substâncias isoladas da fração Fdl-2 (mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e o 2,4,5-trimetoxiestireno) foram ensaiadas na concentração de 75 ppm. Não foi observado atividade significativa destes compostos frente ao *S. zeamais*, a mistura de esteroides apresentou 3% de mortalidade e o 2,4,5-trimetoxiestireno apenas 6%. Estes resultados estão descritos na Tabela 2.32.

TABELA 2.32 - Percentagem de mortalidade ao 10º dia (\pm erro padrão) de adultos de *S. zeamais* expostos em amostras de milho (10 g) tratadas com as substâncias isoladas da fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* (Annonaceae) mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e o 2,4,5-trimetoxiestireno (75 ppm). Temp.: $25\pm 2^\circ\text{C}$; U.R.: $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 h

Nota: Insecto® (formulação à base de terra de diatomáceas) foi utilizado a 1.000 mg kg^{-1} como controle positivo.

Composto	Mortalidade (%) ¹	Número de insetos expostos ²	Grãos Danificados (%) ¹	Perda de Peso dos Grãos	
				Total (%) ³	Relativa ⁴
2,4,5-trimetoxiestireno	6,00 \pm 1,87	15,60 \pm 2,31 b	53,03 \pm 8.12 b	6,41	60,24
Mistura de esteóides [(campesterol (8.44%) + estigmasterol (12.37%) + sitosterol (79.19%)]	3,00 \pm 2,00	17,20 \pm 2,35 b	52.71 \pm 4.73 b	7,17	67,39
Inseto® (Controle positivo)	100,00 \pm 0,00*	0,20 \pm 0,20 c	1.33 \pm 1,33 c	0,09	0,85
Acetona (controle negativo)	1,00 \pm 1.00	29,40 \pm 3,38 a	85,10 \pm 4,72 a	10,64	100,00
F	2,0686 ^{ns}	41,288	35,058	--	--
p value	0,1691	< 0,0001	< 0,0001	--	--

¹ Médias seguidas por letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase binomial seguida pelo teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$);

²Médias seguidas de letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (GLM com distribuição quase Poisson seguida pelo teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$

³Calculo usando a fórmula proposta por Adams e Schulten (1976);

⁴Calculo a partir da comparação relativa do tratamento com seu respectivo controle;

*Aplicado com pulverização de 30 L t-1; ** Não incluído na análise (variância nula).

2.13 Conclusão

Nesta parte do trabalho, foi possível contribuir para a quimiossistemática de *D. lanceolata*: no total foram isoladas 17 substâncias sendo três esteróides, nove alcalóides (dos quais apenas 6 foram identificados), um flavonoide, dois derivados aromáticos, um derivado de dihidronaftalenona e um derivado de aminoácido.

Os extratos mais ativos frente a *A. sexdens rubropilosa* foram DLEF-Hex e DLEF-dicloro. Para DLEF-Hex, as sete subfrações (Fdl-1, Fdl-2 Fdl-3 Fdl-4 Fdl-5 Fdl-6 Fdl-7) obtidas após a realização de uma coluna cromatográfica, sob vácuo, foram encaminhadas ao ensaio de incorporação em dieta artificial das formigas. De acordo com a sobrevivência mediana (Md) de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à bioensaios, diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle = 22,5 dias) foram observadas apenas para a fração (Md-Fdl 7 = 9 dias) com mortalidade acumulada de 98% ao final do experimento. Esta fração foi estudada e levou ao isolamento de 3 alcalóides.

Na fração Fdl-2 foram isolados dois compostos majoritários: o 2,4,5-trimetoxiestireno e 2,4,5-trimetoxifenilamina, além de três esteróides já descritos na literatura sem atividade frente às formigas. O 2,4,5-trimetoxiestireno foi submetido ao ensaio de incorporação em dieta artificial das formigas, onde diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle = 25 dias) foram observadas na concentração 0,1 mg/mL de Md-trimetoxi = 19 dias com 56% de mortalidade acumulada. Já o composto 2,4,5-trimetoxifenilamina, foi ensaiado nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/ml no ensaio de ingestão diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle = 25 dias e) foram observadas de Md-0,1 mg/mL = 19,5 dias e Md-0,2 mg/mL = 18,5 dias, com 56% e 64% respectivamente de mortalidade acumulada. No ensaio frente ao fungo simbionte, a inibição do crescimento micelial foi de apenas 8%.

Da fração DLEF-dicloro foi isolado majoritariamente um flavonoide, este foi submetido ao ensaio de incorporação em dieta artificial das formigas, no qual não foi observado diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle = 25 dias), na concentração de 0,1 mg/mL Md-flavonoide = 25 dias,

sendo sua mortalidade de 30%. Apesar de majoritário nesta fração não é o componente responsável pela atividade na fração frente as formigas. No ensaio *in vitro* sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*, o flavonoide apresentou 35% de inibição no crescimento micelial.

Dentre os extratos de *D. lanceolata* ensaia dos *in vitro* sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*, apenas o extrato etanólico da casca dos frutos DLECAF apresentou atividade significativa, exibindo 86% de inibição no crescimento micelial na concentração de 1000 µg/mL ao final do experimento.

Em virtude dos resultados obtidos dos extratos de *D. lanceolata* a atividade possivelmente está relacionada a mistura de alcaloides, pois quando essa mistura foi ensaiada, apresentou 84% de inibição do crescimento micelial na concentração de 1000 µg/ml e no ensaio nas operárias, apresentou mortalidade média Md= 3 dias nas concentrações de 1 mg/ml e 2 mg/mL quando comparado ao controle. Isso indica que a atividade encontrada está relacionada a presença destes alcaloides, uma vez que os compostos majoritários não apresentaram atividade significativa frente aos ensaios biológicos.

O estudo do óleo essencial, levou a identificação de 5 compostos (β -cariofileno; trans-muurola-4, (14),5-dieno; β -bisaboleno; 3,4,5-trimetoxiestireno e 2,4,5-trimetoxiestireno). Os resultados do estudo *in vitro* sobre o fungo simbiote *L. gongylophorus*, mostram que na concentração de 50 µg/mL, houve 46% de inibição do crescimento micelial, já na concentração de 100 µg/mL a inibição foi de 52%. O aumento proporcional da inibição com uma maior concentração nos leva concluir a melhores resultados de inibição em maiores.

No ensaio de *S. zeamais* expostos em amostras de milho, os extratos de *D. lanceolata* apenas o extrato etanólico das folhas de *D. lanceolata* apresentou resultados significativos mais especificamente a fração hexânica (DLEF-hex), com 74 % de mortalidade, ao 10º dia.

As substâncias isoladas da fração Fdl-2 (mistura dos esteróides campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e o 2,4,5-trimetoxiestireno) foram ensaiados na concentração de 75 ppm. Não foi observado atividade significativa destes compostos frente ao *S. zeamais*, a mistura de esteroides apresentou 3% de mortalidade e o 2,4,5-trimetoxiestireno apenas 6%. Uma hipótese para a atividade da fração DLEF-hex é sinergismo, ou seja, ação combinada de todas as frações e seus constituintes que

produzem a atividade biológica, quando estes constituintes são separados, a atividade deixa de existir.

2.14 Referências Bibliográficas

- ADAMS, R. *Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing, Carol Stream, 4th Ed. 2007.
- BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: Recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat. Prod. Rep.* 22: 269–303, 2005.
- COELHO, E.M.; FERONI, L.R.A.; BERBERT, P.A.; MARTINS, J.H. Eficácia da mistura dióxido de carbono-fosfina no controle de *Sitophilus zeamais* em função do período de exposição. *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* 4: 227-234, 2000.
- COITINHO, R.L.B.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, M.G.C.G.; CÂMARA, C.A. Toxicidade por fumigação, contato e ingestão de óleos essenciais para *Sitophilus zeamais* MOTSCHULSKY, 1885 (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). *Ciênc. Agrotec. Lavras* 35: 172-178, 2010.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley & Sons, 2ª ed., 2009, 507 p.
- ENCYCLOPEADIA BRITANNICA,
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/26391/Annonaceae>, acessado em 19/10/2010.
- FECHINE, I.M.; LIMA, M.A.; NAVARRO, V.R.; da CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MAIA, J.G.S. Alcaloides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 12: 17-19, 2002.
- HUONG, D.T.; LUONG, D.V.; THAO, T.T.P.; SUNG, T.V. A new flavone and cytotoxic activity of flavonoid constituents isolated from *Milium balansae* (Annonaceae). *Pharmazie* 60: 627–629 (2005).
- LIMA, L.A.R.S.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chem.* 122: 1129–1138, 2010.
- MIYASHIRA, C.H. "Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento in vitro de seu fungo mutualista. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 2007.PP. 26-28.
- NASCIMENTO, M.C.B.S. Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades. Seropédica, RJ: 2008.

198p. [Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Univ. Federal Rural do Rio de Janeiro].

NAVARRO, V.R.; SETTE, I.M.F.; Da-CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MAIA, J.G.S. Alcaloides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 3:23-29,2001.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introdução a Espectroscopia*, Cengage, 2010.

RABELO, D.M.; Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antiplasmódica de Espécies de Annonaceae da Amazônia: Estudo Fitoquímico Bioguiado de *Guatteria citriodora*. 2014. 120 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2014.

RIBEIRO, L.P.; Bioprospecção de extratos vegetais e sua interação com protetores de grãos no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: curculionidae). Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar favonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*. 55: 567-573, 2000.

SILVA, D.B.; TULLI, E.C.O.; GARCEZ, W.S.; NASCIMENTO E.A.; SIQUEIRA, J.M. Chemical Constituents of the Underground Stem Bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), *J. Braz. Chem. Soc.* 18: 1560-1565, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. John Wiley & Sons, Inc., 2000.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, Biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Quim. Nova* 21: 557-559, 1998.

SOUSA, O.V.; SOARES JÚNIOR, D.T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R.G.; GATTASS, C.R.; KAPLAN, M.A.C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 14: 11-14, 2004.

SUGA, T. & KONDO, S. Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*. *Phytochemistry*, 13: 522-523, 1974.

WATERMAN, P. G.; 2,4,5-trimethoxyxystrene from *Pachypodan thiumstaudtii* *Phytochemistry*. Vol. IS,347,1974.

CAPÍTULO 3 - ESTUDO FOTOQUÍMICO
BIOMONITORADO DE *Lithraea molleoides*

3.1 Ordem Sapindales

Segundo CRONQUIST (1981, 1988), a ordem Sapindales é composta pelas famílias Staphyleaceae, Melianthaceae, Bretschneideraceae, Akaniaceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Aceraceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Julianiaceae, Simaroubaceae, Cneoraceae, Meliaceae, Rutaceae e Zygophyllaceae. Dentre estas, as principais famílias estudadas pelo grupo de produtos naturais da UFSCar são Meliaceae, Anacardeaceae e Rutaceae.

O interesse no estudo de espécies da ordem Sapindales deve-se à presença de classes de metabólitos secundários que apresentam várias atividades biológicas, principalmente contra insetos (NEBO *et al.*, 2009).

3.2 Família Anacardiaceae

Anacardiaceae (Angiosperm Phylogeny Group, APG, 2003) é constituída por aproximadamente 76 gêneros e 600 espécies. Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos (Anacardieae, Dobineae, Rhoeeae, Semecarpeae e Spondiadeae). Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa.

A dermatite de contato provocada por essas plantas é atribuída principalmente a compostos fenólicos e catecólicos ou a mistura destas substâncias, denominados lipídios fenólicos (CORRÊA *et al.*, 2006; LACCHIA e GUERREIRO, 2009).

Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lansea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirirae* *Melanorrhoea* (CORRÊA *et al.*, 2006).

Alguns estudos mostram que diversas substâncias, tais como derivados de fenol foram isoladas de plantas dessa família, dentre elas, 5-alquilresorcinóis que possuem atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica (LOPEZ, *et al.*, 2005; KOZUBEK *et al.*, 2001; CHATURVEDULA *et al.*, 2002).

Os estudos destas espécies possibilitaram também verificar a ocorrência de substâncias como esteroides, flavonoides, xantonas, terpenos e, principalmente, dos derivados de lipídios fenólicos e na classe dos flavonoides, os biflavonoides são os mais frequentes (CORRÊA *et al.*, 2006). Esta diversidade de metabólitos secundários,

associada à diferentes atividades biológicas dos constituintes têm justificado o interesse no estudo de espécies desta família.

3.3 Espécie *Lithraea molleoides*

Lithraea molleoides Vell. (Anacardiaceae) é uma árvore (Figura 07) encontrada no Brasil, Paraguai, Bolívia, Uruguai, Argentina e Chile. É popularmente usada na forma de extrato alcoólico, decocção e infusão para o tratamento de tosse, bronquite, artrite, doenças do sistema digestivo, como diurético, tranquilizante, hemostático e tônico (SHIMIZU *et al.*, 2006).



FIGURA 3.1 - Folhas, flores e frutos de *Lithraea molleoides*. Fonte: <http://belezadacaatinga.blogspot.com/2011/08/arozeira-lithraea-molleoides-e-schinus.html> acessado em 22-01-2012 as 18:44 hs.

Na literatura encontram-se estudos dessa espécie relacionados à cromatografia gasosa de seus óleos essenciais, catecóis alergênicos e quatro resorcinóis alquilênicos (Z,Z)-5-(trideca-4,7-dienyl) resorcinol (1), (Z,Z,Z)-5-(trideca-4,7,10-trienyl)resorcinol (2), (Z,Z,E)-5-(trideca-4,7,10-trienyl) resorcinol (3) e (Z)-5-(trideca-4-enyl)resorcinol (4), isolados da parte aérea de *Lithraea molleoides* na FIGURA 3-2, VALCIC, 2002).

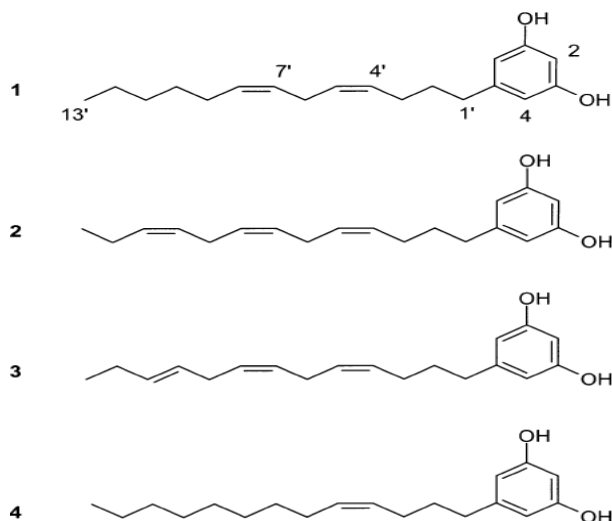


FIGURA 3.2 - Resorcinóis alquilênicos de *Lithraea molleoides*

Há relatos na literatura sobre atividade anti-ulcerogênica do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Lithraea molleoides* (ARAÚJO *et al.*, 2006) e atividade citotóxica contra uma linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano Hep G2 (RUFFA *et al.*, 2002; LÓPEZ *et al.*, 2005).

Diante da existência de apenas estes estudos sobre atividade dessa espécie, ela desperta o interesse para a busca de compostos inseticidas e/ou fungotóxicos.

3.4 Objetivos

Este capítulo tem como objetivo o estudo biomonitorado de *Lithraea molleoides*: Avaliar os potenciais inseticidas e/ou fungicidas dos extratos, frações e substâncias isoladas frente às operárias da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*;

3.5 Procedimento Experimental

3.5.1 Preparo do material vegetal e extratos

As folhas, caules e galhos de *Lithraea molleoides* foram coletadas em uma fazenda localizada em Chapadão do Sul- Paraíso (MS). Estes materiais foram secos

em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 72 horas e pulverizados em um moinho tipo Willey. Em seguida, os pulverizados foram submetidos a três extrações consecutivas com etanol, à temperatura ambiente, na proporção (5:1 v/p), com intervalo de três dias entre cada extração, em repouso com etanol. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (FIGURA 3.3)



FIGURA 3.3 - Preparo dos extratos de *L. molleoides*.

Foram obtidos os extratos observados na Tabela 01 com suas respectivas massas.

TABELA 3.1 - Extratos obtidos com seus respectivos códigos e massas

Extrato de <i>Lithraea molleoides</i>	Material vegetal (g)	Código	Massa (g) Extrato
Galho Etanol	546,0	LMEG	23,79
Folhas Etanol	1198,0	LMEF	58,06
Caule Etanol	718,0	LMEC	32,37

Os extratos foram submetidos aos ensaios biológicos inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operarias de *Atta sexdens rubropilosa*, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP- Rio Claro-SP e ensaio de

inibição de *L. gongylophorus* in vitro pelo método de Incorporação realizado na Universidade Federal de São Carlos

3.6 Fracionamento dos extratos *L. molleoides*

Os extratos LMEF, LMEG e LMEC foram submetidos a uma partição líquido-líquido utilizando como fase hidroalcolica MeOH: H₂O (1:3). Em um funil de separação adicionou-se o extrato solubilizado em 100 mL de metanol e 300 mL de água. Em seguida as extrações foram feitas com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila) conforme mostra FIGURA 3-4.

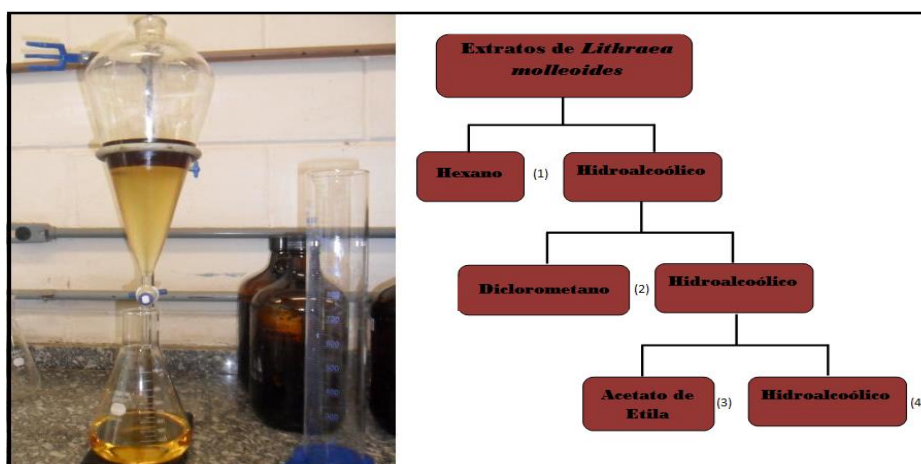


FIGURA 3.4 - Fluxograma dos procedimentos gerais de Partição líquido-líquido dos extratos etanólicos de *L. molleoides*.

- (1) Extração com hexano por três vezes, com 200 mL por vez,
- (2) Extração com diclorometano por três vezes, com 200 mL por vez,
- (3) Extração com acetato de etila por três vezes, com 200 mL por vez,
- (4) Fração hidroalcolica (metanol/água).

Ao final de cada extração, as frações obtidas foram concentradas em evaporadores rotativos obtendo-se quatro frações para cada um dos extratos. A TABELA 3.2 mostra os extratos obtidos por partição líquido-líquido com suas respectivas massas.

TABELA 3.2 - Subtrações dos extratos etanólicos de *L. molleoides* após a partição líquido-líquido

Extratos	Partições	MASSA (g)
FOLHAS	LMEF-Hexano	34,94
	LMEF -Diclorometano	2,10
	LMEF -Acetato de etila	18,17
	LMEF -Hidroalcóolica	9,78
GALHOS	LMEG-Hexano	12,48
	LMEG -Diclorometano	2,08
	LMEG -Acetato de etila	7,14
	LMEG -Hidroalcóolica	3,57
CAULE	LMEC-Hexano	16,76
	LMEC -Diclorometano	2,77
	LMEC -Acetato de etila	8,93
	LMEC-Hidroalcóolica	3,96

Após a obtenção destas frações, estas foram analisadas via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H) e posteriormente encaminhadas para bioensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP-Rio Claro-SP e ensaio de inibição de *L. gongylophorus* in vitro pelo método de incorporação realizado na Universidade Federal de São Carlos.

3.7 Estudo fitoquímico de *Lithareae molleoides*

3.7.1 Fracionamento da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Lithareae molleoides* (LMEF-hex)

O extrato da partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Lithraea molleoides* (LMEF-hex 17,9634 g) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica comum (70-230 mesh) (h=24 cm, ϕ =7 cm) sob vácuo, utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol.

Foram obtidas 14 frações, as quais foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em 8 frações: Flm-1 (hexano), Flm-2 (hexano: diclorometano), e Flm-3, Flm-4, Flm-5 (diclorometano), Flm-6 e Flm-7(acetato de etila) Flm-8 (metanol). As condições estão detalhadas na FIGURA 3.5.

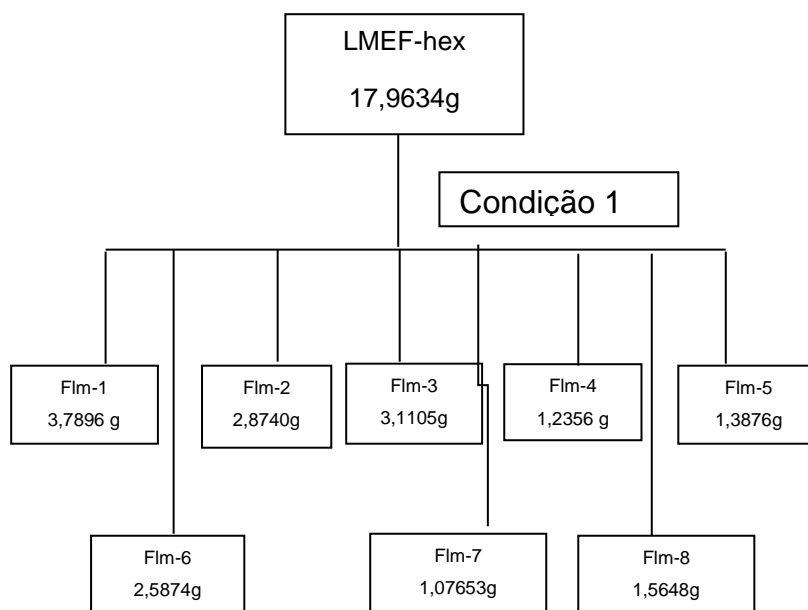


FIGURA 3.5 - Condição 1: Coluna de vidro ($\phi \times h = 7 \text{ cm} \times 24 \text{ cm}$), Fase estacionária: gel comum (70-230 mesh), Modo de eluição: gradiente, Solventes: Hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol.

Estas frações foram enviadas para ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*).

3.7.2 Fracionamento da fração Flm-3

A subfração Flm-3 (massa = 3,0952 g) apresentou atividade frente ensaio por ingestão sobre *Atta sexdens rubropilosa*, com mortalidade de 100% das operárias ao 10º dia de experimento. Por este motivo, o material foi fracionado por cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20, utilizando metanol: diclorometano (1:1 v/v) como fase móvel (condição 8). Foram coletadas 14 frações, estas foram analisadas via RMN ¹H

e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em 7 novas frações apresentadas na FIGURA 3.6.

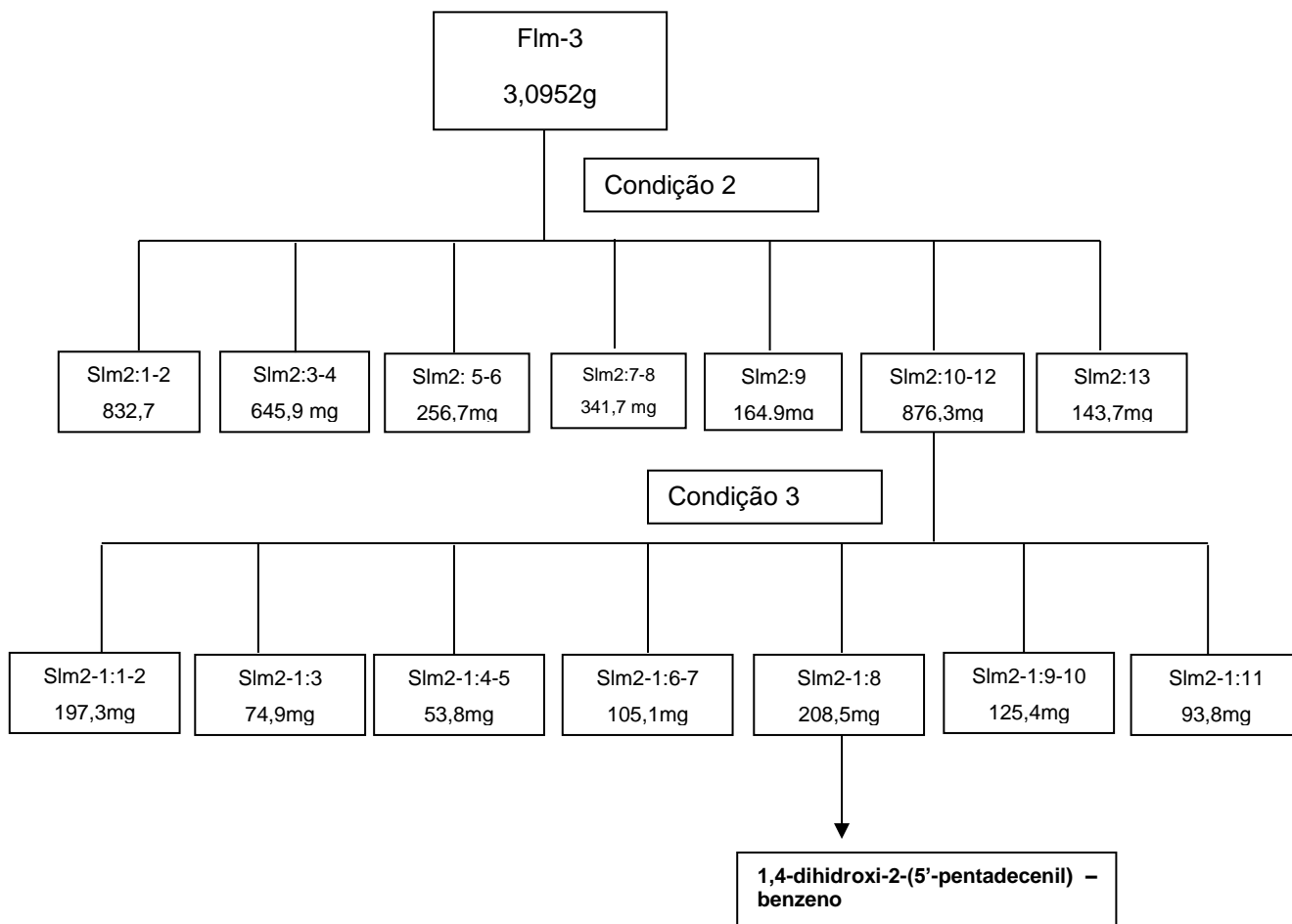


FIGURA 3.6 - Fluxograma- Condição 2: coluna de vidro ($\varphi \times h = 4,0 \times 56$ cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol:diclorometano (1:1). Condição 3: coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \times 56$ cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol.

Em seguida, a fração Slm2:10-12 (massa = 812,3 g) foi submetida cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20, utilizando metanol como fase móvel (condição 3). Foram coletadas 11 frações, estas foram analisadas via RMN ^1H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em

7 novas frações, dentre elas o composto majoritário da fração: 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno. Estas estão apresentadas no fluxograma da FIGURA 3.7.

3.7.3 Fracionamento da fração Flm-6

A subfração Flm-6 (massa= 3,052 g) foi escolhida para o fracionamento antes dos resultados dos ensaios por ingestão sobre *Atta sexdens rubropilosa* serem finalizados. A escolha desta fração foi devido ao espectro de RMN ¹H que apresentava sinais na região de aromáticos. No ensaio por ingestão sobre *Atta sexdens rubropilosa*, sua atividade foi significativa quando comparada ao controle, com mortalidade de 56% das operarias ao 25° dia de experimento.

A subfração Flm-6 (massa= 3,052 g) foi submetida cromatografia de exclusão com Sephadex LH-20, utilizando metanol: diclorometano (1:1 v/v) como fase móvel (condição 3). Devido a grande quantidade de massa, a amostra foi dividida por três, e em cada aplicação na coluna, foram inseridas aproximadamente 1,017g de amostra.

Foram coletadas 25 frações, estas foram analisadas via RMN ¹H e CCDC e de acordo com as semelhanças apresentadas na análise, foram reunidas em 10 novas frações apresentadas no fluxograma da FIGURA 3.7.

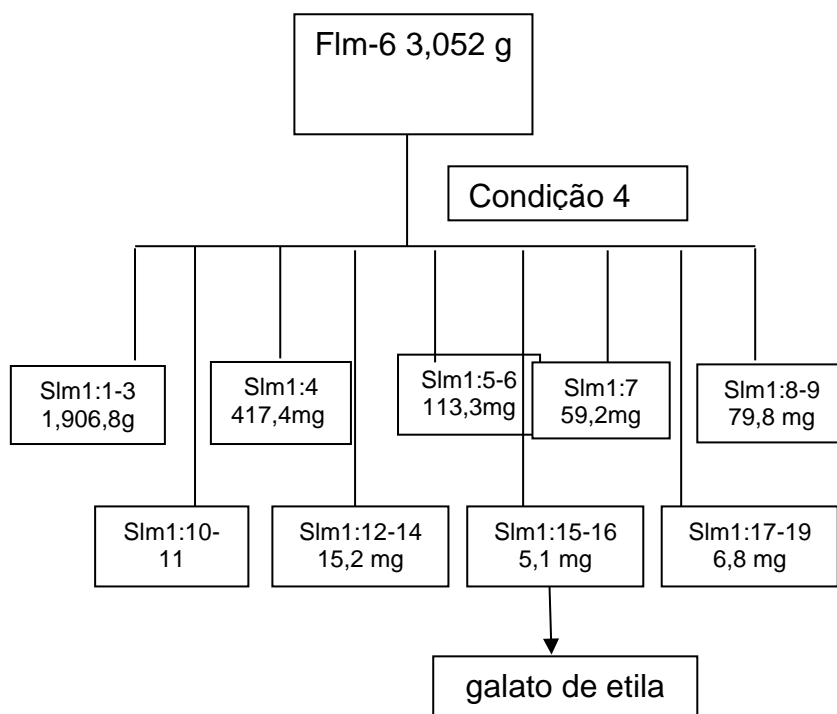
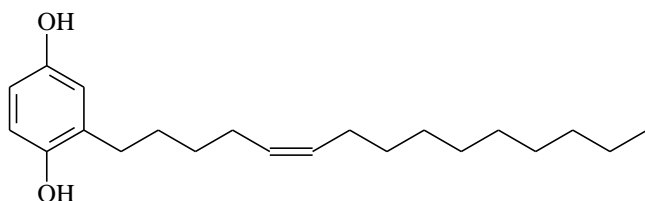


FIGURA 3.7- Fluxograma-Condição 4: coluna de vidro (ϕ x h = 2,5 cm x 62 cm), fase estacionária: Sephadex LH-20, Solvente: metanol:diclorometano (1:1 v/v).

3.8 Resultados e discussão.

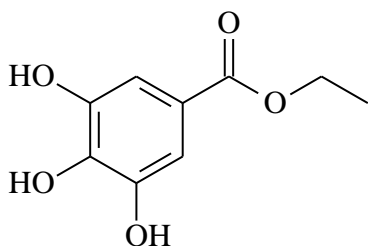
O estudo fitoquímico de, *L. molleoides* possibilitou o isolamento de duas substâncias majoritárias nos extratos que apresentaram atividade frente as formigas cortadeiras.

Substâncias isoladas



1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno

Procedência: Partição hexânica do extrato etanólico das folhas de *Lithraea molleoides*



3,4,5-trihidroxibenzoato de etila (galato de etila)

Procedência: Partição diclorometano do extrato etanólico das folhas de *Lithraea molleoides*

3.8.1 Determinação estrutural

3.8.1.1 Determinação estrutural do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno

A família Anacardiaceae é conhecida por conter metabólitos de grupos alquil ou derivados de alqueno de catecol, resorcinol, hidroquinona e fenol. Estes grupos de compostos são conhecidos por suas propriedades vesicantes e são responsáveis pela indução da dermatite de contato (VALCIC *et al.*,2002).

Análise do espectro de RMN ¹H (FIGURA 3.8) indica a presença de hidroquinona de alquila com uma insaturação. O espectro mostrou tripleto em δ 0,95 (3H, t, $J=7$ Hz) e δ que corresponde H-15', a metila terminal da cadeia alquílica longa. Os singletos largos em δ 1,32 a δ 1,40 correspondem aos metilenos da cadeia alquílica de H-6' a H-12' e integram para 17H. Os sinais sobrepostos entre δ 5,39 a δ

5,43 (m) integrando dois hidrogênios, sugerem prótons olefínicos (hidrogênios ligados à dupla ligação) da cadeia lateral contendo uma dupla ligação. Estes dados levam a concluir que existem uma instauração na cadeia.

O tripleto em δ 2,63 (2H, t, $J=7$ Hz), refere-se aos hidrogênios metilenos α ao anel benzênico H-1'. O sinal em δ 1,64 (2H, quint, $J=7$ Hz), refere-se ao H-2'. O sinal em δ 2,06 (4H, m) refere-se aos hidrogênios vicinais a metila terminal (H-14') e aos hidrogênios metilenos próximos a dupla (H-5').

Os sinais na região de δ 6,69- δ 6,75 integram para três hidrogênios, caracterizam a presença do anel fenólico. Estes sinais sobrepostos dificultaram a interpretação da multiplicidade. Por esse motivo, conclui-se que as hidroxilas estão na posição *para*, com substituição no C-1 e C-4 do anel.

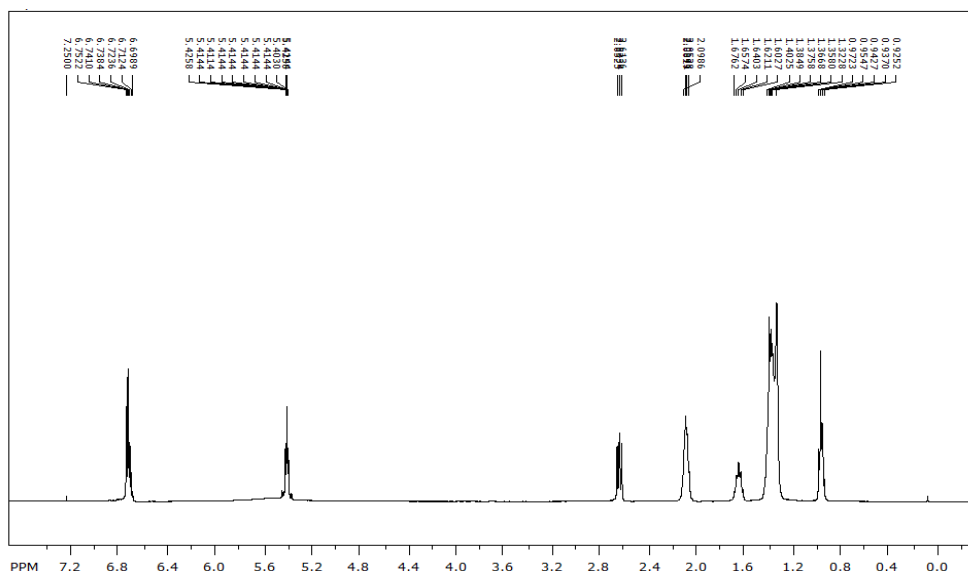


FIGURA 3.8 - Espectro de RMN ^1H do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (400 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.9) mostra a presença diversos sinais de carbonos equivalentes.

