

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

***Annona mucosa* (ANNONACEAE) PARA O CONTROLE DE  
PRAGAS: ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO,  
SÍNTESE DE MÍMICOS E DESENVOLVIMENTO DE  
PROCESSOS DE NANOENCAPSULAÇÃO**

**Keylla Utherdyany Bicalho\***

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 Capes e FAPESP**

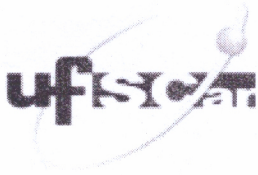
**São Carlos - SP  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B583a Bicalho, Keylla Utherdyany  
Annona mucosa (Annonaceae) para o controle de pragas : estudo fitoquímico biomonitorado, síntese de mímicos e desenvolvimento de processos de nanoencapsulação / Keylla Utherdyany Bicalho. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
196 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Annona mucosa. 2. Acetogeninas. 3. Inseticidas. 4. Síntese de mímicos. 5. Nanoencapsulação. I. Título.



---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Keylla Utherdyany Bicalho, realizada em 26/02/2016:

---

Prof. Dr. João Batista Fernandes  
UFSCar

---

Profa. Dra. Maysa Furlan  
UNESP

---

Prof. Dr. Thiago André Moura Veiga  
UNIFESP

---

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho  
UFSCar

---

Profa. Dra. Taícia Pacheco Fill  
UNICAMP

Dedico esta tese às minhas duas mães Maria José e Graça, pelo amor e apoio incondicional e por me darem a certeza de que o meu caminho nunca será trilhado sozinha.

*“The only true wisdom is in knowing you know nothing.”*

*(Sócrates)*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e proteção;

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

Ao professor Dr. Moacir Rossi Forim, pela coorientação no trabalho de nanoencapsulamento, ensinamentos e amizade;

Ao professor Dr. Richard Brown da Universidade de Southampton por me receber para desenvolver o projeto de doutorado sanduíche, por todo o suporte e ensinamentos;

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

Ao professor Dr. Odair Corrêa Bueno e suas alunas, pela colaboração na realização dos ensaios com as formigas cortadeiras;

Ao professor Dr. José Djair Vendramim e seus alunos pela colaboração na realização dos ensaios biológicos com o gorgulho do milho;

À técnica Ms. Dorai Periotto pela realização dos ensaios biológicos com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*;

À técnica Luciana, do Laboratório de RMN, pela grande colaboração durante toda a minha pós-graduação;

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

Ao amigos do grupo de pesquisa Molecular Assembly, Function and Structure por me receberem tão bem e ajudarem em minhas dificuldades com a síntese; em especial aos Drs. Marco Facciotti e Azzam Mohammed pela amizade, conversas e momentos compartilhados na Inglaterra;

Aos amigos de Southampton, que fizeram com que minha experiência fora do Brasil fosse a melhor possível;

Aos amigos da Vila do Chaves e do Espanha 41 por tornarem meus dias em São Carlos mais felizes;

À toda minha família pelo carinho, dedicação e por compreenderem minha ausência, em especial à minha mãe e à tia Lia exemplos de força e sabedoria em minha vida;

À FAPESP pela bolsa concedida;

Muito obrigada!!

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\delta$	Deslocamento químico
$\delta_H$	Deslocamento químico de hidrogênio
$\delta_C$	Deslocamento químico de carbono
$\phi$	Diâmetro
$\nu_{max}$	Frequência máxima
$\Delta\delta$	Diferença de deslocamento químico
$\alpha_D$	Rotação específica
$\mu S$	Micro-Siemens
AcOH	Ácido acético
ACN	Acetonitrila
atm	Atmosferas
$c$	Concentração em g/100 mL
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
$d$	Dupleto
DCM	Diclorometano
$dd$	Duplo-dupleto
$ddd$	Duplo-duplo-dupleto
$dddd$	Duplo-duplo-duplo-dupleto
$dddq$	Duplo-duplo-duplo-quadrupeto
$ddt$	Duplo-duplo-tripeto
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DIPEA	Diisopropiletilamina
$dq$	Duplo-quadrupeto
$dt$	Duplo-tripeto
DMSO- $d_6$	Dimetilsulfóxido deuterado
DME	Éter dimetílico
DMF	Dimetilformamida
DMPU	1,3-Dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona

DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EMAR	Espectro de massas de alta resolução
EMBR	Espectro de massas de baixa resolução
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
EtOAc	Acetato de Etila
EtOH	Etanol
F	Forte
f	Fraco
<i>g</i>	Força <i>g</i>
g/mol	Gramas por mol
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IES	Ionização por <i>electrospray</i>
IES <sup>+</sup>	Ionização por <i>electrospray</i> no modo positivo
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kV	Quilovolts
l	Largo
L/h	Litros por hora
L/t	Litros por tonelada
Lux	Fator de luminosidade
<i>m</i>	Multiplete
m	Médio
M	Concentração molar
Md	Mediana
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
MHz	MegaHertz
mM	Concentração milimolar
mmol	Milimol

MOMCl	Cloromoetil metil éter
MP	Material de partida
MsCl	Cloreto de mesila
mV	Milivolts
m <sup>3</sup> /h	Metros cúbicos por hora
m/v	Relação massa-volume
m/z	Relação massa/carga
p.	Página
pf	Ponto de fusão
PMA	Ácido fosfomolíbico
ppm	Partes por milhão
<i>q</i>	Quadrupletto
<i>q<sub>dist</sub></i>	Quadrupletto distorcido
<i>qq</i>	Quadruplo-quadrupletto
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1
<i>s</i>	Simpleto
<i>s/</i>	Simpleto largo
T	Tesla
<i>t</i>	Tripletto
t.a.	Temperatura ambiente
TBAB	Brometo de tetra-n-butilamônio
TBDMSOCl	Cloreto de <i>tert</i> -butildimetilsilil
TBDMSOTf	Trimetilsilil tfluorometanossulfonato
<i>t</i> -BuOK	Tert-butóxido de potássio
Temp.	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
TMSCl	Cloreto de trimetilsilil
TsCl	Cloreto de tosila
u	Unidade de massa atômica
U.R.	Umidade relativa
UV	Ultravioleta



# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

<b>Tabela 3.1</b> - Extratos brutos das partes vegetais de <i>Annona mucosa</i> .....	12
<b>Tabela 4.1</b> - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com os extratos de parte vegetais de <i>A. mucosa</i> à 2,0 mg/mL .....	26
<b>Tabela 4.2</b> - Médias de mortalidade do gorgulho do milho ao 10º dia de experimento em amostras de milho tratadas com extratos de <i>A. mucosa</i> .....	26
<b>Tabela 4.3</b> - Estimativa da CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> (em ppm*) e intervalo de confiança dos extratos de folhas e sementes de <i>A. mucosa</i> para adultos de <i>S. zeamais</i> , após 10 dias de exposição em amostras tratadas de milho (10 g). Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h; Luminosidade: 200 lux.....	27
<b>Tabela 4.4</b> – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo <i>L. gongylophorus</i> submetido ao tratamento com os extratos de <i>A. mucosa</i> , após 30 dias de experimento.....	27
<b>Tabela 4.5</b> - Médias de mortalidade ao 10º dia em amostras de milho (10 g) tratadas com as partições dos extratos etanólicos das folhas (1500 ppm) e sementes (288 ppm) de <i>A. mucosa</i> .....	29
<b>Tabela 4.6</b> – Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo <i>L. gongylophorus</i> submetido ao tratamento com a partições dos extratos de folhas e sementes de <i>A. mucosa</i> à concentração de 0,5 mg/mL.....	29
<b>Tabela 4.7</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância <b>I</b> e comparação com a (+)-magnolina (SEO, 2010: CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz para RMN de <sup>1</sup> H/ 75 MHz para RMN de <sup>13</sup> C).....	39
<b>Tabela 4.8</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância <b>II</b> e comparação com a membrina (ESTRADA-REYES <i>et al.</i> , 2002).....	45
<b>Tabela 4.9</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância <b>III</b> e comparação com a eudesmina (SEO, 2010: CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz para RMN de <sup>1</sup> H/ 75 MHz para RMN de <sup>13</sup> C).....	51
<b>Tabela 4.10</b> – Análise comparativa dos dados espectroscópicos das substâncias <b>IV</b> , <b>V</b> e <b>VI</b> .....	60
<b>Tabela 4.11</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância <b>IV</b> e comparação com a rolliniastatina-1 (PETIT <i>et al.</i> , 1987: CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz para RMN de <sup>1</sup> H/ 75 MHz para RMN de <sup>13</sup> C).....	65
<b>Tabela 4.12</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância <b>V</b> e comparação com a rolliniastatina-2 (PETIT <i>et al.</i> , 1989: CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz para RMN de <sup>1</sup> H/ 100 MHz para RMN de <sup>13</sup> C) ....	66
<b>Tabela 4.13</b> – Dados de RMN de <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) e de <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 100 MHz) da substância <b>VI</b> e comparação com a rollimembrina (isômero de posição do grupo diol <i>bis</i> -THF) (GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1997: CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz para RMN de <sup>1</sup> H/ 100 MHz para RMN de <sup>13</sup> C).....	67

<b>Tabela 4.14</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância <b>VII</b> e comparação com a jimenezina (CHAVEZ <i>et al.</i> , 1998: $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz para RMN de $^1\text{H}$ / 125 MHz para RMN de $^{13}\text{C}$ ).....	80
<b>Tabela 4.15</b> – Configurações dos glicosídeos (HARBONE e MABRY, 1982).	85
<b>Tabela 4.16</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz) e de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ , 100 MHz) da substância <b>VIII</b> e comparação com a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicose-6''-O- $\alpha$ -L-raminopiranosil (FATHIAZAD <i>et al.</i> , 2006: $\text{DMSO}-d_6$ , 200 MHz para RMN de $^1\text{H}$ / 50 MHz para RMN de $^{13}\text{C}$ ).....	88
<b>Tabela 4.17</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{MeOD}$ , 400 MHz) e de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{MeOD}$ , 100 MHz) da substância <b>IX</b> e comparação com a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (BENNINI <i>et al.</i> , 1992; $\text{DMSO}-d_6$ , 300 MHz para RMN de $^1\text{H}$ /75 MHz para $^{13}\text{C}$ ).....	92
<b>Tabela 4.18</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{MeOD}$ , 400 MHz) e de projeção de $^{13}\text{C}$ ( $\text{MeOD}$ , 100 MHz) da substância <b>X</b> e comparação com o kaemferol-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (NUGROHO <i>et al.</i> , 2012: $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz para RMN de $^1\text{H}$ / 125 MHz para RMN de $^{13}\text{C}$ ) .....	96
<b>Tabela 4.19</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz) da substância <b>XI</b> e comparação com a quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactosídeo (SANTOS <i>et al.</i> , 2005: $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz para RMN de $^1\text{H}$ / 100 MHz para RMN de $^{13}\text{C}$ ).....	101

## CAPITULO II

<b>Tabela 3.1</b> – Diferentes condições reacionais testadas para a ciclização oxidativa assimétrica mediada por permanganato. ....	127
<b>Tabela 3.2</b> – Tentativas de proteção da hidroxila livre em <b>3.11</b> e <b>3.10</b> .....	133

## CAPITULO III

<b>Tabela 3.1</b> – Métodos analíticos empregados para análise de sesamina.....	164
<b>Tabela 3.2</b> – Variáveis e níveis para o planejamento fatorial e variáveis fixadas. ....	167
<b>Tabela 3.3</b> – Planejamento fatorial $2^3$ centrado na média. ....	168
<b>Tabela 3.4</b> – Parâmetros operacionais mini <i>Spray-Drier</i> .....	169
<b>Tabela 4.1</b> – Dados de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da sesamina e comparação com a literatura (WANG <i>et al.</i> , 2009: $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz para RMN de $^1\text{H}$ / 150 MHz para RMN de $^{13}\text{C}$ ).....	176
<b>Tabela 4.2</b> – Precisão e exatidão da curva de calibração.....	177
<b>Tabela 4.3</b> – Análise de variância de fator único (ANOVA) para o modelo de regressão linear. ....	178
<b>Tabela 4.4</b> – Exatidão e precisão inter e intra dia para validação do método..	179
<b>Tabela 4.5</b> – Descrição das variáveis independentes e respostas das variáveis dependentes observadas para o planejamento fatorial.....	181
<b>Tabela 4.6</b> – Valores de coeficiente angular ( $a$ ) para a reta que descreve os perfis de liberação. ....	185
<b>Tabela 4.7</b> - Porcentagem de cada efeito nas variáveis dependentes.....	186

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

<b>Figura 1.1</b> – Formigas cortadeiras (Fontes: AYLWARD <i>et al.</i> , 2012; NOWAK <i>et al.</i> , 2006).....	5
<b>Figura 4.1</b> – Classificação das liganas em grupos.....	35
<b>Figura 4.2</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância I (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	40
<b>Figura 4.3</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância I (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	40
<b>Figura 4.4</b> – Espectro de COSY da substância I (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	41
<b>Figura 4.5</b> - Mapa de correlações HSQC da substância I (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )..	41
<b>Figura 4.6</b> - Mapa de correlações HMBC da substância I (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )..	42
<b>Figura 4.7</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância II (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	46
<b>Figura 4.8</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância II (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	46
<b>Figura 4.9</b> – Espectro de COSY da substância II (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	47
<b>Figura 4.10</b> - Mapa de correlações HSQC da substância II (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	47
<b>Figura 4.11</b> - Mapa de correlações HMBC da substância II (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	48
<b>Figura 4.12</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância III (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	52
<b>Figura 4.13</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância III (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )...	52
<b>Figura 4.14</b> – Espectro de COSY da substância III (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	53
<b>Figura 4.15</b> - Mapa de correlações HSQC da substância III (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	53
<b>Figura 4.16</b> - Mapa de correlações HMBC da substância III (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). .....	54
<b>Figura 4.17</b> – Exemplo do caminho biossintético proposto para as acetogeninas (ZENG <i>et al.</i> , 1996). .....	55
<b>Figura 4.18</b> – Estrutura geral das acetogeninas naturais.....	56
<b>Figura 4.19</b> – Espectros de massas full-scan, no modo negativo, ionização por <i>eletronspray</i> , das acetogeninas IV, V e VI.....	68
<b>Figura 4.20</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância IV (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )....	69
<b>Figura 4.21</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância IV (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )..	69
<b>Figura 4.22</b> – Espectro de COSY da substância IV (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	70
<b>Figura 4.23</b> – Mapa de correlações HSQC da substância IV (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	70
<b>Figura 4.24</b> – Mapa de correlações HMBC da substância IV (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	71
<b>Figura 4.25</b> – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância V (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	71
<b>Figura 4.26</b> – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância V (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )...	72

<b>Figura 4.27</b> – Espectro de COSY da substância <b>V</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	72
<b>Figura 4.28</b> – Mapa de correlações HSQC da substância <b>V</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	73
<b>Figura 4.29</b> – Mapa de correlações HMBC da substância <b>V</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	73
<b>Figura 4.30</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>VI</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )....	74
<b>Figura 4.31</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>VI</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )..	74
<b>Figura 4.32</b> – Espectro de COSY da substância <b>VI</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	75
<b>Figura 4.33</b> – Mapa de correlações HSQC da substância <b>VI</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	75
<b>Figura 4.34</b> – Mapa de correlações HMBC da substância <b>VI</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	76
<b>Figura 4.35</b> – Espectros de massas full-scan, no modo negativo, ionização por <i>electrospray</i> para a acetogenina <b>VII</b> .....	81
<b>Figura 4.36</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>VII</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )...	81
<b>Figura 4.37</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>VII</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).	82
<b>Figura 4.38</b> – Espectro de COSY da substância <b>VII</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	82
<b>Figura 4.39</b> – Mapa de correlações HSQC da substância <b>VII</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	83
<b>Figura 4.40</b> – Mapa de correlações HMBC da substância <b>VII</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	83
<b>Figura 4.41</b> – Classificação dos flavonoides por subclasses.....	84
<b>Figura 4.42</b> – Designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono na nomenclatura usual. ....	85
<b>Figura 4.43</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>VIII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	89
<b>Figura 4.44</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>VIII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	89
<b>Figura 4.45</b> – Mapa de correlações HSQC substância <b>VIII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	90
<b>Figura 4.46</b> – Expansão do mapa de correlações HMBC substância <b>VIII</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	90
<b>Figura 4.47</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>IX</b> (400 MHz, MeOD)....	93
<b>Figura 4.48</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>IX</b> (100 MHz, MeOD)..	93
<b>Figura 4.49</b> - Mapa de correlações HMBC da substância <b>IX</b> (400 MHz, MeOD). ....	94
<b>Figura 4.50</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>X</b> (400 MHz, MeOD).....	97
<b>Figura 4.51</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância <b>X</b> (100 MHz, MeOD)...	97

<b>Figura 4.52</b> – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância <b>X</b> (400 MHz, MeOD). .....	98
<b>Figura 4.53</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da mistura de substâncias <b>IX</b> e <b>XI</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	102
<b>Figura 4.54</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da mistura das substâncias <b>IX</b> e <b>XI</b> (100 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). .....	102
<b>Figura 4.55</b> - Mapa de correlações HSQC das substâncias <b>IX</b> e <b>XI</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). .....	103
<b>Figura 4.56</b> – Expansão do mapa de correlações HMBC das substâncias <b>IX</b> e <b>XI</b> (400 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). .....	103
<b>Figura 4.57</b> - Avaliação da toxicidade e curva de concentração-resposta de rolliniastatina-1 à células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231.....	105
<b>Figura 4.58</b> – Efeito da rolliniastatina-1 na morfologia das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. ....	106