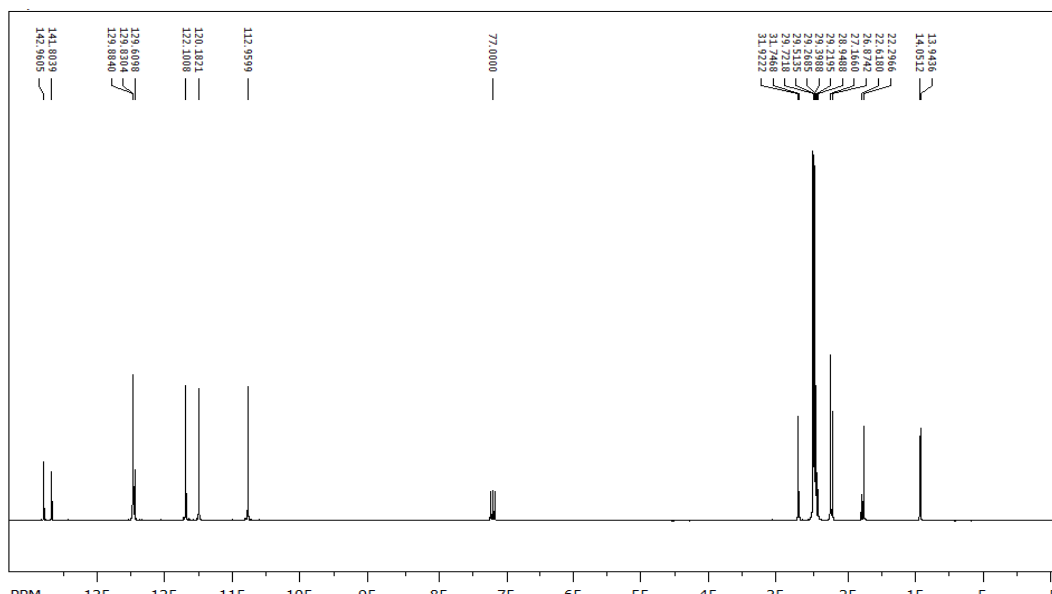


FIGURA 3.9 - Espectro de RMN ^{13}C do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno(100 MHz, CDCl_3).

Através do mapa de correlações HSQC (FIGURA 3.10), observa-se os hidrogênios e carbonos diretamente ligados. Análise do espectro mostra o tripleto sobrepostos em δ 0,95 (3H, t, $J = 7$ Hz) correlaciona-se com o carbono em δ 13,9 referente à metila terminal (C-15'). Os singletos largos em δ 1,32 - δ 1,40 referentes aos hidrogênios metilenos da cadeia alquílica correlacionam-se com os carbonos δ 22,6, δ 22,3, δ 28,9, δ 29,2, δ 29,3, δ 29,4, δ 29,5, δ 29,7, δ 31,7 e δ 31,9. O sinal em δ 1,64 (q) correlaciona-se com o carbono δ 29,7 atribuído ao carbono C-2'.

O multipletto em δ 2,06 referente aos hidrogênios vicinal a metila terminal e aos hidrogênios metilenos próximo a dupla correlaciona-se com os carbonos δ 27,1 e δ 22,6, atribuídos aos carbonos C-5' e C-14'. O tripleto em δ 2,63 correlaciona-se com carbono em 29,7, atribuído ao C-1'. Os sinais entre δ 5,39- δ 5,43 correlaciona-se com dois carbonos em δ 129,8 e um carbono em δ 129,9, atribuídos aos C-3' e C-4'. Os sinais na região de δ 6,69- δ 6,75 referentes ao anel fenólico, correlacionam-se com os carbonos em δ 112,9, δ 120,2 (dois carbonos equivalentes cada) e δ 122,1, atribuídos aos carbonos C-2, C-3 e C-6 e C-5, respectivamente. Os carbonos em δ 142,9 e δ 141,8 foram atribuídos aos carbonos quaternários, com hidroxilas, por não possuírem correlações no HSQC.

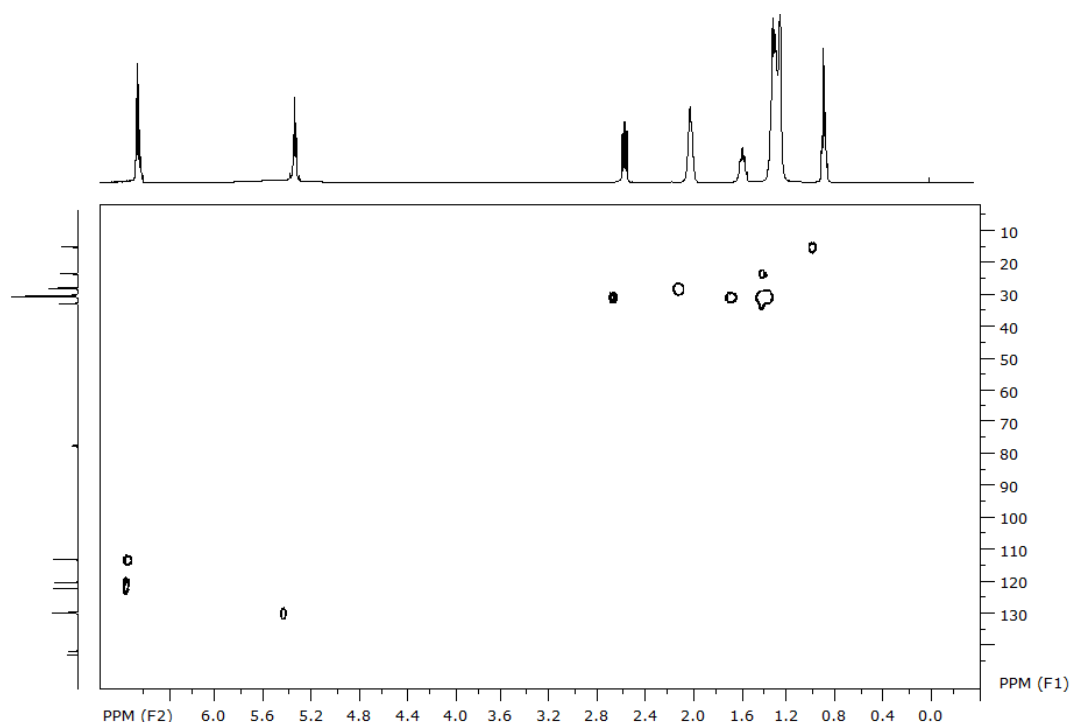


FIGURA 3.10 - Mapa de contorno de HSQC do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (400 MHz, CDCl_3).

O mapa de contorno HMBC (FIGURA 3.11) mostra correlações de hidrogênios e carbonos a duas ou três ligações. O sinal em δ 0,95 (3H, t, $J = 7$ Hz) correlaciona-se com os carbonos δ 22,6 e δ 31,9 referentes ao C-12 e C-11. O sinal entre δ 5,39 e δ 5,43 (m), referente aos hidrogênios olefínicos, apresentam correlação com os carbonos δ 29,7, δ 29,6, δ 27,1 e δ 31,9, atribuídos aos C-1', C-2', C-5' e C-6'.

O tripleto em δ 2,63 (2H, t, $J = 7$ Hz) apresenta correlação com os carbonos δ 29,6, δ 122,1, δ 120,2, δ 142,8 e δ 142,9, atribuídos aos C-2', C-5, C-6 e C-4 e C-1'. O sinal em δ 1,64 (2H, q, $J = 7$ Hz), refere-se ao H-2', apresenta correlação com os carbonos em δ 29,7 e δ 129,9, que foram atribuídos a C-1' e C-3'.

O sinal em δ 2,06 (4H, m) apresenta correlação com carbonos em δ 29,3, e δ 129,8, atribuídos aos C-6' e C-4' e com δ 22,6, δ 31,9 atribuídos aos carbonos C-12', C-11'. Os sinais na região de δ 6,69- δ 6,75 referentes aos hidrogênios do anel apresentam correlação com δ 112,9, δ 120,2 e δ 122,1, atribuídos aos C-2, C-3 e C-6 e C-5, respectivamente.

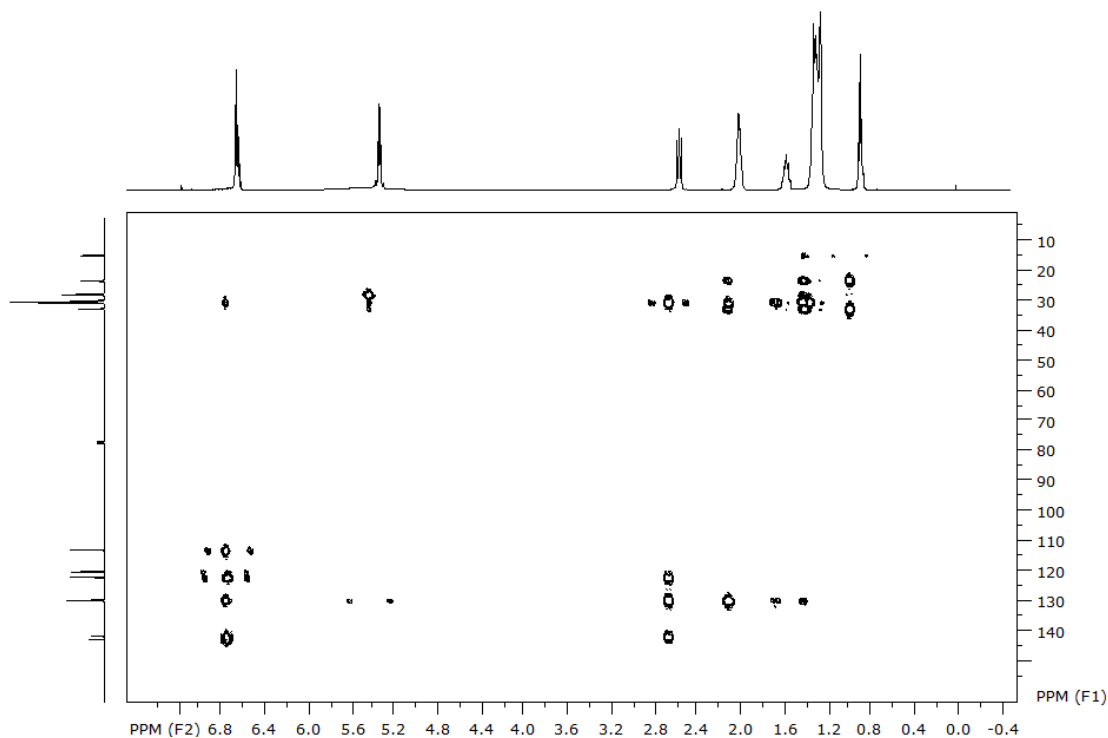


FIGURA 3.11 - Mapa de contorno de HMBC do 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno (400 MHz, CDCl_3).

Portanto, conclui-se que a hidroquinona em questão tem a estrutura indicada na FIGURA 3.12 e possui fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_2$.

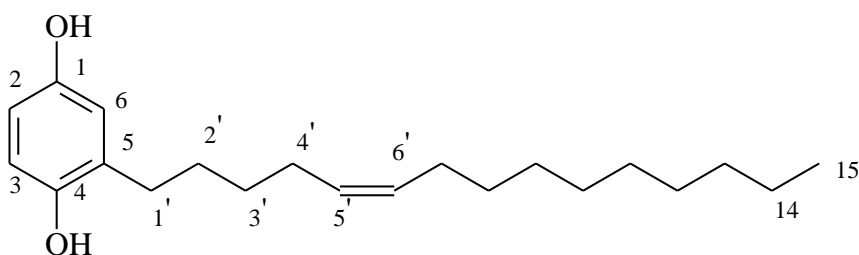


FIGURA 3.12 - 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno.

Foi realizado um experimento de inserção direta por massas. O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo negativo mostrou um pico em m/z 317,3 íons pseudomolecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ do composto em questão, comprovando a massa molecular do composto 318,4 (FIGURA 3.13).

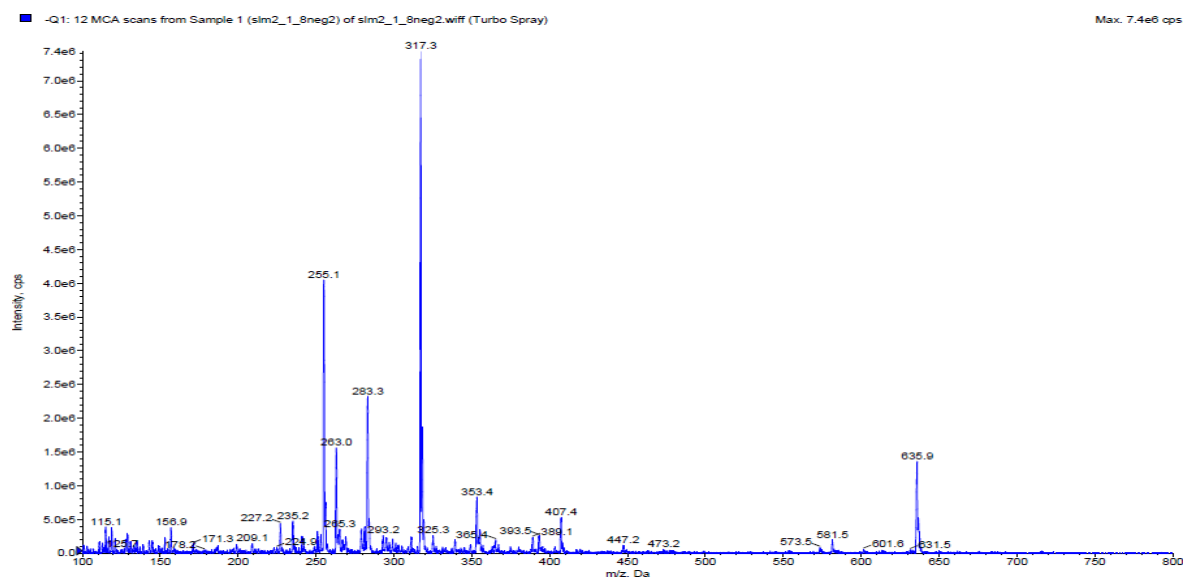


FIGURA 3.13 - Espectro de massas (ESI) modo negativo da substância 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzene.

3.8.1.2 Determinação estrutural do galato de etila

O galato de etila (FIGURA 3.12), foi isolada da partição diclorometano das folhas de *Lithareae molleoides*. Sua identificação estrutural foi realizada utilizando experimento de RMN¹H e RMN¹³C (FIGURAS 3.14 e 3.15) e da comparação dos valores obtidos com os dados de literatura na TABELA 3.3 (MEHLA et al., 2011, Tabela 8)

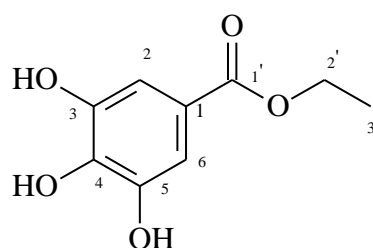


FIGURA 3.14 - Estrutura galato de etila.

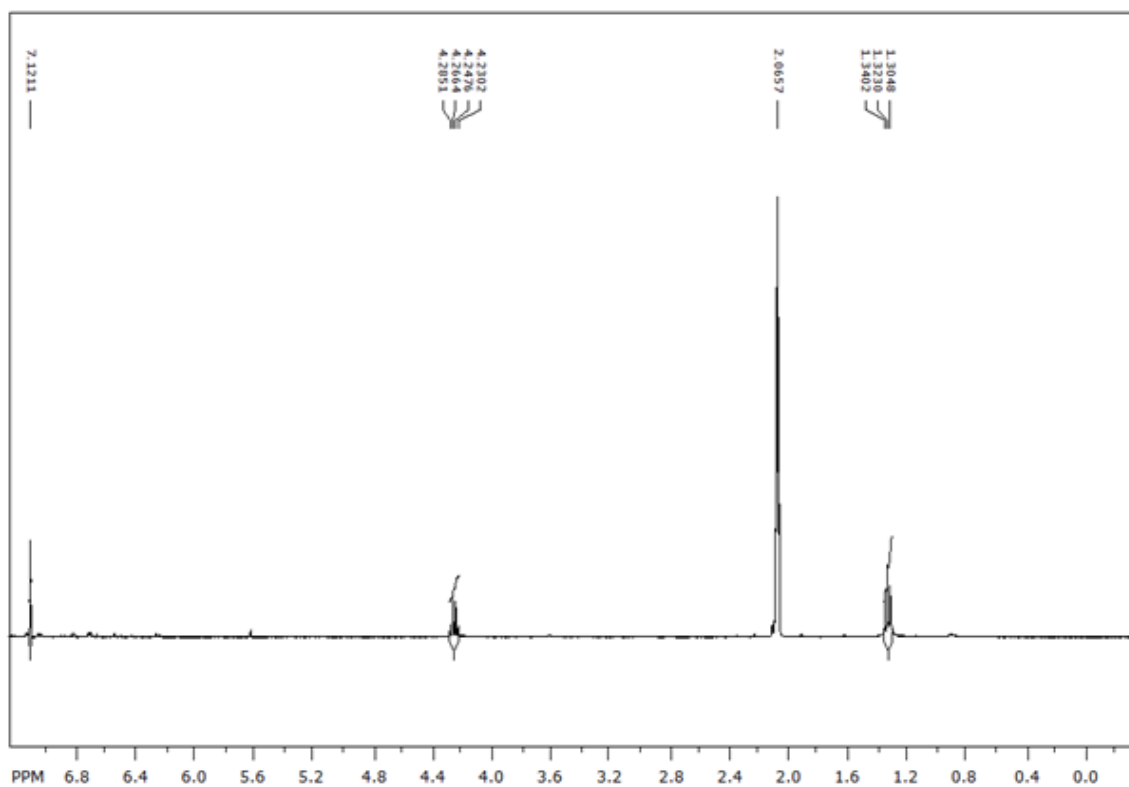


FIGURA 3.15 - Espectro de RMN¹H do galato de etila (Acetona-d₆, 400 MHz).

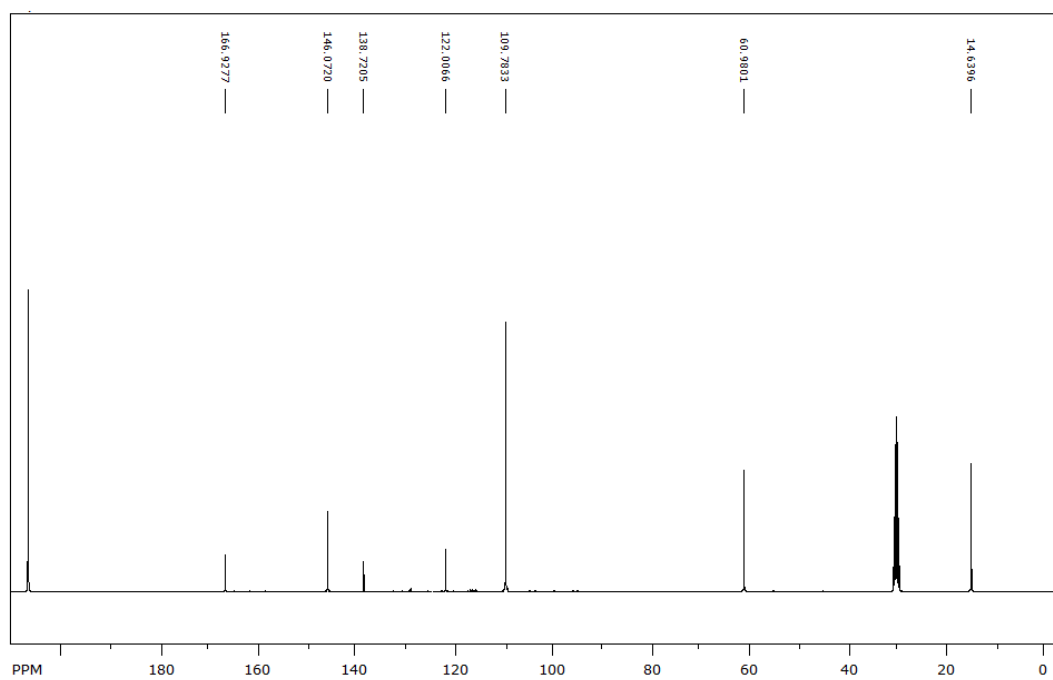


FIGURA 3.16 - Espectro de RMN¹³C do galato de etila (Acetona-d₆, 400 MHz).

TABELA 3.3 - Dados de RMN¹H e RMN¹³C da substância galato de etila comparados com a literatura

H	(Acetona-d ₆ , 400 MHz)	MEHLA, 2011, 400 MHz)	C	(Acetona-d ₆ , 400 MHz)	MEHLA, 2011, 400 MHz)
H-1	-	-	C-1	122,0	121,3
H-2	7,12(s)	7,04 (s)	C-2	109,7	109,7
H-3	-	-	C-3	146,0	146,0
H-4	-	-	C-4	138,7	139,2
H-5	-	-	C-5	146,0	146,0
H-6	7,12 (s)	7,04 (s)	C-6	109,7	109,7
H-1'	-	-	C-1'	166,9	164,6
H-2'	4,25 (q, <i>J</i> = 8,0)	4,28 (q, <i>J</i> = 8,0)	C-2'	60,9	60,9
H-3'	1,32 (t, <i>J</i> = 8,0)	1,36 (t, <i>J</i> = 8,0)	C-3'	14,6	14,3

3.8.2 Resultados dos ensaios biológicos

3.8.2.1 - Incorporação em dieta artificial por ingestão em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

3.8.2.1.1 Extratos de *Lithraea molleoides*

Dentre os extratos de *L. molleoides* ensaiados, observou-se que as folhas (LMEF) apresentaram atividade significativa, com uma mortalidade acima de 50% das operárias no 12º dia de experimento. Ao final do experimento no 25º dia, observou-se uma mortalidade de 98%. O extrato do caule (LMEC) não se mostrou muito ativo, apresentando uma mortalidade acumulada de apenas 58%. E o extrato dos galhos de *L. molleoides* (LMEG) não apresentou atividade quando comparado a dieta pura.

Estes dados podem ser observados no gráfico de sobrevivência FIGURA 3.17 e na TABELA 3.4 com os dados referentes a Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md).

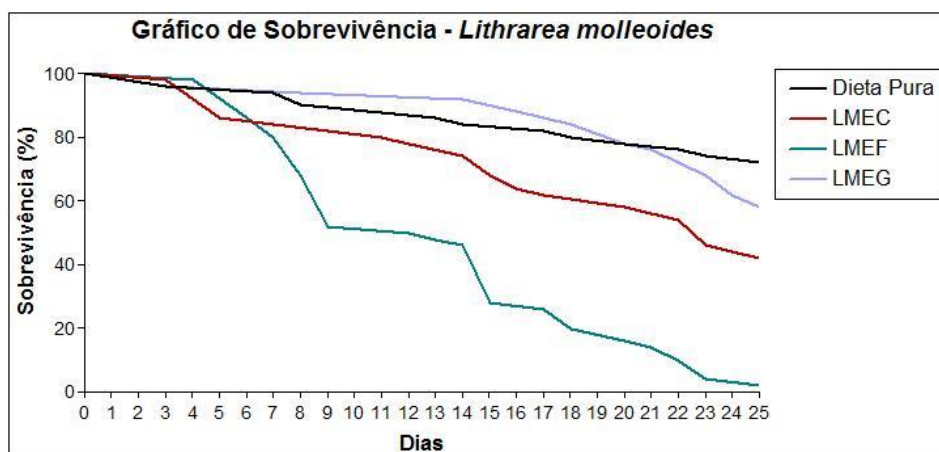


FIGURA 3.17 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio inseticida de incorporação em dieta artificial com *Lithraea molleoides*.

TABELA 3.4 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Lithraea molleoides*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	4	4	10	10	16	18	22	28	>25 a
LMEC	0	0	2	14	14	18	26	38	42	58	23 b
LMEF	0	0	0	14	32	48	54	74	86	98	12 b
LMEG	0	0	4	4	6	6	8	14	24	42	>25 a

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

Diante dos resultados obtidos, o extrato das folhas (LMEF) é um dos extratos promissores na busca de compostos puros com atividade frente às formigas e será alvo de estudos e fracionamento, acompanhados por novos ensaios.

3.8.2.1.2 Partição dos extratos de *Lithraea molleoides*

Após a partição do extrato das folhas de *L. molleoides*, as frações obtidas foram encaminhadas novamente para os ensaios de incorporação em dieta artificial das

formigas e a fração com maior atividade foi LMEF-hexano, onde se observou uma mortalidade de 62% no 10º dia de experimento.

A fração LMEF-diclorometano também apresentou uma atividade significativa, com uma mortalidade acima de 50% das operárias no 16º dia de experimento. Ao final do experimento no 25º dia, observa-se uma mortalidade de 90%.

As frações LMEF-acetato de etila e LMEF-hidroalcoólica não apresentaram atividade frente as formigas e ao final do experimento, apresentaram mortalidade acumulada inferiores a dieta pura. Os motivos destes resultados estão relacionados ao fato destas frações conterem muitos açúcares, o que ao invés de ter efeito tóxico sobre as formigas, serve de alimento para as mesmas.

Estes dados podem ser observados no gráfico de sobrevivência FIGURA 3.18 e na TABELA 3.5 com os dados referentes a Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana Md).

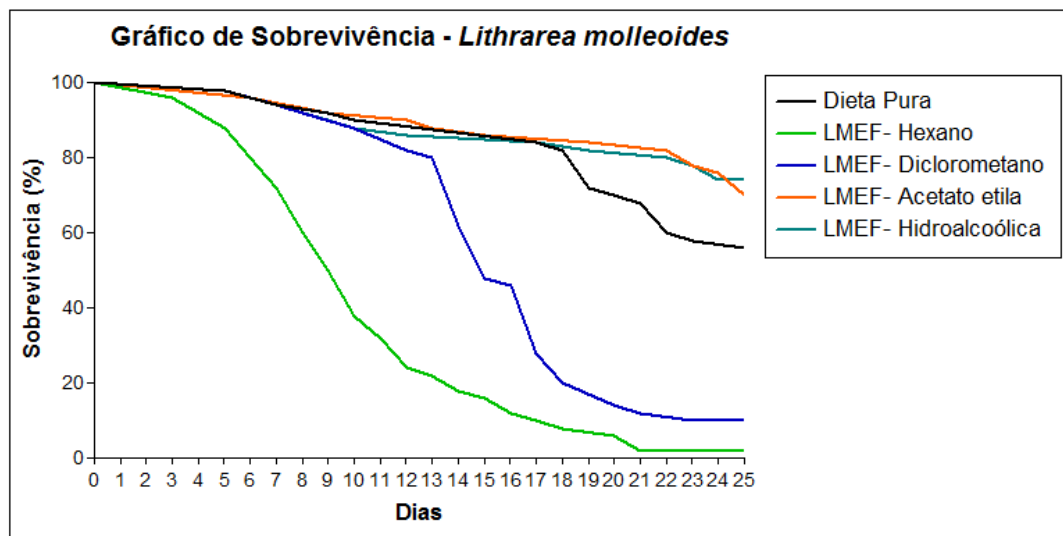


FIGURA 3.18 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Lithraea molleoides*.

TABELA 3.5 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio inseticida de incorporação em dieta artificial com *Lithraea molleoides*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	4	6	10	10	16	32	44	>25 ^a
LMEF – Hexano	0	0	4	20	40	62	82	90	98	98	10 ^b
LMEF - Diclorometano	0	0	0	2	8	12	38	72	88	90	15 ^b
LMEF – Acetato etila	0	0	0	4	4	8	12	14	16	30	>25 ^a
LMEF - Hidroalcoólica	0	0	0	4	8	12	14	16	18	26	>25 ^a

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

3.8.2.1.3 Ensaio das subfrações de LMEF-hex

As oito subfrações obtidas após a realização de uma coluna cromatográfica, sob vácuo, (descrito no procedimento experimental) foram encaminhadas ao ensaio de incorporação em dieta artificial das formigas e os resultados obtidos podem ser observados nas TABELA 3.6 e FIGURA 3.19.

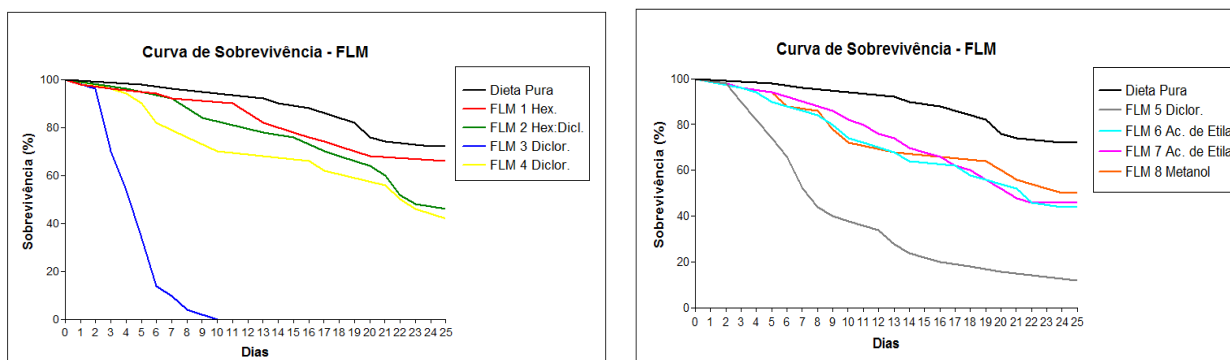


FIGURA 3.19 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com folhas de *Lithraea molleoides*.

TABELA 3.6 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com folhas de *Lithraea molleoides*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	4	6	10	12	26	28	>25a
FLM 1	2	2	4	6	8	8	18	26	32	34	>25a
FLM	0	0	0	4	12	16	22	30	40	54	23b
FLM 3	0	4	30	86	96	100	100	100	100	100	5b
FLM 4	0	2	4	18	24	30	30	38	44	58	22,5b
FLM 5	0	2	10	34	56	62	76	80	84	88	8b
FLM 6	0	0	4	12	16	26	36	38	48	56	22b
FLM 7	0	2	4	8	8	18	30	38	52	54	21b
FLM 8	0	0	4	12	14	28	32	34	44	50	24b

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

3.9 Ensaio das substâncias isoladas de *Lithraea molleoides*

3.9.1 Ensaios da substância isolada de LMEF-hex

A fração mais ativa, FLM-3, com 100% de mortalidade das operárias no 10º dia de experimento, foi submetida a processos cromatográficos que levou ao isolamento da substância (FIGURA 3.20) 1,4-dihidroxi-2-(5-pentadecenil) -benzeno (Slm 2 -1:8).

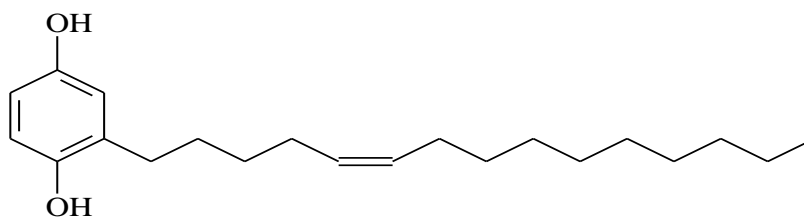


FIGURA 3.20 Substância 1,4-dihidroxi-2-(5-pentadecenil)-benzeno (Slm 2 -1:8).

Nos ensaios frente à formiga cortadeira (FIGURA 3.21 e TABELA 3.7), a 1,4-dihidroxi-2-(5-pentadecenil)-benzeno (Slm 2-1:8), foi ensaiada em duas concentrações, 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL e os dados mostram que os resultados não foram significativos quando comparados a dieta pura.

Observa-se a na concentração de 0,2 mg/mL houve uma mortalidade de 56% ao final do experimento.

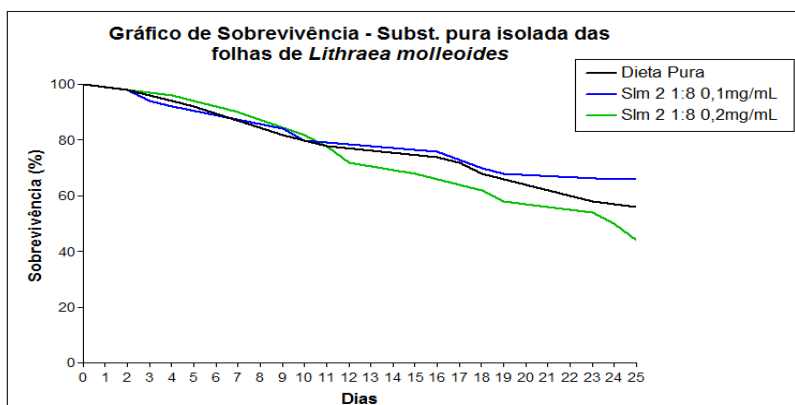


FIGURA 3. 21 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de *Lithraea molleoides* (SIm 2- 1:8) nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.

TABELA 3.7 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com substâncias puras de *Lithraea molleoides* (SIm 2- 1:8) nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	2	2	8	8	18	22	28	36	44	>25 ^a
SIm 2 -1:8 0,1mg/mL	0	2	6	8	8	20	22	24	32	34	>25 ^a
SIm 2 - 1:8 0,2mg/mL	0	0	0	8	10	18	28	36	44	56	24 ^a

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

3.9.2 Ensaio da substância isolada de LMEF-dicloro

O galato de etila, isolada majoritariamente na fração diclorometano das folhas de *L. molleoides*, foi ensaiada nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/mL e seus resultados do ensaio são apresentados na FIGURA 3.22 e TABELA 3.8.

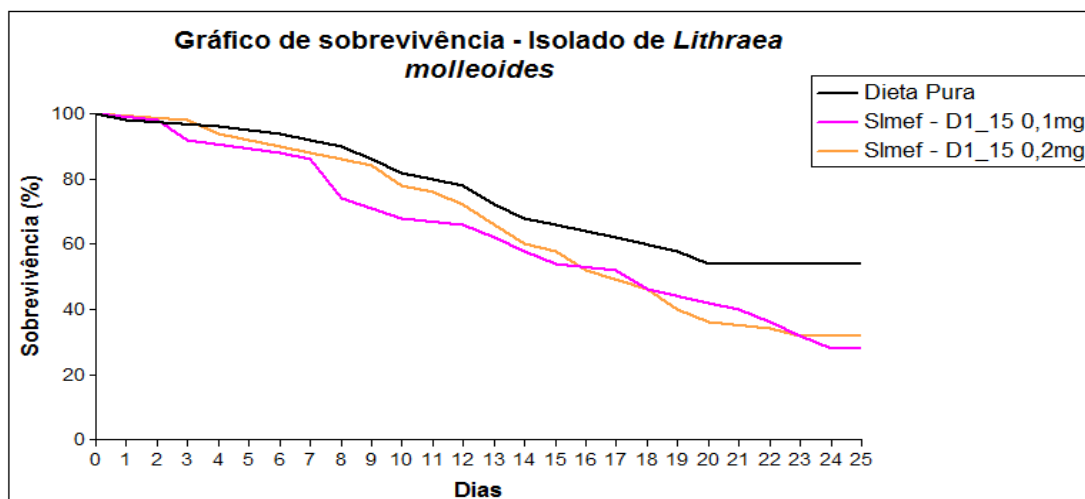


FIGURA 3.22 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com galato de etila nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL

TABELA 3.8 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com com galato de etila nas concentrações 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	6	10	18	32	38	46	46	>25a
Galato de etila 0,1 mg/mL	0	2	8	12	26	32	42	48	60	72	18b
Galato de etila 0,2 mg/mL	0	0	2	10	14	22	40	48	64	68	18b

Observa-se nos resultados, uma mortalidade de 72 e 68% ao final do experimento nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/mL, respectivamente. Em ambas as concentrações, a mortalidade média das operárias foi no 18° dia de experimento.

3.9.3 Ensaio Frente ao Fungo Simbionte *L. gongylophorus*

3.9.3.1 Extrato etanólico folhas de *L. molleoides* (LMEF)

Dentre os extratos etanólicos ensaiados, apenas o extrato de folhas (LMEF) apresentou resultado significativo, com 94% de inibição no crescimento micelial na concentração de 1000 µg/mL ao final do experimento. O extrato LMEG apresentou apenas 23% de inibição e o LMEC 27%. Diante dos resultados, apenas as frações da partição líquido-líquido do extrato das novamente submetidas a ensaios *in vitro* sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

TABELA 3.9 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* após 30 dias do experimento

Réplicas				
	LMEF	LMEC	LMEG	Controle ¹
1	0,64	8,04	9,07	9,84
2	0,64	7,84	8,14	10,86
3	0,64	6,51	8,86	10,86
4	0,64	8,45	7,84	10,40
5	0,64	8,34	7,25	11,46
Média	0,64	7,84	8,23	10,68
SD	0	0,78	0,75	0,60
RSD	0	9,94	9,06	5,65
Inibição	94 %	27 %	23 %	

*1- controle referente à amostra CIC; concentração da amostra: CIC: 1000 µg/mL.

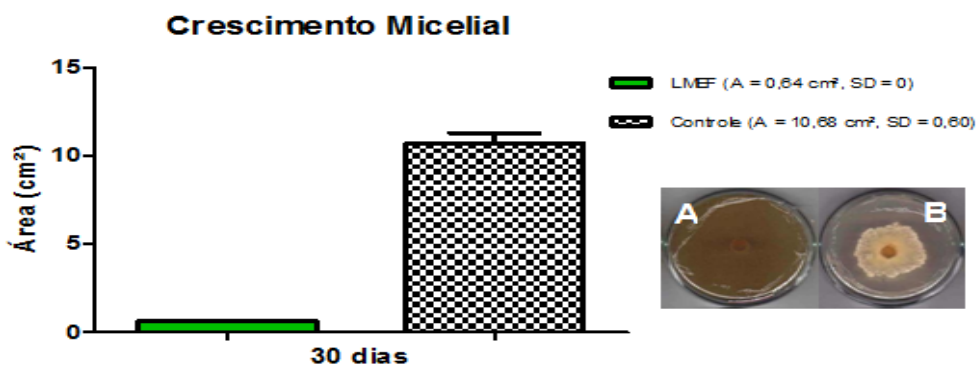


FIGURA 3.23 - Efeito do extrato LMEF (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. Imagens do fungo simbiote na presença do extrato LMEF (1000 µg/mL) (A) e controle (B).

3.9.3.2 Extrato etanólico dos galhos de *L. molleoides* (LMEG)

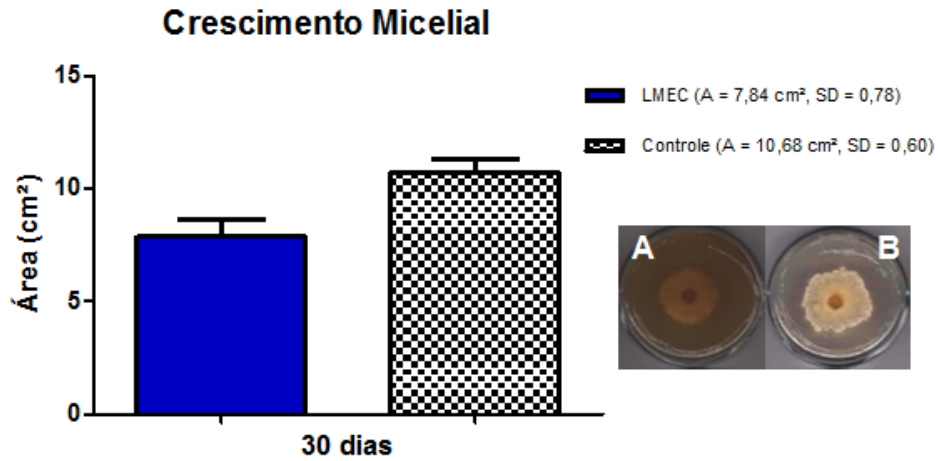


FIGURA 3.24 - Efeito do extrato LMEC (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*. Imagens do fungo simbiote na presença do extrato LMEC (1000 µg/mL) (A) e controle (B).

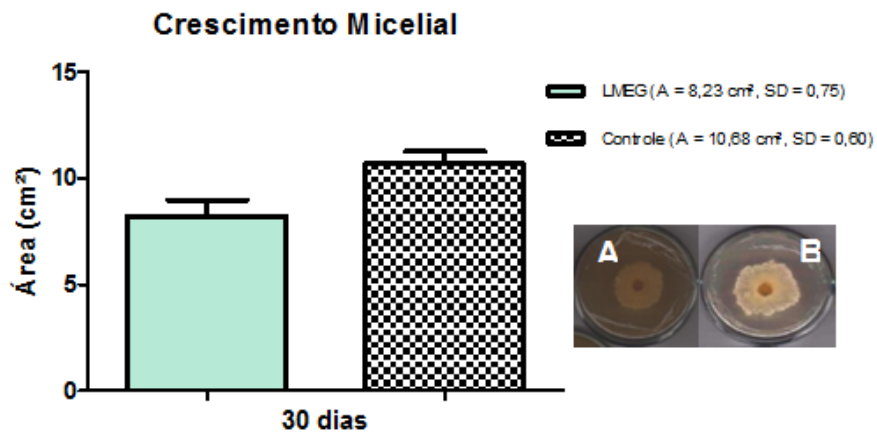


FIGURA 3.25 - Efeito do extrato LMEG (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus* - Imagens do fungo simbiote na presença do extrato LMEG (1000 µg/mL) (A) e controle (B).

3.9.3.3 Ensaio das partições do extrato etanólico das folhas (LMEF)

As partições hexânica (LMEF-hex), diclorometano (LMEF-dicloro), acetato de etila (LMEF-AcOEt) e hidroalcolica (LMEF- hidro), do extrato etanólico das folhas (LMEF) foram ensaiadas *in vitro* sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, concentração de 1000 µg/mL, porém como observado na Tabela 15,

ao final do experimento, 30 dias, não foi observado inibição do crescimento micelial significativo. Resultados na TABELA 3.10 e FIGURA 3.26.

TABELA 3.10 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento

Réplicas	LMEF ACOET	Controle ¹ Acetato	LMEF Hex	LMEF Dicloro	Controle ² Dicloro	LMEF Hidro	Controle ³ Metanol
1	17,19	14,79	15,76	12,56	13,32	12,43	15,61
2	11,58	14,51	16,76	13,07	14,38	11,70	15,90
3	15,48	15,48	16,76	13,85	14,51	13,20	15,90
4	13,32	14,79	15,90	14,65	13,85	11,94	15,61
5	12,69	15,20	16,47	13,07	13,07	12,81	16,04
Média	14,05	14,95	16,33	13,44	13,83	12,42	15,81
SD	2,26	0,38	0,47	0,82	0,63	0,61	0,19
RSD	16,08	2,55	2,90	6,09	4,59	4,95	1,20
Inibição	6		-18	3		21	

¹– controle _acetato de etila, referente a amostra LMEF_ACOET.

²– controle_diclorometano, referente a amostra LMEF_Hex e LMEF_Dicloro.

³– controle_metanol, referente a amostra LMEF_Hidro.

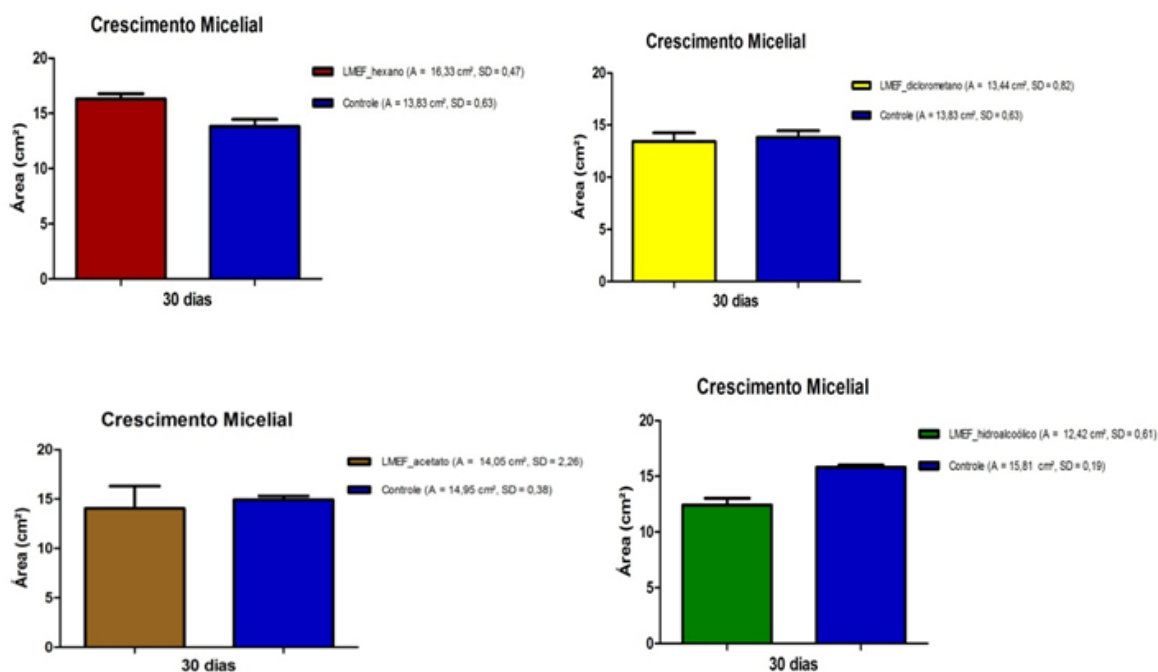


FIGURA 3.26 - Efeito das partições do extrato LMEF (1000 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte *L. gongylophorus*.

3.10 Conclusão

O estudo fitoquímico biomonitorado de *L. molleoides* levou ao isolamento e identificação de 2 substâncias majoritárias nas frações ativas.

No ensaio por ingestão frente as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, observou-se que as folhas (LMEF) apresentaram a maior atividade, com Md acima de 50% das operárias no 12º dia de experimento e 98% ao final do experimento.

Os extratos do caule (LMEC) e galhos de *L. molleoides* (LMEG) não se mostraram ativos no ensaio frente às formigas. Após a partição do extrato das folhas de *L. molleoides*, observou-se que fração com maior atividade foi LMEF-hexano, onde se observou uma mortalidade de 62% no 10º dia de experimento e 100% ao final do experimento.

A fração LMEF-diclorometano também apresentou atividade significativa, com Md acima de 50% das operárias no 16º dia de experimento e 90% ao final do experimento. Portanto estas foram submetidas a processos cromatográficos na busca por potenciais substâncias com propriedades inseticidas.

O extrato LMEF-hex, foi submetido a coluna cromatográfica, sob vácuo, do extrato hexânico das folhas de *L. molleoides* foram encaminhadas ao ensaio de incorporação em dieta artificial das formigas.

De acordo com a sobrevivência mediana (Md) de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à bioensaios, diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle > 25 dias) foram observadas apenas para a fração Flm3 (Md-Flm3 = 5dias) com mortalidade acumulada de 100% no 10º dia de experimento e para a fração Flm 5 (Md-Flm3 = 8dias) com mortalidade acumulada de 88% ao final do experimento. Nos ensaios frente à formiga cortadeira, 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil) -benzeno isolado da Fração Flm3, foi ensaiada em duas concentrações, 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL e os resultados não foram significativos quando comparados a dieta pura.

Observa-se na concentração de 0,2 mg/mL que houve uma mortalidade de apenas 56% ao final do experimento.

Os compostos isolados majoritariamente das frações ativas foram ensaiados, porém não foram obtidos resultados significativos, o que pode nos levar a concluir que a atividade pode estar relacionada ao conjunto de compostos presente em cada fração, uma vez que na fração Flm3 existe muitos derivados de resorcinois, que foram encontrados em mistura, porém não foram isolados, devido a pequena quantidade de massa, ou a um composto minoritário presente nesta fração, mesmo em menor quantidade, apresenta atividade frente as operárias.

No ensaio *in vitro* sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, com os extratos de *Lithraea molleoides*, observou-se que os extratos apresentaram inibição do crescimento micelial de 27% (LMEC), 23% (LMEG) e 94% (LMEF). Sendo apenas o extrato das folhas com atividade significativa. Portanto, as partições dos extratos das folhas de *L. Molleoides* foram ensaiadas *in vitro* sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, concentração de 1000 µg/mL, porém nenhuma das frações apresentaram, ao final do experimento (30 dias), inibição do crescimento micelial significativo.

Este estudo contribuiu para a quimiossistemática de *Lithraea molleoides*, uma vez que o derivado de hidroquinona, 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno, foi isolado pela primeira vez na literatura, e os galato de etila isolado pela primeira vez na planta.

Paralelamente, o estudo de *L. molleoides* contribuiu com trabalho “Cathepsin D immobilized capillary reactors for on-flow screening assays” (Cornelio et al., 2018), onde o extrato LMFE apresentou uma inibição de 52% sobre a Catepsina D livre e CatD-IMER (enzima imobilizada) e a substância 1,4-dihidroxi-2-(5'-pentadecenil)-benzeno apresentou inibição de 100% na Catepsina D livre e 54% na CatD-IMER.

3.11 Referências Bibliográficas

- ARAUJO, C.E.P.; BELA, R.T.; BUENO, L.J.F.; RODRIGUES, R.F.O.; SHIMIZU, M.T. Anti-ulcerogenic activity of the aerial parts of *Lithraea molleoides*- *Fitoterapia*. 77: 406–407, (2006).
- CHATURVEDULA, V.S.P.; SCHILLING, J.K.; MILLER, J.S.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V.E.; KINGSTON, D.G.I. New Cytotoxic Bis 5-Alkylresorcinol Derivatives from the Leaves of *Oncostemon bojerianum* from the Madagascar Rainforest, *J. Nat. Prod.*, 65:1627-1632, 2002.
- CORRÊA, S.J.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quim. Nova* 29: 1287-1300, 2006.
- CORNELIO, V.E.; MORAES, M.C.; DOMINGUES, V.C.D.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cathepsin D immobilized capillary reactors for on-flow screening assays. *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 151: 252-259, 2018.
- CRONQUIST, A. *The evolution and classification of flowering plants*. 2ª edição. New York Botanical Garden, Bronx, 1988.
- KOZUBECK, A.; ZARNOWSKI, R.; STASIUK, M.; GUBERNATOR, J. Natural amphiphilic phenols as bioactive compounds. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6: 351–355, 2001.
- LACCHIA, A.P.S.; GUERREIRO, S.M.C. Aspectos ultra-estruturais dos canais secretores em órgãos vegetativos e reprodutivos de Anacardiaceae. *Acta Bot. Bras.* 23: 376-388. 2009.
- LÓPEZ, P.; RUFFA, M.J.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R.; MARTINO, V.; FERRARO, G. 1,3-dihydroxy-5-(tridec-40,70-dienyl)-benzene: a new cytotoxic compound from *Lithraea molleoides*. *Phytomed.* 12: 108–111, 2005.
- NEBO, L.; SARRIA, A.L.F.; FREITAS, T.; MATOS, A.P.; FERNANDES, J.B.; BUENO, O.C.; VIEIRA, P.C.; SILVA, M.F.G.F. Atividade inseticida de extratos e substâncias puras de plantas da Ordem Sapindales sobre *Spodoptera frugiperda* e formigas cortadeiras 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

- RUFFA, M.J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J. Ethnopharm.* 79: 335–339, 2002.
- SHIMIZU, M.T.; BUENO, L.J.F.; RODRIGUES, R.F.O.; SALLOWICZ, F.A.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M. Essential oil of *Lithraea molleoides* (Vell.): chemical composition and antimicrobial activity, *Braz. J. Microb.* 37: 556-560, 2006.
- VALCIC, S. Nematicidal Alkylene Resorcinols from *Lithraea molleoides*. *J. Nat. Prod.* 65: 1270-1273, 2002.

**CAPÍTULO 4- CEDRELONA: ISOLAMENTO EM
LARGA ESCALA, SEMI-SÍNTESES E
PROCESSOS DE NANOENCAPSULAMENTO**

Capítulo 4- Cedrelona: Isolamento em larga escala, semi-sínteses e processos de nanoencapsulamento

4. Introdução

4.1 Cromatografia em contracorrente

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de extração líquido-líquido sem o uso de adsorventes. Consiste na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra a fase estacionária que é retida no aparelho sem a utilização de suporte sólido (CONWAY, 1990; BERTHOD, 1991).

Existem diversos tipos de cromatografias em contracorrente, dentre as mais conhecidas estão:

- Cromatografia Contracorrente de Gotículas (DCCC);
- Cromatografia Contracorrente de Rotação Locular (RLCC);
- Cromatografia Contracorrente Centrífuga de Partição (CPC);
- Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC).

A técnica de cromatografia contracorrente mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a cromatografia contracorrente de alta velocidade ("HSCCC: high-speed counter-current chromatography", Figura 4.1) (CONWAY, 1990).

Dentre as diversas vantagens desta técnica sobre as demais técnicas de cromatografia está o fato de mesma evitar problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes, o que permite a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificação. Outra vantagem é a recuperação total da amostra e também o baixo consumo de solvente quando comparada a outras técnicas de extração (BERTHOD, 1991).



FIGURA 4.1 - Cromatógrafo de Contracorrente de Alta Velocidade (High-speed counter-current chromatography, HSCCC) Fonte: Cazal, (2010).

O sucesso desta técnica depende da escolha correta do sistema de solvente. Diferente das Técnicas cromatográficas convencionais que utilizam apenas uma fase na separação de analitos, a CCC utiliza sistema de solventes bifásico, que permite a escolha de grande número de solventes em diversas combinações possíveis (ITO, 2005). O princípio fundamental de separação envolve a partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo a proporção relativa de soluto que passa para cada fase determinada pelo seu respectivo coeficiente de partição (K) (MARSTON & HOSTETTMANN, 1994, ITO, 1991, ITO, 2005).

O sistema de solventes adequado deve satisfazer algumas condições básicas): a formação de duas fases; solubilidade e estabilidade da amostra no sistema; o tempo de separação das fases após agitação (tempo de decantação) deve ser inferior de 30 s para assegurar uma retenção satisfatória da fase estacionária; o coeficiente de partição (K) das substâncias deve estar na faixa de $0,5 < K < 2,0$; é recomendado que as fases superior e inferior do sistema bifásico tenham volumes próximos para evitar desperdício de solvente (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006, ITO, 2005).

A escolha do sistema ideal pode ser feita por diferentes métodos. Os mais comumente utilizados são: a busca na literatura por artigos que relatem o isolamento de substâncias similares por CCC (estes sistemas utilizados podem ser testados e modificados de acordo com a necessidade da amostra); e a busca sistemática utilizando tabelas de sistemas de solventes, onde o mesmo sistema de solventes é misturado em diversas proporções variando suavemente a polaridade desde o mais hidrofóbico até o mais hidrofílico (ITO, 2005).

A cromatografia contracorrente tem se mostrado uma ferramenta bastante útil no isolamento e purificação de produtos de origem natural devido às diversas

vantagens discutidas anteriormente. Estes motivos levam ao uso desta técnica no isolamento do limonoide cedrelona, para fins de nanoencapsula-lo e fazer modificações sintéticas em sua estrutura, na busca de potencializar sua atividade inseticida/fungicida frente *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *L. gongylophorus*.

4.2 Nanoencapsulamento

A nanotecnologia tem-se apresentado como uma nova revolução tecnológica, devido ao grande potencial de inovação no campo científico multidisciplinar (LIMA, 2015). A encapsulação de princípios ativos destaca-se neste campo e consiste no empacotamento, com finas camadas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, formam partículas denominadas micro ou nanocápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (SPARKS, 1981).

Inicialmente as nanopartículas poliméricas foram definidas como sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . Quando comparadas com outros sistemas coloidais, apresentam maior estabilidade em fluídos biológicos e ao armazenamento devido às matérias-primas empregadas na sua produção (DOMINGUES, 2006). Na indústria farmacêutica, o termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural na figura 4.2.

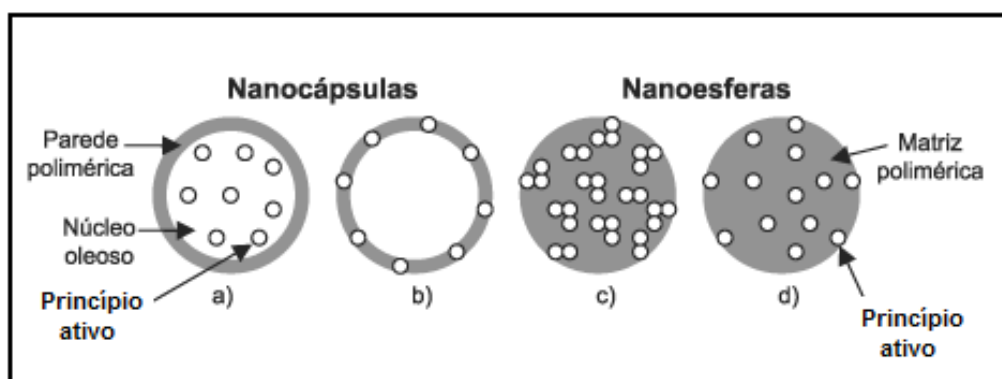


FIGURA 4.2 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas. Fonte: Cazal, (2010).

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco ou inseticida estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas não

apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o composto ativo pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003).

A técnica de nanoencapsulamento de substâncias ativas em iscas inseticidas tem sido utilizada tanto na agricultura, quanto no uso doméstico, por melhorarem a eficácia residual, possuírem estabilidade do princípio ativo contra a degradação no ambiente e principalmente por reduzirem a toxicidade para mamíferos (OHTSUBO *et al.*, 1991).

Na medicina estes sistemas nanoparticulados têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejadas, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos, principalmente através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico (SCHAFFAZICK e GUTERRES, 2003).

4.3 Ordem Rutales

Pela classificação de Dahlgren, a ordem Rutales é constituída pelas famílias Rutaceae, Meliaceae, Cneoraceae, Simaroubaceae e Burseraceae. A ordem Rutales possui de 3000 a 3500 espécies, sendo *Citrus*, pertencente à família Rutaceae, o gênero mais importante economicamente.

Nesta ordem, vários metabólitos secundários foram isolados, tais como, alcaloides, cumarinas, limonoides e triterpenos e quassinoides. Estes metabólitos apresentam diversas atividades biológicas, sendo as principais: antileucêmicos, antimaláricos, antibióticos, antiúlcera, antiinflamatórios, fungicidas e bactericidas (OIANO NETO, 2000).

4.4 Família Meliaceae

A família Meliaceae é composta por 51 gêneros e 1440 espécies aproximadamente, e em geral são arbóreas, às vezes de grande porte com distribuição predominantemente tropical e subtropical. Entre os gêneros mais

importantes desta família estão: *Aglaiia*, *Aphanamixis*, *Azadirachta*, *Carapata*, *Cedrela*, *Chukrasia*, *Dysoxylum*, *Khaya*, *Trichilia*, *Toona*, etc.

As plantas de Meliaceae são conhecidas por fornecerem madeira de grande valor comercial, as chamadas madeiras nobres. Tais plantas têm como característica a presença de substâncias amargas, conhecidas como “meliacinas”, que são limonoides. Estes apresentam várias atividades biológicas como anticâncer, antiparasitária, antimalárica, antifúngica, bactericida e principalmente inseticida (AGOSTINHO, 1996).

O estudo da atividade desses compostos no controle de insetos intensificou-se a partir do isolamento do limonoide azdiractina (FIGURA 4.3) de *Azadirachta indica* A. Juss em 1969. Tal composto é conhecido por apresentar efeitos adversos em mais de 600 espécies de inseto (FORIM, 2010).

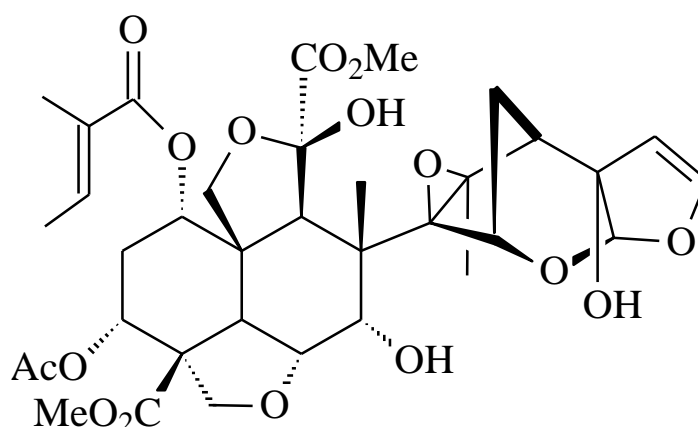


FIGURA 4.3 - Estrutura do limonoide azadiractina

4.5 O gênero *Trichilia*

Trichilia é um gênero pertencente à família Meliaceae e apresenta aproximadamente 230 espécies (RAMÍREZ *et al.*, 2000). É um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família e também o que apresenta mais características anatômicas de Meliaceae.

Pertencente à mesma sub-família (Melioidae) de *Melieae Azadirachta*, o gênero *Trichilia* desperta o interesse dos estudos devido a possibilidade do isolamento de substâncias semelhantes (PENNINGTON e STYLES, 1975) à azadiractina. Dentro da sub-família Melioidae, a *Trichilia* é o gênero que apresenta o maior número e tipos de limonoides (SALLES, 1995). Apesar da predominância de limonoides como

metabólitos secundários neste gênero, já foram isolados também triterpenos, fitoesteroides, esteróides pregnanos, cumarinas, lignanas, γ -lactonas, sesquiterpenos e aminoácidos.

Neste contexto, espécies do gênero *Trichilia* vêm sendo apontadas como promissoras por possuírem substâncias com atividade inseticida comparável à da azadiractina, mas possivelmente com estrutura molecular mais simples e, portanto, com síntese viável economicamente (MIKOLAJCZAK e REED 1987, XIE *et al.* 1994, RAMÍREZ *et al.* 2000, WHEELER *et al.* 2001, CAZAL, 2010).

4.6 *Trichilia catiguá*

Popularmente conhecida como catuaba, catiguá, caatiguá, cedrinho, mangalô-catigá e angelim-rosa, *Trichilia catigua* são árvores com cerca de 10 m de altura e ocorrem de São Paulo até o Rio Grande do Sul. Possuem flores branco-amareladas e os frutos avermelhados (FIGURA 4.4). As flores são encontradas no período de setembro a outubro e os frutos de dezembro a janeiro.



FIGURA 4.4 - Frutos de *Trichilia catigua* A. Juss. (Fonte: Vanessa de Cássia Domingues).

O limonoide cedrelona (FIGURA 4.5) é encontrado em quantidade significativa no arilo dos frutos de *Trichilia catigua* A. Juss (MATOS *et al.*, 2009). Segundo estudos recentes do grupo de Produtos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, este limonoide não apresenta atividade frente às formigas cortadeiras, porém inibiu em 54% seu fungo simbiote (CAZAL, 2010).

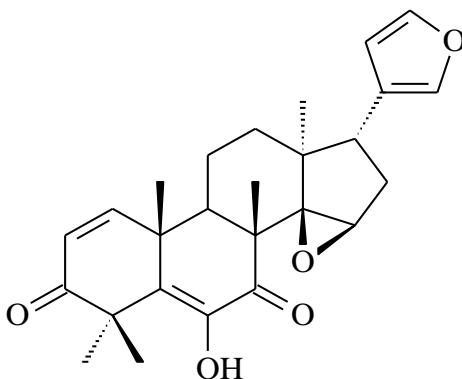


FIGURA 4.5 - Estrutura do limonoide cedrelona.

Diante dessas informações, pretende-se neste projeto nanoencapsular a cedrelona, a fim de aumentar a atividade frente o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* e modificá-la estruturalmente na busca de uma maior inibição diante das formigas e fungos.

4.7 Procedimento Experimental

O Projeto tinha como proposta isolar cedrelona dos frutos de *T. catigua* utilizando a técnica de HSCCC, que será descrito na parte inicial deste procedimento. Porém diante da adversidade e contratempos encontrados: como a escassez dos frutos e o baixo rendimento de extrato, no decorrer do trabalho, outros métodos e alternativas foram investigados como novas fontes do metabólito almejado.

4.7.1 Preparo do material vegetal e extrato de *T. catiguá*

Os frutos de *T. catigua* foram coletados no Campus da ESALQ na cidade de Piracicaba-SP no dia 14/12/2011 e posteriormente foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 72 horas, separados os arilos e pulverizados. Os arilos pulverizados foram submetidos a três extrações consecutivas com etanol, à temperatura ambiente, na proporção (5:1 v/m), com intervalo de três dias entre cada extração, em repouso com etanol. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato etanólico (Tabela 4.1).

TABELA 4.1- Extrato dos arilos dos frutos de *Trichilia catigua*

Extrato de <i>Trichilia catigua</i>	Material vegetal (g)	Código	Massa (g)
Arilo/Etanol	35,14	TCEA	10,00

O extrato foi analisado através de cromatografia em camada delgada comparativa e via RMN ¹H para posteriormente ser encaminhado para bioensaios inseticidas de incorporação em dieta artificial por ingestão em operarias de *Atta sexdens rubropilosa*, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP-Rio Claro-SP e de inibição de *L. gongylophorus in vitro* pelo método de incorporação realizado na Universidade Federal de São Carlos.

4.7.2 Estudo do extrato etanólico dos arilos dos frutos de *Trichilia catigua* (TCEA)

O extrato etanólico do arilo dos frutos de *Trichilia catigua* (TCEA) foi fracionado utilizando a cromatografia líquido-líquido e High-speed counter-current chromatography (HSCCC), na busca do limonoide cedrelona (FIGURA 4-6).



FIGURA 4.6 - Extração e fracionamento de *T. catiguá* e cedrelona.

A escolha de um bom sistema de solventes é extremamente importante para o sucesso da separação no HSCCC. Um bom sistema de solvente deve atender a as exigências descritas anteriormente.

Assim, foram testados diversos sistemas de solventes, baseado na consulta de lista de solventes para classes específicas de produtos naturais encontrados na literatura.

Foi realizado um levantamento bibliográfico de sistemas de solventes para limonoides, porém não foram encontrados muitos relatos na literatura. Foram testados inicialmente os sistemas de solventes descritos na Tabela 4.2, e a partir destas algumas combinações com proporções diferentes que serão discutidos no item resultados e discussão deste capítulo.

Cada um dos sistemas foi testado colocando-se as misturas de solventes em tubos de ensaios para observar a formação de duas fases, e agitando em agitador tipo Vortex, para observar a formação ou não de emulsão e os volumes das fases orgânica (FO) e aquosa (FA) formados.

TABELA 4.2 - Sistemas de solventes encontrados na literatura e suas proporções

	Sistemas de solventes	Proporções (v/v)	Referências
1	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:2:1,5:1	SILVA, <i>et al</i> 2009.
2	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:1,5:2:1	SILVA, <i>et al</i> 2009.
3	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:2:1,75:1	SILVA, <i>et al</i> 2009.
4	Hex/ButOH/MeOH/H ₂ O	1:0,9:1:0,9	SILVA, <i>et al</i> 2007.
5	Hex/EtOH/ACN/H ₂ O	10:8:1:1	SEVERINO, <i>et al</i> , 2009.
6	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:0,9:1:0,9	PENG, <i>et al</i> , 2005.
7	Hex/EtOH/ACN/H ₂ O	2:1:1:1	PENG, <i>et al</i> , 2005.
8	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:0,8:1,3:0,9	WANG, <i>et al</i> , 2012.
9	Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:0,2:1:0,2	WANG, <i>et al</i> , 2012

Em seguida, os sistemas de solventes que não apresentaram emulsão foram testados com o extrato TCEA. Este teste foi realizado para analisar a formação de emulsão ou não quando adicionado o extrato ao sistema de solvente.

Para esta etapa, foram solubilizados aproximadamente 10 mg de extrato bruto para cada 4 mL de sistema de solvente (2 mL da FO e 2 mL da FA), de cada um dos sistemas, em tubos de ensaios. Separou-se a fase superior (F.S) da fase inferior (F.I) e ambas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), para o cálculo do coeficiente de partição (k).

4.7.2.1 Procedimentos para o cálculo do coeficiente de partição (k) dos sistemas de solventes

Para determinar o coeficiente de partição foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Neste procedimento, foi adicionado cerca de 10 mg de extrato em um tubo de ensaio contendo 2 mL da fase superior e 2 mL da fase inferior. O tubo de ensaio foi agitado em vortex durante 5 min e a mistura foi separada por centrifugação a 4000 × g durante 15 min. Após a centrifugação, uma alíquota de 300 µL de cada fase foi seca no "speed-vac" e ressuspensa em 1 mL de metanol. As fases superiores e inferiores foram analisadas por CLAE para determinar o coeficiente de partição (K). Para estas análises foi utilizada uma coluna Luna C18, (25 x 0,46 cm, 10 µm), Phenomenex, com $\lambda = 278$ nm. O valor K foi expresso com a concentração da substância analisada na fase inferior dividido pela concentração na fase superior (FIGURA 4.7).

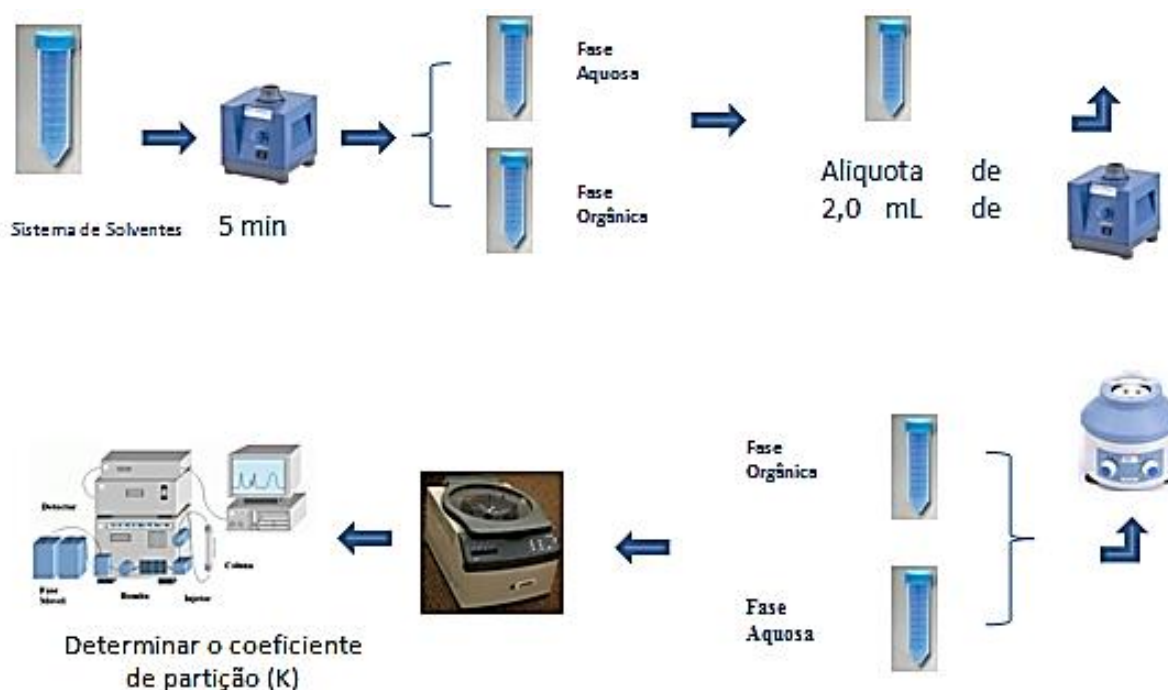


FIGURA 4.7 - Determinação do coeficiente de partição (K).