## CAPITULO II

<b>Figura 1.1</b> – Estruturas de algumas acetogeninas de anonáceas alvos de estudos de síntese total. ....	119
<b>Figura 1.2</b> – Exemplos dos mímicos sintetizados pelo grupo de Hideto Miyoshi (Universidade de Kyoto). ....	120
<b>Figura 1.3</b> – Série de mímicos poliéter lineares sintetizados pelo grupo do Prof. Yu-Lin Wu (Instituto de Química Orgânica de Shangai).....	121
<b>Figura 1.4</b> – Segunda geração de mímicos de acetogeninas partindo de AA005. ....	122
<b>Figura 1.5</b> – Série de mímicos bivalentes e monovalentes contendo fragmentos diaminas.....	122
<b>Figure 1.6</b> – Estrutura da Rolliniastatina-1. ....	123
<b>Figura 3.1</b> – Fragmentos inicialmente propostos para a segunda parte dos mímicos. ....	131

## CAPÍTULO III

<b>Figura 3.1</b> – Representação esquemática do preparo das nanoformulações	166
<b>Figura 3.2</b> – Representação esquemática do preparo de micropartículas em pó.....	169
<b>Figura 4.1</b> – Análise por CLAE método gradiente exploratório da amostra de sesamina a ser encapsulada. ....	173
<b>Figura 4.2</b> – Análise por CLAE método isocrático da amostra de sesamina a ser encapsulada.....	173
<b>Figura 4.3</b> – Isômeros diequatorial (I) e diaxial (II) possíveis para as lignanas furofurânicas. ....	174
<b>Figura 4.4</b> – Curva de calibração para análise de sesamina. As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Agilent 1260.....	177
<b>Figura 4.5</b> – Unidades monoméricas constituintes de PCL (A) e lignina (B)	180

<b>Figura 4.6</b> – Perfil de liberação das nanoformulações NF1-NF8.....	184
<b>Figura 4.7</b> – Efeitos calculados em porcentagem, após normalização dos dados, dos experimentos realizados pelo planejamento fatorial $2^3$ . A inclinação dos vetores indica a amplitude dos efeitos.....	186
<b>Figura 4.8</b> – Fotomicroscopias obtidas por MET, a partir da suspensão de nanoesferas NF3. ....	189
<b>Figura 4.9</b> – Análise elementar para as nanopartículas NF3 obtidas por EDX.....	190
<b>Figura 4.10</b> – Fotomicroscopias obtidas por MEV para as nanoformulações NF1 (A), NF3 (B) e NF7 (C) em pó às expansões de 100x, 5.000x e 50.000x	191

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

### CAPÍTULO I

<b>Fluxograma 3.1</b> – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>A. mucosa</i> (MUF).....	12
<b>Fluxograma 3.2</b> – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido do extrato etanólico dos ramos de <i>A. mucosa</i> (MUR).....	13
<b>Fluxograma 3.3</b> – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido do extrato etanólico das sementes de <i>A. mucosa</i> (MUS). ....	13
<b>Fluxograma 3.4</b> – Fracionamento da fração MUSHi. ....	14
<b>Fluxograma 3.5</b> – Fracionamento da fração C1-3. ....	14
<b>Fluxograma 3.6</b> – Fracionamento da fração C1-4. ....	15
<b>Fluxograma 3.7</b> – Fracionamento da fração MUFHe. ....	16
<b>Fluxograma 3.8</b> – Fracionamento da fração CF2-4. ....	17
<b>Fluxograma 3.9</b> – Fracionamento de MUFA.....	18
<b>Fluxograma 3.10</b> – Fracionamento dos flavonoides VIII-X. ....	18
<b>Fluxograma 3.11</b> – Obtenção dos flavonoides IX e XI em mistura.....	19
<b>Fluxograma 3.12</b> – Fracionamento da fração S1-4. ....	19
<b>Fluxograma 3.13</b> – Fracionamento da fração S4-2. ....	20
<b>Fluxograma 3.14</b> – Fracionamento da fração S4-3. ....	20
<b>Fluxograma 3.15</b> – Fracionamento da fração S4-5. ....	21

## LISTA DE GRÁFICOS

### CAPÍTULO I

<b>Gráfico 4.1</b> - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com os extratos de parte vegetais de <i>A. mucosa</i> na concentração de 2,0 mg/mL.....	25
<b>Gráfico 4.2</b> - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com as partições obtidas dos extratos etanólico das folhas e das sementes de <i>A. mucosa</i> na concentração de 1,0 mg/mL. ....	28
<b>Gráfico 4.3</b> – Médias de mortalidade ao 10º dia em amostras de milho (10 g) tratadas com as sub-frações da partição hidroalcolica do extrato das sementes de <i>A. mucosa</i> (58 ppm).....	30
<b>Gráfico 4.4</b> – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão com amostras de rolliniastatina-1 nas concentrações 100 e 200 µg/mL.....	104

# LISTA DE ESQUEMAS

## CAPÍTULO I

<b>Esquema 4.1</b> – Proposta de formação dos íons <i>m/z</i> 297 (IV e V) e <i>m/z</i> 269 (VI).....	61
<b>Esquema 4.2</b> – Proposta de formação do íon <i>m/z</i> 297 para a substância VII	78

## CAPÍTULO II

<b>Esquema 2.1</b> – Análise retrossintética para os mímicos propostos.....	124
<b>Esquema 3.1</b> – Síntese do <i>trans</i> -dieno 3.3. <i>Reagentes e condições:</i> a) CH <sub>2</sub> =CHMgBr, THF, 0 °C; b) éter butil vinílico, 3.4, refluxo à 110 °C, 48h; c) 3.6, DIPEA, LiCl, ACN, 0 °C; d) DME, t.a.; e) NaH, cloreto de cloroacetila, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , -60 °C; f) P(OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , vial selado, 160 °C.....	126
<b>Esquema 3.2</b> – Esquema geral de uma reação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) (STEINBACH <i>et al.</i> , 2015). .....	127
<b>Esquema 3.3</b> – Ciclização oxidativa assimétrica mediada por permanganato. <i>Reagentes and condições:</i> a) Ver Tabela 3.1.....	127
<b>Esquema 3.4</b> – Proposta mecanística de WALBA <i>et al.</i> baseada em cicloadições [2+2]. .....	129
<b>Esquema 3.5</b> – Proposta mecanística de BALDWIN <i>et al.</i> , baseada em cicloadições [3+2]. .....	130
<b>Esquema 3.6</b> – Síntese do epóxido 3.11. <i>Reagentes e condições:</i> a) NaBH <sub>4</sub> , THF:H <sub>2</sub> O 1:0.001; b) i) Bu <sub>2</sub> SnO, benzeno anidro, refluxo, ii) TsCl, TBAB, t.a.; c) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MeOH, t.a. ....	130
<b>Esquema 3.7</b> – Síntese dos fragmentos 3.12 e 3.13. <i>Reagentes e condições:</i> a) Iodeto de alila, <i>t</i> -BuOK, THF, t.a., 24 h; b) MsCl, DIPEA, 0 °C; c) Tiourea, NaOH, EtOH, refluxo. ....	131
<b>Esquema 3.8</b> – Síntese dos fragmentos 3.14 e 3.15. <i>Reagentes e condições:</i> a) MsCl, DIPEA, 0 °C; b) etileno glicol, NaH, DMF, 0 °C; c) MsCl, Et <sub>3</sub> N, DCM, 0 °C; d) tiourea, NaOH, EtOH, refluxo. ....	132
<b>Esquema 3.9</b> – Tentativas falhas da reação de acoplamento. <i>Reagentes e condições:</i> a) NaH, BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O, THF, 0 °C; b) NaH, DMPU, THF, - 78 °C.....	132
<b>Esquema 3.10</b> – Reação de acoplamento e obtenção da olefina 3.19. <i>Reagentes e condições:</i> a) NaH, THF, 0 °C.....	134
<b>Esquema 3.11</b> – Síntese final do mímico de ACG 3.21. <i>Reagentes e condições:</i> b) [CpRu(CH <sub>3</sub> CN) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup> , DMF, t.a.....	134



## RESUMO

*Annona mucosa* (ANNONACEAE) PARA O CONTROLE DE PRAGAS: ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO, SÍNTESE DE MÍMICOS E DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS DE NANOENCAPSULAÇÃO – A agricultura é um dos setores mais impulsionadores do PIB brasileiro. No entanto, diversas perdas têm ocorrido durante o processo produtivo agrícola, com destaque para o ataque de pragas. Atualmente, as formigas cortadeiras e o gorgulho do milho têm causado grandes prejuízos e são de difícil controle. Uma alternativa para o controle dessas pragas é a busca na natureza por novos compostos com potenciais inseticida e fungicida. Nessa perspectiva, a primeira parte desse trabalho, envolveu o estudo fitoquímico biomonitorado de *Annona mucosa*, na busca por novos compostos com estas propriedades. A partir de extratos das partes vegetais, verificou-se grande potencial inseticida e fungicida das frações desta planta. O estudo fitoquímico das folhas e sementes desta espécie levou ao isolamento e identificação de 11 metabólitos secundários, sendo 3 lignanas, 4 acetogeninas e 4 flavonoides, e confirmaram o potencial de atividade biológica dessas substâncias. As acetogeninas são derivadas de ácidos graxos caracterizadas pela presença de duas unidades funcionais principais, o grupo diol-tetrahidrofurânico e uma unidade  $\gamma$ -lactônica- $\alpha,\beta$ -insaturada, separados por uma cadeia alquílica longa. Diversas pesquisas envolvendo a síntese de mímicos de acetogeninas com estruturas simplificadas, mas mantendo as funcionalidades importantes para atividade biológica, têm sido desenvolvidas. Baseados nessa ideia, a segunda parte deste trabalho teve como objetivo a síntese de mímicos da rolliniastatina-1, acetogenina majoritária na composição química de *A. mucosa*. Uma rota sintética envolvendo 12 etapas reacionais foi desenvolvida para obter-se mímicos poliéteres. Neste trabalho foi possível a obtenção de apenas um mímico completo. No entanto, a rota sintética foi completamente estabelecida e uma nova metodologia de reação sequencial de troca vinil etílica-Rearranjo de Claisen foi implementada para a síntese de aldeídos  $\gamma,\delta$ -insaturados de forma simplificada. Além disso, a etapa chave da rota, a ciclização oxidativa, etapa de formação do anel THF com estereoquímica *treo-cis-treo*, foi otimizada em termos de rendimento e de estereoseletividade. Na busca pelo desenvolvimento de novas tecnologias para aplicação de princípios ativos, o nanoencapsulamento é uma técnica que resulta em sistemas de liberação controlada dessas substâncias e podem ser aplicados em

diversos campos. Assim, a última parte deste trabalho envolveu o desenvolvimento de formulação e aperfeiçoamento do processo e dos parâmetros para nanoencapsulamento da lignana furofurânica sesamina. Para tanto, foi feito um planejamento fatorial  $2^3$  centrado na média, onde foram avaliados os efeitos das variáveis independentes (tipo e quantidade de polímero e quantidade de óleo) nas características físico-químicas das nanopartículas e na taxa de encapsulamento, recuperação e liberação da sesamina. Foram empregados os biopolímeros poli- $\epsilon$ -caprolactona e lignina, e foram preparadas suspensões coloidais de nanocápsulas e nanoesferas. Os resultados do planejamento fatorial comprovaram a eficiência dos dois biopolímeros e a melhor nanoformulação foi a suspensão de nanoesferas feitas com 100 mg de lignina (NF3). A grande disponibilidade de lignina, que é resíduo industrial, sua não-toxicidade ao meio ambiente e aplicação tecnológica aqui reportada tornam esse biopolímero de grande potencial para aplicação no campo.

## ABSTRACT

*Annona mucosa* (ANNONACEAE) FOR PESTS CONTROL: BIOASSAY-GUIDED PHYTOCHEMICAL STUDY, SYNTHESIS OF MIMICS AND DEVELOPMENT OF NANOENCAPSULATION PROCESSES – The agriculture is one of the major drivers of Brazilian GDP. However, several losses have occurred during the agricultural productive process, especially the pest attack. Currently, leaf-cutting ants and the maize weevil have caused great economics losses and are hard to control. One alternative for these pests control is searching on nature for novel compounds with insecticide and fungicide potential. In this perspective, the first part of this work was the biassay-guided phytochemical study of *Annona mucosa*, searching for novel compounds with these properties. From the vegetal parts crude extracts, was verified great insecticide and fungicide potentials for its fractions. The phytochemical study of leaves and seeds crude extracts resulted on the isolation and identification of 11 secondary metabolites, 3 lignans, 4 acetogenins and 4 flavonoids, and confirmed the biological potential of these substances. Acetogenins are derived from fatty acid and are characterized by the presence of two main cores, diol-THF group and a  $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -lactone separated by an alkyl chain. Several researches aiming the acetogenins mimics total synthesis, with simplified structures, but keeping the biologically important functionalities, have been developed. Based on this idea, the second part of this work aimed the total synthesis of rolliniastatin-1 mimics, major acetogenin on the *A. mucosa* chemical composition. A complete synthetic route with 12 steps was developed in order to get the polyether mimics. Although, only one complete mimic was synthesized, the synthetic rout was completely established and a new simple methodology of sequential vinyl ether exchange-Claisen Rearrangement was employed for the synthesis of  $\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes. Besides, the key step, the oxidative cyclization, reaction for *treo-cis-treo* THF ring formation, was optimized by its yields and stereoselectivity. In the quest for developing new technologies for bioactive compounds application, the nanoencapsulaiton is a technique that results in controlled release systems of these substances and can be applied in several fields. In this way, the last part of this work was about the formulation development and improvement of process and parameters for the nanoencapsulation of the furofuranic lignan sesamin. To achieve that, a  $2^3$  factorial design was performed, where were evaluated the effect of the independent variables (type and amount of polymer and

amount of oil) on the nanoparticles physical-chemistry characteristics and on the trapping, recovery and release rates. The biopolymers poly-  $\epsilon$ -caprolactone and lignin were employed and colloidal suspensions of nanocapsules and nanospheres were prepared. The results from the factorial design proved the efficiency of both biopolymers and the best nanoformulation was the nanospheres suspension produced with 100 mg of lignina (NF3). The wide availability of lignin, which is an industrial residue, its non-toxicity to the environment and the technological application reported make this biopolymer a great potential for use in agricultural field.

# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 – Uso de produtos naturais como inseticidas .....	2
1.2 – <i>Annona mucosa</i> (Annonaceae) .....	3
1.3 – <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (Formigas cortadeiras) .....	4
1.4 – <i>Sitophilus zeamais</i> (Gorgulho do milho) .....	6
1.5 – Métodos de controle para <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e <i>Sitophilus zeamais</i> ....	6
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>9</b>
3.1 – Materiais .....	9
3.2 – Equipamentos .....	10
3.3 – Material botânico .....	11
3.4 – Obtenção dos extratos de <i>Annona mucosa</i> .....	11
3.5 – Partição líquido-líquido dos extratos de <i>Annona mucosa</i> .....	12
3.6 – Estudo da fração MUSHi .....	14
3.7 – Estudo da fração MUFHe .....	15
3.8 – Estudo da fração MUFA .....	17
3.9 – Metodologia dos ensaios biológicos .....	21
3.9.1 – Ensaios por ingestão com as operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> .....	21
3.9.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	22
3.9.3 – Ensaio biológico com <i>Sitophilus zeamais</i> .....	23
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
4.1 – Ensaios biológicos dos extratos e frações de <i>A. mucosa</i> .....	25
4.1.1 – Efeito dos extratos de <i>A. mucosa</i> frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> , ao gorgulho do milho, <i>S. zeamais</i> , e ao fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....	25
4.1.2 – Efeito das frações de <i>A. mucosa</i> frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> , ao gorgulho do milho, <i>S. zeamais</i> , e ao fungo simbiote <i>L. gongylophorus</i> .....	28
4.2 – Fitoquímica de <i>Annona mucosa</i> .....	31
4.2.1 – Substâncias identificadas .....	31
4.2.2 – Identificação estrutural .....	34
4.2.2.1 – Lignanas .....	34
4.2.2.1.1 – Identificação estrutural da substância I .....	36
4.2.2.1.2 – Identificação estrutural da substância II .....	43
4.2.2.1.3 – Identificação estrutural da substância III .....	49
4.2.2.2 – Acetogeninas .....	55
4.2.2.2.1 – Identificação estrutural das substâncias IV, V e VI .....	57
4.2.2.2.2 – Identificação estrutural da substância VII .....	77
4.2.2.3 – Flavonoides .....	84
4.2.2.3.1 – Identificação estrutural da substância VIII .....	86
4.2.2.3.2 – Identificação estrutural da substância IX .....	91
4.2.2.3.3 – Identificação estrutural da substância X .....	95
4.2.2.3.4 – Identificação estrutural da substância XI .....	99
4.3 – Avaliação das atividades biológicas da rolliniastatina-1 .....	104

<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>117</b>
1.1 – Produtos naturais como estruturas-modelo para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas .....	117
1.2 – Acetogeninas e seu potencial biológico.....	118
1.3 – Síntese de mímicos de acetogeninas.....	119
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>124</b>
<b>3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>125</b>
3.1 – Síntese do fragmento contendo o anel THF com estereoquímica <i>treo-cis-treo</i> .....	125
3.2 – Síntese dos fragmentos contendo a cadeia poliéter.....	130
3.3 – Síntese final dos mímicos.....	132
<b>4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>135</b>
4.1 – Procedimentos Gerais .....	135
4.2 – Procedimentos reacionais .....	136
<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>152</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>153</b>

## **CAPÍTULO III**

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>157</b>
1.1 – Nanomateriais como sistemas de liberação controlada de princípio ativo..	157
1.2 – Nanopartículas poliméricas .....	157
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>160</b>
<b>3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>161</b>
3.1 – Materiais.....	161
3.2 – Equipamentos.....	162
3.3 – Nanoformulações de sesamina .....	164
3.3.1 – Isolamento da lignana sesamina .....	164
3.3.2 – Análise cromatográfica, construção da curva analítica e validação do método para análise de sesamina por CLAE .....	164
3.3.3 – Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> e preparo das nanoformulações de sesamina	166
3.3.4 – Preparo dos produtos secos por aspersão .....	168
3.3.5 – Quantificação e caracterização físico-química nas nanopartículas .....	169
3.3.5.1 - Determinação da quantidade total de sesamina – Recuperação absoluta .....	169
3.3.5.2 – Determinação da eficiência de encapsulamento de sesamina .....	170
3.3.5.3 – Determinação do pH.....	170
3.3.5.4 – Diâmetro médio/Potencial zeta das nanopartículas .....	171
3.3.5.5 – Morfologia .....	171
3.3.6 – Estudo de cinética de liberação .....	171
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>173</b>

4.1 – Análise cromatográfica e identificação espectroscópica de sesamina .....	173
4.2 – Validação do método analítico para quantificação de sesamina por CLAE	176
4.3 – Quantificação e caracterização físico-química das nanopartículas .....	179
4.4 – Cinética de liberação das nanopartículas .....	183
4.5 – Avaliação do planejamento fatorial .....	185
4.6 – Avaliação da morfologia .....	189
<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>192</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>193</b>

## **CAPÍTULO I**

**Estudo fitoquímico biomonitorado de *Annona mucosa*  
sobre *Atta sexdens rubropilosa*, *Leucoagaricus  
gongylophorus* e *Sitophilus zeamais***



## **1 – INTRODUÇÃO**

A população mundial vem crescendo a uma taxa alarmante e estima-se que atingirá o total de 9 bilhões de pessoas em 2050 (FAO, 2009). Diante disso, o grande desafio atual é conciliar a produção de alimentos para esse contingente com agricultura sustentável e proteção do meio ambiente (BOMMARCO *et al.*, 2013; HUSSAIN *et al.*, 2015). O aumento necessário na produção de alimentos pode ser alcançado via extensificação da agricultura, ou seja, aumento da extensão de terra cultivada, ou via intensificação, o que significa aumentar o rendimento das terras atualmente cultivadas (TILMAN *et al.*, 2011).