4.7.3 Isolamento de cedrelona de *Toona Ciliata*

Em virtude da escassez dos frutos de *Trichilia catigua*, em 2013 iniciou-se a busca por outra planta com abundância em cedrelona. Dados da literatura relatam a presença da cedrelona nos galhos de *Toona ciliata*. Inicialmente, foi realizada uma coleta dessa planta em maio de 2013, na Empresa de Reflorestamento Tropical Flora em Garça –SP. Após preparo do extrato, foi realizado o perfil químico do mesmo por

CLAE, onde se observou que não havia a presença da cedrelona. Uma segunda coleta foi realizada em dezembro de 2013, uma vez que a ausência do limonoide cedrelona na coleta de maio pode estar relacionada à variação sazonal. Porém, o perfil cromatográfico dos extratos preparados mostrou ausência do limonoide novamente.

Em uma busca mais aprofundada na literatura, observou-se que a presença do limonoide em grande quantidade é observada somente no mês de setembro no caule *Toona ciliata* (AGOSTINHO,1996). Deste modo, foram realizadas no ano de 2014 duas coletas no mês de setembro nos dias 02 e 29 onde foi encontrada a cedrelona.

Para a extração, os caules de *Toona ciliata* foram coletados e posteriormente secos em estufa de circulação de ar a 40°C, por aproximadamente 160 horas e serrados em pedaços pequenos para serem pulverizadas em um moinho tipo Willey (FIGURA 4.8). Em seguida, os pulverizados foram submetidos a três extrações consecutivas com hexano, à temperatura ambiente, na proporção (5:1 v/m), com intervalo de três dias entre cada extração, em repouso com hexano. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo. Em seguida o extrato foi submetido a sucessivas lavagens com hexano gelado para o isolamento de cristais depositados ao fundo. Estes cristais foram submetidos à análise por CLAE, C18 Luna Phenomenex 10 µm (0,46 x 25 cm), levando ao isolamento da cedrelona. Os cristais foram analisados via RMN ¹H.

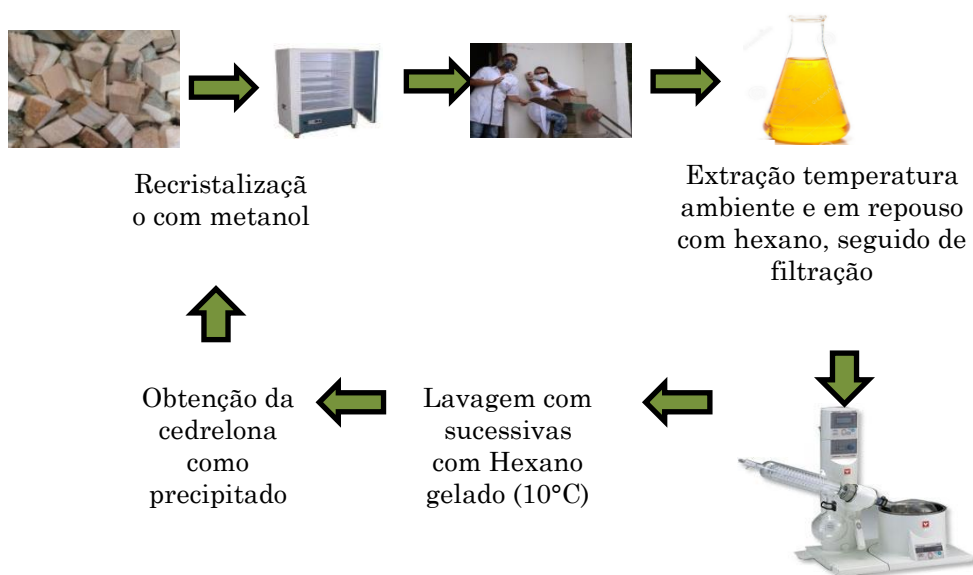


FIGURA 4.8 Fluxograma da obtenção de cedrelona do caule de *Toona ciliata*.

4.7.4 Mudanças estruturais da cedrelona

Com o metabólito isolado e identificado em quantidade satisfatória, iniciamos a etapa das mudanças estruturais. A molécula original foi modificada por acetilação, mesilação e esterificação, produzindo três novos compostos, o acetato de cedrelona, o mesilato de cedrelona e propionato de cedrelona.

4.7.4.1 Reação de Acetilação.

Reação de substituição do hidrogênio da hidroxila do carbono C-6 por um grupo acetila ($\text{CH}_3\text{-CO}$), gerando um éster denominado acetato. A reação de acetilação foi realizada com anidrido acético (Ac_2O) e piridina.

Em um balão de 10 mL foram adicionados 100 mg (180 μmol) do material de partida, solubilizados em 0,8 mL de piridina (10 mmol), mantidos sob agitação e temperatura de 60°C

Em seguida foi adicionado lentamente 1,0 mL (10 mmol) de anidrido acético e a reação prosseguiu nas condições de temperatura e agitação por 12 horas. Ao término da reação, foi realizada uma extração utilizando-se 20,0 mL de fase aquosa (10 mL de água e 10 mL de HCl 1,0 M) e como fase orgânica, CH_2Cl_2 (3x30 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em evaporador rotativo.

A amostra foi submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (230-400 mesh) ($h= 2,8$ cm $\phi= 1,0$ cm) e hexano:acetona (7:3 v/v), como fase móvel. Depois de seco, o produto foi identificado por RMN 1 e 2D e CG-MS.

4.7.4.2 Produto de Mesilação.

Foi realizado uma reação de mesilação na hidroxila do carbono C-6 com cloreto de Mesila (MsCl) e trimetilamina.

Em um balão de 10 mL foram adicionados (144 μmol , 60 mg) de cedrelona solubilizados em CH_2Cl_2 (1 mL), depois de 5min sob agitação, adicionou-se a trietilamina (180 μmol , 25 μL) e o cloreto de metanosulfonila (180 μmol , 14 μL), gota-

gota, à 0 °C. Após a adição dos reagentes cautelosamente, a reação prosseguiu sob agitação e temperatura controlada, durante 7 horas. Posteriormente foram adicionados 20 mL de água fria (miliQ) e CH₂Cl₂ (3x30 mL). As extrações sucessivas com CH₂Cl₂ foram concentradas, adicionando Na₂SO₄ anidro e filtrada. A fase orgânica foi seca em evaporador rotativo.

A amostra foi submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (230-400 mesh) (h=2,8 cm ϕ =1,0 cm) e hexano:acetona (7:3 v/v), como fase móvel. Depois de seco, o produto foi identificado por RMN 1 e 2D e CG-MS.

4.7.5 Produto de esterificação com cloreto de propionila

Foi realizada uma reação de esterificação na hidroxila do carbono C-6 com cloreto de propionila e piridina.

Em um balão de 10 mL, foram adicionados (144 μ mol, 60 mg) de cedrelona solubilizados em CH₂Cl₂ (1 mL), depois de 5min sob agitação, adicionou-se a piridina (720 μ mol, 63 μ L) e o cloreto de propionila (720 μ mol, 56 μ L), gota-gota, sob agitação, a 25°C. Após a adição dos reagentes cautelosamente, a reação prosseguiu sob agitação e temperatura controlada, durante 12 horas. Posteriormente foram adicionados 20 mL de água fria (miliQ) e CH₂Cl₂ (3x30 mL). As extrações sucessivas com CH₂Cl₂ foram concentradas, adicionado Na₂SO₄ anidro e filtrada. A fase orgânica foi seca em evaporador rotativo.

A amostra foi submetida a uma coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária, sílica gel 60 (230-400 mesh) (h=2,8 cm ϕ =1,0 cm) e hexano: acetona (7:3 v/v), como fase móvel. Depois de seco, o produto foi identificado por RMN 1 e 2D e CG-MS.

4.7.6 Análise cromatográfica qualitativa da cedrelona.

A cedrelona isolada foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na busca de melhores condições cromatográficas para o desenvolvimento e validação do método analítico cromatográfico. Diversos experimentos foram realizados para a escolha de melhor seletividade, sensibilidade e tempo de análise. (TABELA 4.3).

Os parâmetros utilizados na otimização do método analítico foram: área da banda cromatográfica, relação sinal -ruído entre a altura do pico e a linha de base e tempo de retenção.

TABELA 4.3 - Métodos analíticos empregados para análise da cedrelona

Método	Coluna	Condições analíticas	Tempo da corrida
Gradiente exploratório	C18 Luna Phenomenex 10 µm (0,46 x 25 cm)	MeOH:H ₂ O 10-90%, 1,0 mL/min, 278 nm	65 min
Isocrático	C18 Gemini Phenomenex 5 µm (0,46 x 15 cm)	MeOH:H ₂ O 85:15; 1,0 mL/min, 278 nm	15 min

Nesta análise utilizou-se o equipamento Agilent Technologies modelo 1260, com coluna analítica Gemini-C18 (Phenomenex®, (150 x 4,60 mm, 5 µm) acoplada a uma coluna de segurança C18 (Phenomenex® - mm), fase móvel MeOH: H₂O (85:15 v/v), com vazão de 1,0mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 278 nm.

4.7.7 Validação do método analítico para quantificação da cedrelona por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O método foi validado após a investigação da faixa linear de trabalho, seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão, limite de quantificação e de detecção.

4.7.7.1 Preparo da solução padrão para construção da curva de calibração

A faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 1 e 100 µg/mL. Inicialmente foi preparada uma solução estoque (1 mg/mL), diluindo 10 mg de cedrelona em 10 mL de MeOH, que posteriormente, foi diluída para a solução de trabalho (100 µg/mL). A partir dessa solução de trabalho foram preparadas soluções de análise em 11 concentrações diferentes; 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL. Todos os pontos da curva de calibração foram preparados em triplicata.

4.7.7.2 Preparo da solução padrão para validação do método

A validação do método analítico foi realizada de acordo com critérios propostos pela ICH (International Conference on Harmonization). Para tal, foram investigadas a linearidade, seletividade, exatidão, precisão, recuperação, limites de quantificação e de detecção e repetibilidade (CAZO *et al.*, 2012).

A sensibilidade do método foi definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Esses limites foram calculados através dos parâmetros da curva analítica por padronização externa. O Limite de Detecção foi expresso como $LD = 3,3 \cdot (s/a)$ e o Limite de Quantificação foi expresso como $LQ = 10 \cdot (s/a)$

Sendo:

s = Desvio padrão do intercepto,

a = Coeficiente angular da curva de calibração

Para verificar a precisão do método, foram preparadas três soluções de cedrelona em concentrações diferentes, sendo a primeira limitada a 120% (1,2 µg/mL) do menor ponto da curva, a segunda e a terceira localizadas entre 40-60% (50 µg/mL) e 90-100% (95 µg/mL) do maior ponto da curva, respectivamente.

A escolha desses pontos se deve ao fato de serem concentrações dentro da faixa linear utilizada, porém em concentrações diferentes das utilizadas na curva de calibração. As amostras foram preparadas em quintuplicata e analisadas em um único dia para verificação de repetitividade ou precisão intra-dia, e preparadas e analisadas em três dias não consecutivos para verificação da precisão inter-dias. A partir dos valores obtidos foi calculado o desvio padrão $s(X)$ e o coeficiente de variação CV (%) para cada concentração.

Para confirmar a validação do método analítico, os resultados foram submetidos à análise de variância de fator único (ANOVA) para avaliar a significância estatística do método proposto. Significância estatística foi estabelecida em valor- $P < 0,05$ que significa que as análises se aplicam à regressão linear proposta a um nível de confiança de 95%.

Para avaliação da repetibilidade do injetor, foi preparada uma amostra de 95 µg/mL e esta foi injetado 10 vezes seguido, nas mesmas condições e então calculado o desvio padrão $s(X)$ e o coeficiente de variação CV (%), a precisão e a exatidão.

Para avaliar a estabilidade das amostras no auto injetor, foi preparada uma amostra de 95 µg/mL e esta foi injetada 10 vezes em intervalos de 24h entre cada injeção nas mesmas condições e então calculado o desvio padrão $s(X)$ e o coeficiente de variação CV (%), a precisão e a exatidão.

4.8 Preparo das nanopartículas de cedrelona

4.8.1 Escolha do polímero

Dentre os polímeros mais utilizados em formulações encontram-se os polímeros poli-ε-(caprolactona) (PCL), poli-β-(hidroxibutirato) (PHB) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) observados na FIGURA 4.9. O uso destes polímeros e poliésteres está relacionado as suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade (CAZAL, 2010).

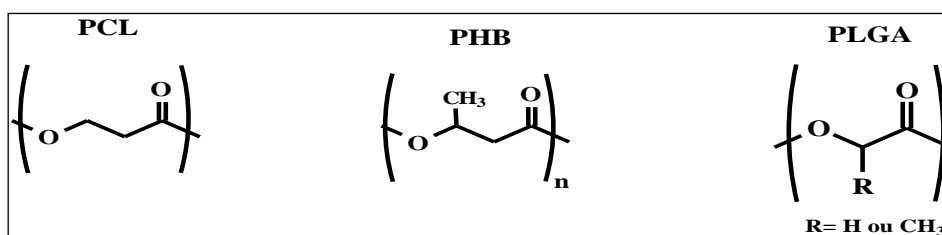


FIGURA 4.9 - Estrutura dos polímeros poli-ε-(caprolactona) (PCL), poli-β-(hidroxibutirato) (PHB) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).

Entre os polímeros biodegradáveis, o poli-β-(hidroxibutirato) (PHB) é um dos mais biodegradáveis. Este é completamente degradado, gerando CO₂ e convertido à biomassa por bactérias, fungos e leveduras. A poli-ε-(caprolactona) (PCL), um poliéster alifático cuja aplicação está sendo investigada particularmente no contexto de sistemas de liberação de drogas.

Acredita-se que, no solo, enzimas extracelulares sejam as responsáveis por quebrar as extensas cadeias de PCL antes que os microrganismos tenham a capacidade de assimilar o polímero (ROSA *et al.*, 2000). PLGA é sintetizado por meio da polimerização via abertura dos dímeros cíclicos de ácido glicólico e ácido láctico. Durante a polimerização, as sucessivas unidades monoméricas (de ácido glicólico e láctico) são ligados em PLGA por ligações éster, obtendo um poliéster alifático linear.

4.8.2 Preparo das nanopartículas de PCL com cedrelona

As nanocápsulas e nanoesferas foram preparadas baseadas na técnica de deslocamento do solvente descrita por Fessi *et al.* (1988a, 1988b, 1989). A metodologia consiste em uma fase orgânica contendo o polímero, o princípio ativo, óleo (somente para nanocápsulas), tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo), o solvente orgânico e uma fase aquosa contendo um tensoativo de elevado EHL, e água (FIGURA 4.10).

Ambas as fases são mantidas sob agitação magnética durante 20 minutos. Em seguida a fase orgânica é vertida, na fase aquosa, através de uma bomba peristáltica (10%) mantendo-se a agitação magnética durante 20 minutos, em temperatura constante de 45 °C.

Posteriormente, a suspensão coloidal é mantida por 30 minutos em repouso e o solvente orgânico e parte da água são eliminados via um evaporador rotativo a 45 °C, ajustando o volume final conhecido (CAZAL, 2010).

A representação esquemática do método para preparação pode ser observada na. Os compostos utilizados nas nanopartículas encontram-se listadas na Tabela 4.4.

TABELA 4.4 -Composição das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação

Formulação	
	Fase orgânica
Polímero	PCL
Tensoativo	Span [®] 60
Óleo	Oleato de isodecila
Solvente	Acetona
Substância	cedrelona
	Fase aquosa
Tensoativo	Tween 80
Solvente	H ₂ O

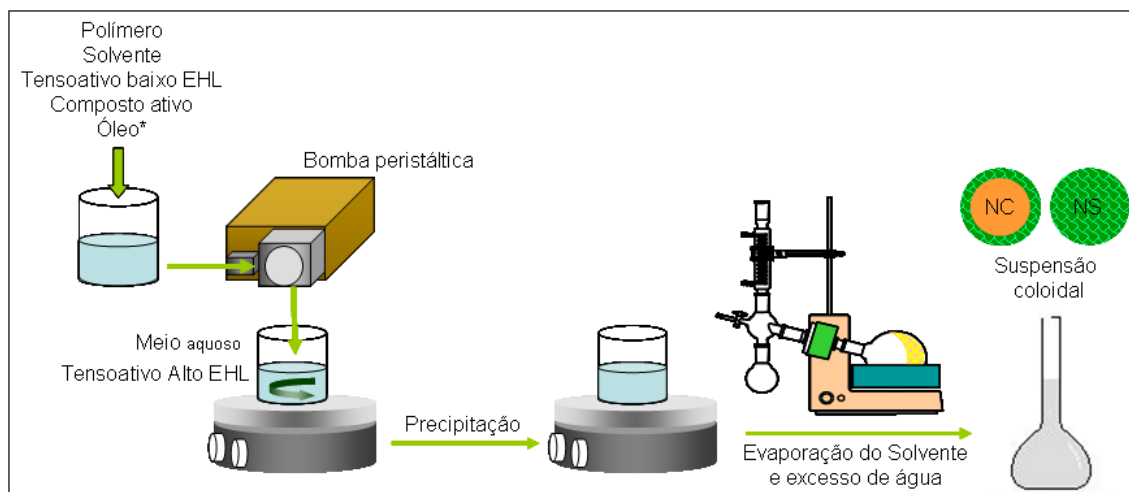


FIGURA 4.10 - Esquema de preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. Figura Cedida pelo Prof. Dr. Moacir R. Forim.

Para a avaliação das formulações, foi realizado um planejamento fatorial, onde cada variável é denominada de fator e cada fator varia de dois ou mais níveis. O número de experimento é calculado pela expressão N^k , onde N é o número de níveis e k o número de fatores.

Para estes experimentos, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 centrado na média, considerando a quantidade de princípio ativo cedrelona, do polímero PCL e de oleato de isodecila (que possibilita a formação de nanocapsulas e nanoesferas). Desta maneira, foi montado um planejamento com estes componentes por se tratarem dos fatores que exercem maiores influências sobre as características das nanopartículas (TABELA 4.5 e 4.6).

TABELA 4.5 - Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2^3 centrado na média

Variavel	Fatores	Níveis		
		-1	0	1
X 1	PCL (mg)	100,0	150,0	200,0
X 2	Óleo (mg)	0	155,0	310,0
X 3	cedrelona (mg)	25,0	37,5	50,0

Nesse experimento a concentração de Span® 60 e Tween 80 foram mantidas constantes em 76,5 mg e os volumes de água e acetona com 53 mL e 26,5 mL, respectivamente.

TABELA 4.6 -Planejamento fatorial 2³ centrado na média. Np= Nanopartícula.

Ensaio	Ordem de Execução dos ensaios	Fatores		
		Cederelona	PCL	Óleo
Np1	14	-1	-1	-1
Np 2	10	1	-1	-1
Np 3	4	-1	1	-1
Np 4	5	1	1	-1
Np 5	9	-1	-1	1
Np 6	1	1	-1	1
Np 7	3	-1	1	1
Np 8	8	1	1	1
Np 9*	12	0	0	0
Np 10*	2	0	0	0
Np 11*	6	0	0	0
Np 12**	13	-1	-1	-1
Np 13**	7	1	1	-1
Np 14**	11	1	-1	+1

* Valores centrados na média

** Repetições

4.8.3 Preparo das nanopartículas sem o princípio ativo cedrelona - Controle

Para avaliar os resultados de atividade biológica, foi necessário o preparo de controles, a fim de associar as possíveis atividades as nanopartículas e não a composição. Portanto, foram preparadas formulações referentes a cada um dos constituintes que foram usadas como controle ver TABELA 4.7.

Tabela 4.7 - Nanopartículas sem cedrelona-Controle.

Ensaio	Fatores		
	(PCL) mg	Óleo (mg)	Amostra referente
Controle-1	100	Ø	Np1, Np4 e Np12
Controle -2	200	Ø	Np2 , Np6 e Np14
Controle -3	100	310	Np3 e Np7
Controle -4	200	310	Np5, Np8 e Np13
Controle -5	150	155	Np9, Np10 e Np11

4.9 Caracterização físico-química das nanopartículas

As análises físico-químicas das nanopartículas foram realizadas após a preparação das suspensões coloidais. Os parâmetros analisados foram: pH, análise do diâmetro de partícula (DP), utilizando a análise da difusão dinâmica da luz (PCS), e potencial zeta (PZ). As análises de PZ e DP foram realizadas com a colaboração do técnico responsável, Lourivaldo dos Santos Pereira, do Departamento de Química (FFCLRP) da USP, Ribeirão Preto.

4.9.1 Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados diretamente nas suspensões através do potenciômetro (Qualxtron Mod. 8010), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. O pH foi medido primeiramente após o preparo e em seguida durante 5, 10, 15, 20 e 30 dias. Posteriormente, as medidas foram realizadas durante 3 meses em intervalos de 15 dias para avaliação da estabilidade das suspensões.

4.9.2 Diâmetro médio de partículas

Análise de diâmetro de partícula (DP) foi realizada utilizando a técnica da difusão dinâmica da luz (PCS) e expressas em nanômetros. As medidas foram realizadas em triplicata (n = 3), foram obtidas a temperatura ambiente num ângulo fixo de 90°. O diâmetro de partícula foi determinado após diluir 0,1 mL de cada suspensão

coloidal em 10 mL de água ultrapura e 10 mM de NaCl, ZETASIZER 3000 HSA, da Malvern Instruments.

4.9.3 Potencial zeta

O Potencial zeta foi determinado após diluir 0,1 mL de cada suspensão coloidal em 10 mL de água ultrapura e 10 mM de NaCl, ZETASIZER 3000 HSA, da Malvern Instruments.

4.9.4 Determinação da quantidade total de cedrelona na suspensão coloidal.

A quantidade total de cedrelona nas nanopartículas foi analisada através da dissolução das nanopartículas em acetona e analisadas por CLAE, utilizando as mesmas condições da curva de calibração. Uma alíquota de 100 µL de suspensão foi solubilizada em 900 µL de acetona, em seguida foram agitadas em vortex por 1 min e deixadas em repouso por 30 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos e uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi seca em speed-vac, e ressuspensa em metanol, para análise cromatográfica.

4.9.5 Determinação da quantidade de cedrelona encapsulada.

A avaliação do teor de cedrelona encapsulada foi realizada através da quantificação do teor de cedrelona não encapsulada. Para esta metodologia, utilizou-se a técnica ultrafiltração-centrifugação, na qual as nanopartículas em suspensão ficam retidas pela membrana, enquanto a fase aquosa foi ultrafiltrada e analisada por CLAE, para a determinação da substância livre. Em seguida, a quantidade de substância encapsulada é determinada pela diferença entre a quantidade de substância total e a quantidade de substância livre

A suspensão coloidal foi homogeneizada e em seguida, transferiu-se uma alíquota de 500 µL para tubo de centrífuga Spin[®] (2,0 mL) com filtro de acetato de celulose 0,22 µm (FIGURA 4.11). Este foi centrifugado a 8.000 rpm por 40 min. Após a este tempo, o ultrafiltrado foi seco em speed-vac, à 45 °C e depois ressuspensa em 200 µL de metanol, para análise via CLAE.



FIGURA 4.11- Filtro de acetato de celulose utilizado para determinação da quantidade de cedrelona encapsulada.

Para o Cálculo da eficiência de encapsulação (EE), utilizou-se a fórmula:

$$EE = \frac{(B - A)}{B} * 100$$

Onde: A é a concentração de cedrelona no ultrafiltrado ($\mu\text{g/mL}$) e B é a concentração total ($\mu\text{g/mL}$) na suspensão coloidal.

4.10 Morfologia das nanopartículas

Para avaliar a homogeneidade e morfologia das nanopartículas, gotas da suspensão coloidal foram evaporadas diretamente em suportes metálicos ou depositadas em fitas de carbono. Depois disso, as amostras foram metalizadas com ouro e submetidas à análise (MEV) utilizando-se um microscópico (MEV) Philips XL 30 FEG no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais/UFSCar. O suporte metálico usado foi fabricado em alumínio sendo previamente limpo e polido à máquina com pasta de diamante.

4.11 Resultados e Discussão

Os testes realizados com os sistemas de solventes obtidos na literatura para avaliar a formação ou não de emulsão e o volume de fase orgânica (FO) e fase aquosa

(FA) formada podem ser observadas na TABELA 4.8. Os testes que formaram emulsão foram descartados.

TABELA 4.8 -Teste com sistemas de solventes da literatura

Teste	Mistura de solventes	Massa do extrato (mg)	Formou emulsão	Tempo de separação	Coefficiente de partição (k)
1	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:2:1,5:1)	10,6	sim	15min 10 seg	*
2	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:1,5:2:1)	10,6	sim	24hs	*
3	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:2:1,75:1)	10,6	sim	24hs	*
4	Hex/Butanol/MeOH/H ₂ O (1:0,9:1:0,9)	10,5	sim	30min	*
5	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:1:1)	10,5	não	25 seg	3,98
6	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:0,9:1:0,9)	10,3	sim	24hs	*
7	Hex/EtOH/ACN/H ₂ O (2:1:1:1)	10,3	sim	24hs	*
8	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:0,8:1,3:0,9)	10,3	sim	30min	*
9	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:0,2:1:0,2)	10,3	sim	24hs	*
10	Hex/Dicloro/MeOH (47:6:72)	*	*	*	*
11	Dicloro/MeOH/H ₂ O (4:5:3)	10,8	não	10seg	0,00479
12	Dicloro/MeOH/H ₂ O (8:13:7)	10,7	não	20 seg	0,016
13	Dicloro/MeOH/H ₂ O (7:13:9)	10,2	não		0,00262
14	Dicloro/MeOH/H ₂ O (93:35:72)	10,2	sim	-	--
15	Dicloro/EtOH/H ₂ O (93:35:72)	10,1	não	15 seg	0,0340
16	Hex/EtOH/ H ₂ O (6:5:5)	10,1	não		0,16

*Não foi calculado o coeficiente de partição pois não estavam dentro dos parâmetros necessários como não formar emulsão e ter um bom tempo de separação (inferior a 30s).

Os sistemas de solventes que não apresentaram emulsão, foram testados com o extrato TCEA, a fim de avaliar o comportamento do extrato com o sistema de solventes, analisando a formação ou não de emulsão, bem como calcular o coeficiente de partição, para os sistemas que se mostrarem adequados. Os resultados podem ser observados na TABELA 4.8.

Diante dos resultados da TABELA 4.8, o sistema que apresentou ausência de emulsão, bom tempo de separação e melhor coeficiente de partição ($k=3,98$), quando testado com o extrato, foi sistema de solvente, Hex/Etanol/ACN/ H₂O (10:8:1:1).

Portanto este foi testado, nas mesmas condições descritas anteriormente, com algumas alterações nas proporções dos seus solventes, buscando melhores resultados de k . Foram testados reduções somente na proporção de hexano, hexano e acetonitrila e hexano, acetonitrila e água. Os resultados destes testes estão descritos na TABELA 4.9.

TABELA 4.9 -Testes com sistema de solvente Hex/Etanol/ACN/ H₂O variando as proporções dos solventes envolvidos

	Mistura de solventes	Massado extrato (mg)	Formou emulsão	Tempo de separação (seg)	Coeficiente de partição (k)
	Hex/AcoEt/MeOH/H ₂ O (1:2:1,5:1)	10,6	Não	30	0,16
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:1:1)	10,5	Não	25	3,98
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:3:1)	10,6	Não	15	5,82
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:5:1)	10,6	Não	16	4,08
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (9:8:1:1)	10,6	Não	20	4,50
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (8:8:1:1)	10,5	Não	18	3,53
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (7:8:1:1)	10,6	Não	19	3,92
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:7:1:1)	10,6	Não	18	4,83
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:6:1:1)	10,6	Não	30	5,22
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:5:1:1)	10,6	Sim	20	5,71
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:0,5:1)	10,5	Não	11	3,52
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:0,5:0,5)	10,6	Não	17	3,66
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (10:8:1:0,5)	10,5	Não	13	2,73
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (8:10:1:1)	10,6	Não	14	3,94
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (8:10:0,5:0,5)	*	*	*	*
	Hex/Etanol/ACN/H ₂ O (8:10:0,5:1)		Não	15	3,61

Com os resultados dos novos testes, o melhor valor do coeficiente de partição foi do sistema Hex/Etanol/ACN/H₂O (10:8:1:0,5), com $k= 2,73$. Sendo o mais próximo de 1. Quanto mais próximo $k= 1$, maior é o equilíbrio da amostra no sistema de

solvente, ou seja, 50 % da amostra está presente na fase orgânica e 50 % na fase aquosa.

Além de apresentar um ótimo tempo de separação com formação de duas fases proporcionais e k mais próximo de 1. Portanto, o sistema Hex/Etanol/ACN/ H₂O (10:8:1:0,5) foi escolhido para ser utilizado na técnica de contracorrente para o isolamento de cedrelona do extrato etanólico do arilo dos frutos de *T. catigua*.

4.11.1 - Isolamento da cedrelona por HSCCC

Para o isolamento da cedrelona, utilizou-se o equipamento HSCCC QuikPrep/LabPrep MK 5, do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, com quatro colunas.

Para o fracionamento do extrato etanólico dos arilos de *Trichilia catiguá* (TCEA), foi utilizado o sistema de solvente Hex/Etanol/ACN/H₂O (10:8:1:0,5) com modo de eluição normal (cauda-cabeça).

Inicialmente as colunas foram preenchidas com a fase estacionária (FI) e em seguida, o aparelho foi submetido à rotação de 800 rpm, enquanto a fase móvel foi bombeada para a coluna a um fluxo de 3,0 mL/min.

Em uma proveta de 100 mL foram coletados 59 mL da fase estacionária, até iniciar-se a saída da fase móvel (F.S). Coletou-se 10 mL da fase móvel e em seguida, injetou-se 1,05 g do extrato TCEA previamente solubilizados em 5 mL do sistema de solventes (2,5 mL da F. S e 2,5 mL da F. I).

Foram coletadas inicialmente 100 mL até iniciar a saída de amostra com coloração amarela, em seguida, coletou-se alíquotas de 20 mL. Foram coletadas 150 frações, depois desligou-se a rotação e coletou-se da fração 151 a 165.

Para limpeza do equipamento, com a rotação desligada, foi bombeado aproximadamente 700 mL da fase inferior (até sair incolor) e na sequência, limpou-se o equipamento com 900 mL de EtOH: H₂O (8:2). Todas as frações obtidas foram analisadas por cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) e/ou RMN ¹H (FIGURA 4.12).

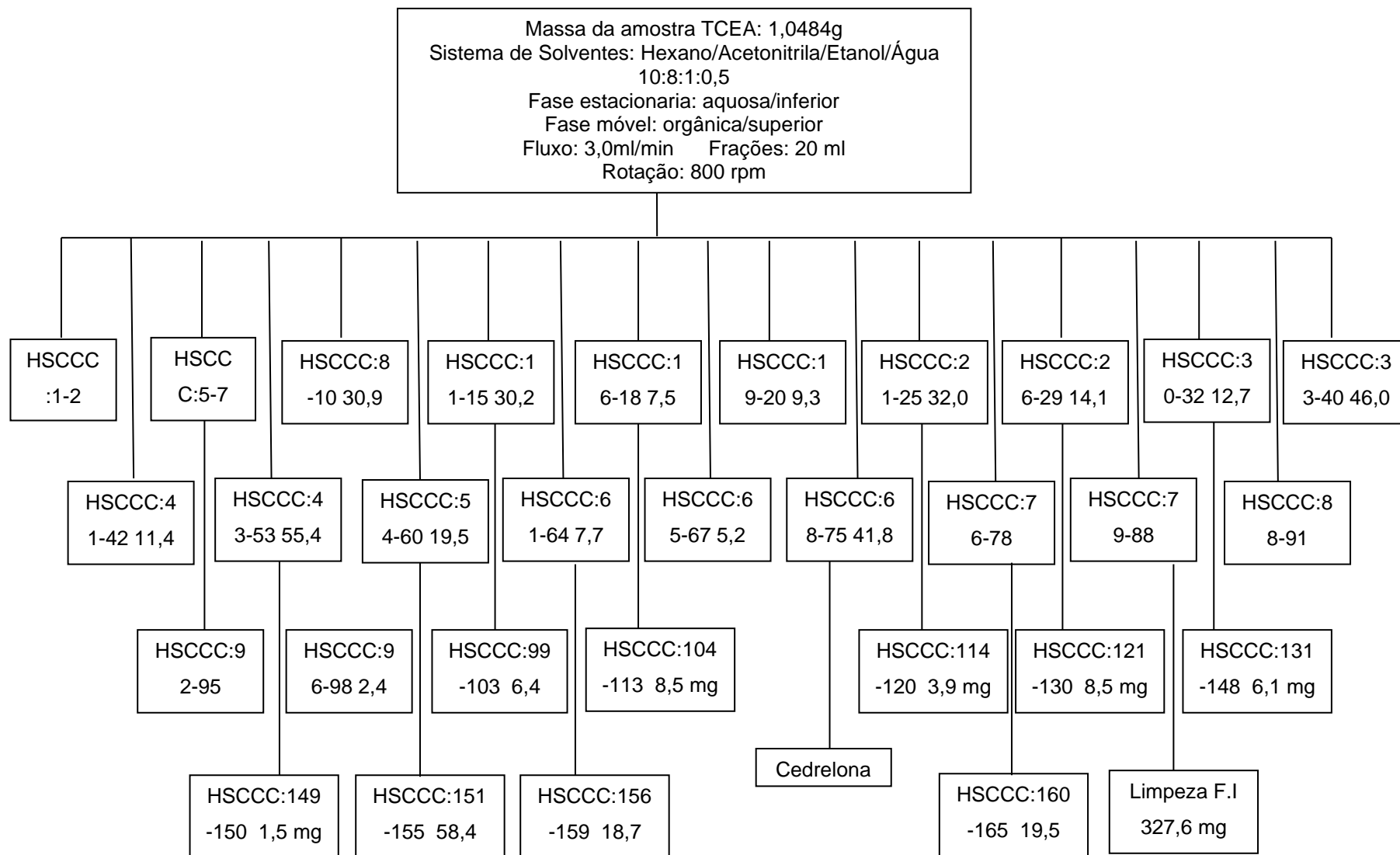


FIGURA 4.12 - Fluxograma de Frações reunidas do HSCCC.

4.11.2 Determinação estrutural do limonoide isolado e dos produtos das semi-sínteses

4.11.2.1 Substância isolada de *Trichilia catigua* e *Toona ciliata*: limonoide cedrelona

A cedrelona (FIGURA 4.13) foi isolada do extrato etanólico do arilo *Trichilia catigua*. A identificação da mesma foi feita através de RMN ^{13}C e RMN ^1H e comparação com a literatura (TABELAS 4.10 e 4.11).

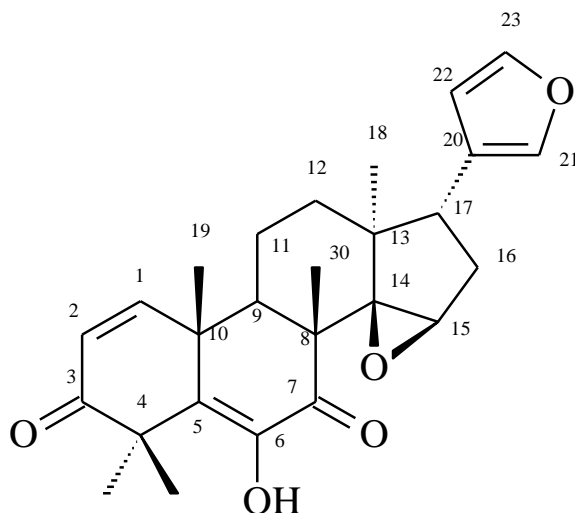


FIGURA 4.13 -Estrutura da cedrelona.

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 4-14 a 4-16) indicou a presença de um limonoide. Os sinais em δ 7,38 (t, $J = 1,6$ Hz), δ 7,16 (m) e δ 6,19 (m) foram atribuídos aos hidrogênios H-23, H-21 e H-22 respectivamente, referentes ao anel furano. Os cinco singletos em δ 0,76; 1,13; 1,31; 1,51 e 1,59 integrando para 3 hidrogênios cada um, foram atribuídos a cinco metilas.

Os dubletos em δ 6,92 (d, $J = 9,9$ Hz) e δ 6,12 (d, $J = 9,9$ Hz) foram atribuídos aos H-1 e H-2, respectivamente. O singlete em δ 3,81 foi atribuído ao H-15 do grupo epóxido C-14/C-15 e o singlete em δ 6,46 foi atribuído à hidroxila do grupo diosfenol no C-6.

TABELA 4.10 - Dados de RMN¹H da cedrelona em comparação com a literatura (CAZAL, 2010, LUO *et al.*, 2000)

H	(CDCl ₃ , 400 MHz)	(CAZAL,2010, CDCl ₃ , 400 MHz)	(LUO <i>et al.</i> , 2000)
1	6,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9Hz)	6,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz)	6,86 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)
2	6,12 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9Hz)	6,10 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 10 Hz)	6,05 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,8 Hz)
9	2,69 (2H, <i>dd</i>)	2,68 (2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,6; 3,2 Hz)	-
11	1,89 (<i>m</i>)	1,85 (<i>m</i>)	-
12	2,10 (<i>m</i>)	2,08 (<i>m</i>)	-
15	3,81 (1H, <i>s</i>)	3,79 (1H, <i>s</i>)	3,74 (1H, <i>s</i>)
16a	1,95 (<i>dd</i>)	1,94 (<i>dd</i>)	-
16b	2,34 (<i>dddd</i>)	2,30 (<i>dddd</i>)	-
17	2,77 (2H; <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,9 e 11 Hz)	2,76 (2H; <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,4 e 10 Hz)	-
18	0,76 (3H, <i>s</i>)	0,75 (3H, <i>s</i>)	0,69 (3H, <i>s</i>)
19	1,13 (3H, <i>s</i>)	1,12 (3H, <i>s</i>)	1,06 (3H, <i>s</i>)
21	7,16 (1H, <i>m</i>)	7,14 (1H, <i>m</i>)	7,09 (1H, <i>s</i>)
22	6,19 (1H, <i>m</i>)	6,18 (1H, <i>m</i>)	6,12 (1H, <i>s</i>)
23	7,38 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 1,6 Hz)	7,36 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 1,3 Hz)	7,31 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 1,5 Hz)
28	1,51 (3H, <i>s</i>)	1,49 (3H, <i>s</i>)	1,43 (3H, <i>s</i>)
29	1,59 (3H, <i>s</i>)	1,57 (3H, <i>s</i>)	1,51 (3H, <i>s</i>)
30	1,31 (3H, <i>s</i>)	1,29 (3H, <i>s</i>)	1,23 (3H, <i>s</i>)
OH	6,46(1H, <i>s</i>)	6,52 (1H, <i>s</i>)	6,46 (1H, <i>s</i>)

A análise do espectro de RMN¹³C (FIGURA 4.17, TABELA 4-11) mostra a presença de 26 sinais de átomos de carbono. Os carbonos carbonílicos foram caracterizados pelos sinais em δ 203,6 atribuído ao C-3 e δ 197,9 característico de grupamento diosfenol, atribuído ao C-7. Os sinais em δ 69,8 e 55,1 foram atribuídos aos carbonos do epóxido C-14 e C-15, respectivamente.

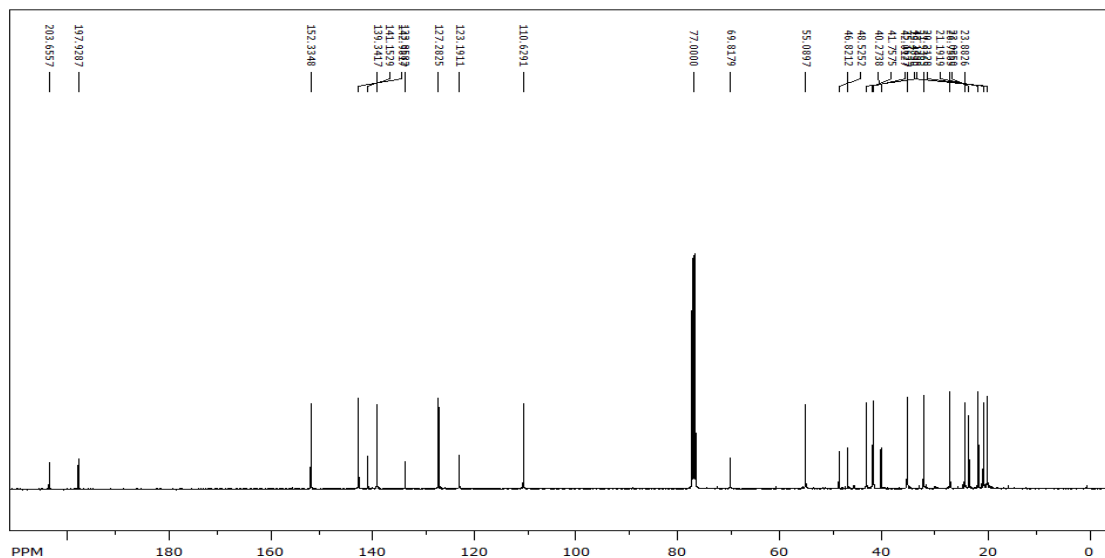


FIGURA 4.17 -Espectro de RMN ^{13}C da cedrelona (100 MHz, CDCl_3).

TABELA 4.11 -Dados de RMN ^{13}C da cedrelona em comparação com a literatura (CAZAL, 2010 e LUO *et al.*, 2000)

H	(CDCl_3 , 400 MHz)	CAZAL, 2010 (CDCl_3 , 100 MHz)	(LUO <i>et al.</i> , 2000)
1	152,3	152,3	152,2
2	127,2	127,2	127,2
3	203,6	203,5	203,3
4	48,5	48,5	48,5
5	133,8	133,8	133,9
6	141,1	141,2	141,2
7	197,9	197,9	197,8
8	46,8	46,8	46,8
9	43,1	43,6	43,2
10	40,2	40,2	40,2
11	19,5	19,4	19,4
12	35,1	35,1	35,1
13	42,0	42,0	41,9
14	69,8	69,8	69,7
15	55,1	55,0	55,0
16	31,9	31,9	31,9
17	41,7	41,7	41,7
18	23,8	23,8	23,8
19	20,2	20,1	20,1
20	123,2	123,2	123,2
21	139,3	139,3	139,3
22	110,6	110,6	110,6
23	142,9	142,9	142,9
28	26,7	26,7	26,7
29	21,2	21,8	21,2
30	23,0	23,0	22,9

4.11.2 Substâncias sintetizadas, produto de acetilação da cedrelona

O produto acetato de cedrelona (FIGURA 4.18), obtido após a reação de acetilação, foi identificado por CG-MS RMN ^1H , ^{13}C e 2D).

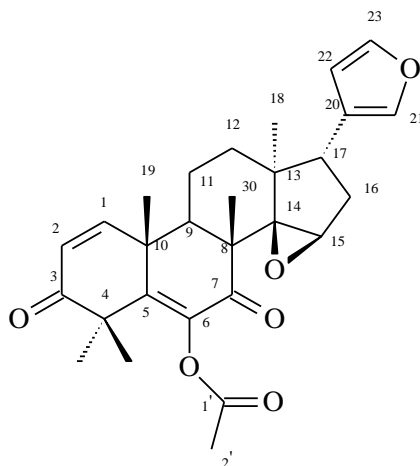


FIGURA 4.18- Produto sintetizado - Acetato de Cedrelona.

Foi obtido 15,2 mg de produto, sendo o rendimento da reação de 76%. Análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 4.19 a 4.22) mostra a formação do produto acetilado. Observa-se no espectro a ausência do singlete em δ 6,47 referente à hidroxila do material de partida. O tripleto em δ 7,37 (t, $J=1,5$ Hz) foi atribuído ao H-23 e os multipletos em δ 7,14 e δ 6,18 aos hidrogênios H-21 e H-22 respectivamente, característicos do anel furano. Os dubletos em δ 6,93 (1H, d, $J=11,0$ Hz) e δ 6,16 (1H, d, $J=11,0$ Hz) foram atribuídos aos H-1 e H-2 respectivamente. O singlete em δ 3,74 foi atribuído ao H-15.

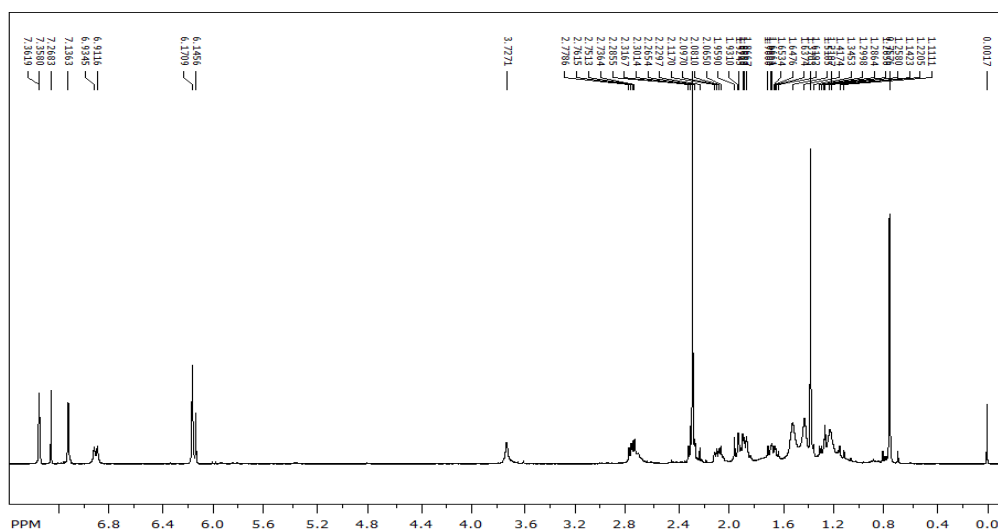


FIGURA 4.19 - Espectro de RMN ^1H do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

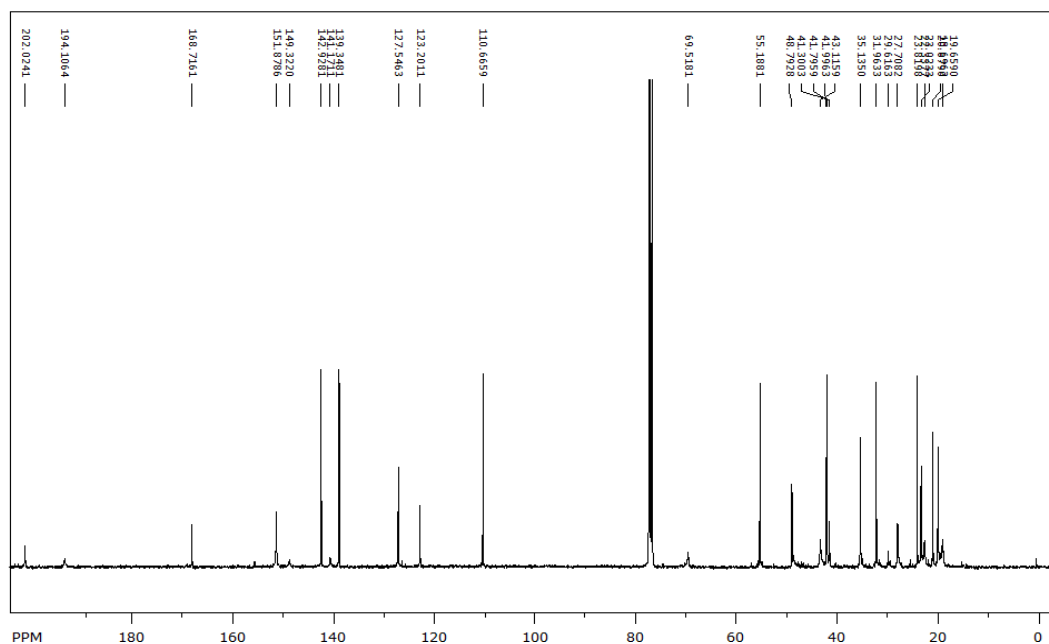


FIGURA 4.22- Espectro de RMN ^{13}C do acetato de cedrelona (100 MHz, CDCl_3).

O espectro de HSQC (FIGURAS 4.23 a 4.25) mostra a correlação dos hidrogênios H-21, H-22 e H-23 com os carbonos em δ 139,3, δ 110,6, δ 142,9 respectivamente, referentes aos hidrogênios do anel furano. Observa-se também a presença de sinais sobrepostos: um duplo dubleto em δ 6,16 referente ao H-2 que se correlaciona com carbono em δ 127,5 e um multipeto em δ 6,18 do H-22 correlacionando com o carbono em δ 110,6.

O sinal do hidrogênio em δ 3,74(s) correlaciona-se com o carbono δ 55,1 e foi atribuído ao H-15. Na região de δ 2,30 observa-se novamente sobreposição de sinais: δ 2,30 (s) que se correlaciona com carbono δ 20,6 referente a uma metila e δ 2,30 (m) referente aos H-16a e H-16b que se correlacionam com carbono δ 31,9. O multipeto em δ 2,08 correlaciona-se com carbono em δ 35,1 e foi atribuído aos H-12a enquanto o multipeto em δ 1,67 que também se correlaciona com carbono δ 35,1 foi atribuído aos H-12b.

TABELA 4.12- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do acetato de cedrelona (400 e 100 MHz, CDCl_3)

H/C	RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz)	RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz)
1	6,93 (1H, d, $J = 11,0\text{Hz}$)	151,8
2	6,16 (1H, d, $J = 11,0\text{ Hz}$)	127,5
3	-	202,1
4	-	41,7
5	-	149,3
6	-	139,3
7	-	194,1
8	-	
9	1,37(m)	23,1
10	-	48,7
11	1,85 (2H,m)	19,6
12a	2,08 (1H,m)	35,1
12b	1,67 (1H,m)	35,1
13	-	43,1
14	-	69,5
15	3,74 (1H, s)	55,1
16a	1,92 (1H,m)	31,9
16b	2,30 (1H,m)	31,9
17	2,76 (2H,dd, $J = 6,2$ e $11,0\text{ Hz}$)	41,9
18	0,76 (3H, s)	23,1
19	1,37(3H,m)	23,1
20	-	123,2
21	7,14 m	139,3
22	6,18m	110,6
23	7,37 (t, $J=1,5\text{Hz}$)	142,9
28	1,51 (3H,s)	27,7
29	1,44 (3H,s)	22,3
30	1,22	18,7
$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$	-	168,7
$\text{O}\text{C}\underline{\text{O}}\text{CH}_3$	2,30 (3H, s)	20,6

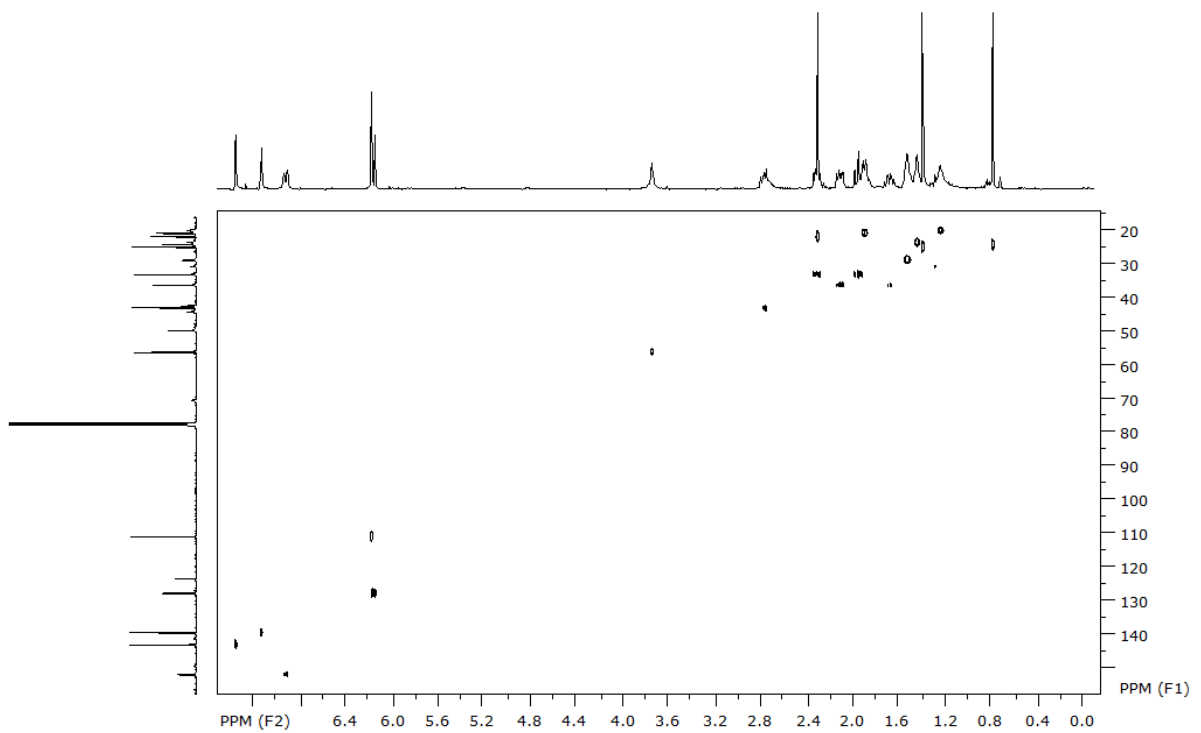


FIGURA 4.23 - Mapa de contorno de HSQC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

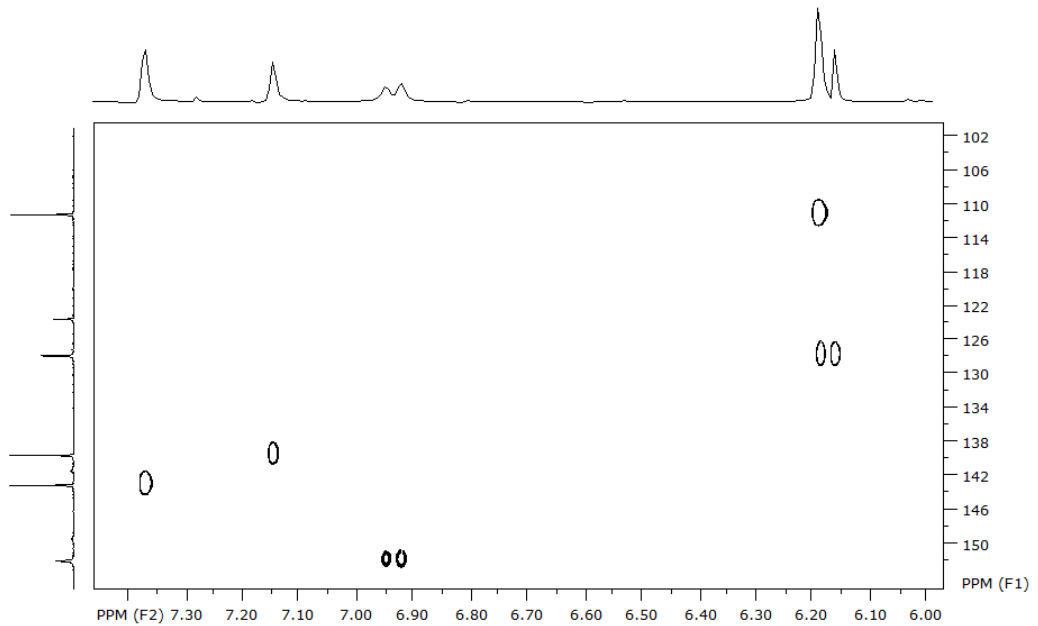


FIGURA 4.24 - Expansão do mapa de contorno de HSQC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

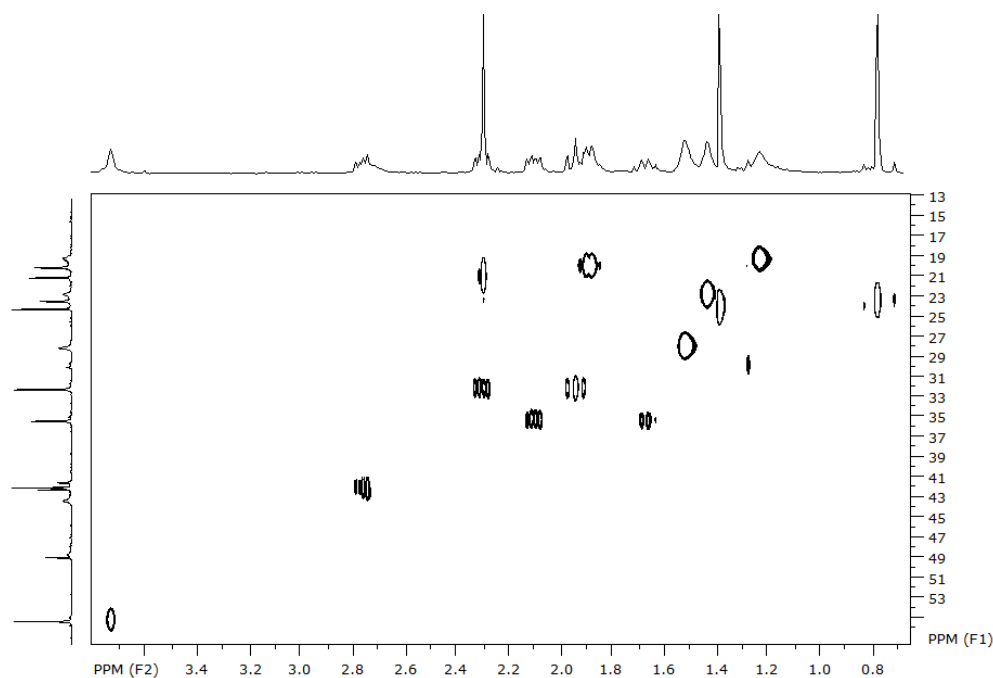


FIGURA 4.25 - Expansão do mapa de contorno de HSQC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

O mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.26) mostra correlação dos sinais de H-21 e H-22 com um carbono em δ 123,2, atribuído ao C-20. Observa-se a correlação do H-23 (δ 7,37, *t*) com os carbonos δ 110,6, δ 123,2 e δ 139,5 que foram atribuídos aos carbonos C-22, C-20 e C-21, respectivamente. O sinal do hidrogênio em δ 2,78 (dd) foi atribuído ao H-17, pois observa-se no HMBC a correlação deste sinal com os carbonos C-20, C-21, C-22 do anel furano e com o carbono em δ 43,1, δ 31,9 e δ 23,1 atribuídos aos C-13, C-16 e C-18, respectivamente.

Observam-se ainda as correlações dos sinais sobrepostos, o que facilitou a atribuir estes valores: os sinais em δ 6,18 (m) atribuídos ao H-22 mostram correlações com os carbonos δ 139,3, δ 123,2 e δ 142,9 atribuídos aos carbonos C-21, C-20 e C-23 respectivamente. Já o sinal δ 6,16 (d) atribuído ao H-1 mostra correlações com carbonos em δ 48,7 e δ 41,3 referentes aos C-10 e C-13 respectivamente.

O singlete em δ 2,30 (s) foi atribuído a metila do grupo acetil (OCOCH_3), pois mostra correlações com carbonos δ 168,7 e δ 139,3, referentes a carbonila do grupo acetil e ao C-6 respectivamente. Já o multipletto em δ 2,30 mostra correlações com os carbonos δ 69,5, δ 55,1 e δ 41,9 atribuídos aos carbonos C-14, C-15 e C-17 respectivamente. O singlete em δ 0,76 foi atribuído a metila H-18, pois mostra correlações com os carbonos δ 35,1, δ 43,1 e δ 69,5 atribuídos aos carbonos C-12,

C-13 e C-14 respectivamente. O duplete em δ 6,93 foi atribuído ao H-2, mostrando correlações com os carbonos δ 41,7, δ 151,8 e δ 202,1 atribuídos aos carbonos C-4 C-1 e C-3, respectivamente.

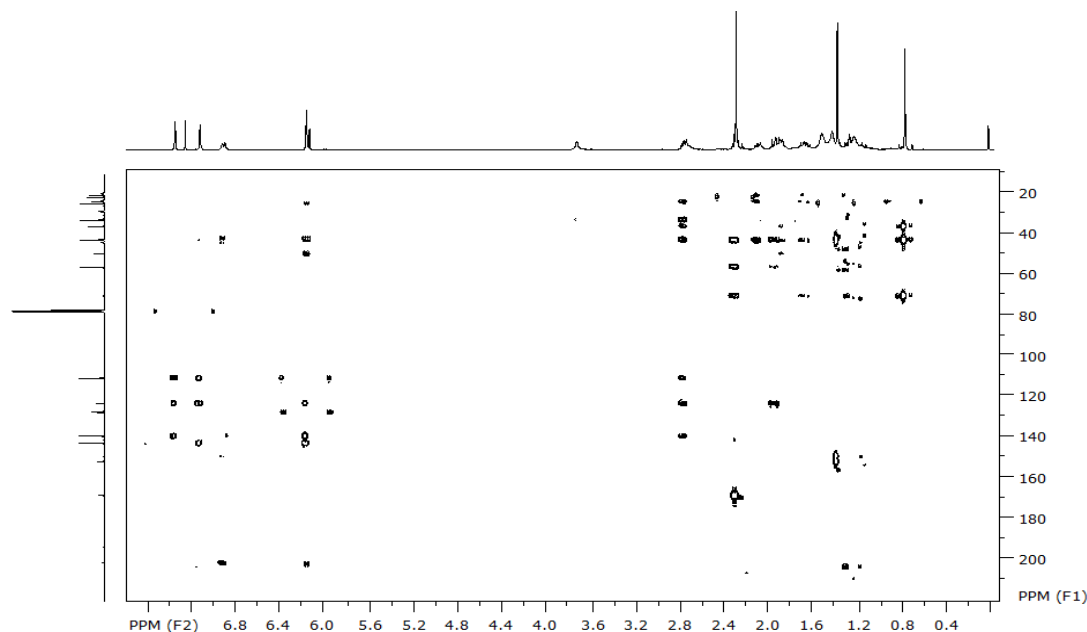


FIGURA 4.26- Mapa de contorno de HMBC do acetato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

Para confirmação do resultado, a amostra e o material de partida foram injetados em um cromatógrafo à gás, nas mesmas condições. Observa-se a diferença no tempo de retenção das amostras (FIGURA 4.27 e 4.28).

O espectro de massas (FIGURA 4.29) obtido do produto acetilado confirma a formação do produto acetato de cedrelona. A massa do material de partida obtida foi 422,03 e a do produto acetilado 464.

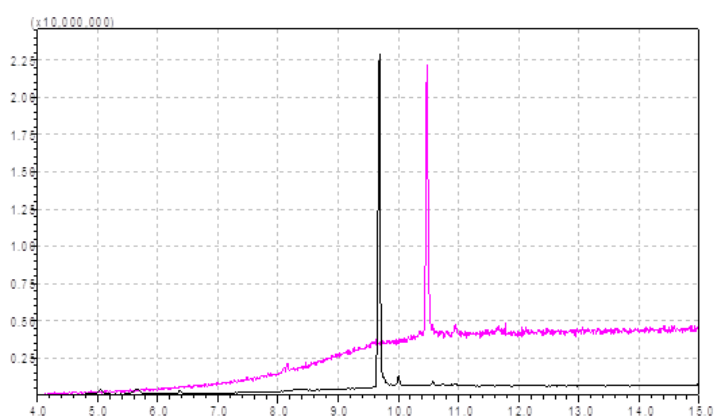


FIGURA 4.27- Sobreposição dos cromatogramas da cedrelona (preto) e do produto de acetilação (rosa) obtido no GC-MS. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 250 °C; tempo inicial de 2,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 320 °C, permanecendo nesta temperatura por 6,0 min. Temperatura do injetor 290 °C e temperatura da interface 320 °C.

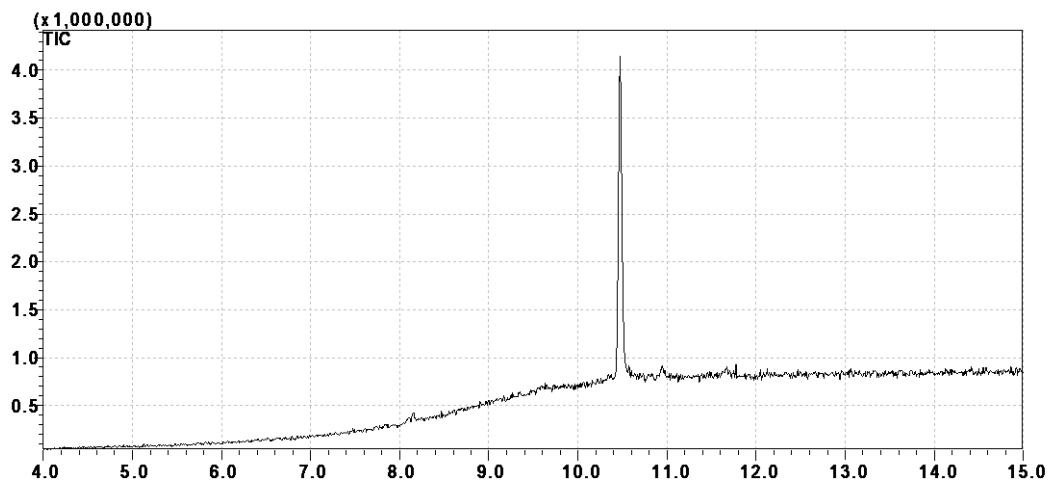


FIGURA 4.28 - Cromatograma do produto de acetilação obtido no GC-MS. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 250 °C; tempo inicial de 2,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10° C/min. até 320 °C, permanecendo nesta temperatura por 6,0 min. Temperatura do injetor 290 °C e temperatura da interface 320 °C.

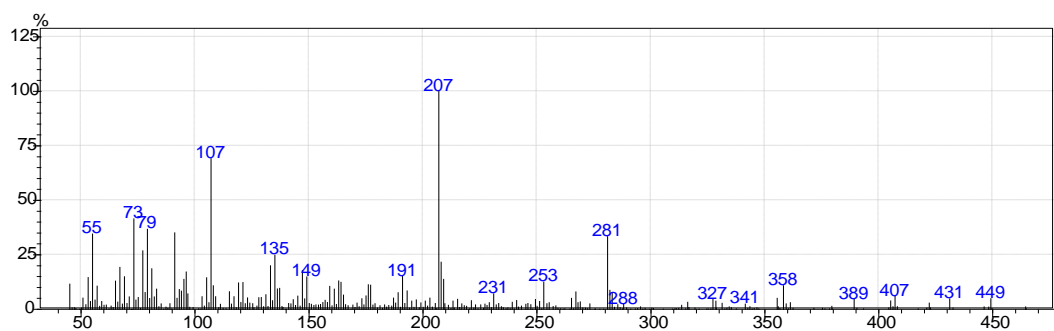


FIGURA 4.29 -Espectro de massas do acetato de cedrelona (IE = 70 e.V).

4.11.2.3 Produto de mesilação

O mesilato de cedrelona (FIGURA 4.30), sintetizada a partir do limonoide cedrelona, isolado do extrato hexânico de *Toona ciliata* teve a sua identificação realizada através de RMN ^1H e RMN ^{13}C , (FIGURAS 4.31 a 4.33) e experimentos bidimensionais.

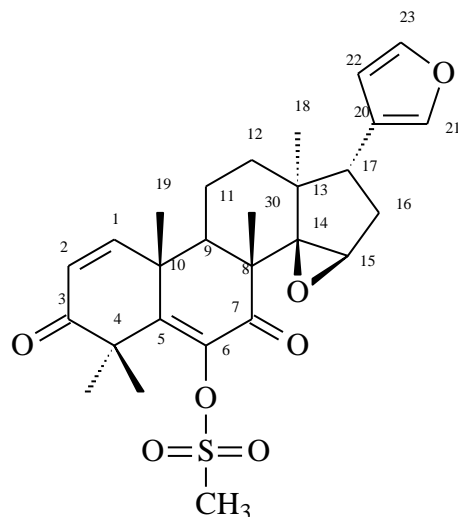


FIGURA 4.30 - Mesilato de cedrelona.

Os sinais em δ 7,35 (t, $J = 1,6$ Hz), δ 7,13 (m) e δ 6,17 (m) foram atribuídos aos hidrogênios H-23, H-21 e H-22 respectivamente, referentes ao anel furano. Os dubletos em δ 6,91 (d, $J = 9,9$ Hz) e δ 6,15 (d, $J = 9,9$ Hz) foram atribuídos aos H-1 e H-2, respectivamente. O singlete em δ 3,72 foi atribuído ao H-15 do grupo epóxido C-14/C-15. Uma das confirmações do sucesso da reação foi o desaparecimento do singlete em δ 6,46, referente à hidroxila do grupo diosfenol no C-6. Os cinco singletos em δ 0,76; 1,13; 1,31; 1,51 e 1,59, integrando para 3 hidrogênios cada um, foram atribuídos a cinco metilas (FIGURAS 4.31 a 4.34, TABELA 4.13).

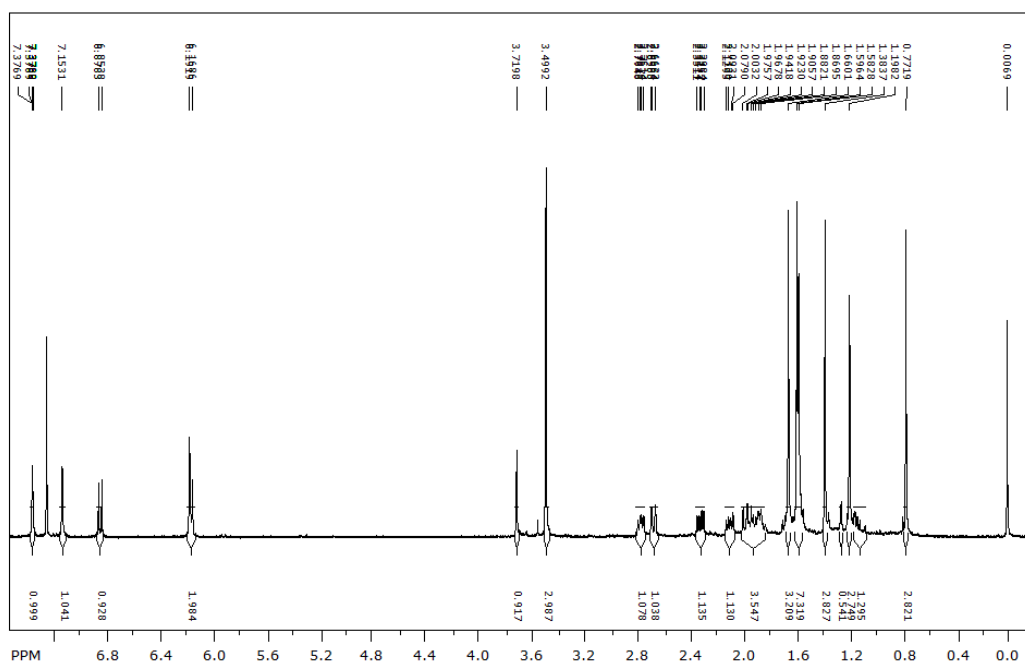


FIGURA 4.31 - Espectro de RMN ^1H do mesilato de cedrelona (400 MHz CDCl_3).