A extensão atual de terras empregadas para a agricultura e pecuária compreendem cerca de 38% da superfície terrestre (FOLEY *et al.*, 2011). Fica claro assim que cada hectare de cultura existente necessitará produzir alimentos em um nível substancialmente maior que o produzido atualmente (ITTERSUM *et al.*, 2013). Acredita-se que o aumento de produtividade das terras agricultáveis pode alcançar 58% do volume atual (FOLEY *et al.*, 2011; FRITZ *et al.*, 2015).

Mesmo já sendo um dos maiores produtores agrícolas do mundo, o Brasil é um país com grande potencial para aumento de sua produtividade de maneira sustentável pois conta com clima diversificado, energia solar abundante, chuvas regulares, quase 13% de toda água doce do planeta e grandes extensões de terras agricultáveis férteis e de alta produtividade (ITTERSUM *et al.*, 2013; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004).

No entanto, diversas perdas podem ocorrer durante o processo produtivo que prejudicam a produção agrícola de um país, destacando-se o aparecimento de pragas como insetos, fungos e plantas daninhas. Nesse contexto, o Brasil possui uma das mais ricas e diversificadas faunas de predadores e parasitoides de insetos-pragas agrícolas do planeta, o que o coloca na posição de maior consumidor mundial de pesticidas (BUENO *et al.*, 2011).

Dentre os pesticidas para controle de insetos, os inseticidas, os mais amplamente utilizados no mundo são os neonicotinóides e o fipronil, que correspondem a cerca de 1/3 do mercado de inseticidas (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). Além destes, outros inseticidas sintéticos amplamente empregados na agricultura são o DDT (Diclorodifenilcloroetano) e piretróides (DAVIES *et al.*, 2007).

No entanto, o uso em larga escala desses inseticidas tem gerado problemas como o aparecimento de resistência, contaminação ambiental devido à sua persistência no solo e na água e atingem espécies selvagens da biodiversidade que são importantes para o ecossistema e em alguns casos estão relacionados com o aparecimento de atividade carcinogênica e mutagênica (BONMATIN *et al.*, 2015; CHAGNON *et al.*, 2015; MREMA *et al.*, 2013).

Surge assim, a necessidade de se desenvolver novas metodologias de controle de pragas para substituir o uso intensivo desses inseticidas. Diante desse quadro, tem aumentado significativamente o número de trabalhos visando a descoberta de novos inseticidas a partir de metabólitos secundários de plantas (KISHORE *et al.*, 2014).

### 1.1 – Uso de produtos naturais como inseticidas

A atual busca por compostos inseticidas na natureza se baseia na grande riqueza da flora brasileira e no fato de os metabólitos secundários de plantas serem biodegradáveis, não deixando resíduos no meio ambiente ou nos alimentos (DAYAN *et al.*, 2009; SPARKS 2013).

Estima-se que no Brasil existem entre 55.000-60.000 espécies de plantas vasculares que produzem uma grande variedade de substâncias com variadas propriedades biológicas e esqueletos estruturais (FIASCHI e PIRANI, 2009). Assim, a natureza passa a ser um enorme atrativo na busca de substâncias para controle de pragas, principalmente levando-se em consideração que apenas uma pequena parcela dessas foi investigada com esta finalidade (GERWICK e SPARKS, 2014).

Vários metabólitos secundários de diferentes classes já são atualmente empregados na agricultura oriundos das mais diversas fontes como plantas, fungos e bactérias. Como exemplos de inseticidas naturais obtidos de plantas e empregados na agricultura têm-se os alcaloides nicotina e estricnina, os terpenoides azadiractina e as piretrinas, sendo que a azadiractina foi o único novo inseticida botânico lançado no mercado americano nos últimos 20 anos e ainda flavonoides e fenólicos como o eugenol, a karanjina e a rotenona (COPPING e DUKE 2007; DAYAN *et al.*, 2009; MIRESMAILLI e ISMAN, 2014).

Segundo JACOBSON (1989), algumas famílias promissoras para o estudo de compostos com atividade inseticida são Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiatae e Canellaceae. Outros estudos mostram também o potencial

de algumas famílias como fonte de compostos inseticidas, entre essas, Anacardiaceae, Euphorbiaceae, Pedaliaceae, Leguminosae, Solanaceae dentre outras (BUENO *et al.*, 2004a; 2004b; CROMBIE, 1990; HENRICK, 1994; ROY *et al.*, 1987).

### 1.2 – *Annona mucosa* (Annonaceae)

A família Annonaceae pertence ao grupo das Eudicotiledôneas, ordem Magnoliales (PIERSON *et al.*, 2012). É uma família muito diversa e que compreende aproximadamente 112 gêneros e 2440 espécies encontradas predominantemente em florestas tropicais de planície (COUVREUR *et al.*, 2011). No Brasil ocorrem 29 gêneros e 386 espécies sendo os gêneros mais comuns *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia* e *Rollinia* (LOPES e MELLO-SILVA, 2014). As espécies de Annonaceae têm sido intensivamente investigadas nos últimos 30 anos devido, principalmente, à descoberta das acetogeninas, mas também foram relatados para essa família o isolamento de muitos alcalóides isoquinolínicos, flavonoides, ciclopeptídeos e algumas lignanas (BERMEJO *et al.*, 2005; ESTRADA-REIS *et al.*, 2002; LIAW *et al.*, 2010; POMILIO *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2000; TEMPONE *et al.*, 2005; WÉLÉ *et al.*, 2009).

As acetogeninas formam uma classe de metabólitos secundários C35 ou C37 derivados do caminho dos policetídeos, contendo funções oxigenadas ao longo da cadeia alquílica e uma unidade  $\gamma$ -lactônica terminal, insaturada ou não (BERMEJO *et al.*, 2005). Mais de 500 acetogeninas foram isoladas de plantas da família Annonaceae. Essas estruturas químicas apresentam um amplo espectro de atividades biológicas como antitumoral, citotóxica, imunossupressiva, antiparasitária e inseticida dentre as quais, destacam-se as atividades citotóxica e pesticida (CHAHBOUNE *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2011; COLOM *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2014; DANG *et al.*, 2011; GUADAO *et al.*, 2000; KOJIMA e TANAKA, 2009; LEATEMIA e ISMAN, 2004; LIAW *et al.*, 2010; ZAFRA-POLO *et al.*, 1996).

Tem sido reportado repetidamente na literatura que as acetogeninas desempenham um importante papel na proteção das plantas contra patógenos e insetos herbívoros, o que explica seu promissor potencial inseticida. Isso tem despertado o estudo dessa família, principalmente no tocante às propriedades inseticidas (ALKOFAHI *et al.*, 1989 apud COLOM *et al.*, 2009; COLE, 1994; GAJALAKSHMI, *et al.*, 2011).

O gênero *Rollinia* (Annonaceae) é composto por 65 espécies, algumas das quais já foram previamente investigadas do ponto de vista farmacológico (KUO *et al.*, 2001; 2004). Este gênero é considerado muito próximo do gênero *Annona* e os dois gêneros juntos somam aproximadamente 175 espécies. Estudos moleculares e morfológicos mostraram que o gênero *Rollinia* deveria ser incorporado ao gênero *Annona*. Em 2007, todas as mudanças de nomenclatura necessárias foram apresentadas. Mais tarde, essa decisão taxonômica foi reforçada por estudos filogenéticos (CHATROU *et al.*, 2009; MAAS e WESTRA, 2010; RAINER, 2007).

*Annona mucosa*, popularmente conhecida como “biribá”, é uma árvore tropical frutífera de ampla distribuição. Ocorre na Índia ocidental e Indonésia e na América Central, sendo encontrada do México ao Brasil (ESTRADA-REYES *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2001; KUO *et al.*, 2001). Esta espécie tem sido empregada na medicina popular como agente terapêutico no tratamento de tumores na Índia ocidental e Indonésia e estudos mostraram que o extrato hexânico desta planta possui atividade ansiolítica (ESTRADA-REYES *et al.*, 2010; HARTWELL 1982 apud KUO *et al.*, 2001; KUO *et al.*, 2004; PETTIT *et al.*, 1987)

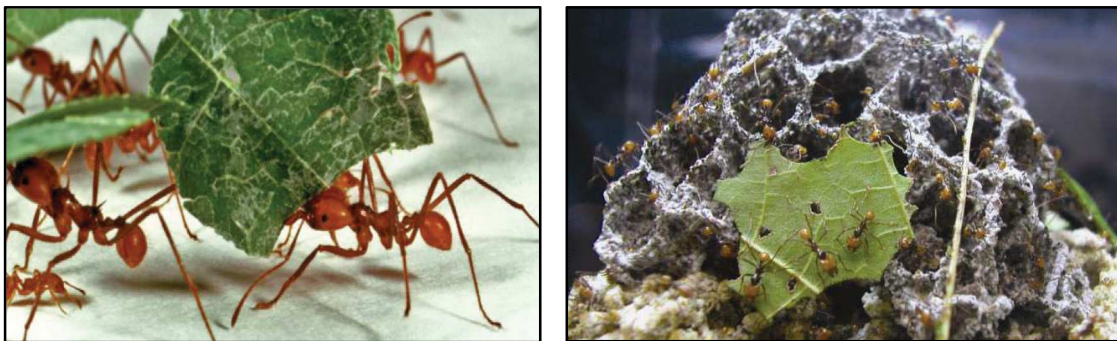
O estudo fitoquímico desta planta revelou-a como uma rica fonte de metabólitos secundários, sendo encontrados como principais classes acetogeninas, alcalóides, lignanas e esteróides com um ampla gama de atividades biológicas, das quais se destacam as atividades inseticida e anti-tumoral (CHÁVEZ *et al.*, 1998; 1999; CHEN *et al.*, 1996a; 1996b; ESTRADA-REYES *et al.*, 2002; FIGUEIREDO *et al.*, 1999; GU *et al.*, 1997; KUO *et al.*, 2001; 2004; LIAW *et al.*, 2003; SHI *et al.*, 1996a; 1996b), despertando assim, o interesse no estudo dessa espécie como fonte de metabólitos secundários para controle de pragas presentes da agricultura brasileira como a formiga cortadeira da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*.

### **1.3 – *Atta sexdens rubropilosa* (Formigas cortadeiras)**

As formigas, grupos de insetos mais abundantes na biosfera, pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera e estão reunidas na família Formicidae. São considerados insetos eussociais, ou seja, uma colônia de formigas é tida como um superorganismo, porque ela exhibe fenômenos sociais, como cuidados e cooperação entre companheiras de ninho, divisão de tarefas, em que cada casta realiza sua

função e ainda há sobreposição de gerações e cuidados com a prole (DELLA LUCIA *et al.*, 2014; EIVSON e HUGHES, 2011; PURCEL *et al.*, 2012).

As formigas cortadeiras (Figura 1.1), dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas uma das principais ameaças à produção agrícola brasileira. Conhecidas pelo forte poder de destruição, atacam plantas em qualquer estágio de desenvolvimento cortando suas folhas que são carregadas para o interior dos ninhos. Causam significativas perdas na agricultura, principalmente em florestas implantadas de *Pinus* e *Eucalyptus* (SOUTO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2011; ZANETTI *et al.*, 2014).



**Figura 1.1** – Formigas cortadeiras (Fontes: AYLWARD *et al.*, 2012; NOWAK *et al.*, 2006)

As formigas pertencentes à tribo Attini vivem em simbiose obrigatória com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*. Nessa relação mutualística complexa, as formigas fornecem o material vegetal que é utilizado como substrato para crescimento do fungo simbiote, proteção e dispersão do fungo para novos ninhos via transmissão vertical. O fungo por sua vez produz enzimas que reduzem polissacarídeos em açúcares menores que servem de alimento para as formigas e sua larva (CAFARO *et al.*, 2011; ESTRADA *et al.*, 2013; HOLLOBLER e WILSON; 1990; SILVA *et al.*, 2003).

Uma vez que a integridade dos jardins de fungo é essencial para a sobrevivência da colônia, acredita-se que a seleção de plantas a serem cortadas pelas formigas é baseada na tentativa de prevenir a introdução de microorganismos estranhos aos jardins de fungo. Por outro lado, a existência desta relação simbiótica é uma das razões do sucesso ecológico das formigas cortadeiras, pois, ao não utilizar o material vegetal cortado diretamente como fonte de alimentação, isso protege as formigas dos mecanismos de defesa químicos das plantas e aumenta assim a

variedade de espécies vegetais das quais podem se alimentar (ESTRADA *et al.*, 2013; VASCONCELOS e FOWLER, 1990).

#### **1.4 – *Sitophilus zeamais* (Gorgulho do milho)**

O gorgulho do milho, *S. zeamais*, é um coleóptero pertencente à família Curculionidae. Os adultos de *S. zeamais* são pequenos besouros castanhos-escuros, com aparelho bucal do tipo mastigador, possuindo mandíbulas fortes o suficiente para romperem a dureza dos grãos armazenados (BOTTON *et al.*, 2005; GALLO *et al.*, 2002).

Encontrado em todas as regiões quentes e tropicais do mundo, o gorgulho é praga primária de milho, trigo, arroz e sorgo, podendo também se desenvolver em produtos de cereais processados, como macarrão e em mandioca desidratada (KASSA *et al.*, 2002; TREMATERRA, 2009).

Dentre as características que fazem deste inseto uma das pragas mais prejudiciais ao milho armazenado, destacam-se o grande número de hospedeiros alternativos, seu elevado potencial biótico, polifagia, sua capacidade de penetração na massa, infestação cruzada e capacidade de atacar grãos tanto em depósitos quanto no campo (ALMEIDA *et al.*, 1999; GALLO *et al.*, 2002; PIKANÇO *et al.*, 2004). As perdas que decorrem do ataque deste inseto são principalmente de peso, de valor comercial e nutritivo do milho (NWOSU *et al.*, 2015; SANTOS & CRUZ 1984 apud SILVA *et al.*, 2007).

#### **1.5 – Métodos de controle para *Atta sexdens rubropilosa* e *Sitophilus zeamais***

As formigas cortadeiras atacam e danificam quase todas as espécies de plantas, trazendo considerável prejuízo à agricultura. No entanto, sabendo-se que elas também trazem benefícios ao meio ambiente, já que ao podar a vegetação, contribuem para o crescimento de algumas plantas, decompõe de forma rápida o material vegetal, além de arejar e revirar o solo, portanto, o combate a esses insetos não seria uma alternativa adequada e sim o seu controle. A grande dificuldade encontrada no controle das formigas cortadeiras se deve à ocorrência delas o ano todo, a facilidade de formação e estabilização de novas colônias e pela complexidade

de um formigueiro adulto (BENCKISER, 2010; MARINHO *et al.*, 2006; MONTOYA-LERMA *et al.*, 2012).