C-7. Os sinais em δ 69,8 e 55,1 foram atribuídos aos carbonos do epóxido C-14 e C-15, respectivamente.

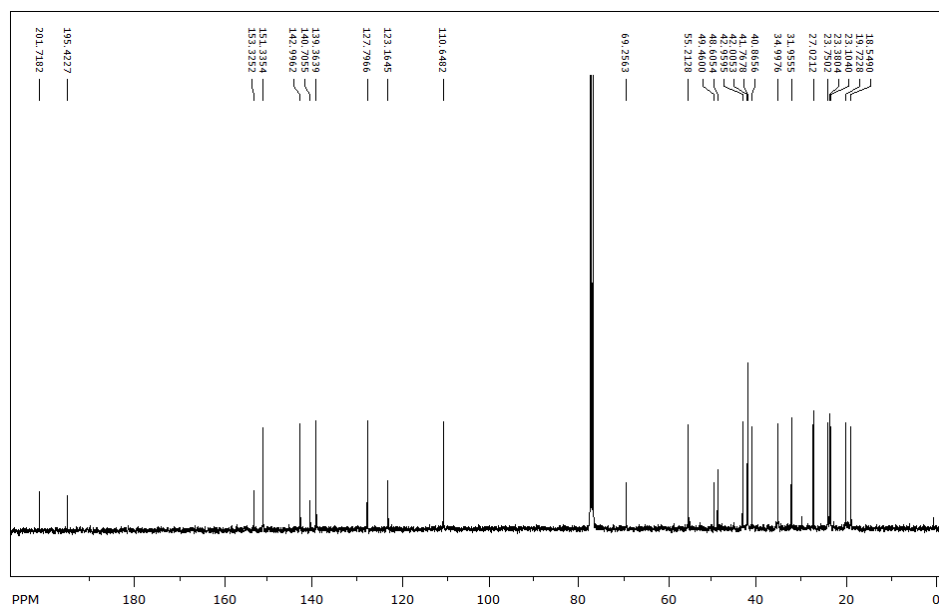


FIGURA 4.34- Espectro de RMN ^{13}C do mesilato de cedrelona (100 MHz, CDCl_3).

TABELA 4.13 - Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do mesilato de cedrelona em comparação com a cedrelona

H	Mesilato de cedrelona (CDCl_3 , 400 MHz)	Cedrelona (CDCl_3 , 400 MHz)	C	Cedrelona (CDCl_3 , 400 MHz)	Mesilato de cedrelona (CDCl_3 , 400 MHz)
1	6,86 (1H, d, $J = 9,9\text{Hz}$)	6,92 (1H, d, $J = 9,9\text{Hz}$)	1	152,3	151,3
2	6,17 (1H, d, $J = 9,9\text{Hz}$)	6,12 (1H, d, $J = 9,9\text{Hz}$)	2	127,2	127,8
3	-	-	3	203,6	201,7
4	-	-	4	48,5	48,6
5	-	-	5	133,8	139,3
6	-	-	6	197,9	195,4
7	-	-	7	46,8	
8	-	-	8	43,1	48,6
9	2,69 (2H, <i>dd</i>)	2,69 m	9	40,2	42,9
10	-	-	10	19,5	40,0

11	1,19 (2H,s)	1,89 (m)	11	35,1	18,5
12a	2,10 (m)	2,10 (m)	12	35,1	35,0
12b	1,67 (m)	-			35,0
13	-	-	13	42,0	42,0
14	-	-	14	69,8	69,2
15	3,71 (1H, s)	3,81 (1H, s)	15	55,1	55,2
16a	1,98 (m)	1,95 (dd)	16	31,9	31,9
16b	2,32 (m)	2,34 (dddd)		31,9	31,9
17	2,77 (2H; dd, J = 6,9 e11 Hz)	2,77 (2H; dd, J = 6,9 e11 Hz)	17	41,7	42,0
18	0,77 (3H, s)	0,76 (3H, s)	18	23,8	23,1
19	1,19 (3H, s)	1,13 (3H, s)	19	20,2	18,5
20	-	-	20	123,2	123,1
21	7,15 (1H, m)	7,16 (1H, m)	21	139,3	139,3
22	6,19 (1H, m)	6,19 (1H, m)	22	110,6	110,6
23	7,37 (1H, t, J = 1,6 Hz)	7,38 (1H, t, J = 1,6 Hz)	23	142,9	142,9
28	1,64 (3H, s)	1,51 (3H, s)	28	26,7	27,0
29	1,67(3H, s)	1,59 (3H, s)	29	21,2	23,3
30	1,38 (3H, s)	1,31 (3H, s)	30	23,0	23,7
<u>C</u> OS	-	-	<u>C</u> OS	141,1	
OO			OO		
<u>C</u> H ₃	3,49 (3H, s)	-	<u>C</u> H ₃	-	41,7

Os mapas de contorno HSQC e HMBC (FIGURAS 4.35 a 4.37) foram registrados e confirmam a proposta estrutural do mesilato de cedrelona.

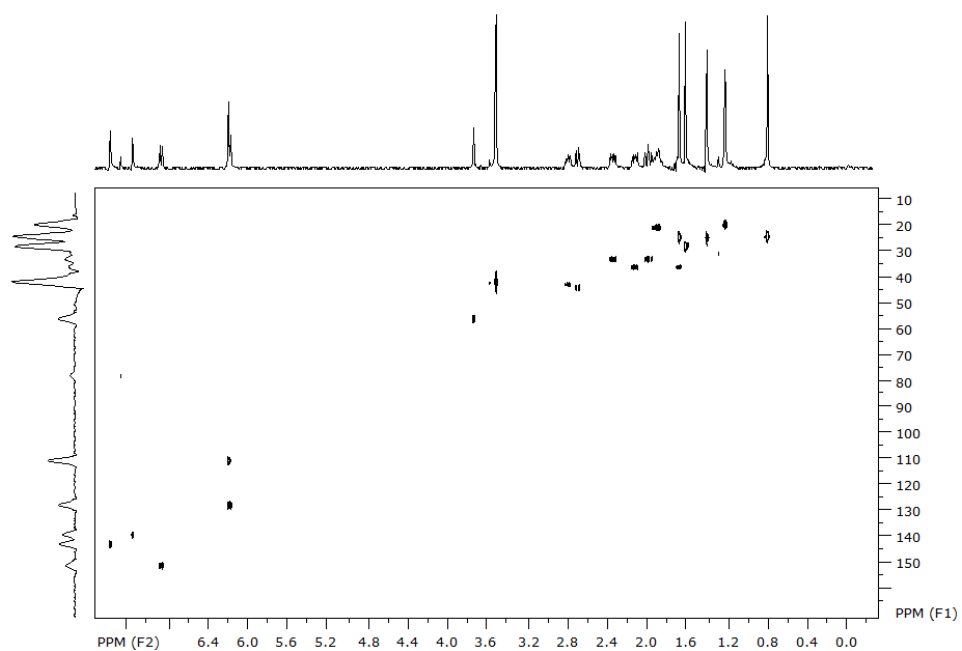


FIGURA 4.35 - Mapa de contorno de HSQC do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

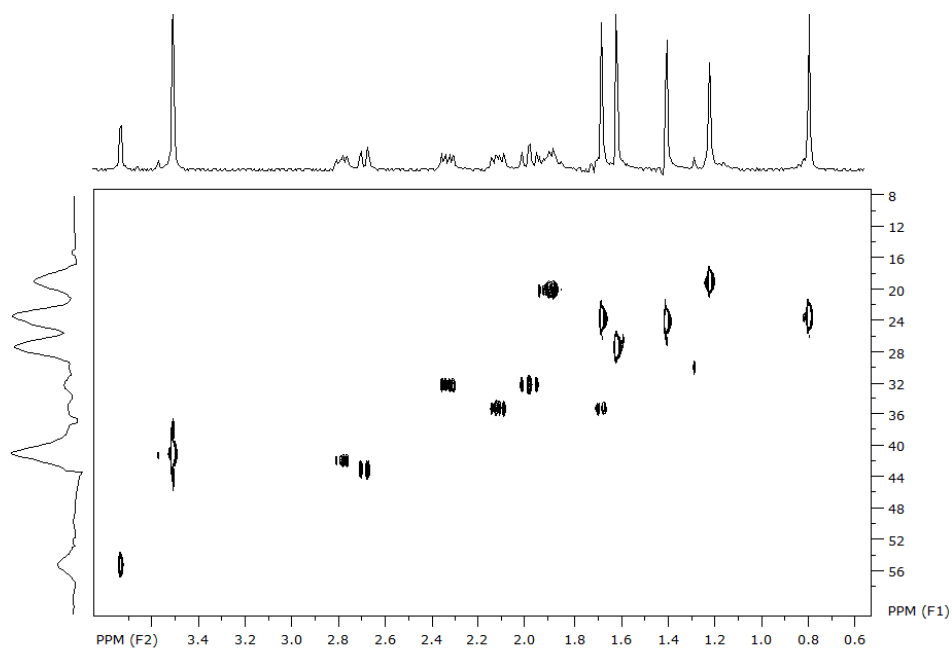


FIGURA 4.36 - Expansão do mapa de contorno de HSQC do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

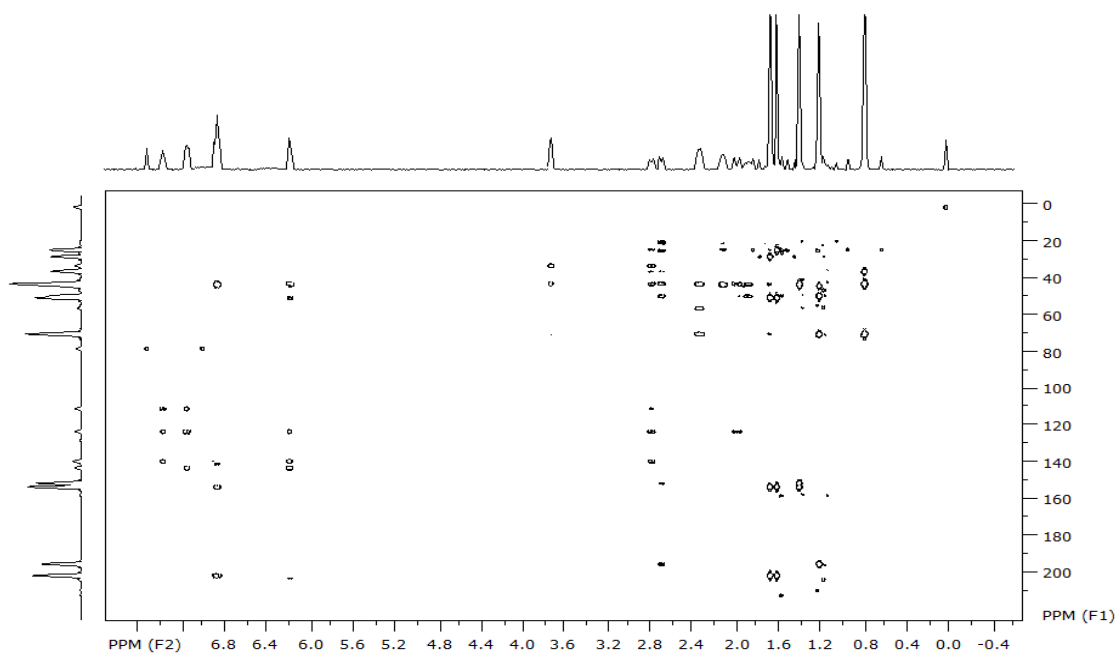


FIGURA 4.37 - Mapa de contorno de HMBC do mesilato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

Foi realizado também um experimento de inserção direta por massas. O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo positivo (FIGURA 4.38) do mesilato de cedrelona apresentou um pico em m/z 523,4 referente ao íon molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$, um aduto de sódio, concluindo a massa molecular do composto é 500,3.

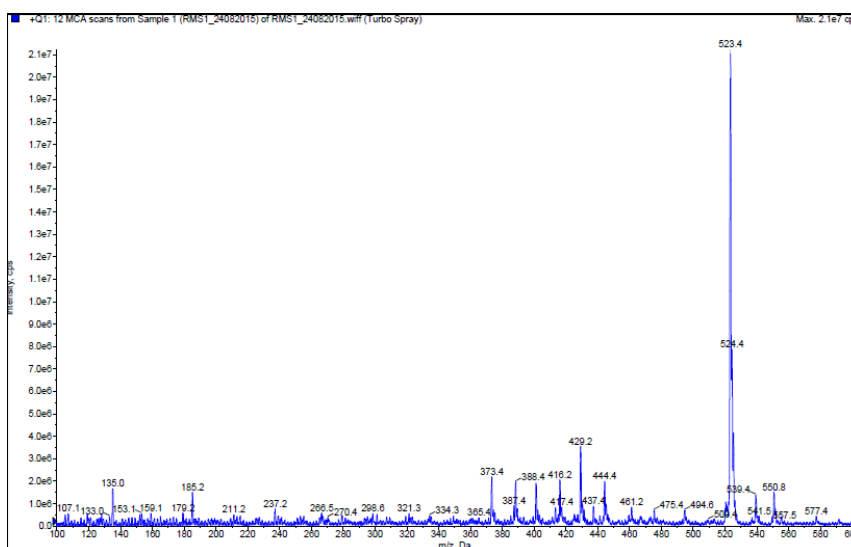


FIGURA 4.38 - Espectro de massas (ESI) modo positivo do $[\text{M}+\text{Na}]^+$ do mesilato de cedrelona.

4.11.2.4 Produto de esterificação com cloreto de propionila

O propionato de cedrelona (FIGURA 4.39), sintetizado a partir do limonoide cedrelona, isolado do extrato hexânico de *Toona ciliata* teve a sua identificação realizada através de RMN¹H e RMN¹³C e experimentos bidimensionais.

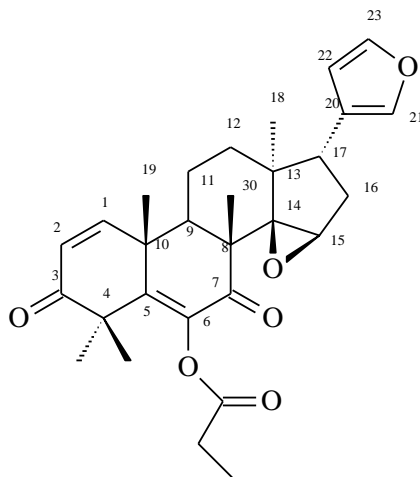


FIGURA 4.39 - Substância sintetizada - propionato de cedrelona.

Os sinais em δ 7,35 (t, $J = 1,6$ Hz), δ 7,13 (m) e δ 6,17 (m) foram atribuídos aos hidrogênios H-23, H-21 e H-22 respectivamente, referentes ao anel furano. Os dubletos em δ 6,91 (d, $J = 9,9$ Hz) e δ 6,15 (d, $J = 9,9$ Hz) foram atribuídos aos H-1 e H-2, respectivamente. O singlete em δ 3,72 foi atribuído ao H-15 do grupo epóxido C-14/C-15. Uma das confirmações do sucesso da reação foi o desaparecimento do singlete em δ 6,46, referente à hidroxila do grupo diosfenol no C-6. Os cinco singletos em δ 0,76; 1,13; 1,31; 1,51 e 1,59, integrando para 3 hidrogênios cada um, foram atribuídos a cinco metilas (FIGURAS 4.40 a 4.42, Tabela 4.14).

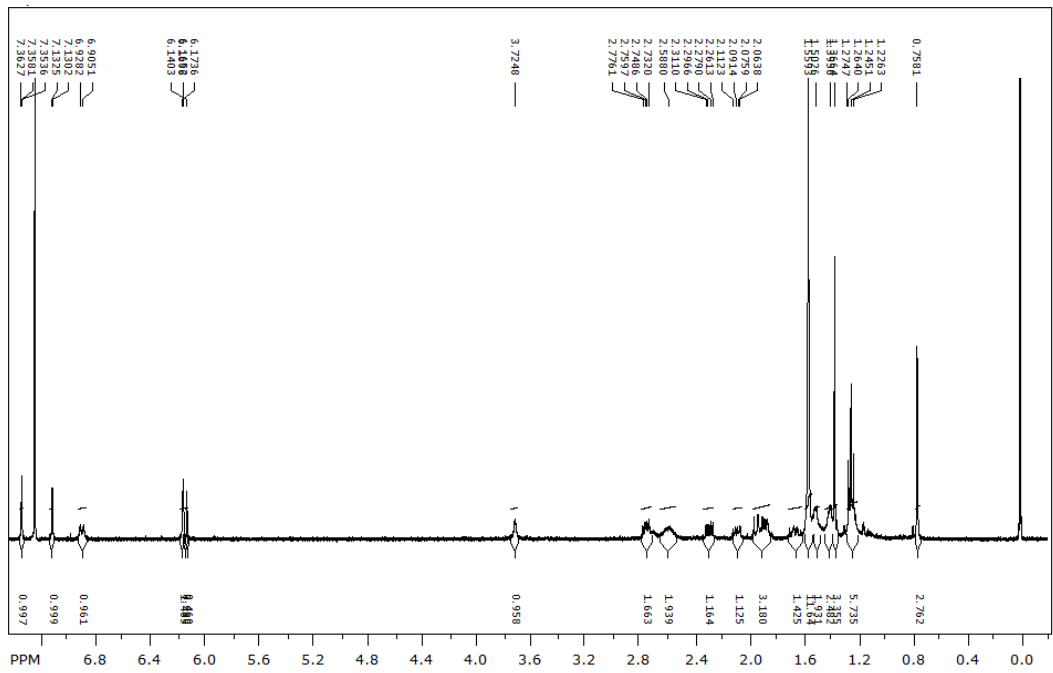


FIGURA 4.40 - Espectro de RMN ¹H do propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl₃).

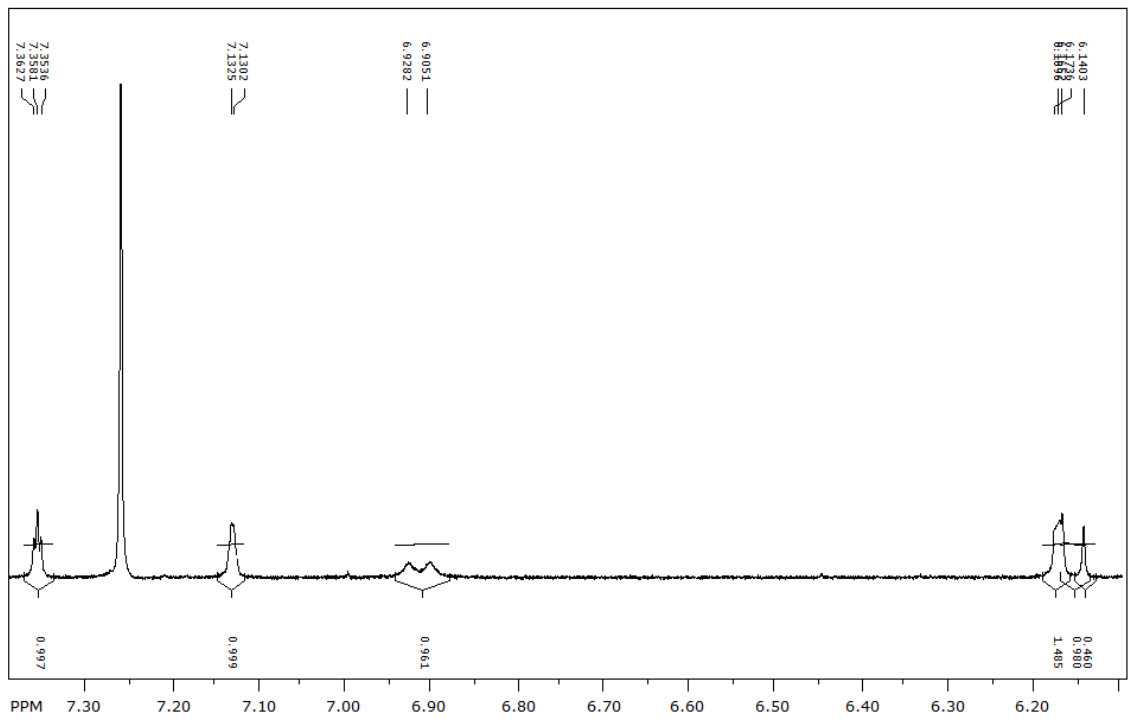


FIGURA 4.41 - Expansão do espectro de RMN ¹H do propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl₃).

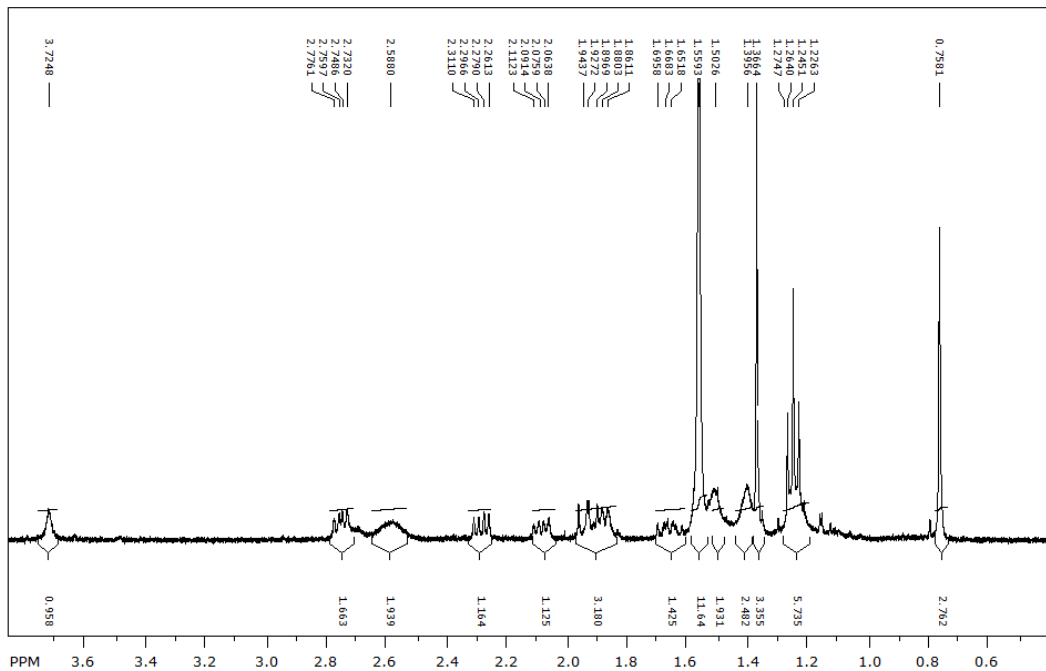


FIGURA 4.42 - Expansão do espectro de RMN ¹H do propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl₃).

A análise do espectro de RMN ¹³C (FIGURA 4.43 e TABELA 4.14) mostra a presença de 29 átomos de carbono. Os carbonos carbonílicos foram caracterizados pelos sinais em δ 203,6 atribuído ao C-3 e δ 197,9 característico de grupamento diosfenol, atribuído ao C-7. Os sinais em δ 69,8 e 55,1 foram atribuídos aos carbonos do epóxido C-14 e C-15, respectivamente.

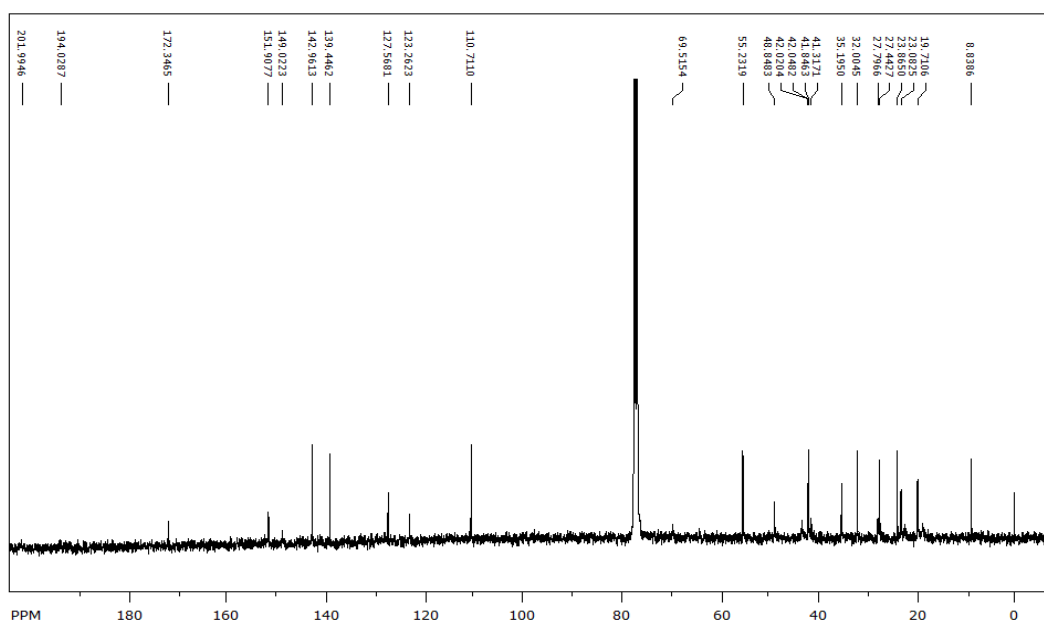


FIGURA 4.43- Espectro de RMN ¹³C do propionato de cedrelona (100 MHz, CDCl₃).

TABELA 4.14 Dados de RMN ¹H e RMN ¹³C do propionato de cedrelona em comparação com a cedrelona

H	Propionato de cedrelona (CDCl ₃ , 400 MHz)	Cedrelona (CDCl ₃ , 400 MHz)	C	Cedrelona (CDCl ₃ , 100 MHz)	Propionato de cedrelona (CDCl ₃ , 100 MHz)
1	6,91 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9Hz)	6,92 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9Hz)	1	152,3	151,9
2	6,15 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9Hz)	6,12 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9,9Hz)	2	127,2	127,7
3	-	-	3	203,6	201,9
4	-	-	4	48,5	48,8
5	-	-	5	133,8	127,5
6	-	-	6	141,1	142,9
7	-	-	7	197,9	194,1
8	-	-	8	46,8	42,1
9	2,75 (2H, <i>dd</i>)	2,69 (2H, <i>dd</i>)	9	43,1	41,8
10	-	-	10	40,2	41,3
11	1,90 (<i>m</i>)	1,89 (<i>m</i>)	11	19,5	19,7
12a	2,08 (<i>m</i>)	2,10 (<i>m</i>)	12	35,1	35,1
12b	1,65 (<i>m</i>)	-			
13	-	-	13	42,0	42,0
14	-	-	14	69,8	69,5
15	3,72 (1H, <i>s</i>)	3,81 (1H, <i>s</i>)	15	55,1	55,2
16a	1,95 (<i>m</i>)	1,95 (<i>dd</i>)	16	31,9	32,0
16b	2,28 (<i>m</i>)	2,34 (<i>dddd</i>)			
17	2,75 (<i>m</i>)	2,77 (2H; <i>dd</i> , <i>J</i> = 6,9 e 11 Hz)	17	41,7	41,8
18	0,77 (3H, <i>s</i>)	0,76 (3H, <i>s</i>)	18	23,8	22,6
19	1,36 (2H, <i>s</i>)	1,13 (3H, <i>s</i>)	19	20,2	23,1
20	-	-	20	123,2	123,2

21	7,13 (1H, <i>m</i>)	7,16 (1H, <i>m</i>)	21	139,3	139,4
22	6,17 (1H, <i>m</i>)	6,19 (1H, <i>m</i>)	22	110,6	110,7
23	7,35 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 1,6 Hz)	7,38 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 1,6 Hz)	23	142,9	142,9
28	1,55 (3H, <i>s</i>)	1,51 (3H, <i>s</i>)	28	26,7	27,7
29	1,55 (3H, <i>s</i>)	1,59 (3H, <i>s</i>)	29	21,2	23,1
30	1,55 (3H, <i>s</i>)	1,31 (3H, <i>s</i>)	30	23,0	23,7
<u>OCO</u>	-	-	<u>OCO</u>	-	172,3
2'	1,88 (2H, <i>m</i>)	-	2'	-	19,7
3'	1,25(3H, <i>t</i>)	-	3'	-	9,1

Os mapas de contorno HSQC e HMBC (FIGURAS 4.44 e 4.45), foram registrados e confirmam a proposta estrutural do propionato de cedrelona.

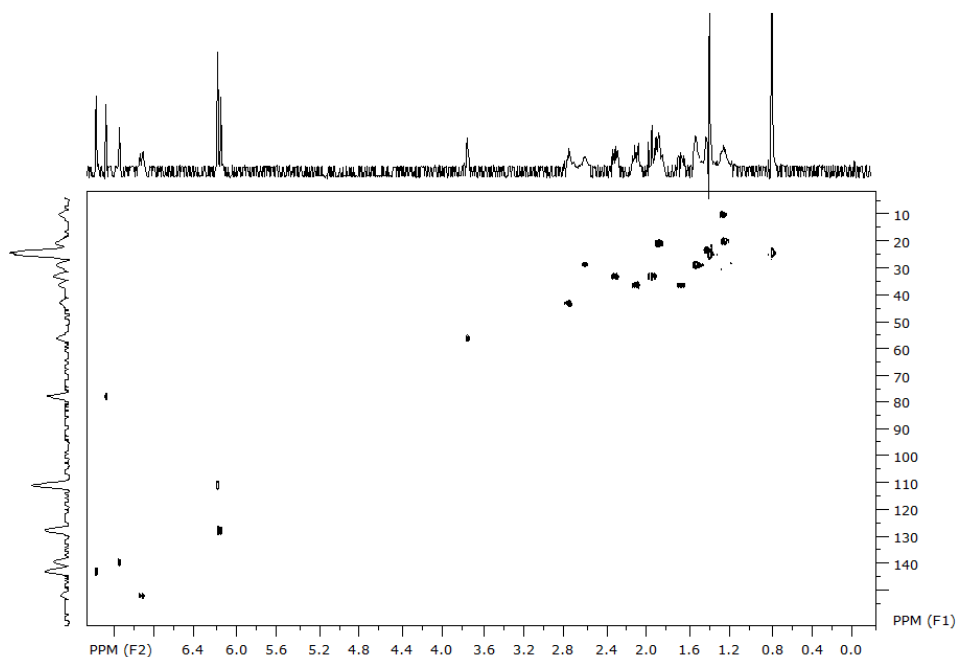


FIGURA 4.44 - Mapa de contorno de HSQC do Propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl_3).

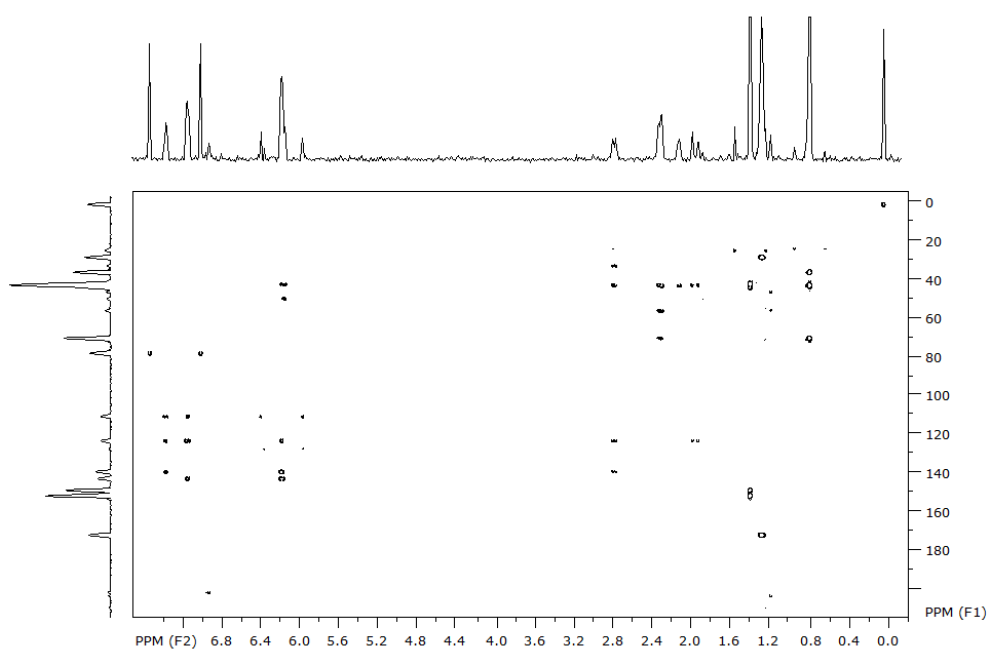


FIGURA 4.45 - Mapa de contorno de HMBC do Propionato de cedrelona (400 MHz, CDCl₃).

O produto da reação para formação de propionato de cedrelona foi analisado por CG/EM (FIGURAS 4.46 e 4.47).

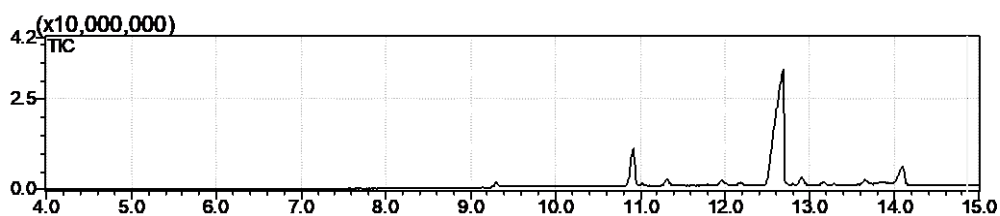


FIGURA 4.46- Cromatograma do produto da reação com cloreto de propionila obtido no GC-MS. Condições: Gás de arraste: Hélio; temperatura inicial de 250 °C; tempo inicial de 2,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 10 °C/min até 320 °C, permanecendo nesta temperatura por 6,0 min. Temperatura do injetor 290 °C e temperatura da interface 320 °C.

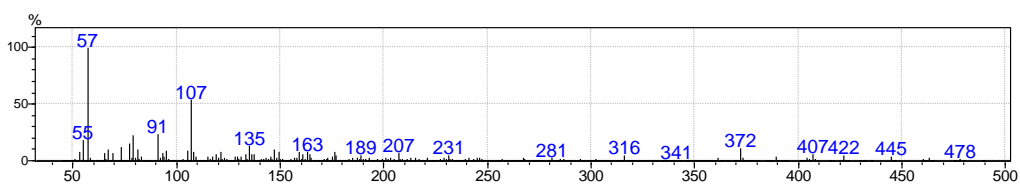


FIGURA 4.47- Espectro de massas do propionato de cedrelona (IE = 70 e.V).

Foi realizado também um experimento de inserção direta por massas. O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo positivo (FIGURA 4.48) do propionato que apresentou um pico em m/z 501,3 referente ao íon molecular $[M+Na]^+$ (aduto de sódio), indicando a massa molecular do composto 478,3.

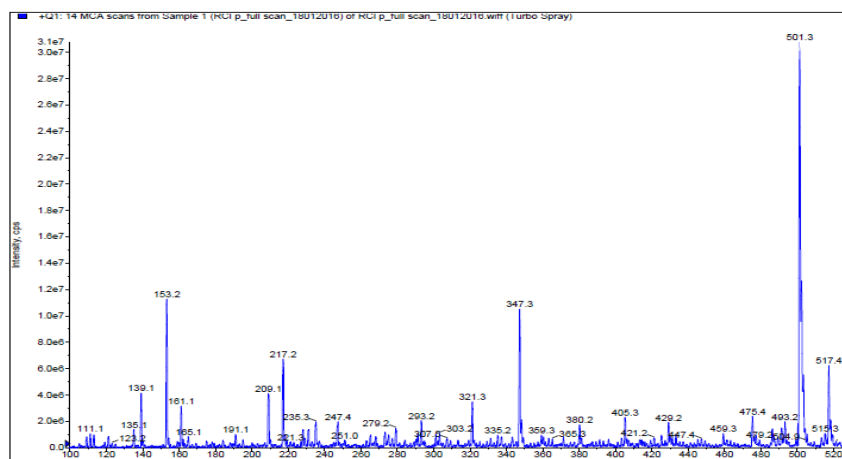


FIGURA 4.48 - Espectro de massas (ESI) modo positivo da $[M+Na]^+$ do propionato de cedrelona.

4.12 Ensaios Biológicos dos produtos sintetizados

4.12.1 Acetato de cedrelona

O acetato de cedrelona foi ensaiado frente às operárias *A. sexdens rubropilosa* e frente ao fungo simbionte *L. gongylophorus*. Os resultados estão na TABELA 4.15 e FIGURA 4.49 e 4.50.

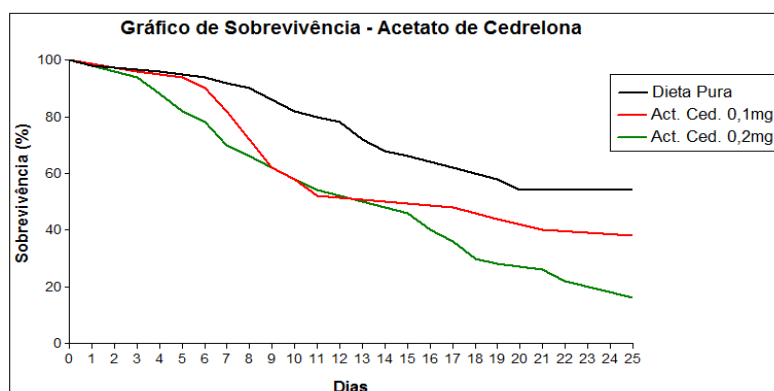


FIGURA 4.49- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto acetato de cedrelona.

TABELA 4.15 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto acetato de cedrelona

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	6	10	18	32	38	46	46	>25a
Act. de cedrelona 0,1 mg	0	0	4	10	28	42	50	52	60	62	15,5b
Act. de cedrelona 0,2 mg	0	0	6	22	34	42	48	64	74	84	15a

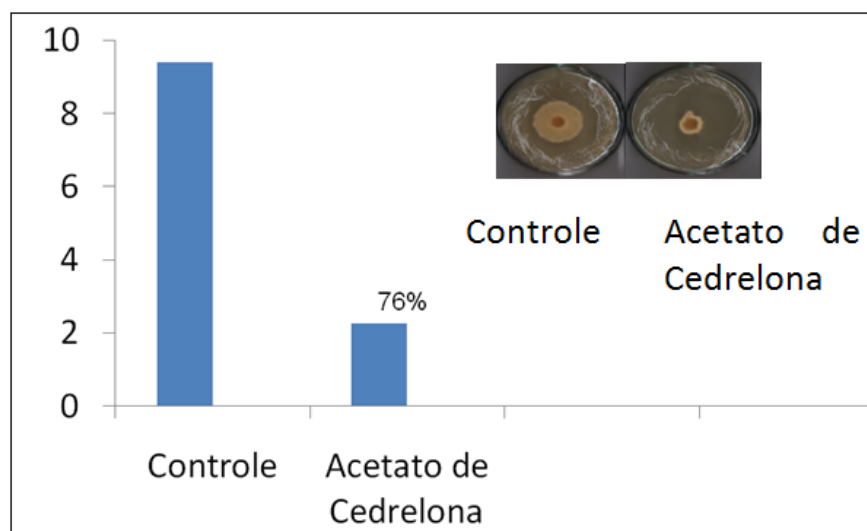


FIGURA 4.50 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* após 30 dias do experimento.

De acordo com a sobrevivência mediana (Md) de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à bioensaios e diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle dieta pura = 25 dias) foram observadas para ambas as concentrações, sendo a Md = 7 dias.

Houve um aumento significativo na atividade do acetato de cedrelona, quando comparado a cedrelona. O produto sintetizado apresentou mortalidade acumulada de 62% e 84% ao final do experimento na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL respectivamente.

Para o ensaio frente ao fungo *L. gongylophorus*, acetato de cerelona apresentou resultado significativo, com 76% de inibição no crescimento micelial na concentração de 100 µg/mL ao final do experimento (FIGURA 4.50).

4.12.2 Mesilato de cedrelona

O mesilato de cedrelona foi ensaiado frente às operárias *A. sexdens rubropilosa* e frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus*. Os resultados são apresentados na FIGURA 4.51 e TABELA 4.16.

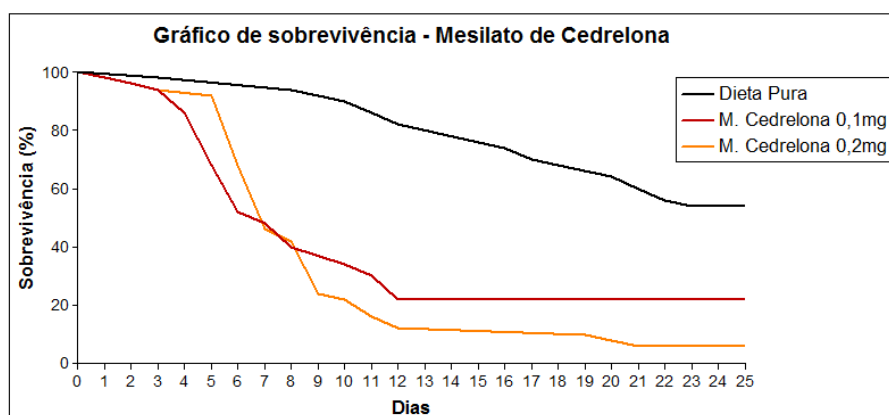


FIGURA 4.51 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto mesilato de cedrelona.

TABELA 4.16- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto mesilato de cedrelona

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	2	2	6	10	18	30	44	46	>25a
Mesilato de cedrelona 0,1 mg	2	4	6	48	60	66	78	78	78	78	7,0b
Mesilato de cedrelona 0,2 mg	2	4	6	32	58	78	88	88	94	94	7,0b

De acordo com a sobrevivência mediana (Md) de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à bioensaios, diferenças significativas de acordo com a estatística "log

rank" teste ($p < 0,05$, Md-controlê dieta pura = 19 dias) foram observadas para ambas as concentrações, sendo a Md = 7 dias.

Houve um aumento significativo na atividade do mesilato de cedrelona, quando comparado a cedrelona. O produto sintetizado apresentou mortalidade acumulada de 78% e 94% ao final do experimento na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL respectivamente.

Para o ensaio frente ao fungo *L. gongylophorus*, mesilato de cerelona não apresentou resultado significativo, com apenas 8% de inibição no crescimento micelial na FIGURA 4.52.

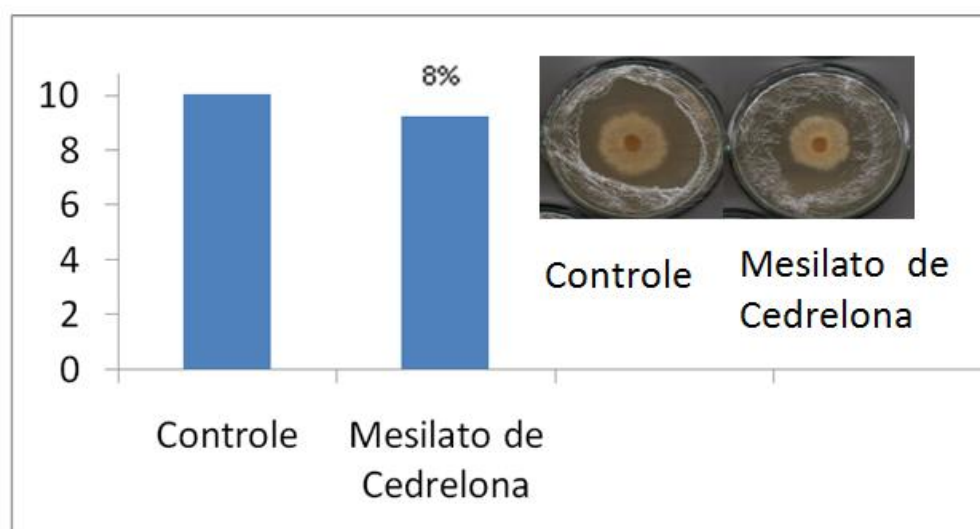


FIGURA 4.52 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* após 30 dias do experimento.

4.12.3 Propionato de cedrelona

O propionato de cedrelona (Rclp) foi ensaiado frente às operárias *A. sexdens rubropilosa* e frente ao fungo simbionte *L. gongylophorus*. Os resultados são apresentados nas FIGURAS 4.53 e 4.54 e TABELA 4.17 e 4.18.

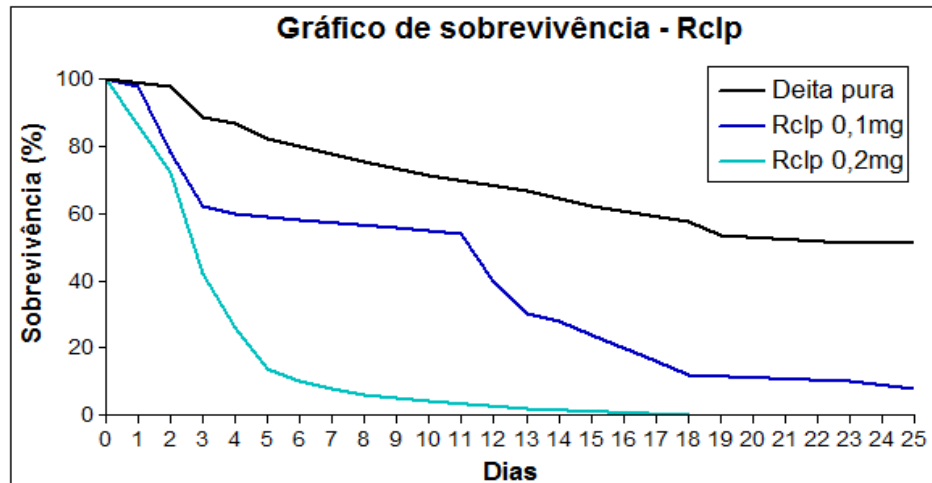


FIGURA 4.53-Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o propionato de cedrelona.

TABELA 4.17- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o propionato de cedrelona

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	12	20	28	32	36	40	44	52	54	19 ^a
Propionato de cedrelona - 0,1 mg	2	22	38	42	42	44	72	84	88	92	12 ^b
Propionato de cedrelona - 0,2 mg	0	28	58	90	94	96	98	98	100	100	3,0 ^b

Observa-se um aumento significativo na atividade do propionato de cedrelona quando comparado a cedrelona. O produto sintetizado apresentou mortalidade acumulada de 92% e 100% ao final do experimento na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.

De acordo com a sobrevivência mediana (Md) de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à bioensaios, diferenças significativas de acordo com a estatística "log rank" teste ($p < 0,05$, Md-controle dieta pura = 19 dias) foram observadas para ambas as concentrações, sendo a Md = 12 para 0,1 mg/mL e Md = 3 dias para 0,2 mg/mL.

O propionato de cerelona apresentou resultado significativo, com 60% de inibição no crescimento micelial na concentração de 100 µg/mL ao final do experimento com *Leucoagaricus gongylophorus* (TABELA 4.18 e FIGURA 4.54).

TABELA 4.18 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento

Réplicas		
Ensaio	Propionato de cedrelona	*Controle
1	4,90625	11,5753
2	5,225274	12,18603
3	4,5216	11,8177
4	4,828064	12,43471
5	4,5216	-
Média	4,8006	12,0034
SD	0,2949	0,3817242
RSD	6,14376171	3,18012455
Inibição	60 %	-

*Controles, Acetona: 500 µL

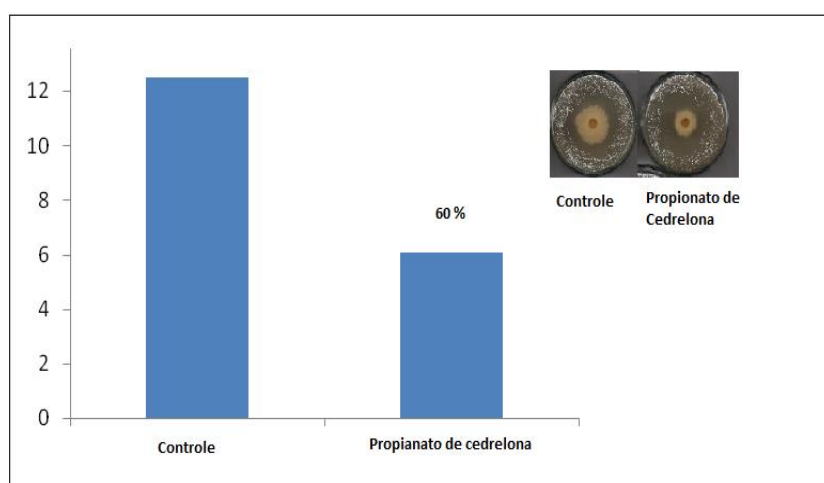


FIGURA 4.54 - Gráfico das médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* de propionato de cedrelona comparada ao controle.

4.13 Processos de Nanoencapsulamento

4. 13.1 Análise cromatográfica da cedrelona

Observa-se na FIGURA 4.55 o cromatograma obtido por CLAE em gradiente exploratório da amostra de cedrelona, na busca de melhores condições cromatográficas para a mesma.

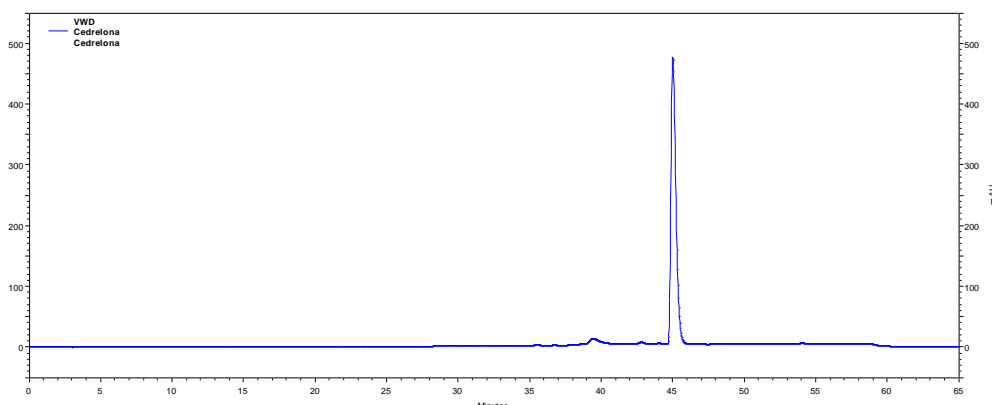


FIGURA 4.55- Cromatograma de cedrelona. Análise por CLAE método gradiente exploratório da amostra de cedrelona a ser encapsulada nas condições: Coluna C18 Phenomenex Luna 10 μm ($\varnothing = 0,46$ cm, h = 25 cm), eluição gradiente MeOH:H₂O 10-90%, fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm.

Após diversos experimentos para ajustar o método utilizado no CLAE, na busca da melhor seletividade, sensibilidade e tempo de análise, as melhores condições encontradas foram: C18 Gemini Phenomenex 5 μm (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH: H₂O 85:15, fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 278$ nm, observadas no cromatograma da FIGURA 4.56.

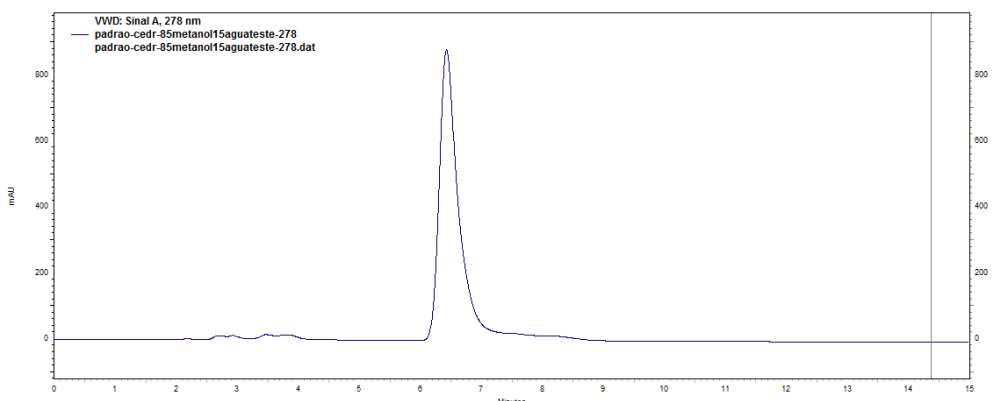


FIGURA 4.56- Cromatograma de cedrelona. Análise por CLAE método isocrático da amostra de cedrelona a ser encapsulada nas condições: C18 Gemini Phenomenex 5 μm (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH:H₂O 85:15, fluxo 1,0 mL/min, $\lambda = 278$ nm.

4.13.2 Validação do método analítico para quantificação da cedrelona por CLAE

A curva analítica para cedrelona obtida em função das áreas das bandas cromatográficas, abrangendo a faixa 1-100 µg/mL foi linear.

A regressão linear obtida pela área em função da concentração está representada na FIGURA 4.57.

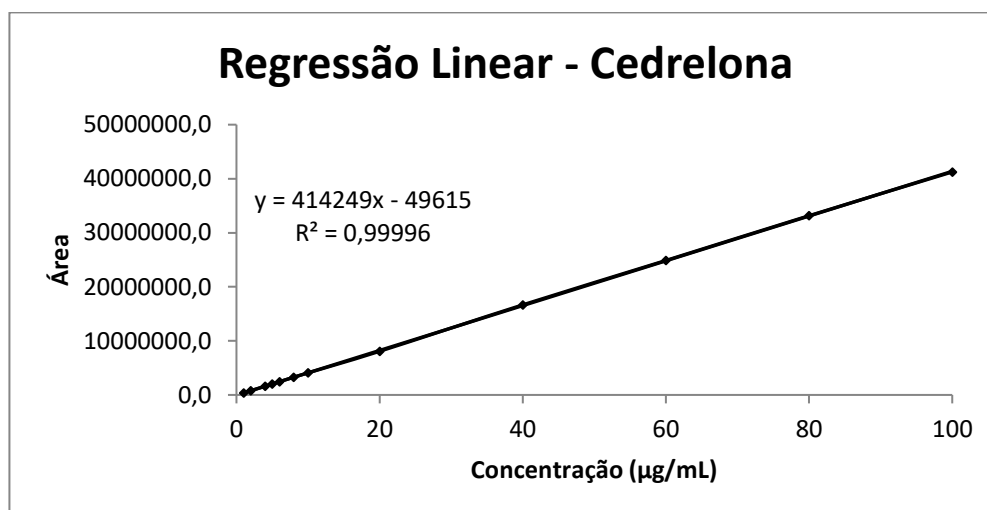


FIGURA 4.57 - Curva de calibração para análise de cedrelona. As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Agilent 1260, nas condições: C18 Gemini Phenomenex 5 µm (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH:H₂O 85:15, fluxo 1,0 mL/min, λ = 278 nm.

O gráfico acima mostra que os resultados são diretamente proporcionais, o que tornou possível a correlação entre a concentração de cedrelona nas amostras padrão com a área dos picos nos cromatogramas, e é descrita pela equação da reta $y = 414249x - 49615$, onde y é a área da banda cromatográfica e x é a concentração da cedrelona na solução em µg/mL com coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,99996$.

A TABELA 4.19 mostra os dados para a análise de variância de fator único (ANOVA) para o modelo de regressão linear, que confirma a linearidade do modelo a um nível de confiança de 95%. A significância estatística foi estabelecida no valor de $P < 0,05$, o que indica que o modelo é explicado pela regressão proposto num intervalo de confiança de 95%.

O p-valor para a inclinação da curva menor que 0,05 confirma estatisticamente que para cada conjunto de valores de Y (absorbância) existe um valor de X

(concentração) correspondente enquanto o p-valor do intercepto maior que 0,05 confirma a hipótese nula onde o intercepto não é estatisticamente diferente de zero.

TABELA 4.19- Análise de variância de fator único (ANOVA) para o modelo de regressão linear

ANOVA						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>	
Regressão	1	6,61x10 ¹⁵	6,61x10 ¹⁵	875641,4	1,41x10 ⁻⁷⁶	
Resíduo	34	2,57x10 ¹¹	7,55x10 ⁹			
Total	35	6,61x10 ¹⁵				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção (a)	-49614,7	19060,49	-2,603014	0,063596	-88350,322	-10879,16
Slope/inclinação (b)	414249,4	442,6891	934,757	1,41x10 ⁻⁷⁴	413349,8	415149,1

A exatidão do método indica a correlação entre os resultados obtidos e os aceitos como verdadeiros, enquanto a precisão é a capacidade do método de reproduzir o mesmo resultado para múltiplas análises de uma mesma amostra.

Para a determinação da exatidão e precisão do método foram preparadas soluções padrão em três níveis de concentrações diferentes, baixa, média e alta concentração (CQB, CQM e CQA, respectivamente). As soluções preparadas para as três concentrações foram 1,2, 50 e 95 µg/mL, que cobrem toda a faixa linear de trabalho, mas são diferentes dos valores usados na construção da curva de calibração.

As amostras foram preparadas em quintuplicata e analisadas em três dias não consecutivos (n=3) e assim calculadas a exatidão e a precisão inter e intra-dia para cada ponto. Os resultados encontram-se na TABELA 4.20.

O limite de detecção foi calculado de acordo com a relação sinal/ruído, sendo 10 e 3 vezes e para o LQ e o LD foram estabelecidos em 0,8 e 0,26, respectivamente. O LQ encontrado foi menor que o primeiro ponto da curva de calibração (<1,0 µg/mL) provando ser a curva linear, exata e precisa na faixa de trabalho.

Para o estudo de reprodutibilidade do injetor, foram obtidos 99,9% de exatidão e 0,17 de precisão enquanto esses mesmos parâmetros para estudo de estabilidade do injetor foram de 99,9% e 0,0007, respectivamente.

TABELA 4.20- Análise de variância de fator único (ANOVA) para o modelo de regressão linear

Cedrelona (µg/mL)	Dia	Repetições	Exatidão (%)	Precisão [DPR (%)]
Variação Intra Dia				
1,2	1	5	102,5	0,50
50	1	5	100,0	0,16
95	1	5	100,2	0,07
1,2	2	5	101,5	0,18
50	2	5	100,2	0,14
95	2	5	100,1	0,09
1,2	3	5	101,1	0,18
50	3	5	100,0	0,09
95	3	5	100,0	0,14
Variação Inter Dia				
1,2	-	15	101,7	0,74
50	-	15	100,1	0,14
95	-	15	100,1	0,12

4.13.3 Incorporação da cedrelona pelo método de nanoprecipitação

As incorporações foram preparadas pela técnica de nano precipitação conforme descrita anteriormente. Preparou-se várias formulações alterando quantidade de polímero, quantidade de amostra e a presença ou ausência do oleato de isodecila (TABELA 4.21). Para formação das nanopartículas, o solvente orgânico e parte da fase aquosa foram removidos sob pressão reduzida ajustando o volume final da dispersão coloidal em 50 mL (FIGURA 4.58).

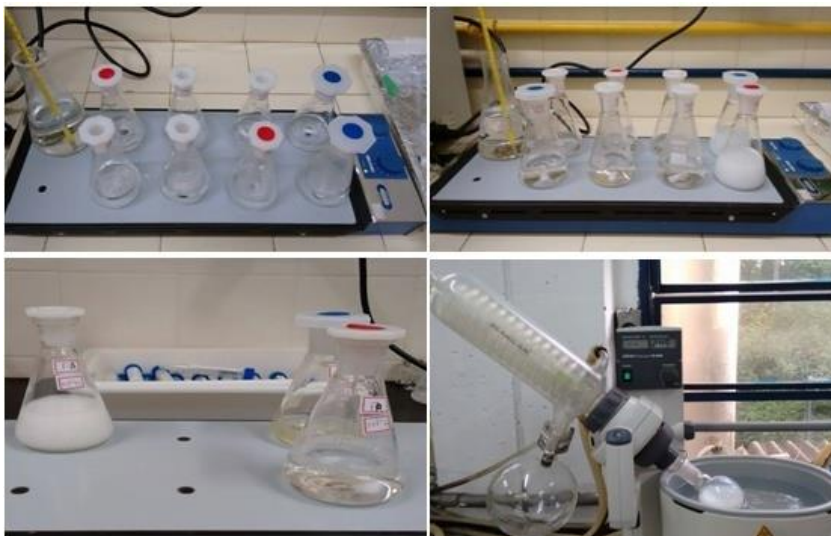


FIGURA 4.58- Preparação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.

TABELA 4.21- Dados para o preparo das formulações.

Ensaio/ amostras	Quantidade de cedrelona (μg)	PCL (mg)	Óleo** (mg)
NP1	506,0	100,0	Ø
NP2	500,0	200,2	Ø
NP3	502,0	100,3	310,1
NP4	1000,0	100,3	Ø
NP5	502,0	200,1	310,1
NP6	1002,0	200,1	Ø
NP7	1002,0	100,0	310,0
NP8	1000,0	200,1	310,0
NP9^a	750,0	150,1	155,3
NP10^a	750,0	150,2	155,1
NP11^a	750,0	150,2	155,3
NP12^b	502,0	100,1	Ø
NP13^b	504,0	200,3	310,1
NP14^b	1002,0	200,3	Ø

Após a obtenção do método analítico, as suspensões coloidais foram preparadas conforme método descrito anteriormente e analisadas via CLAE. A

TABELA 4.22 representa os resultados da eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 14 ensaios de nanopartículas cedrelona.

TABELA 4.22- Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 14 ensaios de nanopartículas de cedrelona

Ensaio/ amostras	Concentração* µg/mL	PCL (mg)	Óleo** (mg)	EE (%)	pH	DP (nm)	PZ (mV)	Recup. (%)
NP1	506,0	100,0	∅	95,5	5,10	200,0	-35,7	99,6
NP2	500,0	200,2	∅	97,8	5,50	221,8	-38,0	100,5
NP3	502,0	100,3	310,1	95,8	4,87	295,3	-39,9	85,3
NP4	1000,0	100,3	∅	82,2	5,15	195,6	-37,1	64,4
NP5	502,0	200,1	310,1	96,8	4,80	174,5	-42,0	99,9
NP6	1002,0	200,1	∅	97,7	5,05	212,4	-39,1	61,7
NP7	1002,0	100,0	310,0	99,3	4,87	287,7	-40,5	99,9
NP8	1000,0	200,1	310,0	99,2	4,89	321,5	-40,0	98,6
NP9 ^a	750,0	150,1	155,3	95,1	4,82	272,9	-40,3	82,2
NP10 ^a	750,0	150,2	155,1	99,1	4,92	251,4	-40,9	95,0
NP11 ^a	750,0	150,2	155,3	95,5	5,08	322,4	-36,9	93,1
NP12 ^b	502,0	100,1	∅	97,8	4,94	196,0	-37,1	93,5
NP13 ^b	504,0	200,3	310,1	95,5	4,80	325,1	-40,9	99,0
NP14 ^b	1002,0	200,3	∅	99,0	4,87	227,2	-36,6	92,6

NP = nanopartículas

*Concentração de µg de cedrelona por mL de suspensão coloidal

** Ausência de óleo (∅)correponde as NS (nanoesferas)

^aValores centrados na média

^b Repetições

Observa-se na TABELA 4.22, que as nanopartículas NP9, NP10, NP11 são as centradas na média, já as NP12, NP13 e NP14 são repetições aleatórias, referentes respectivamente as NP1, NP5 e NP6. A NP6 apresentou uma taxa de recuperação de 61,7%, e sua repetição NP14 apresentou uma taxa de 92,6%, o que remete a erros associados ao preparo das nanopartículas e não método de nanoprecipitação. Provavelmente, houve perda de material no preparo das suspensões coloidais da NP6.

O resultado da EE% observa-se o menor valor de 82,2 bem próximo de 99,3% (TABELA 4.22). A média da Rec% foi de 96,8%, confirmando assim a quantificação da cedrelona, ou seja, o composto na formulação.

O diâmetro médio das partículas nas formulações apresentou-se na faixa de 195,6 a 347,1 nm (TABELA 4.22). Para as NS (que não apresentam óleo em sua composição) observam-se valores menores das partículas que variam de 200 a 196 nm. Já as NC (com óleo em sua composição) observam-se valores mais altos variando de 325,1 a 347,2 nm (FIGURA 4.59), estes valores estão condizentes com a literatura (CAZAL, 2010).

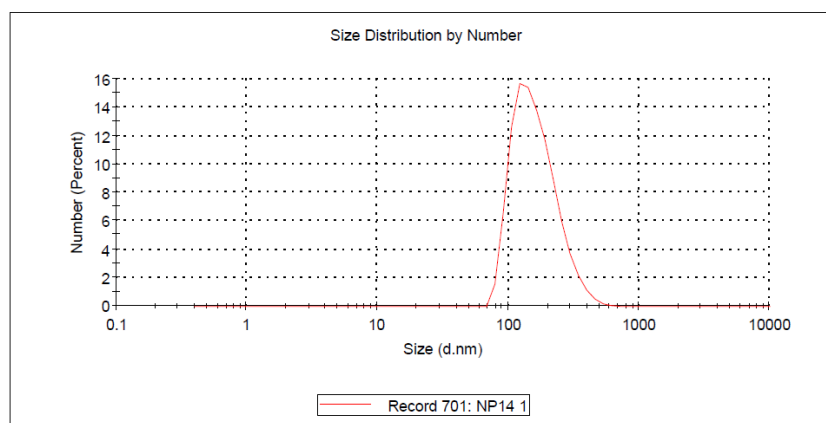


FIGURA 4.59 - Distribuição de tamanho pela intensidade das partículas das 14 formulações.

Os PZ (potencial zeta) das nanopartículas variaram de -35,7 a -40,9. Este experimento é utilizado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais. Os valores elevados do PZ, podendo ser negativos ou positivos, identificam a estabilidade de uma suspensão, de modo que a repulsão entre partículas evita a agregação (Brookhaven Instruments, 2015).

As nanopartículas preparadas neste trabalho apresentam potencial Zeta negativo devido à presença de um polímero do tipo poliéster, PCL, na sua formulação.

Em geral, nanopartículas que apresentam valores de potencial zeta próximos a ± 30 mV possuem boa estabilidade coloidal em solução (MELO *et al.*, 2010) (FIGURA 4.60). Os valores negativos para o PCL são justificados pela presença

de grupos carboxila dos terminais (MÜLLER *et al.*, 2001 e MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

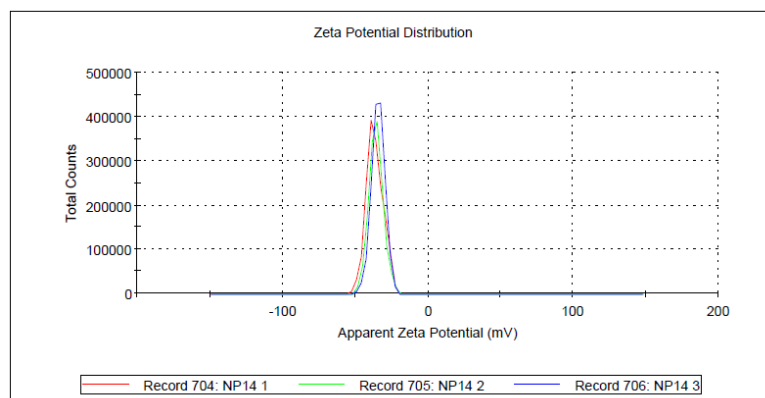


FIGURA 4.60 - Distribuição do potencial zeta calculado pela média dos deslocamentos de fases medidos durante as análises em triplicata.

4.13.4 Medidas de pH

Foram realizadas medições de pH, de 5 em 5 dias durante o primeiro mês, e posteriormente a cada quinze dias, durante três meses, a TABELA 4.23. mostra as variações observadas.

TABELA 4.23 - Medidas de pH das nanopartículas contendo cedrelona, medidas de 5 em 5 dias durante um mês

Nanopartículas	pH-dias							
	t0	t5	t10	t15	t20	t25	t30	tmédio
NP1	5,10	5,20	5,23	5,28	5,21	5,20	5,17	5,20
NP2	5,50	5,24	5,16	5,10	5,23	5,22	5,16	5,23
NP3	4,87	5,04	5,03	4,98	5,02	5,04	4,94	4,98
NP4	5,15	5,24	5,27	5,22	5,10	5,13	5,11	5,17
NP5	4,80	4,88	4,88	4,83	5,01	4,98	4,69	4,86
NP6	5,05	5,13	5,10	5,10	5,01	4,99	4,93	5,04
NP7	4,87	4,99	5,03	5,10	4,95	5,01	4,86	4,97
NP8	4,89	4,93	5,02	5,13	5,15	4,96	4,77	4,97
NP9 ^a	4,82	4,86	4,96	4,99	4,98	5,01	4,81	4,91
NP10 ^a	4,92	5,11	5,16	5,20	5,16	5,17	4,96	5,09
NP11 ^a	5,08	5,15	5,17	5,20	5,10	4,97	5,04	5,10
NP12 ^b	4,94	5,04	5,08	5,10	5,05	4,99	4,94	5,02
NP13 ^b	4,80	4,88	4,88	4,83	4,80	4,85	4,74	4,82
NP14 ^b	4,87	5,00	5,00	5,03	4,99	4,98	4,87	4,96

A medida do pH é um parâmetro importante na avaliação da estabilidade de sistemas coloidais, pois alterações de seus valores podem estar relacionados com a degradação do polímero, uma vez que, a relaxação das cadeias poliméricas de PCL poderia ocasionar uma exposição de um maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, assim como o pH levemente ácido poderia ocasionar a hidrólise do poliéster, o que alteraria o pH das suspensões (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2002; LOPES, *et al.*, 2000).

A variação do pH pode também estar relacionado a degradação de algum outro componente da formulação ou até mesmo com a difusão do princípio ativo das nanopartículas para o meio aquoso (CAZO *et al.*, 2012). Os valores de pH variaram de 4,86 a 5,23 em média em todas as formulações (TABELA 4.24).