O controle das formigas cortadeiras pode ser feito por métodos mecânicos, químicos e biológicos. O método mecânico consiste na escavação do formigueiro e eliminação da rainha; o controle biológico baseia-se no emprego de predadores, parasitóides e microorganismos que utilizam a formiga cortadeira como hospedeira e o controle químico, em que o produto tóxico é aplicado diretamente nos ninhos em formas de líquidos termonebulizáveis, gases tóxicos, pós secos e iscas granuladas (BOARETTO e FORTI, 1997; SILVA e PAZINI, 2012). Atualmente, a utilização de iscas granuladas tem sido o método mais empregado, pois oferece maior segurança ao operador, dispensa mão-de-obra, equipamentos especializados e permite o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (PETERNELLI *et al.*, 2008; ZANETTI *et al.*, 2003). As iscas tóxicas foram inicialmente formuladas com o inseticida aldrin, que foi posteriormente substituído por dodecacloro, que por sua vez, foi substituído por sufloramida, após a proibição do uso de inseticidas clorados (ALMEIDA *et al.*, 2007; BOARETTO e FORTI, 1997; DELLA LUCIA *et al.*, 2014).

Para o controle de *Sitophilus zeamais*, o controle químico é o método mais utilizado devido, principalmente, à carência de métodos de controle alternativos eficientes (GUEDES *et al.*, 1995). No entanto, esta técnica esbarra na escassez de inseticidas registrados no mercado que dificulta a alternância de princípios ativos provocando, em alguns casos, ocorrência de populações resistentes (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Esses inseticidas sintéticos, que são utilizados no controle químico das duas pragas estudadas, são em sua maioria organoclorados e fosforados que geram problemas de contaminação do meio ambiente, aparecimento de resistência e não-seletividade como descrito anteriormente, surgindo assim, a necessidade de se buscar substâncias naturais com propriedades inseticidas para o controle dessas pragas sem danos ao homem e ao meio ambiente (DELLA LUCIA *et al.*, 2014). Uma segunda alternativa para o controle das formigas cortadeiras consiste no combate ao fungo simbiote como forma de controlar o formigueiro, pois, devido à simbiose existente, a eliminação do fungo acarreta a morte das formigas justificando assim, a busca também por compostos naturais com propriedades fungicidas.

## **2 – OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo geral busca de novos compostos com potencial inseticida e/ou fungicida a partir da espécie *Annona mucosa* (Annonaceae).

Os objetivos específicos são:

**a)** Preparo de extratos e partições das partes vegetais de *Annona mucosa*, e avaliação do potencial inseticida destes frente às formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa* e o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais*, bem como avaliação do potencial fungicida frente ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

**b)** Isolamento e caracterização estrutural das substâncias dos extratos de folhas, ramos e sementes de *Annona mucosa*.

**c)** Avaliação do potencial inseticida e/ou fungicida das substâncias isoladas frente aos organismos citados no item a.



### **3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 – Materiais**

##### Material cromatográfico

Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) usando folhas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, com 0,2 mm de espessura da Merck;

- Cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica-gel 70-230 mesh e 230-400 mesh da ACROS ORGANICS;

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária a fase reversa Phenomenex Luna C-18, analítica (10 µm, 25,0 x 0,46 cm) e preparativa (10 µm, 25,0 x 1,0 cm);

- Cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20, da Amersham Pharmacia Biotech AB.

##### Solventes

Solventes comerciais destilados no Departamento de Química da UFSCar;

Solventes grau CLAE da MERCK, TEDIA e da J. T. BAKER;

Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL-CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, com % de deutério de 99,8% para CDCl<sub>3</sub> e MeOD e 99,9% para DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Água ultra pura proveniente de sistema de filtragem e osmose reversa (0,08 µS) obtida através de equipamento modelo Master System – Gehaka

##### Reveladores

Câmara de luz UV ( $\lambda = 254$  e  $365$  nm);

Solução de vanilina;

Reagente de Kedde.

## **3.2 – Equipamentos**

### Evaporadores rotatórios

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

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

### Balança analítica

Sartorius modelo BP210S;

Bel Engineering Mod. Mark 210A

### Câmara de UV

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

### Cromatógrafo para cromatografia líquida de alta eficiência

SHIMADZU LC-6AV, condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo e “loop” de 200 µL;

Agilent Technologies modelo 1200 equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A e detector UltraVioleta G1314B. Equipamento acoplado a uma interface G1369A, software EZChrom Ellite;

Agilent Technologies modelo 1260 equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329B e detector UltraVioleta G1314B e compartimento termostaticado de coluna G1316A. Os cromatogramas foram registrados no software OpenLab.

### Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

BRUKER AVANCE™ III NanoBay 9,4T (400MHz para RMN <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN <sup>13</sup>C) – DQ-UFSCar.

### Espectrômetro de CL-EM

Cromatógrafo Agilent Technologies 1260, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, amostrador automático G1367B e detector de arranjo de diodos (DAD) G1314D, forno de coluna G1316A. Acoplado ao espectrômetro de

massas API 2000 (APPLIED BIOSYSTEMS). Fonte de ionização IES. Analisador ‘triplo quadrupolo’. Software utilizado para processamento dos dados: Analyst 1.5.1.

#### Polarímetro

Polarímetro Schmidt – Haensch, modelo Polatronic H100, utilizando célula de quartzo de 1dm de largura à 23 ° C.

### **3.3 – Material botânico**

As partes vegetais, folhas, ramos e sementes, de *Annona mucosa*, foram coletadas no Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Quieroz” (ESALQ/USP) em Piracicaba em 17 de março de 2011 (latitude: 22°42’26” sul; longitude: 47°37’39” oeste). A identificação das espécies foi feita pelo Dr. Renato de Mello-Silva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e a exsicata depositada no herbário da ESALQ/USP com o número de referência 120985.

### **3.4 – Obtenção dos extratos de *Annona mucosa***

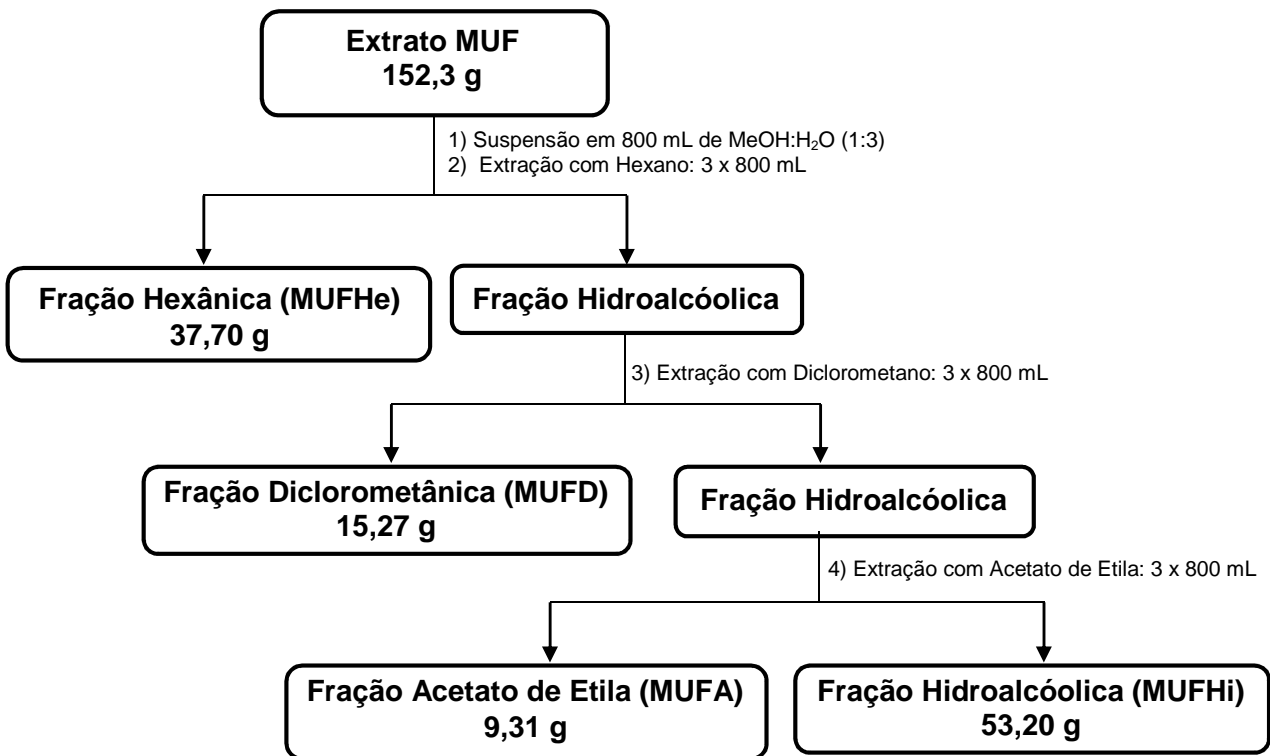
Os extratos brutos foram preparados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. As partes vegetais, folhas, ramos e sementes, foram secas em estufa de circulação a 40 °C durante aproximadamente 3 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material vegetal seco e moído das folhas foi submetido a três extrações consecutivas com um intervalo de três dias entre cada extração utilizando-se etanol como solvente. A Tabela 3.1 apresenta as massas dos materiais vegetais secos e moídos e as respectivas massas dos extratos brutos obtidos ao fim da extração com etanol.

**Tabela 3.1** - Extratos brutos das partes vegetais de *Annona mucosa*

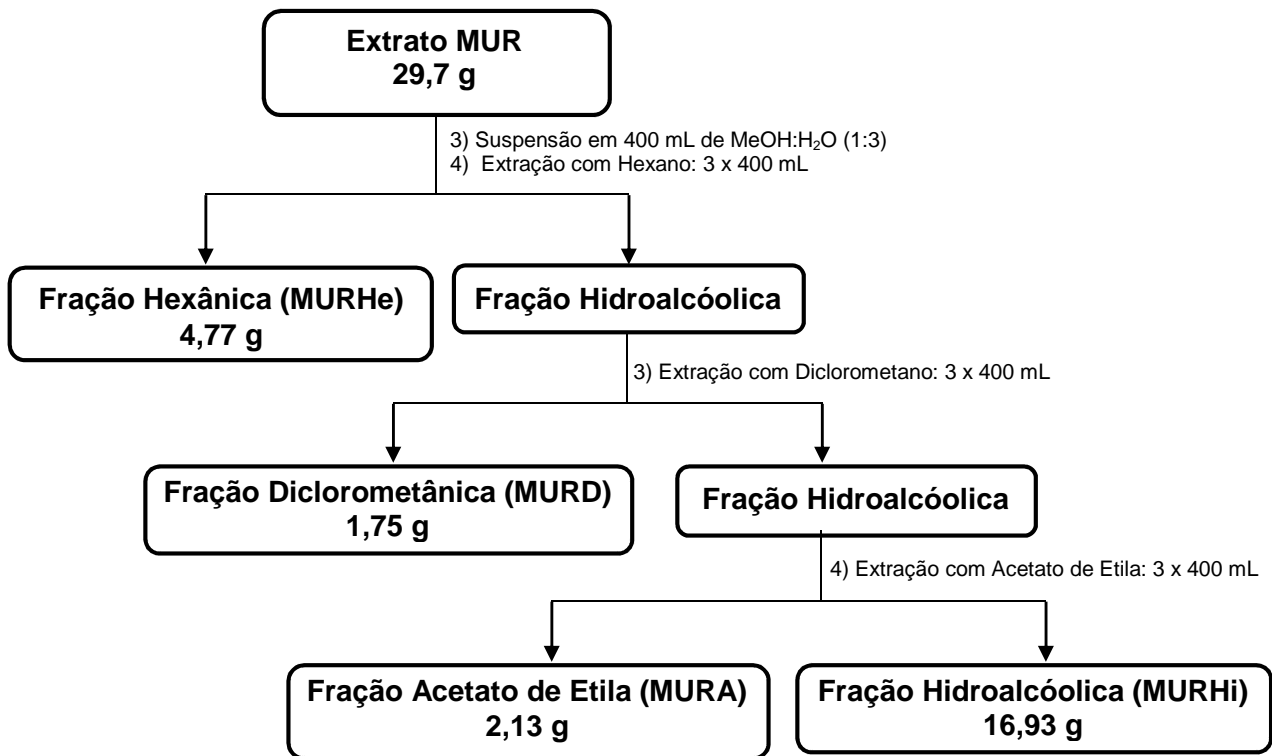
Parte vegetal	Código	Massa seca e moída (g)	Massa do extrato EtOH (g)	Rendimento (%)
Folhas	MUF	1316,0	162,4	12,3%
Ramos	MUR	528,3	31,1	5,9%
Sementes	MUS	582,7	106,7	18,3%

### 3.5 – Partição líquido-líquido dos extratos de *Annona mucosa*

A metodologia empregada na partição líquido-líquido dos extratos brutos das folhas e dos ramos baseou-se no preparo de uma solução hidroalcoólica de cada extrato em questão onde este foi solubilizado em uma solução Metanol/H<sub>2</sub>O (1:3) e subsequentemente extraído com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila, obtendo-se quatro frações (Fluxogramas 3.1 e 3.2). As frações foram então concentradas em evaporador rotatório até a eliminação completa do solvente.

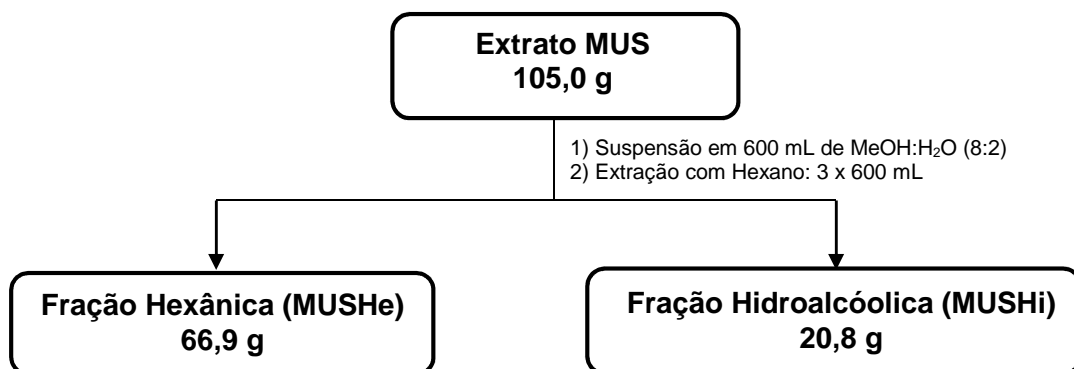


**Fluxograma 3.1** – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *A. mucosa* (MUF).



**Fluxograma 3.2** – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido do extrato etanólico dos ramos de *A. mucosa* (MUR).

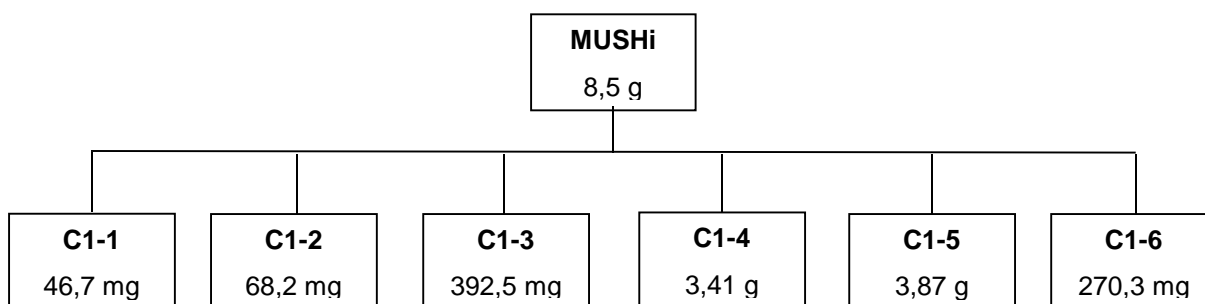
Para a partição líquido-líquido do extrato bruto das sementes, rico em óleo, empregou-se uma metodologia onde este extrato foi solubilizado em uma solução Metanol/H<sub>2</sub>O (8:2) e subseqüentemente extraído com hexano, gerando uma fase hexânica oleosa e uma fase hidroalcoólica parcialmente livre do óleo (Fluxograma 3.3).



**Fluxograma 3.3** – Metodologia utilizada na partição líquido-líquido do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* (MUS).

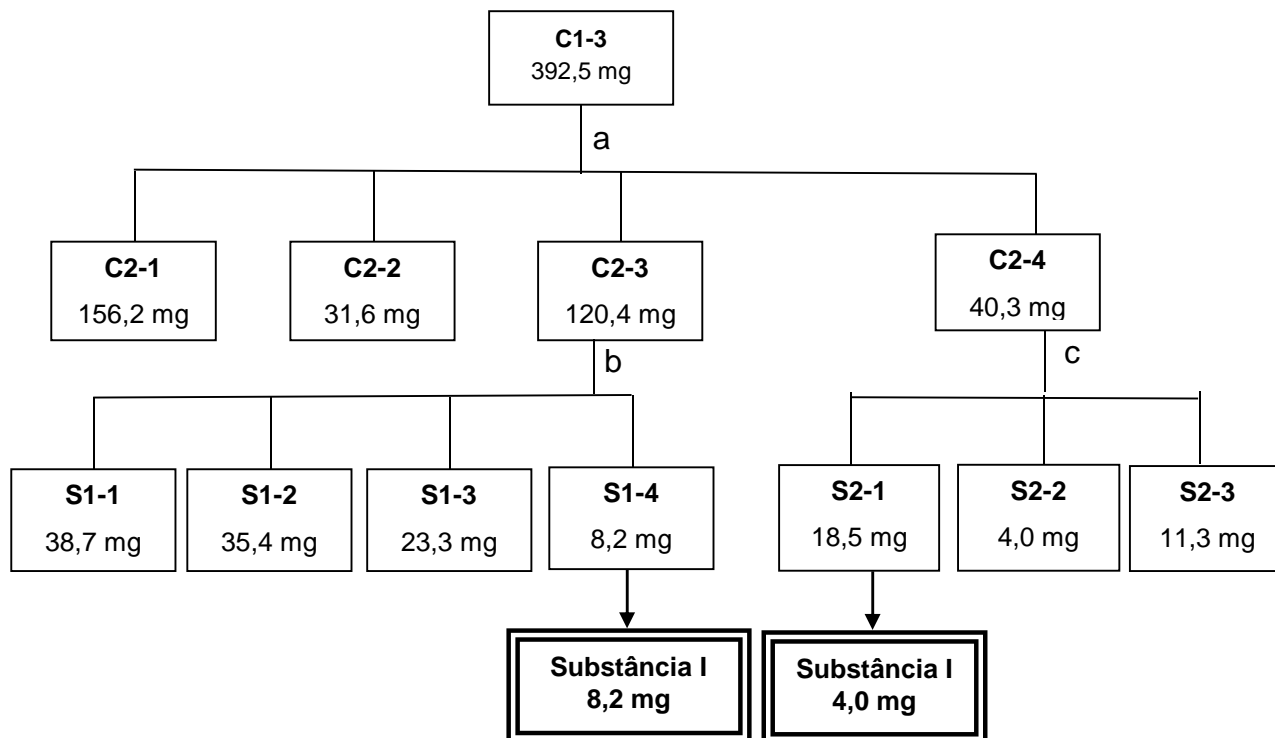
### 3.6 – Estudo da fração MUSHi

O primeiro fracionamento da fração hidroalcolica (MUSHi) do extrato etanólico das sementes de *A. mucosa* resultou em 6 que foram ensaiadas frente ao *Sitophilus zeamais* (Fluxograma 3.4). Com base nos resultados do ensaio biológico, a fração C1-4 foi submetida a fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência, levando ao isolamento das substâncias IV-VII (Fluxograma 3.6), enquanto o estudo da fração C1-3 resultou na obtenção da substância I (Fluxograma 3.5).