TABELA 4.24 - Medidas de pH das nanopartículas contendo cedrelona, medidas durante quatro meses

Nanopartículas	1	2	3	4
NP1	5,17	5,03	4,97	4,93
NP2	5,16	5,10	4,94	4,96
NP3	4,94	4,98	5,10	5,14
NP4	5,11	5,02	5,15	5,13
NP5	4,69	4,97	4,92	4,95
NP6	4,93	4,95	4,91	4,94
NP7	4,86	4,95	5,26	5,20
NP8	4,77	5,02	5,21	5,15
NP9^a	4,81	4,82	4,96	4,90
NP10^a	4,96	5,13	5,25	5,21
NP11^a	5,04	4,99	4,94	4,95
NP12^b	4,94	4,97	5,16	5,10
NP13^b	4,74	4,84	4,70	4,73
NP14^b	4,87	4,99	4,84	4,96

4.13.5 Cálculo dos efeitos para o planejamento fatorial

Juntamente com os experimentos, foi preparado formulações 1,5 e 6 conforme o planejamento fatorial e caracterizadas com os critérios estabelecidos anteriormente, verificando assim, os erros associados e o desvio padrão relativo (DPR) convertidos em % (TABELA 4.25).

Efeito 1 refere se a presença ou ausência de oleado de isodecila, o efeito 2 refere-se à concentração do polímero, e o efeito 3 a quantidade de cedrelona.

TABELA 4.25 - Efeitos calculados em porcentagem para o planejamento fatorial com interação das variáveis independentes 1, 2 e 3

Efeitos	RA(%)	DP	PZ	pH	EE(%)
1	-2,90	8,9	3,50	0,90	4,50
2	14,30	30,4	7,40	-4,30	4,30
3	-15,10	-3,4	0,70	0,40	-2,10
12	3,80	3,4	-1,60	0,20	-4,50
13	-4,80	-1,7	-1,70	0,10	2,80
23	-21,70	-1,4	-2,30	-0,40	4,60
123	-3,10	-0,9	-1,40	1,20	3,90
DPR(%)	11,1	3,6	3,1	1,4	1,3

*DPR: Desvio Padrão Relativo dos erros médios associados as repetições calculadas em %.

Observa-se que todos os efeitos não tiveram variações significativas. Os efeitos de primeira ordem 1 foram mais significativos com relação ao diâmetro de partícula (DP), com 8,9% de variação.

Já o efeito de primeira ordem 2 foi mais significativo na RA (%) e no DP, com 14,3% e 30,4% respectivamente. O efeito 3 apresentou valores menos significativos, devido a um erro de -15,1 % para RA%.

Nos efeitos de segunda ordem, não são observadas variações significativas. Observa-se no efeito 12 apenas 3,8% relacionado à RA% e -4,5% relacionado à EE%. Já no efeito 23, observa-se 4,6% para EE% e -21,7% para RA%. Em efeitos de terceira ordem, como o 123, observa-se que os experimentos não apresentaram variações significativas, com 3,9% para EE%.

A FIGURA 4.61 mostra o gráfico dos efeitos em relação ao valor normal esperado. Ao redor de zero pode-se observar os efeitos pequenos. Quando os efeitos estão afastados de zero considera-os como os efeitos mais importantes.

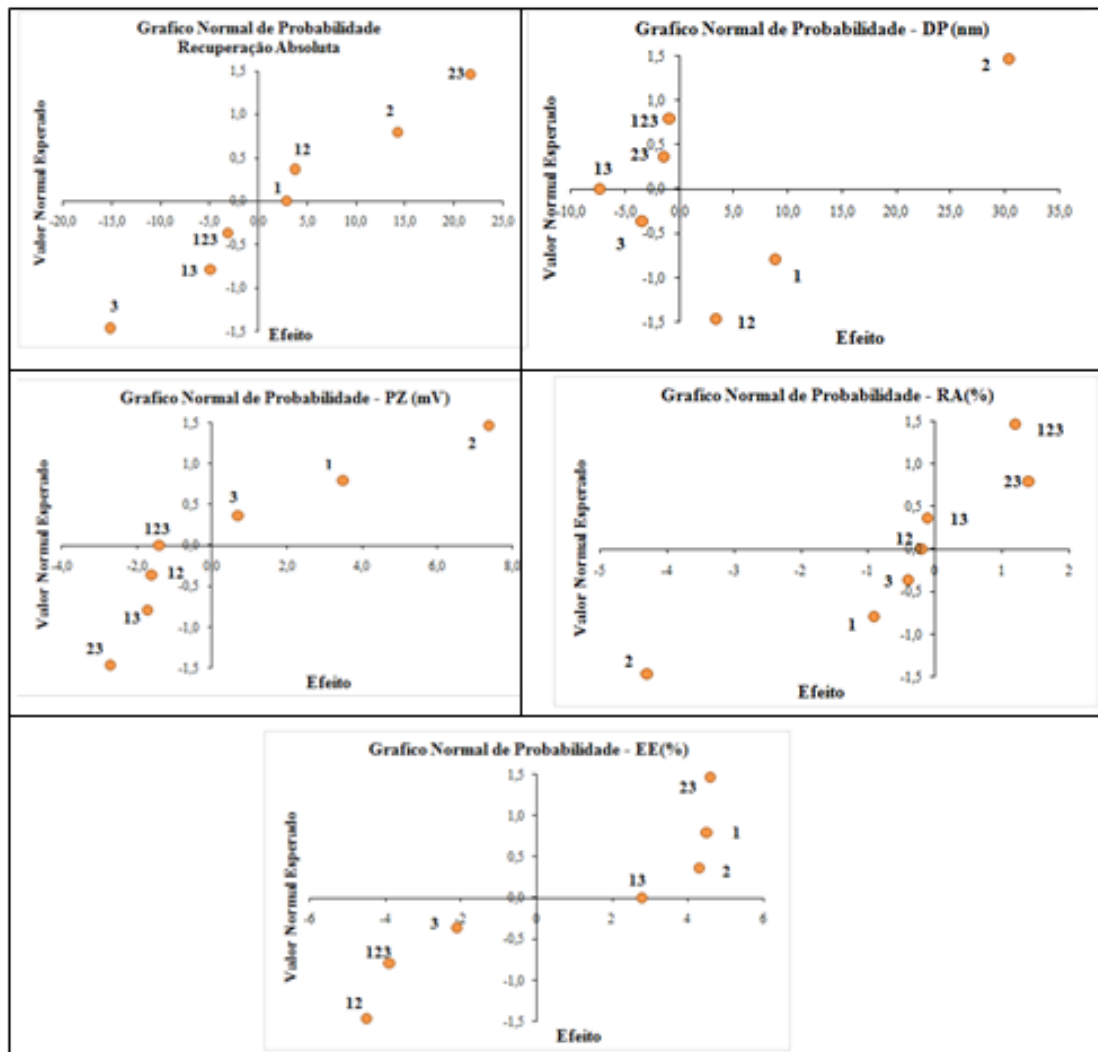


FIGURA 4.61 - Gráfico da distribuição dos efeitos em relação ao valor normal esperado do planejamento fatorial (Análise da ANOVA).

A visualização gráfica é uma das maneiras mais fáceis de identificar a importância de cada efeito. A FIGURA 4.62 mostra a visualização dos efeitos principais e de interação ao alterar os níveis de baixo (-1) para alto (+1). Como pode se observar, não houve muita diferença significativa nos efeitos para todos os experimentos.

O efeito mais significativo foi o 2, representado no DP, onde há deslocamento do (-1) para (+1), que possui uma seta com inclinação maior, contribuindo assim, 30,4% na avaliação do efeito.

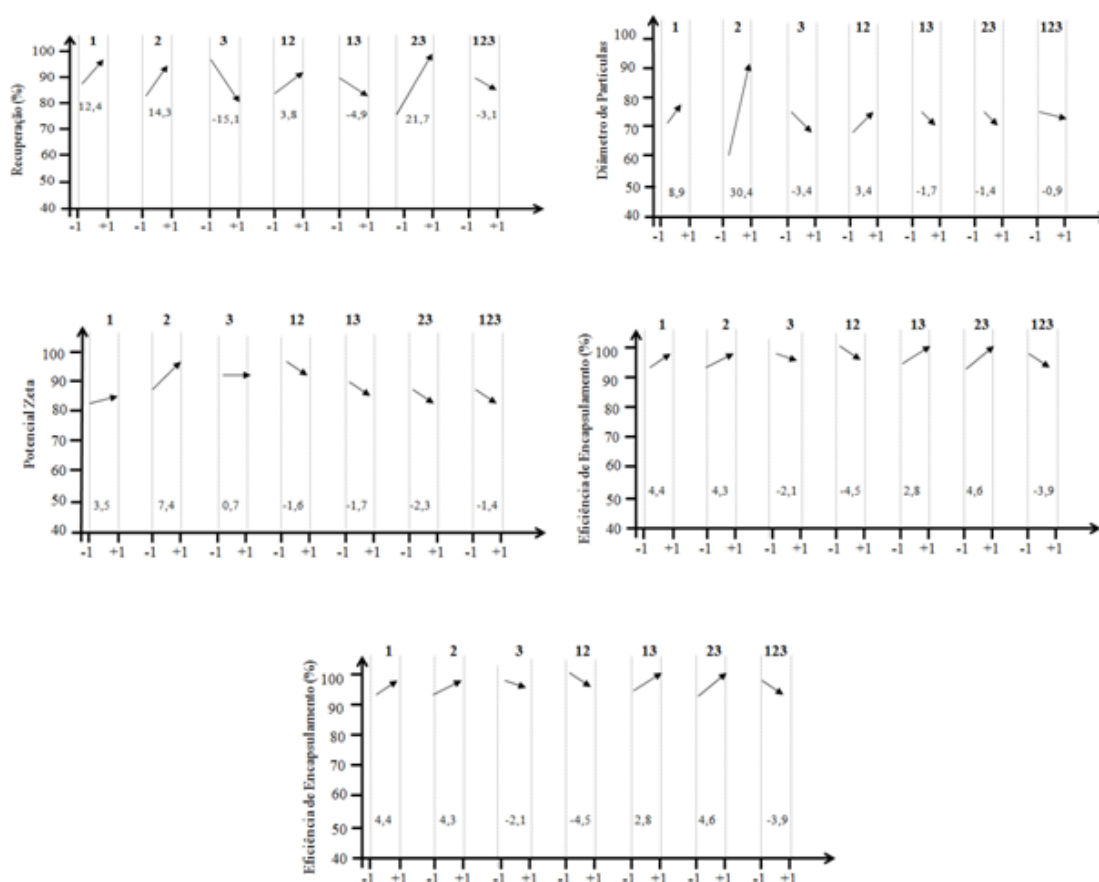


FIGURA 4.62 - Visualização dos efeitos principais em porcentagem e de interação

4.13.6 Análise morfológica das nanopartículas por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a avaliação da morfologia, as nanopartículas de PCL contendo cedrelona, foram caracterizadas utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Este tipo de caracterização é muito utilizado para obter informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas.

Observa-se nas figuras abaixo, as nanopartículas em evidência e aglomeradas. Nota-se claramente a diferença na organização estrutural devido as concentrações diferentes do composto ativo.

Observa-se também a diferença na organização estrutural entre as nano cápsulas nano esferas. As nano cápsulas são constituídas por um núcleo oleoso revestido por uma camada polimérica, já as nanoesferas são formadas por uma matriz

polimérica, onde o princípio ativo pode ficar retido ou adsorvido nesta (Figuras 4.63 a 4.67).

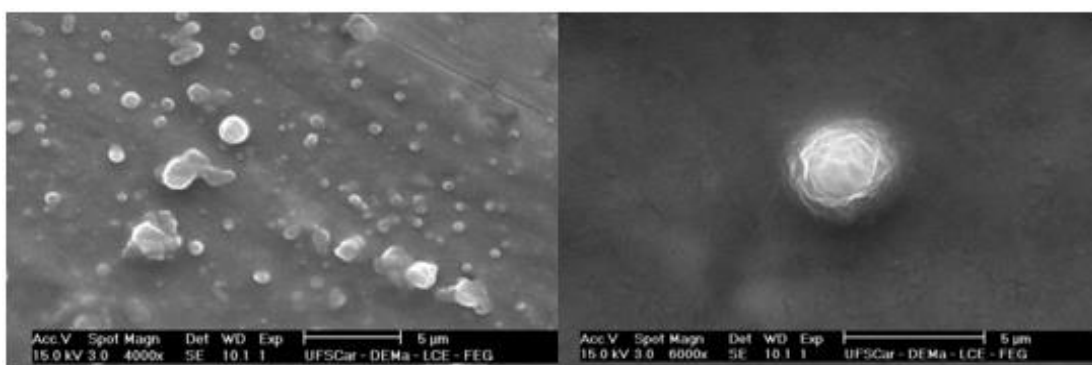


FIGURA 4.63 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP1, contendo cedrelona incorporada.

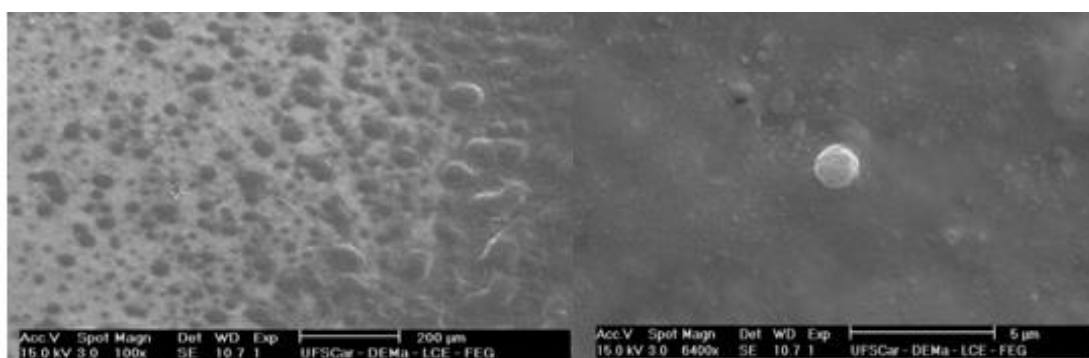


FIGURA 4.64 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP2, contendo cedrelona incorporada.

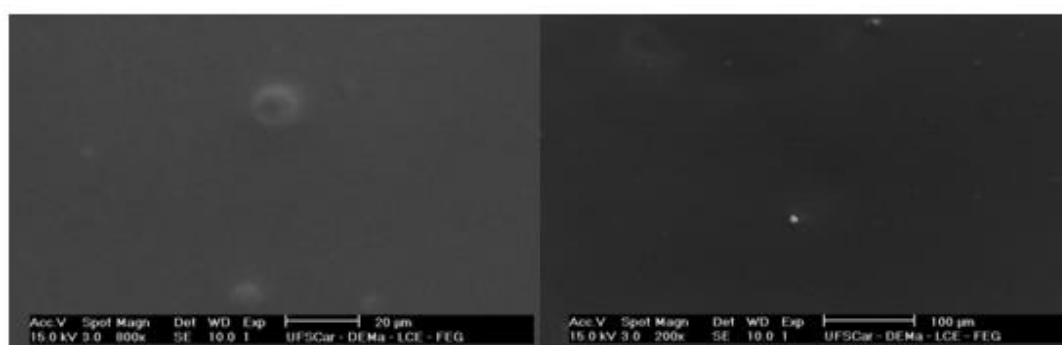


FIGURA 4.65 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP3 e NP5, contendo cedrelona incorporada.

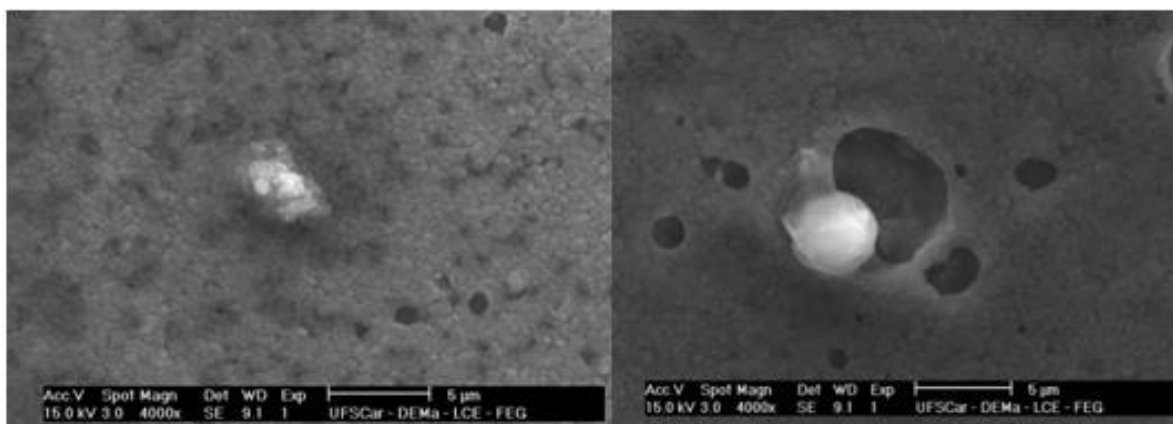


FIGURA 4.66 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP10, contendo cedrelona incorporada.

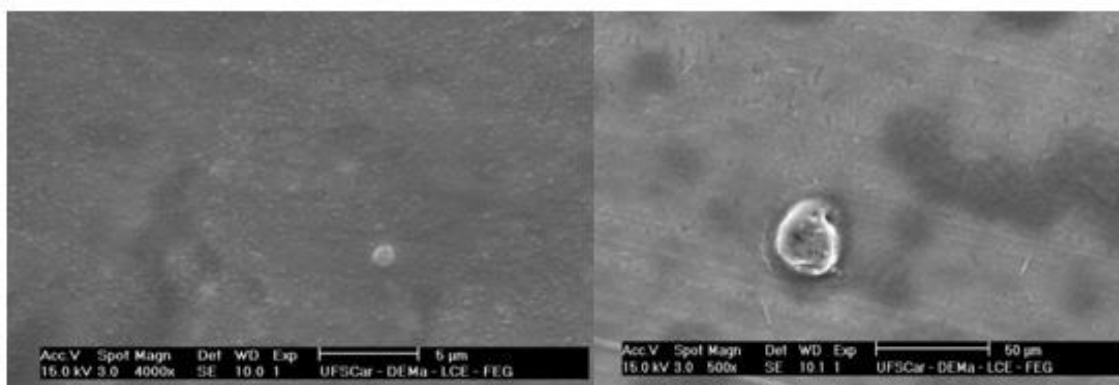


FIGURA 4.67 - Imagem de MEV das partículas de PCL, NP14, contendo cedrelona incorporada.

4.14 Ensaios Biológicos das Nanopartículas

As nanopartículas carregadas de cedrelona e seus respectivos brancos, foram ensaiadas frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote, conforme descrito no procedimento experimental.

4.14.1 Ensaio frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Inicialmente foram realizados ensaios com a cedrelona em diferentes concentrações referentes à concentração de cedrelona nas nanopartículas ensaiadas. Estes resultados estão descritos na TABELA 4.26. As porcentagens de inibição foram de 45, 56 e 59% de inibição nas concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL respectivamente.

TABELA 4.26 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento

Réplicas				
Ensaio	Cedrelona 100 µg	Cedrelona 150 µg	Cedrelona 200 µg	*Controle
1	7,938234	4,673576	6,1544	12,43471
2	7,065	4,750506	5,554346	12,93963
3	6,242634	5,3066	5,554346	12,06262
4	7,065	5,72265	5,3066	12,81246
5	6,1544	5,144576	5,3066	12,93963
Média	6,8931	5,1196	5,5753	12,6378
SD	0,7280	0,4285	0,3466	0,382352
RSD	10,561985	8,3697157	6,217451	3,025465
Inibição	45 %	56 %	59 %	-

Em 2010, Cazal realizou ensaios frente ao fungo simbiote com os constituintes usados no preparo das nanocápsulas, tais como PCL (poli-ε-(caprolactona), oleato de isodecila, span 60, tween 80. Seus resultados mostram que o polímero (PCL) exibiu 5% de inibição no crescimento micelial, enquanto o oleato de isodecila e o tensoativo, span 60, exibiram 1% e 17%, respectivamente.

Já o tensoativo, tween80, aumentou o crescimento micelial em relação ao controle. Portanto estes dados nos levam a confirmar que os compostos utilizados nas formulações não apresentam atividade significativa quando ensaiados isoladamente (CAZAL, 2010). Por esse motivo, foram utilizadas como controle as formulações sem o princípio ativos, denominados de brancos (Controle). O controle 1 e controle 2 não apresentam óleo em sua formulação, sendo, portanto, o branco das nanoesferas (NS).

Estes diferem apenas na quantidade de polímero, sendo 100 e 200 mg respectivamente. Já o controle 3 e controle 4 apresentam óleo em sua formulação, sendo, portanto, o branco das nanocápsulas (NC). Estes diferem apenas na quantidade de polímero, sendo 100 e 200 mg respectivamente. O controle 5 refere-se

ao ensaio centrado na média, onde foram utilizados 150 mg de polímero e 155 mg de óleo.

Para o ensaio das nanopartículas, foram ensaiadas todas as variações. Portanto ensaio-se NP1, NP2, NP3, NP4, NP5, NP7, NP8, NP10, NP14. As nanopartículas centradas na média, utilizou-se NP10, que possui os melhores valores nos experimentos de caracterização. Já nas repetições, a NP6 foi substituída pela NP14, pois esta apresentou uma EE% maior.

Para discussão dos resultados obtidos, as nanopartículas foram comparadas com seus respectivos brancos e usando como controle somente o fungo incorporado ao meio de cultura. Estes dados são apresentados na TABELAS 4.27.

A TABELA 4.27 mostra que quando comparados com controle, as porcentagens de inibição foram de 62 e 55% para as NP1, NP4 comparadas ao Bco1. A diferença entre ambas nanopartículas é apenas a concentração de cedrelona, que varia teoricamente de 100 µg/mL para NP1 e 200 µg/mL para NP2. Porém se observar a RA% de ambas, nota-se que para NP4, está se encontra com penas 64,4% de recuperação, enquanto a NP1 apresenta 99,6% o que justifica os valores de inibição bem mais baixos de NP2 comparados a NP1.

A TABELA 4.27 também mostra que quando comparados com controle, as porcentagens de inibição foram de 63 e 75% para as NP2 e NP14. A diferença entre ambas as nanopartículas é apenas a concentração de cedrelona, que varia teoricamente de 100 µg/mL para NP2 e 200 µg/mL para NP14.

Estes resultados mostram que a formulação NP14 foi mais eficiente que as demais, pois apresentou uma inibição de 75%. Quando se compara o controle 1 e controle 2, a diferença entre eles está na quantidade de polímero (PCL), onde o 1 apresenta 100 mg de polímero e o 2 apresenta 200 mg, se observa uma maior inibição nas NP contendo mais polímero, o que leva a acreditar que a quantidade de polímero interfere na maior inibição do fungo.

TABELA 4.27 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento das NP1, NP4 e Controle 1; NP2, NP14 e Controle 2

Réplicas						
Ensaio	NP 1 2 mL	NP 4 2 mL	*Controle Branco 1 2 mL	NP 2 2 mL	NP 14 2 mL	*Controle Branco 2 2 mL
1	4,372136	6,1544	10,28695	4,673576	3,662496	13,3249
2	4,080744	4,90625	11,5753	4,372136	3,46185	12,81246
3	4,298346	4,828064	11,09802	4,90625	2,893824	12,56
4	4,446554	4,90625	12,56	4,90625	3,077514	13,19585
5	4,009466	4,597274	10,74665	4,90625	3,203114	12,93963
Média	4,2414	5,0784	11,2534	4,7529	3,2598	12,9666
SD	0,1884	0,6147	0,8697382	0,2355	0,3055	0,3044457
RSD	4,4426349	12,1031845	7,72868207	4,95466749	9,3724490	2,3479287
Inibição	62%	55 %	-	63%	75 %	-

A TABELA 4.28 mostra que quando comparados com controle, as porcentagens de inibição foram de 39 e 56% para as NP3 e NP7. A diferença entre ambas as nanopartículas é apenas a concentração de cedrelona, que varia de 100 µg/mL para NP3 e 200 µg/ml para NP7.

Estes resultados mostram que a formulação NP14, foi mais eficiente, que as demais, pois apresentou uma inibição de 75%. Para as nanocápsulas NP5 e NP8 as porcentagens de inibição foram de 44 e 42% respectivamente.

TABELA 4.28 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento das amostras NP3, NP7 e controle 3 e NP5, NP8 controle 4

Réplicas						
Ensaio	NP 3 2 mL	NP 7 2 mL	*Controle Branco 3 2 mL	NP 5 2 mL	NP 8 2 mL	*Controle Branco 4 2 mL
1	4,90625	3,662496	8,240616	4,15265	4,5216	7,065
2	4,90625	3,46185	7,838696	4,5216	4,225184	7,065
3	4,750506	3,46185	7,739786	4,15265	4,298346	7,065
4	4,828064	3,46185	7,938234	4,372136	4,5216	8,342666
5	4,90625	3,46185	7,938234	4,15265	4,5216	8,342666
Média	4,8595	3,5020	7,9391	4,2703	4,4177	7,5761
SD	0,0697	0,0897	0,1875636	0,1696	0,1446	0,69985
RSD	1,434027 97	2,5623115 9	2,3625260	3,9714138 6	3,2743323 8	9,2370691 1
Inibição	39 %	56 %	-	44 %	42 %	-

A TABELA 4.29 mostra que quando comparados com controle, a porcentagem de inibição foi de 54% para a NP10.

TABELA 4.29 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento das amostras NP10 e controle 5

Réplicas		
Ensaio	NP 10 2 mL	*Controle Branco 5 2 mL
1	3,730634	9,181674
2	4,15265	8,652584
3	3,730634	8,240616
4	3,938816	8,139194
5	3,938816	8,240616
Média	3,8983	8,4909
SD	0,1762	0,4336738
RSD	4,5201809	5,10749007
Inibição	54 %	-

Em diversas nanopartículas ensaiadas, observou-se um declínio na atividade fungicida. Essa diminuição da atividade pode estar relacionada com o meio em que o ensaio é realizado, pois depende a liberação do princípio ativo para o meio.

Como as nanopartículas foram incorporadas em dietas contendo ágar, ou seja, meio sólido, isso poderá ter dificultado a liberação do princípio ativo (cedrelona) e conseqüentemente diminuição da atividade.

Muitas das nanopartículas preparadas neste trabalho não apresentaram um aumento na atividade quando comparado a cedrelona isolada, porém o uso das mesmas ainda é justificado, pois estas oferecem diversas vantagens como, liberação controlada, aumento da solubilidade e da estabilidade, reduz o contato dos ingredientes ativos com os trabalhadores rurais e as taxas de escoamento (Grupo ETC, 2005, CAZAL, 2010).

4.15 Conclusões

O HSCCC se mostrou eficiente no isolamento de cedrelona em relação as outras técnicas, tais como economia de solvente e tempo, recuperação total da amostra e reprodutibilidade.

O método validação mostrou-se eficaz para a quantificação de cedrelona nas nanocápsulas e nanoesferas. A técnica de nanoprecipitação mostrou-se viável e reprodutível para encapsulamento da cedrelona. Todas as formulações se mostraram estáveis, com alta eficiência de encapsulamento (EE%) e diâmetros de partículas esperados de acordo com relatos da literatura. Como não houve diferenças significativas nas formulações, foram escolhidas 9 delas para ensaio frente ao fungo e a formiga. Dentre estas, a que apresentou melhor atividade foi a NP14, com 75% de inibição do crescimento micelial.

Os novos compostos sintetizados a partir da cedrelona mostraram-se promissores na busca de ativos inseticidas/fungicidas.

Com relação ao ensaio frente ao fungo simbiote, o derivado mais ativo foi o acetato de cedrelona, com inibição no crescimento micelial de 76% (concentração de 100 µg/mL). Já o proprionato de cedrelona apresentou 62% de inibição no crescimento micelial na mesma. Esta inibição é maior que a cedrelona (46%), na mesma concentração.

Para o ensaio frente *A. sexdens rubropilosa*, o acetato de cedrelona com mortalidade acumulada de 62% e 84% ao final do experimento, na concentração de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL respectivamente. Já mesilato de cedrelona, mortalidade acumulada de 78% e 94% ao final do experimento nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente.

O composto propionato de cedrelona (RCIp), foi o composto com maior potencial inceticida sobre *A. sexdens rubropilosa*, com mortalidade acumulada de 92% e 100% nas concentrações de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL.

Os produtos derivados da acetilação e mesilação da cedrelona também foram ensaiados em células tumorais de mama da linhagem MDA- MB-231. O ensaio antitumoral *in vitro* foi realizado em parceria com o Laboratório de Biologia do Envelhecimento – Departamento de Gerontologia/UFSCar, sob coordenação da professora Márcia Regina Cominetti nos quais apresentaram resultados promissores

inibindo a proliferação de células tumorais de mama da linhagem MDA- MB-231 (Becceneri, 2020).

4.16 Referências Bibliográficas

- AGOSTINHO, S.M.M. Estudo fitoquímico de *Toona ciliata* (Meliaceae) e Avaliação da Atividade Biológica de seus Metabólitos Secundários. São Carlos: UFSCar, 1996. 261 p. Doutorado.
- BECENERI, A.B.; FUZER, A.M.; POPOLIN, C.P.; CAZAL, C.M.; DOMINGUES, V.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C., COMINETTI, M.R. Acetylation of cedrelone increases its cytotoxic activity and reverts the malignant phenotype of breast cancer cells in 3D culture, *Chemico-biological interactions*, 12/2019; 316:108920.
- BERTHOD, A. Practical approach to high-speed counter-current chromatography. *J. Chromat. A* 550: 677-693, 1991.
- BROOKHAVEN INSTRUMENTS CORPORATION. Disponível em:<<http://www.brookhaveninstruments.com/zeta-potential-analyzers>>Acessoem:03Abr. 2015.
- CAZAL, C. M. Nanopartículas polimérica associado ao controle de formigas cortadeiras e busca de novas substâncias naturais, com atividade antitumoral 2010. 292 p. Tese (Doutorado Química Orgânica) – Universidade Federal de São Carlos- UFSCar, São Carlos, 2010.
- CAZO, N. A., PEREIRA-FILHO, E. R., SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C., PUHLB, A. C., POLIKARPOV, I., FORIM, M. R. Nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação. *Orbital Elec. J. Chem.* 4: 54-76, 2012.
- CONWAY, W. D. Counter-Current Chromatography: Apparatus, Theory and Applications. VCH Publishers Inc., New York, 1990.
- DOMINGUES, G.S. Caracterização físico-química e avaliação dos perfis de liberação in vitro de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas. 2006. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Ciências Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.Ph.; PUISIEUX, F.; THIES, C.; Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. Centre National de La Recherche Scientifique- França. Patente Francesa 2608988-A1, 1988a.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *R1-R4. Int. J. Pharm.* 55: R1-R4, 1989.

- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.Ph. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. Centre National de La Recherche Scientifique- França. Patente Europeia 0274961, 1988b.
- FORIM, M.R., MATOS, A. P., SILVA, M. F. G. F., CASS, Q. B., VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B., Uso de CLAE no controle de qualidade em produtos comerciais de nim: reprodutibilidade da ação inseticida, *Quim. Nova* 33, 5: 1082-1087, 2010.
- GRUPO ETC (Action Group on Erosion Technology and Concentration). Tradução: PEDROZO, J.F.; BORGHETTI, F. Nanotecnologia: os riscos da tecnologia do futuro. Porto Alegre: L&PM, 2005.
- ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for highspeed counter-current chromatography. *J. Chromat. A* 1065: 145-168, 2005.
- ITO, Y. Recent advances in counter-current chromatography. *J. Chromat.* 538: 3-25, 1991.
- LIMA, T.C. Obtenção de formulações nanoparticuladas para incorporação de algumas lignanas e neolignanas como potencial no desenvolvimento de novos fármacos shistosomicida. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) –UNIFRAN, Franca, 2015.
- LUO, X.; WU, S.; MA, Y. & WU, D. "Tetranortriterpenoids from *Walsura yunnanensis*". *J. Nat. Prod.* 63: 947-951, 2000.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. *J. Chromat. A* 658: 315-341, 1994.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *J. Chromat. A* 1112: 181-194, 2006.
- MATOS, A.P.; NEBO, L.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; DA SILVA, M.F.G.F. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Quim. Nova* 32: 1553-1556, 2009.
- MIKOLAJCZAK, K.L.; REED, D.K. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. *J. Chem. Ecol.* 13: 99-111, 1987.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based on nocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385: 113-142, 2010.
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A.R.; DE LUCCA FREITAS, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLACOSTA, T.; GUTERRES, S.S. Spray-dried diclofenac-loaded poli(e-caprolactone) nanocapsules and nanospheres preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie* 56: 864-867, 2001.

- OHTSUBO, T.; TSUDA, S.; TSUJI, K. A study of the physical strength of fenitrothion microcapsules. *Polymer*, 32: 2395-2399, 1991.
- OIANO NETO, J. Estudo fitoquímico de *Toona ciliata*: uma Contribuição a Quimiosistemática do Gênero e a Ecologia da Interação *Hypsipyla*-Meliaceae. São Carlos: UFSCar, 2000. 287 p. Doutorado (Química Orgânica) - UFSCAR.
- PENG, J., FAN, G., QU, L., ZHOU, X., WU, Y. "Application of preparative high-speed counter-current chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisin A from *Schisandra chinensis*". *J. Chromat. A*, 1082 (2005) 203–207.
- PENNINGTON, T. D. & STYLES, B. D. "A generic monograph of Meliaceae". *Blumea*, 22: 419-540, 1975.
- RAMÍREZ, M. DEL C.; TOSCANO, R.A.; ARNASON, J.; OMAR, S.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; MATA, R. Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. *Tetrahedron* 56: 5085-5091, 2000.
- ROSA, D.S.; PENTEADO, D.F.; CALIL, M.R. Thermal Properties and Biodegradability of PCL and PHB Submitted in Fungi Pool. *Rev. Ciênc. Tecnol.* 15: 75-80, 2000.
- SALLES, L.R.V.O. Evolução de limonoides em Meliaceae e estudo fitoquímico de *Khaya senegalensis* (Meliaceae). Tese de doutorado, DQ, UFSCar, São Carlos, SP, 1995.
- SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova* 26: 726-737, 2003.
- SEVERINO, V.G.P.; CAZAL, C.M.; FORIM, M.R.; SILVA, M.F.G.F.; FILHO, E. R.; FERNANDES, J.B., VIEIRA, P.C. Isolation of secondary metabolites from *Hortia oreadica* (Rutaceae) leaves through high-speed counter-current chromatography, *J. Chromatog. A* 1216: 4275–4281, 2009.
- SILVA, V. P.; OLIVEIRA, R.R.; FIGUEIREDO, M.R. Isolation of Limonoids from Seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography. *Phytochem. Anal.* 20: 77–81, 2009.
- SILVA, J.C.T.; JHAM, G.N.; OLIVEIRA, R.D.L.; BROWN, L.; Purification of the seven tetranortriterpenoides in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromat. A* 1151: 203-210, 2007.
- SPARKS, R.E. *Microencapsulation*. In: Kirk-Othmer. Encyclopedia of chemical technology, 3. ed. John Wiley and Sons, New York, 15, 470 p., 1981.
- WANG, D., LIN, Y., LIN, X., GENG, Y., WANG, X., ZHANG, J., QIU, J.; Extraction and isolation of Dictamnine, Obacunone and raxinellone from *Dictamnus dasycarpus* Turcz by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. *Quim. Nova* 35: 337-340, 2012.

- WHEELER, D.A.; ISMAN, M.B, SANCHEZ-VINDAS, P.E.; ARNASON, J.T. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 347-358, 2001.
- XIE, Y. S.; ISMAN, M.B.; GUNNING, P.; MACKINNON, S.; ARNASON, J.T.; TAYLOR, D.R.; SÁNCHEZ, P.; HASBUN, C.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidoptera larvae. *Biochem. Syst. Ecol.* 22: 129-136, 1994.