#### Fluxograma 3.4 – Fracionamento da fração MUSHi.

Cromatografia por adsorção: coluna de vidro ( $\phi = 5$  cm,  $h = 35$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição gradiente: Hexano:Diclorometano:Acetato de Etila:Metanol.

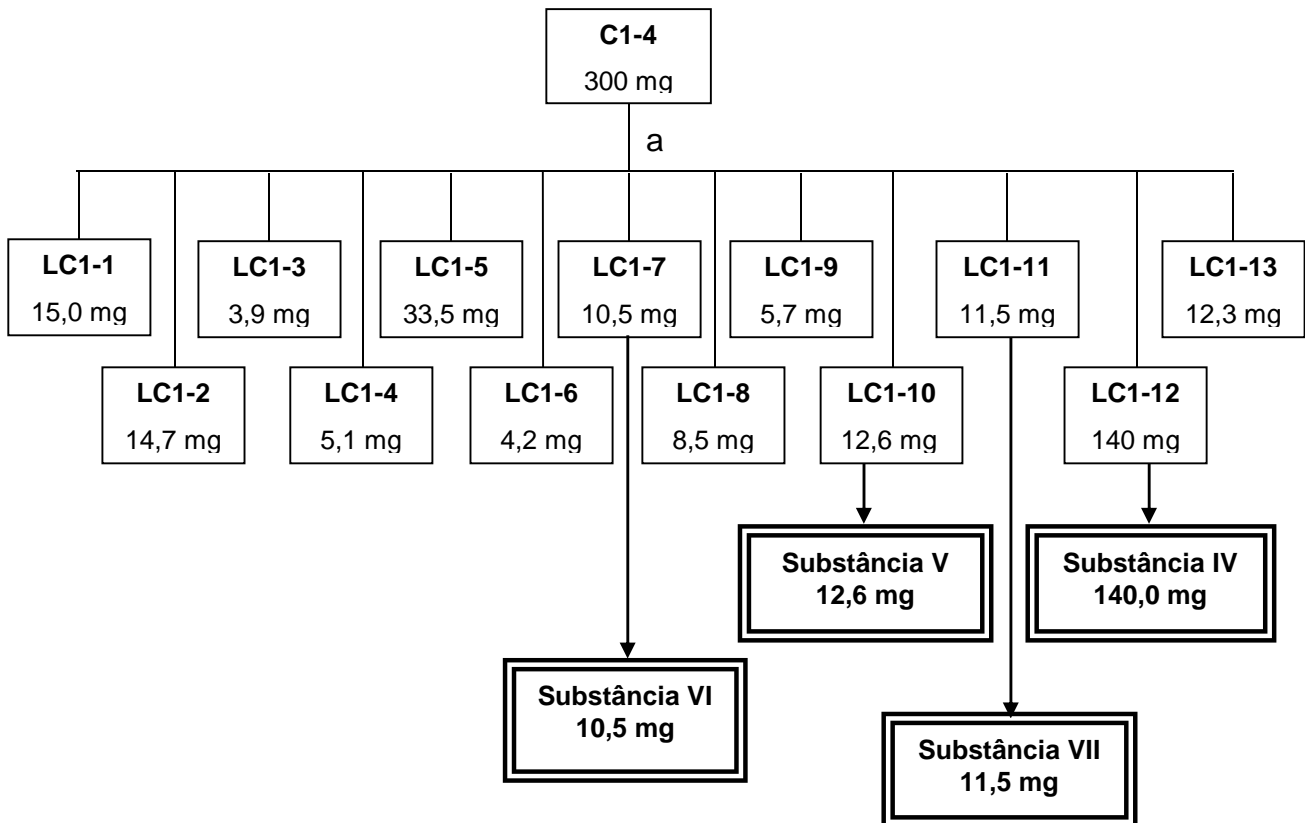


#### Fluxograma 3.5 – Fracionamento da fração C1-3.

a) Cromatografia por adsorção: coluna de vidro ( $\phi = 3,0$  cm,  $h = 28$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição gradiente: Hexano:Diclorometano:Acetato de Etila:Metanol

b) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2$  cm,  $h = 56$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

c) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2$  cm,  $h = 56$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

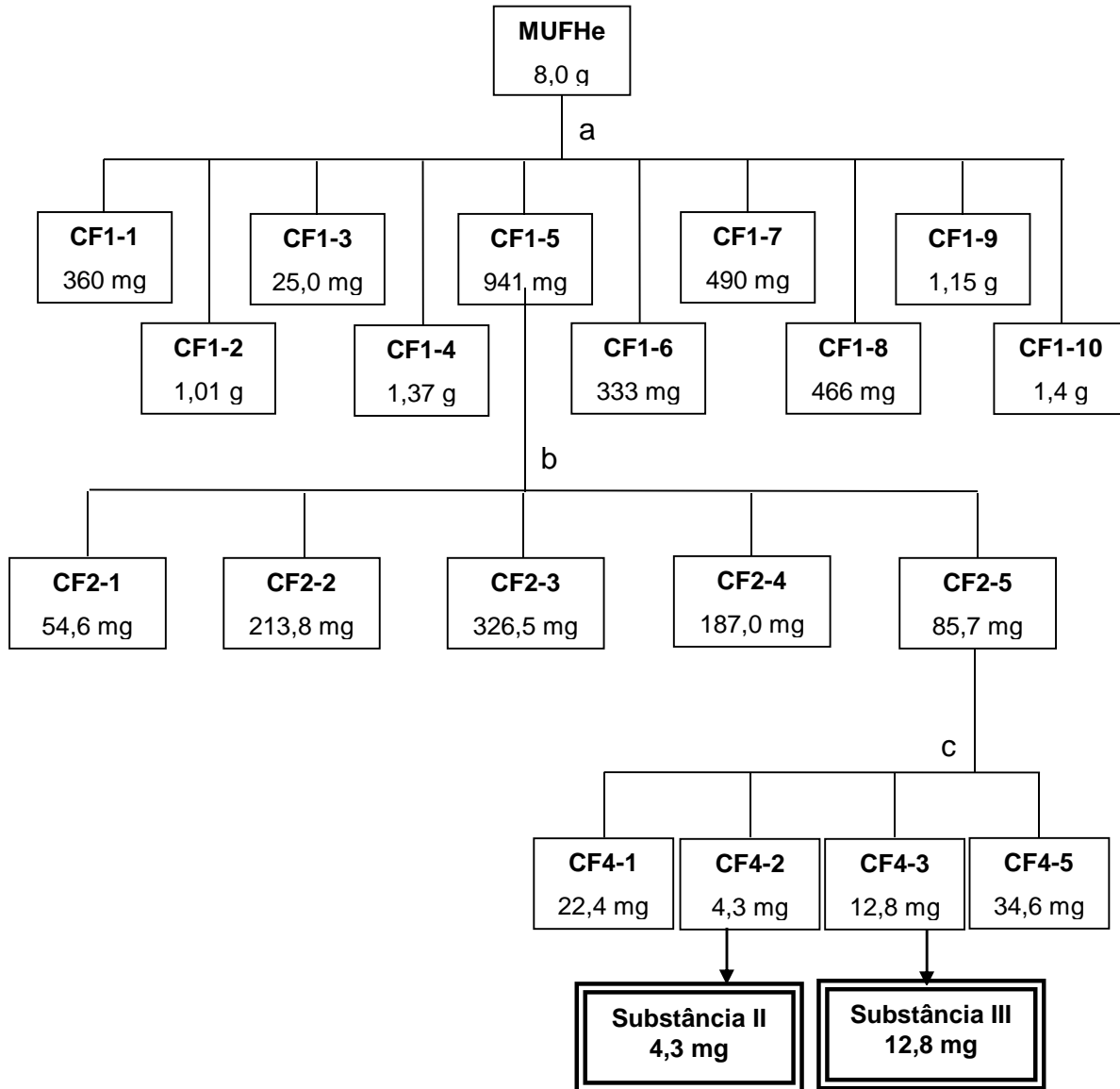


**Fluxograma 3.6** – Fracionamento da fração C1-4.

a) CLAE analítico e preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna 10 µm (analítica:  $\varnothing = 0,46$  cm, h = 25 cm; e preparativa:  $\varnothing = 1,0$  cm, h = 25 cm); eluição isocrática ACN:H<sub>2</sub>O 73:27; fluxo analítico de 1,0 mL/min e preparativo de 5,0 mL/min; loop de 200 µL e detector UV 210 e 254 nm.

### 3.7 – Estudo da fração MUFHe

A fração hexânica (MUFHe) do extrato etanólico das folhas de *A. mucosa* foi submetida a sucessivos fracionamentos por cromatografia por adsorção, utilizando sílica-gel como fase estacionária e resultou na obtenção das substâncias II e III (Fluxogramas 3.7 e 3.8).



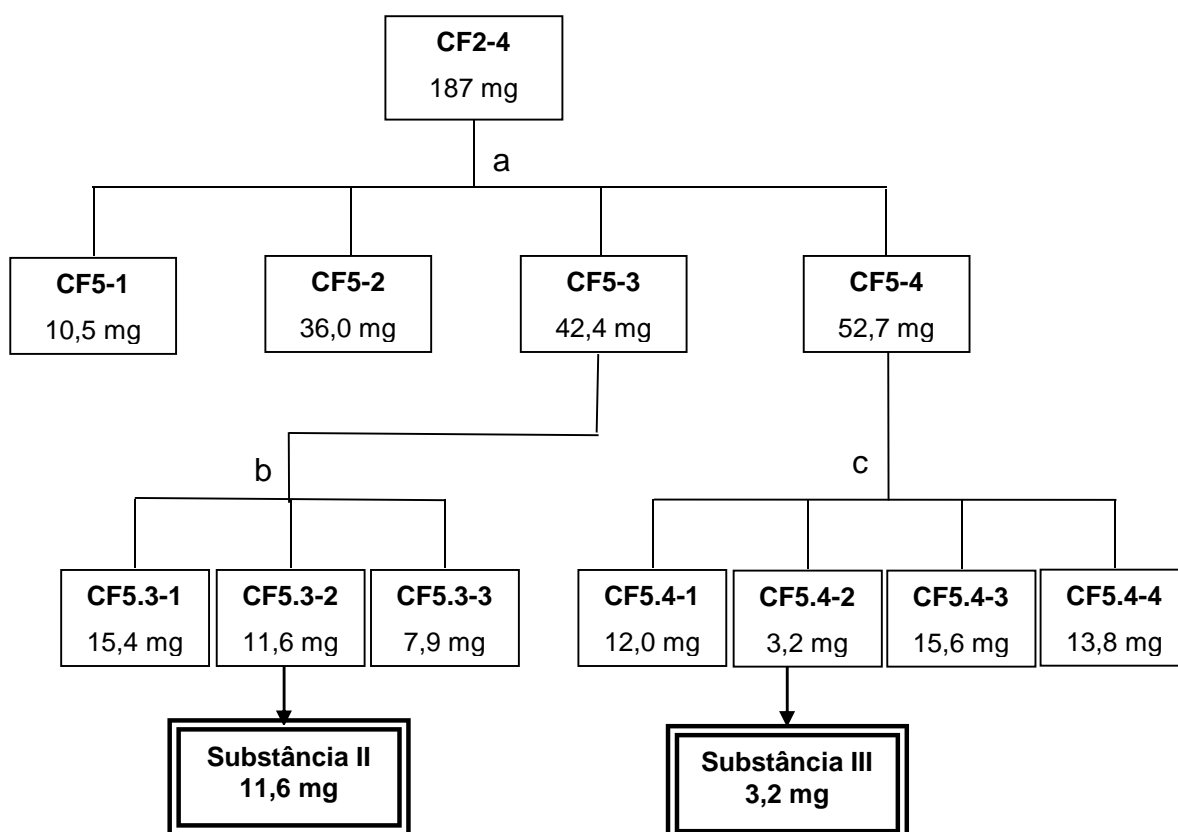
**Fluxograma 3.7 – Fracionamento da fração MUFHe.**

a) Cromatografia por adsorção: coluna de vidro ( $\phi = 4,8$  cm,  $h = 30$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição gradiente: Hexano:Diclorometano:Acetato de Etila:Metanol

b) Cromatografia por adsorção; coluna de vidro ( $\phi = 4,8$  cm,  $h = 30$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição isocrática Hexano:Acetona 3:1

c) Cromatografia por adsorção; coluna de vidro ( $\phi = 3,0$  cm,  $h = 35$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição isocrática Diclorometano:Acetona 4,9:0,1.





**Fluxograma 3.8** – Fracionamento da fração CF2-4.

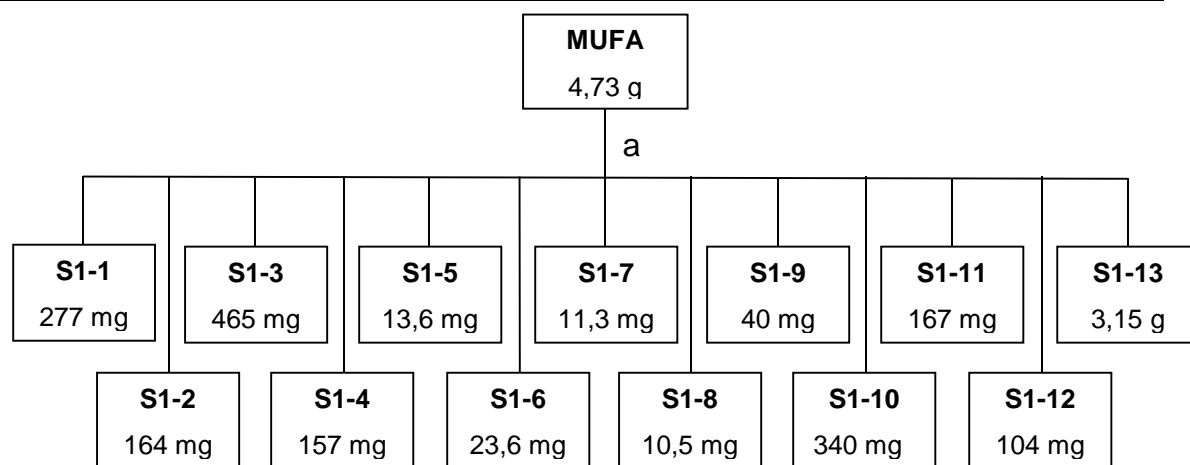
a) Cromatografia por adsorção: coluna de vidro ( $\phi = 3,0$  cm,  $h = 57$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição isocrática: Diclorometano 100%.

b) Cromatografia por adsorção; coluna de vidro ( $\phi = 1,3$  cm,  $h = 30$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição isocrática Hexano:Acetona 3:1

c) Cromatografia por adsorção; coluna de vidro ( $\phi = 1,3$  cm,  $h = 45$  cm), fase estacionária: sílica-gel (230-400 Mesh), eluição isocrática Diclorometano:Acetona 4,9:0,1.

### 3.8 – Estudo da fração MUFA

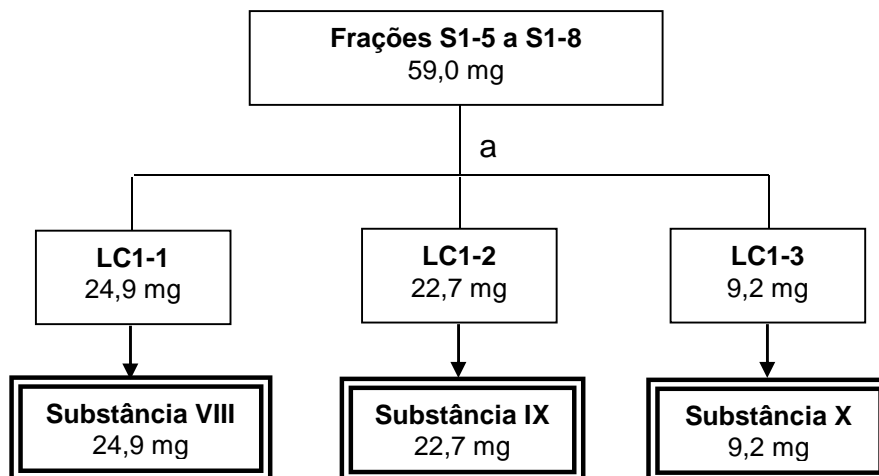
A fração acetato de etila (MUFA) do extrato etanólico das folhas de *A. mucosa* foi submetida a sucessivos processos de purificação por cromatografia por exclusão utilizando sephadex-LH 20 como fase estacionária. No primeiro processo (Fluxograma 3.9), foram obtidas 13 frações, onde, através de análises de RMN de  $^1\text{H}$ , verificou-se que as frações S1-1 a S1-12 todas continham flavonoides e a fração S1-13 era composta apenas por pigmentos.



**Fluxograma 3.9** – Fracionamento de MUFA.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 3,5$  cm,  $h = 58$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

No segundo processo, as frações S1-5 a S1-8 obtidas do primeiro fracionamento, foram refracionadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Fluxograma 3.10). A análise no modo analítico revelou que as quatro frações continham mesma composição química variando apenas a proporção dos compostos em cada fração. Assim, as mesmas foram submetidas à separação cromatográfica em modo preparativo que resultou na obtenção de 3 flavonoides.

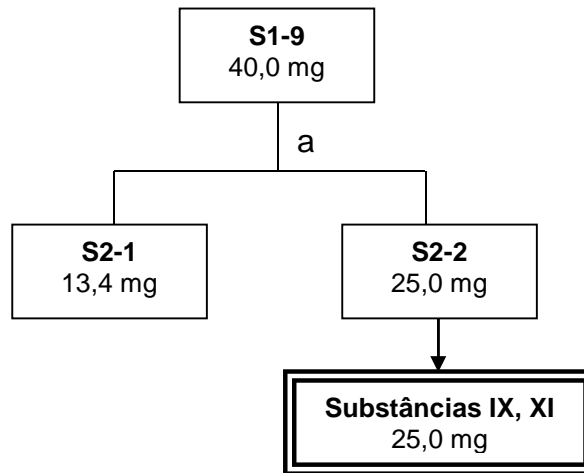


**Fluxograma 3.10** – Fracionamento dos flavonoides VIII-X.

a) CLAE analítico e preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu\text{m}$  (analítica:  $\phi = 0,46$  cm,  $h = 25$  cm; e preparativa:  $\phi = 1,0$  cm,  $h = 25$  cm); eluição isocrática ACN:H<sub>2</sub>O 8:2; fluxo analítico de 1,0 mL/min e preparativo de 3,5 mL/min; loop de 200  $\mu\text{L}$  e detector UV 254 nm.

A análise de RMN de <sup>1</sup>H da fração S1-9 revelou a presença de dois hidrogênios anoméricos, com diferentes integrais para os sinais, indicando a presença de uma mistura de dois compostos. A amostra foi então submetida a um rápido fracionamento

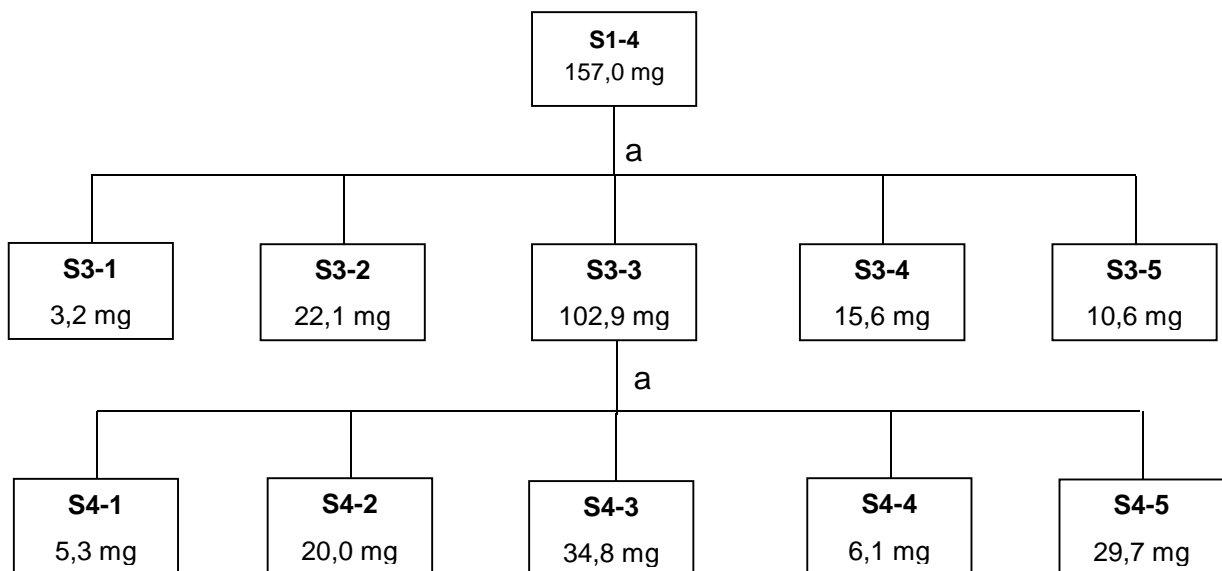
por cromatografia em coluna utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária resultando apenas na remoção de pigmentos (Fluxograma 3.11).



**Fluxograma 3.11** – Obtenção dos flavonoides **IX** e **XI** em mistura.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2$  cm,  $h = 56$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

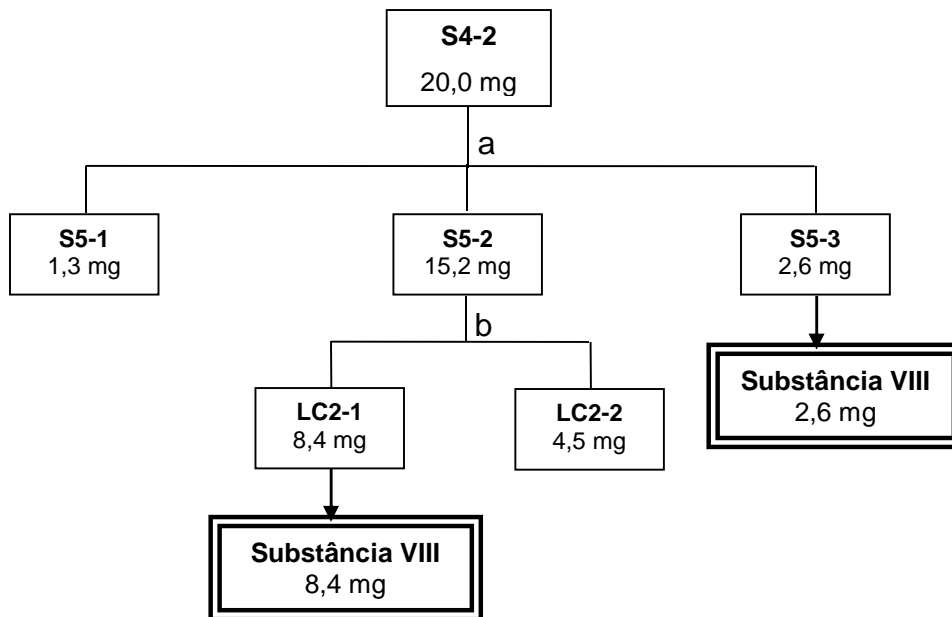
A fração S1-4 foi submetida a novos fracionamentos por sucessivas cromatografias em coluna utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária (Fluxograma 3.12) que resultou na obtenção de misturas de substâncias e na eliminação de parte dos pigmentos.



**Fluxograma 3.12** – Fracionamento da fração S1-4.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2$  cm,  $h = 140$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

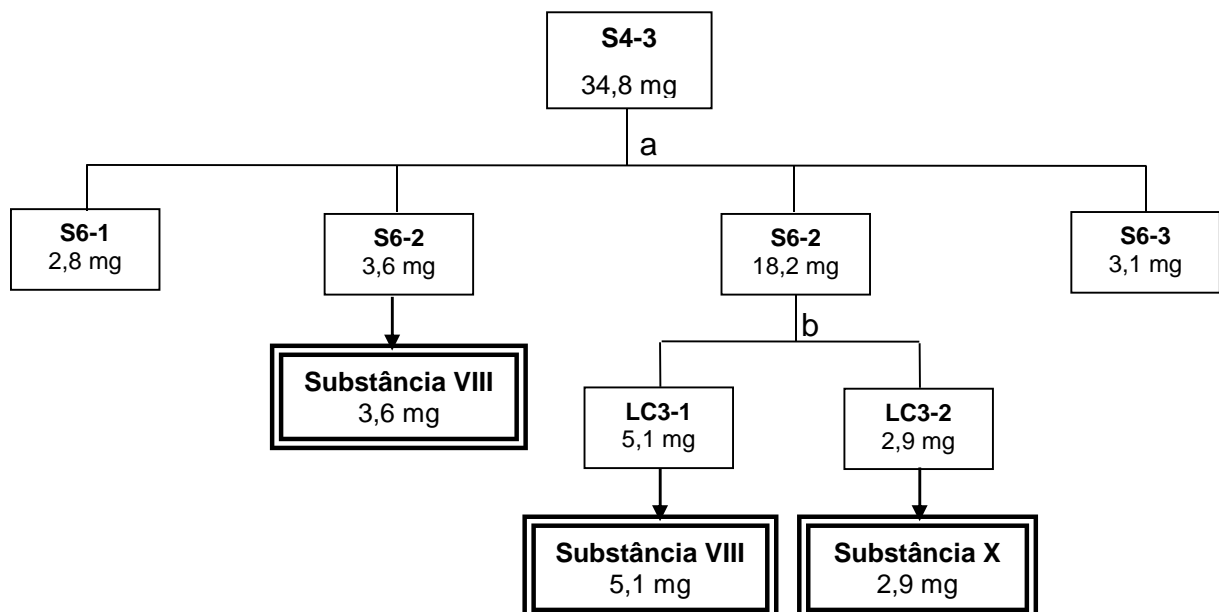
As frações S4-2, S4-3 e S4-5 foram então refracionadas por cromatografia em coluna utilizando sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Fluxogramas 3.13 a 3.15).



**Fluxograma 3.13** – Fracionamento da fração S4-2.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2,3$  cm,  $h = 62$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

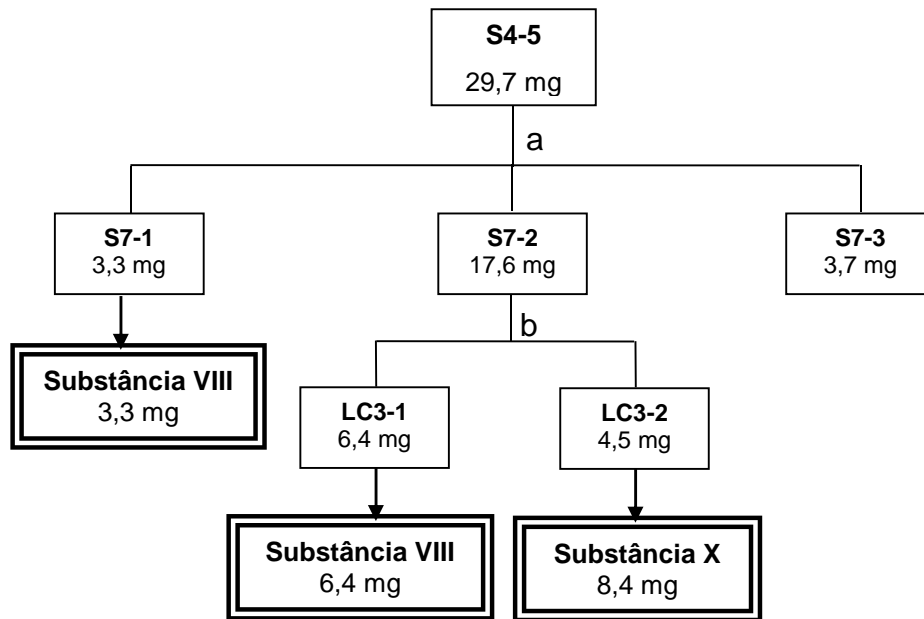
b) CLAE analítico e preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu\text{m}$  (analítica:  $\phi = 0,46$  cm,  $h = 25$  cm; e preparativa:  $\phi = 1,0$  cm,  $h = 25$  cm); eluição isocrática ACN: H<sub>2</sub>O 8:2; fluxo analítico de 1,0 mL/min e preparativo de 3,5 mL/min; loop de 200  $\mu\text{L}$  e detector UV 254 nm.



**Fluxograma 3.14** – Fracionamento da fração S4-3.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2,3$  cm,  $h = 62$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

b) CLAE analítico e preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna 10  $\mu\text{m}$  (analítica:  $\phi = 0,46$  cm,  $h = 25$  cm; e preparativa:  $\phi = 1,0$  cm,  $h = 25$  cm); eluição isocrática ACN: H<sub>2</sub>O 8:2; fluxo analítico de 1,0 mL/min e preparativo de 3,5 mL/min; loop de 200  $\mu\text{L}$  e detector UV 254 nm.



**Fluxograma 3.15** – Fracionamento da fração S4-5.

a) Cromatografia por exclusão; coluna de vidro ( $\phi = 2,3$  cm,  $h = 62$  cm), fase estacionária: sephadex LH-20, fase móvel: eluição isocrática MeOH 100%.

b) CLAE analítico e preparativo: coluna C-18 Phenomenex Luna  $10 \mu\text{m}$  (analítica:  $\phi = 0,46$  cm,  $h = 25$  cm; e preparativa:  $\phi = 1,0$  cm,  $h = 25$  cm); eluição isocrática ACN:  $\text{H}_2\text{O}$  8:2; fluxo analítico de  $1,0$  mL/min e preparativo de  $3,5$  mL/min; loop de  $200 \mu\text{L}$  e detector UV  $254$  nm

### 3.9 – Metodologia dos ensaios biológicos

#### 3.9.1 – Ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizadas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP, pelas alunas Amanda Barbosa e Nathália de Almeida sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Nestes ensaios as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada uma dieta sólida constituída por: 5,0% de glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de agar bacteriológico e 100 mL de água destilada. Após mistura destes componentes, a dieta foi levada ao forno de microondas por aproximadamente 4 minutos e logo em seguida, autoclavada a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm por 15 min. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias

subsequentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização dos experimentos de toxicidade.

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

As formigas foram distribuídas em lotes de 50 operárias para cada tratamento divididas em 5 placas de Petri, contendo 10 formigas cada. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de  $25 \pm 1$  °C e umidade relativa acima de 70,0% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico log-rank ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

### **3.9.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus***

Os ensaios com o fungo simbiote *L. gongylophorus* foram realizados no Laboratório de Bioensaios do grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela técnica Ms. Dorai Periotto Zandonai.

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

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporadas ao meio de cultura e solubilizados em água destilada. Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaio com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavados nas condições 120 °C, 1,0 atm por 20 min. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 min por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*. As amostras foram preparadas em quintuplicata. O tempo de

incubação foi de aproximadamente 30 dias, a 25 °C ( $\pm 2$ ), onde foram realizados os cálculos das áreas do crescimento micelial do fungo simbiote em cada amostra. 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.

### **3.9.3 – Ensaio biológico com *Sitophilus zeamais***

A criação de *S. zeamais* utilizada nos bioensaios foi estabelecida a partir de exemplares de uma população mantida no Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP, obtidos junto ao Prof. Dr. Valter Arthur. 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.

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 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 com as amostras a serem testadas. Como controle, foram utilizadas amostras de milho tratadas com mistura acetona:metanol 1:1. 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 diariamente, contando-se e retirando-se os indivíduos mortos durante um período de 10 dias. Foi considerado morto o indivíduo cujas extremidades estavam completamente distendidas e que não apresentava reação ao contato com um pincel, durante o período de um minuto.

As amostras que apresentaram os resultados mais promissores foram testadas para estimar a CL<sub>50</sub> (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  $CL_{50}$  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  $CL_{50}$ . Para as demais frações, oriundas de partições líquido-líquido dos extratos e de fracionamentos cromatográficos, foram testadas em concentração igual à  $CL_{50}$  da amostra de origem.



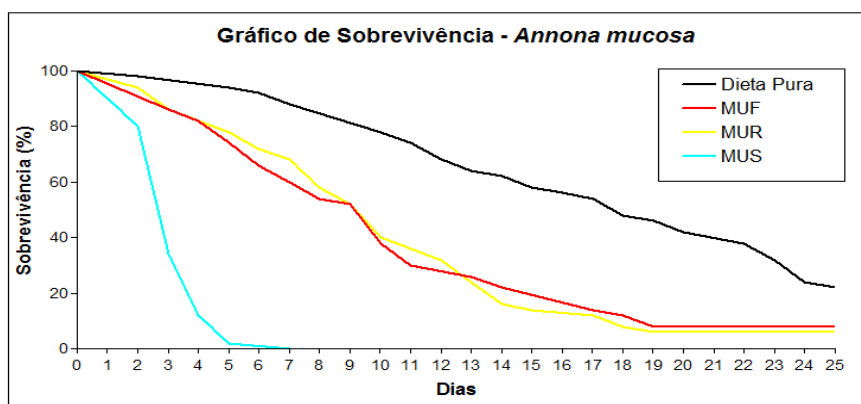
## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho trata-se do estudo fitoquímico biomonitorado das partes vegetais de *A. mucosa*. Sendo assim, de posse dos extratos brutos dessas partes vegetais, bem como das frações oriundas da partição líquido-líquido dos mesmos, o primeiro passo do trabalho foi avaliar o potencial inseticida e fungicida dos extratos e frações para escolha das amostras que seriam submetidos à estudos fitoquímicos.

### 4.1 – Ensaio biológicos dos extratos e frações de *A. mucosa*

#### 4.1.1 – Efeito dos extratos de *A. mucosa* frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, ao gorgulho do milho, *S. zeamais*, e ao fungo simbiote *L. gongylophorus*

Para análise dos dados dos ensaios dos extratos brutos de *A. mucosa* sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa*, foram traçadas as curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Na análise estatística dos resultados obtidos após um período de 25 dias de experimento, foi empregado o teste “log-rank”, comparando as curvas de sobrevivência de formigas submetidas ao tratamento com aquelas dos controles com dieta pura. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico 4.1 e na Tabela 4.1.



**Gráfico 4.1** - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com os extratos de parte vegetais de *A. mucosa* na concentração de 2,0 mg/mL.

**Tabela 4.1** - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com os extratos de parte vegetais de *A. mucosa* à 2,0 mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
<b>Dieta Pura</b>	0	2	2	8	12	22	38	46	58	78	18 <sup>a</sup>
<b>MUF - folhas</b>	0	0	14	34	46	62	78	86	92	92	10 <sup>b</sup>
<b>MUR - ramos</b>	0	6	8	28	42	60	84	88	94	94	10 <sup>b</sup>
<b>MUS - sementes</b>	0	20	66	98	100	100	100	100	100	100	3,0 <sup>b</sup>

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

Nesses experimentos houve aumento gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do tempo de experimento para os três extratos, com todos apresentando diferença significativa em relação ao controle e altas porcentagens de mortalidade. A maior toxicidade foi observada para o extrato das sementes (MUS) que alcançou 100% de mortalidade em apenas 8 dias de experimento.

Para o ensaio com o gorgulho do milho, os extratos foram testados em duas concentrações, 1.500 e 3.000 ppm, e como testemunha foi utilizada mistura acetona:metanol 1:1, a mesma mistura utilizada para ressuspender a amostra. Os dados são apresentados na Tabela 4.2.

O extrato das sementes foi o tratamento que apresentou efeito bioativo mais pronunciado, com 100% de mortalidade nas duas concentrações testadas. O extrato das folhas apresentou diferentes toxicidades de acordo com a concentração, variando de 30,5% de mortalidade à 1.500 ppm até 83,0% à 3.000 ppm.

**Tabela 4.2** - Médias de mortalidade do gorgulho do milho ao 10º dia de experimento em amostras de milho tratadas com extratos de *A. mucosa*.

Tratamento	Extrato	Mortalidade (%) <sup>*</sup>	
		1.500 ppm	3.000 ppm
<i>Annona mucosa</i>	Folhas	30,50±6,60	83,00±5,33
	Ramos	2,00±0,81	0,00±0,00
	Sementes	100,00±0,00	100,00±0,00
Testemunha (acetona:metanol, 1:1)	--	1,50±0,76	0,00±0,00

\* Aplicadas com um volume de calda de 30 L/t.

Para os extratos mais promissores, ou seja, aqueles que ocasionaram mortalidade superior a 50% dos gorgulhos expostos na concentração 3.000 ppm, extratos de sementes e folhas, foram realizadas curvas de concentração-resposta para estimar os limiares a serem utilizados nos bioensaios subsequentes. Os resultados comprovaram a alta toxicidade do extrato de sementes que apresentou baixo valor de concentração letal média (CL<sub>50</sub>), de apenas 288,33 ppm (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** - Estimativa da CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> (em ppm\*) e intervalo de confiança dos extratos de folhas e sementes de *A. mucosa* para adultos de *S. zeamais*, após 10 dias de exposição em amostras tratadas de milho (10 g). Temp.: 25±2 °C; U.R.: 60±10%; Fotofase: 14 h; Luminosidade: 200 lux.

Espécies (estruturas)	n <sup>1</sup>	Slope ± EP (p valor)	CL <sub>50</sub> (IC) <sup>2</sup>	CL <sub>90</sub> (IC) <sup>2</sup>
<i>Annona mucosa</i> (folhas)	1400	5,74±0,46 (p<0,0001)	1972,00 (1847,00– 2080,00)	3190,00 (3026,00– 3405,00)
<i>Annona mucosa</i> (sementes)	1600	4,92±0,33 (p<0,0001)	288,33 (267,29 – 307,21)	505,47 (478,58 – 537,75)

\* Aplicadas com um volume de calda de 30 L/t.

<sup>1</sup>n: número de insetos testados;

<sup>2</sup> IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade de erro;

Para a avaliação da toxicidade dos extratos frente ao fungo simbionte *L. gongylophorus*, estes foram testados na concentração de 1 mg/mL (Tabela 4.4). Os resultados obtidos indicam maior potencial fungicida dos extratos de folhas e sementes que chegaram a 76% e 60% de inibição de crescimento micelial do fungo, respectivamente.

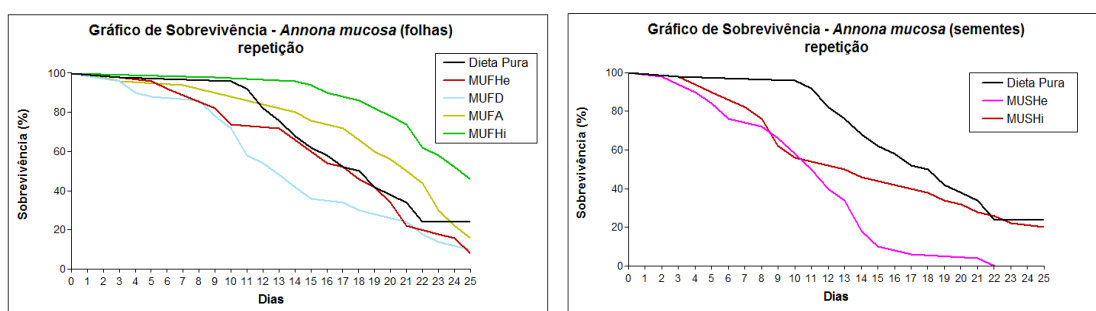
**Tabela 4.4** – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do crescimento do fungo *L. gongylophorus* submetido ao tratamento com os extratos de *A. mucosa*, após 30 dias de experimento.

Amostra	Média das áreas	% de inibição
MUF	3,1436	76%
MUR	5,2547	60%
MUS	7,2523	45%
Controle	13,3019	

Os resultados obtidos nos bioensaios, quando avaliados em conjunto, mostraram maior potencial dos extratos das folhas e sementes, MUF e MUS, respectivamente. Além disso, análises prévias de RMN de  $^1\text{H}$  e de CLAE analítico para os extratos de folhas e ramos mostraram perfis químicos semelhantes para esses dois extratos. Sendo assim, apenas as partições oriundas dos extratos de folhas e sementes foram submetidas aos ensaios biológicos.

### 4.1.2 – Efeito das frações de *A. mucosa* frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, ao gorgulho do milho, *S. zeamais*, e ao fungo simbiote *L. gongylophorus*

Para o ensaio frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com as partições obtidas do extrato de folhas de *A. mucosa*, as frações hexânica (MUFHe), diclorometânica (MUFD) e acetato de etila (MUFA) apresentaram mortalidade superior ao controle ao final do 25º dia de experimento 92, 90 e 84% de mortalidade, respectivamente. Dentre as duas partições obtidas do extrato bruto das sementes, a partição hexânica (MUSHe) apresentou considerável toxicidade às operárias de formigas cortadeiras, provocando 100% de mortalidade ao 25º dia de experimento, enquanto a partição hidroalcóolica (MUSHi) provocou mortalidade final de 80% (Gráfico 4.2).



**Gráfico 4.2** - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com as partições obtidas dos extratos etanólico das folhas e das sementes de *A. mucosa* na concentração de 1,0 mg/mL.

No ensaio frente ao gorgulho do milho, as partições obtidas foram ensaiadas na CL<sub>50</sub> dos respectivos extratos brutos. As duas frações obtidas do extrato bruto das sementes foram altamente tóxicas ao gorgulho do milho com taxas de mortalidade superiores a 90% enquanto o controle apresentou apenas 6% de mortalidade (Tabela

4.5). As partições obtidas das folhas foram ensaiadas na concentração de 1500 ppm, pois o valor de CL<sub>50</sub> para este extrato, 1972 ppm, foi superior ao menor valor testado no *screening* dos extratos. Para essas partições observou-se elevada toxicidade apenas para a partição hexânica que provocou 91% de mortalidade dos gorgulhos (Tabela 4.5). Esses resultados indicam possível concentração dos compostos bioativos nessa fração indicando serem as substâncias de média a baixa polaridade as responsáveis pela toxicidade das folhas.

**Tabela 4.5** - Médias de mortalidade ao 10º dia em amostras de milho (10 g) tratadas com as partições dos extratos etanólicos das folhas (1500 ppm) e sementes (288 ppm) de *A. mucosa*.

Espécie vegetal	Frações	Mortalidade (%)*
<i>Folhas</i>	Hexano (MUFHe)	91,00±4,06
	Diclorometano (MUFD)	33,00±4,84
	Acetato de etila (MUFA)	2,50±1,53
	Hidroálcool (MUFHi)	1,00±0,66
	Controle (Acetona: Metanol (1:1))	1,00±0,66
<i>Sementes</i>	Hexano (MUSHe)	100,0±0,00
	Hidroálcool (MUSHi)	94,0±2,56
	Controle (Acetona: Metanol (1:1))	6,0±1,94

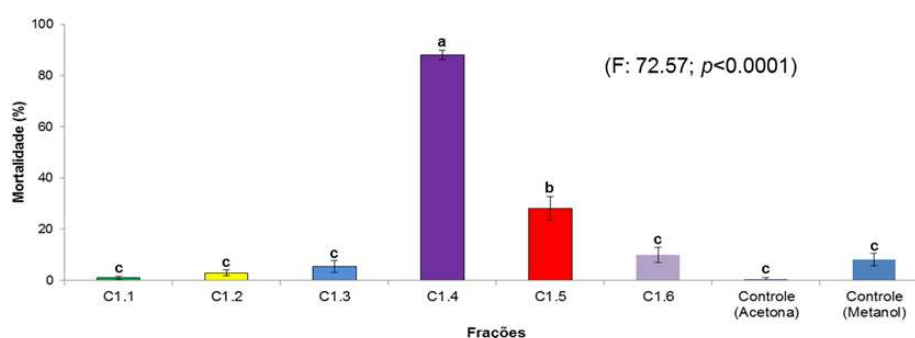
\* Aplicadas com um volume de calda de 30 L/t.

No ensaio frente ao fungo simbiote, o que se observou foi maior bioatividade das partições mais apolares das folhas, as partições hexânica (MUFHe) e diclorometânica (MUFD), que inibiram em 61 e 86%, o crescimento micelial do fungo, respectivamente. Para as partições oriundas do extrato das sementes, observou-se melhor resultado da partição hidroalcolica, mas o potencial fungicida dessa fração, de apenas 46% de inibição do crescimento micelial do fungo, é considerado fraco (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6** – Porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *L. gongylophorus* submetido ao tratamento com as partições dos extratos de folhas e sementes de *A. mucosa* à concentração de 0,5 mg/mL

<b>Annona mucosa</b>			
<b>Amostra</b>	<b>% de inibição</b>	<b>Amostra</b>	<b>% de inibição</b>
MUFHe	61%	MUSHe	4%
MUFD	86%	MUSHi	46%
MUFA	1%		
MUFHi	-4%		

As sub-frações obtidas da partição hidroalcóolica do extrato das sementes foram avaliadas quanto ao seu potencial inseticida apenas frente ao gorgulho do milho, uma vez que esse ensaio, de apenas 10 dias, era o mais viável. Essas amostras foram ensaiadas a uma concentração 1/5 da concentração utilizada no ensaio da partição de origem, ou seja, a concentração utilizada nesse ensaio foi 1/5 da CL<sub>50</sub> do extrato bruto. Os resultados mostraram um forte potencial inseticida da fração C1-4 (Gráfico 4.3) provocando mortalidade de gorgulhos superior à 80%. Análises de RMN de <sup>1</sup>H dessa fração indicaram a presença de acetogeninas, ressaltando novamente, o potencial inseticida dessa classe de compostos.



**Gráfico 4.3** – Médias de mortalidade ao 10º dia em amostras de milho (10 g) tratadas com as sub-frações da partição hidroalcóolica do extrato das sementes de *A. mucosa* (58 ppm).

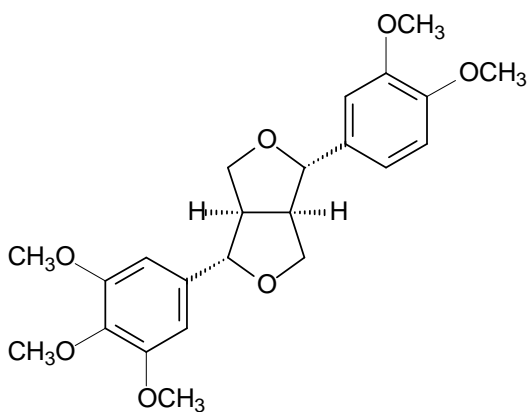
De forma geral, os resultados confirmaram o potencial inseticida de *A. mucosa*, com destaque para as frações hexânica das folhas e hexânica e hidroalcóolica das sementes com bioatividade sobre os dois alvos. No ensaio fungicida, a maior toxicidade foi das frações apolares das folhas. Dessa forma, as partições hexânica das folhas (MUFHe) e hidroalcóolica das sementes (MUSHi) foram escolhidas para estudo. Além dessas, a fração acetato de etila das folhas (MUFA) foi selecionada com base em análises de RMN de <sup>1</sup>H, que indicaram a presença de flavonoides.

## 4.2 – Fitoquímica de *Annona mucosa*

O estudo fitoquímico de *A. mucosa* levou ao isolamento e identificação de 11 metabólitos secundários, sendo 3 lignanas, 4 acetogeninas e 4 flavonoides.

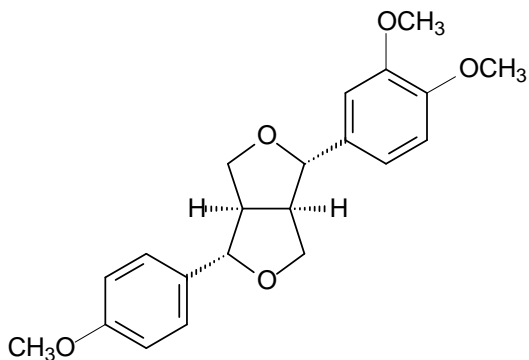
### 4.2.1 – Substâncias identificadas

#### Lignanas



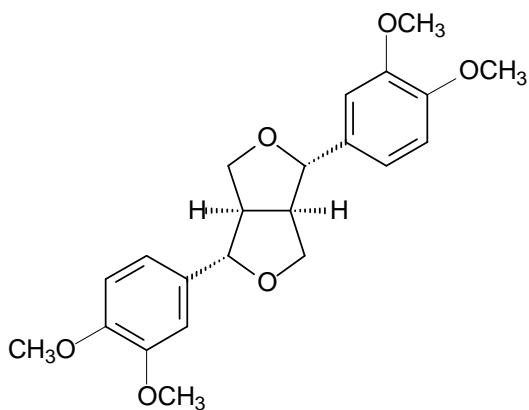
(I)

(+)-Magnolina (I)  
 Massa: 12,2 mg  
 Isolamento: p. 14  
 Identificação: p. 36-42



(II)

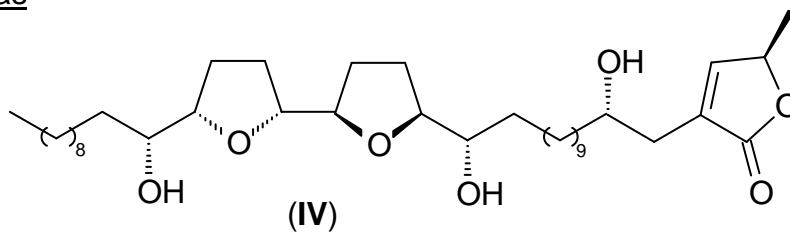
(-)-Membrina (II)  
 Massa: 15,9 mg  
 Isolamento: p. 16-17  
 Identificação: p. 43-48



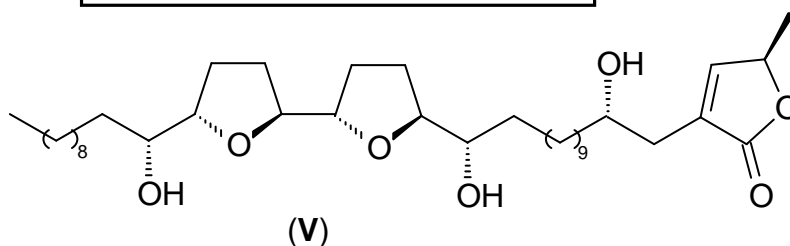
(III)

(+)-Eudesmina (III)  
 Massa: 16,0 mg  
 Isolamento: p. 16-17  
 Identificação: p.49-54

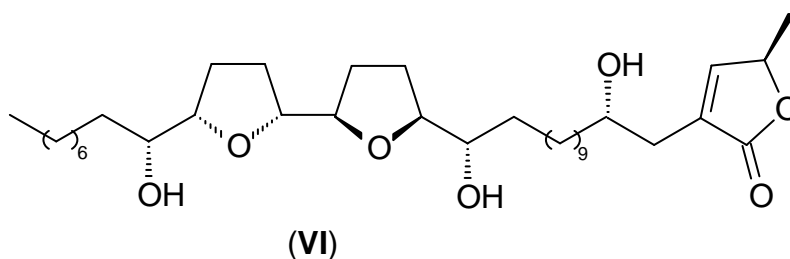
Acetogeninas



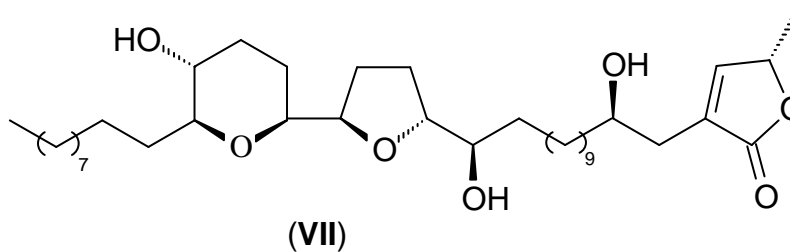
Rolliniastatina 1 (IV)  
 Massa: 140 mg  
 Isolamento: p. 15  
 Identificação: p. 57-71



Rolliniastatina 2 (V)  
 Massa: 12,6 mg  
 Isolamento: p. 15  
 Identificação: p. 57-71



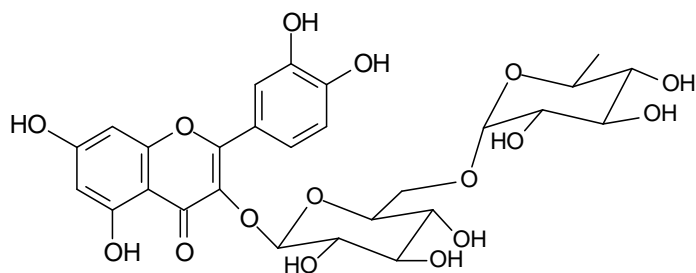
Substância VI  
 Massa: 10,5 mg  
 Isolamento: p. 15  
 Identificação: p. 57-71



Jimenezina (VII)  
 Massa: 11,5 mg  
 Isolamento: p. 15  
 Identificação: p. 72-77



Flavonoides



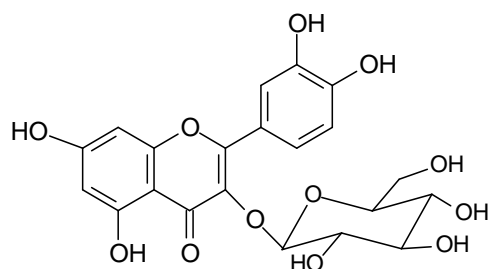
**(VIII)**

Rutina (**VIII**)

Massa: 54,3 mg

Isolamento: p. 18, 20 e 21

Identificação: p. 80-84



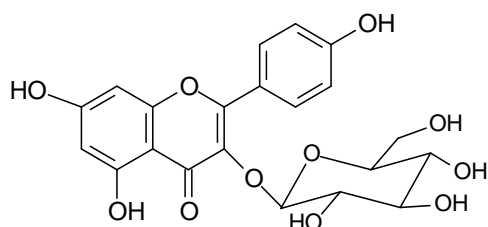
**(IX)**

Isoquercetina (**IX**)

Massa: 22,7 mg + 25,0 mg (em mistura com **XI**)

Isolamento: p. 18-19

Identificação: p. 85-88



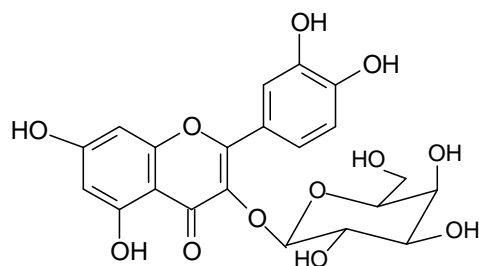
**(X)**

Astragalina (**X**)

Massa: 20,5 mg

Isolamento: p. 18, 20 e 21

Identificação: p. 89-92



**(XI)**

Hiperina (**XI**)

Massa: 25 mg (em mistura com **IX**)

Isolamento: p. 19

Identificação: p. 93-97

## 4.2.2 – Identificação estrutural

### 4.2.2.1 – Lignanas

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

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

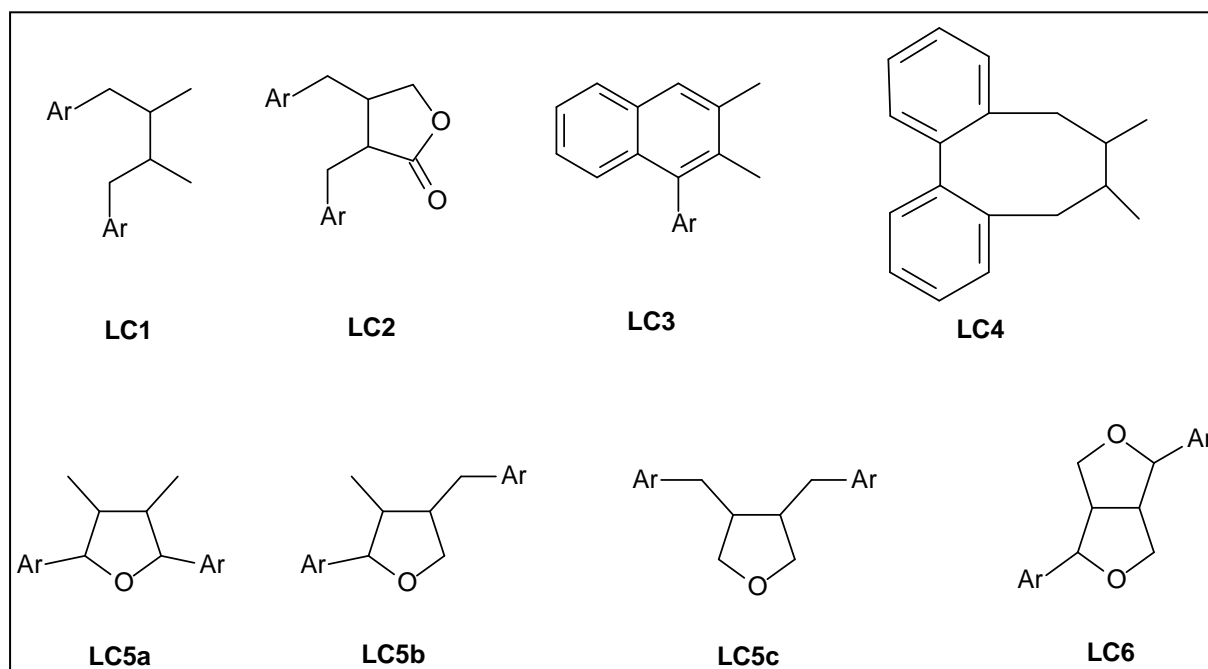
A IUPAC recomenda o uso do termo lignana para os dímeros de unidades  $C_6C_3$  ligadas pelos carbonos  $\beta, \beta'$  de suas respectivas cadeias laterais, enquanto o termo neolignana é reservado para designar os dímeros unidos por outros carbonos ( $m, m'$ ;  $\gamma, \gamma'$ ;  $\beta, \gamma'$ , etc), esses vários padrões de união possíveis para as neolignanas resulta em uma enorme diversidade estrutural para esses compostos (MOSS, 2000; PAN *et al.*, 2009).

Aproximadamente 3000 diferentes estruturas de lignanas e outros produtos naturais relacionados como neolignanas e flavonolignanas são conhecidos (SCHMIDT *et al.*, 2008). As lignanas clássicas são divididas em seis grupos: derivadas do dibenzilbutano (LC1), da dibenzilbutirolactona (LC2), do arilnaftaleno (LC3), do dibenzilciclooctadieno (LC4), furofurânicas (LC5) e 2,6-diarilfurofurânicas (LC6) (Figura 4.1), enquanto as neolignanas consistem em 15 grupos (PAN *et al.*, 2009).

Para a nomenclatura da grande diversidade de estruturas classificadas como lignanas e neolignanas foi necessário um sistema de numeração apropriado para o nome sistemático das estruturas. FREUDENBERG e WEINGES propuseram que a primeira unidade fenilpropânica ( $C_6C_3$ ) fosse numerada de 1 a 9, enquanto a segunda unidade fosse numerada de 1' a 9' para gerar assim, um sistema de numeração consistente (FREUDENBERG e WEINGES, 1961 apud MOSS, 2000). Esse sistema

é recomendado pela IUPAC e através dele os átomos de carbono  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , em relação ao anel aromático, recebem a numeração 7, 8 e 9, respectivamente, para a primeira unidade fenilpropânica, e 7', 8' e 9', respectivamente, para a segunda unidade fenilpropânica (MOSS, 2000).

As lignanas têm atraído muito interesse dos cientistas ao longo dos anos e ainda hoje são extensivamente estudadas devido à sua ampla ocorrência na natureza, principalmente no reino vegetal, e também à ampla gama de atividades biológicas (ENDERS e MILOVANOVIC, 2007; SILVA *et al.*, 2009). O papel biológico das lignanas nas plantas está ainda em discussão, mas é geralmente aceito que elas desempenham um papel de defesa nas plantas contra doenças e pestes e no controle de crescimento vegetal. Em adição ao seu papel na natureza, também possuem significativas atividades farmacológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, imunossupressora, tripanocida, antioxidante, antiviral, dentre outras (ANDRADE *et al.*, 2009; BAYINDIR *et al.*, 2008; DINELLI *et al.*, 2007; MAN *et al.*, 2012; PAN *et al.*, 2009).

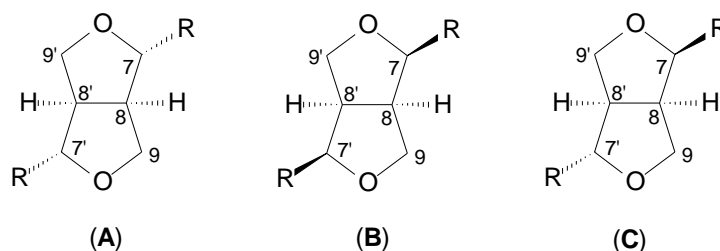


**Figura 4.1** – Classificação das lignanas em grupos.

#### 4.2.2.1.1 – Identificação estrutural da substância I

A substância **I** foi obtida das frações S2-2 e S1-4 da partição hidroalcolólica do extrato das sementes de *A. mucosa* e foi estruturalmente identificada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC e comparação com a literatura (SEO, 2010).

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.2), observaram-se os seguintes sinais:  $\delta_{\text{H}}$  4,73 (*dd*,  $J = 4,6$  e  $7,2$  Hz, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  4,23-4,30 (*m*, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  3,89 (*dd*,  $J = 2,9$  e  $9,5$  Hz, 2H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,08 (*m*, 2H). Esses sinais, com esses valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e integração caracterizam sistemas furofurânicos presentes em muitas lignanas (SEO, 2010). Os sistemas furofurânicos apresentam três diastereoisômeros possíveis: diequatorial (**A**), diaxial (**B**) e axial/equatorial (**C**) (RUSSEL & FENEMORE, 1973).



O diastereoisômero axial/equatorial (**C**) pode ser diferenciado dos outros dois (**A** e **B**). Em **A** e **B** os hidrogênios benzílicos (H-7 e H-7') são equivalentes, portanto, observa-se um único sinal entre  $\delta_{\text{H}}$  4,67-4,98, enquanto em **C** observa-se dois sinais, um próximo a  $\delta_{\text{H}}$  4,85 e outro próximo a  $\delta_{\text{H}}$  4,40 (PELTER *et al.*, 1976).

A distinção entre os diastereoisômeros **A** e **B** pode ser feita com base no deslocamento químico observado para os hidrogênios oximetilênicos H-9 e H-9'. No isômero diaxial (**B**), o anel aromático em axial fica muito próximo do hidrogênio axial do grupo metilênico (H-9/H9') do anel furânico oposto a ele, assim os dois hidrogênios axiais da molécula aparecem na faixa de deslocamento entre  $\delta_{\text{H}}$  3,3-3,7, devido ao efeito anisotrópico do anel. No isômero diequatorial (**A**), os hidrogênios metilênicos equatoriais são desblindados devido à presença dos anéis aromáticos também em equatorial, e aparecem na faixa de deslocamento entre  $\delta_{\text{H}}$  4,2-4,4. Para os dois casos, os demais hidrogênios metilênicos são observados na faixa  $\delta_{\text{H}}$  3,8-4,0. O deslocamento químico dos grupos metilênicos permite ainda a identificação do isômero axial/equatorial (**C**), uma vez que, para esse isômero, um dos hidrogênios

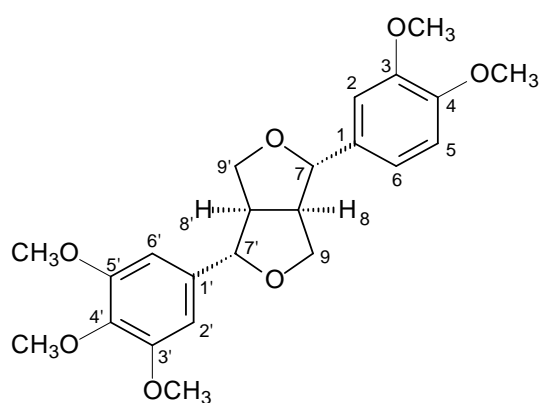
desloca-se para a faixa  $\delta_H$  3,3-3,7 e o outro para a faixa  $\delta_H$  4,2-4,4 (RUSSEL & FENEMORE, 1973).

Com base na estrutura geral proposta acima, dados da literatura (SEO, 2010) e correlações observadas no espectro de COSY e no mapa de correlações HSQC (Figuras 4.4 e 4.5), os sinais descritos anteriormente podem ser atribuídos da forma: os quatro hidrogênios em  $\delta_H$  3,89 (2H) e  $\delta_H$  4,23-4,30 (2H) se correlacionam com apenas um carbono no mapa de correlações HSQC, indicando serem esses os hidrogênios diastereotópicos H-9 e H-9' e, por comparação com a literatura, pode-se atribuir, a configuração diequatorial à molécula, e o duplo-duplete em  $\delta_H$  3,89 aos hidrogênios H-9<sub>ax</sub> e H-9'<sub>ax</sub>, e o múltiplo em  $\delta_H$  4,23-4,30 aos hidrogênios H-9<sub>eq</sub> e H-9'<sub>eq</sub>. Esses dois sinais correlacionam-se com o múltiplo em  $\delta_H$  3,08 (2H) no espectro de COSY e este foi então atribuído aos hidrogênios H-8 e H-8'. Por último, a correlação observada entre o duplo-duplete em  $\delta_H$  4,73 e o múltiplo em  $\delta_H$  3,08 permite atribuir o primeiro sinal aos hidrogênios H-7 e H-7'. Os deslocamentos de carbono do sistema furofurânico puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de HSQC, onde se tem o H-7 e H-7' correlacionando com  $\delta_C$  85,6 e 85,9 (C-7/C-7'), H-9<sub>(ax e eq)</sub> e H-9'<sub>(ax e eq)</sub> correlacionando com  $\delta_C$  71,6 e 71,8 (C-9/C-9') e por último H-8 e H-8' correlacionando com  $\delta_C$  53,9 e 54,3 (C-8/C-8').

Foram observados também, no espectro de RMN de  $^1H$ , sinais na região de hidrogênios aromáticos,  $\delta_H$  6,55 (s, 2H);  $\delta_H$  6,88 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H);  $\delta_H$  6,86 (dd,  $J = 1,5$  e 8,0 Hz, 1H) e  $\delta_H$  6,82 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H); e sinais referentes à 5 grupos metoxila,  $\delta_H$  3,80 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>);  $\delta_H$  3,84 (s, 9H, 3 x -OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_H$  3,86 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>) confirmando assim, a substituição de cinco hidrogênios aromáticos por grupos metoxila. Como não se observa no espectro de COSY correlações entre esses dois sinais de aromáticos, isso indica serem sinais de anéis diferentes. Assim, tem-se um anel aromático com 3 hidrogênios, e substituído por 2 grupos metoxilas, nas posições 3 e 4 e um segundo anel aromático (anel ') com dois hidrogênios substituídos por 3 grupos metoxilas nas posições 3', 4' e 5'. As posições 3, 4 e 5 de substituição destas metoxilas foram determinadas pelo caminho biossintético das lignanas (BAYINDIR *et al.*, 2008; DEWICK, 2002). Dessa forma, para os sinais de hidrogênios aromáticos, pode-se atribuir o duplete em  $\delta_H$  6,88 ao hidrogênio H-2 que acopla em *meta* ( $J = 1,5$  Hz) com o hidrogênio H-6 ( $\delta_H$  6,86; dd,  $J = 1,5$  e 8,0 Hz), que por sua vez, acopla também em *orto* com o hidrogênio H-5 ( $\delta_H$  6,82; d,  $J = 8,0$  Hz). O simpleto em  $\delta_H$  6,55 (s, 2H) foi atribuído aos hidrogênios H-2' e H-6'.

Os deslocamentos químicos de carbonos aromáticos e das metoxilas da molécula puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC (Figuras 4.3, 4.5 e 4.6) e comparação com a literatura (SEO, 2010) e são mostrados na Tabela 4.7. Dessa forma, a substância **I** foi identificada como sendo a magnolina.

A dispersão óptica rotatória da substância **I** foi determinada por experimento de  $\alpha_D$  onde se obteve o valor de  $\alpha_D = +52,53$  ( $c$  0,44  $\text{CHCl}_3$ ), que comparando com a literatura,  $\alpha_D = +53,4$  ( $c$  1,3,  $\text{CHCl}_3$ ) (SEO, 2010) trata-se na (+)-magnolina.



**(+)-magnolina (I)**

**Tabela 4.7** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância **I** e comparação com a (+)-magnolina (SEO, 2010:  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 75 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância I	SEO, 2010	Substância I	SEO, 2010
<b>1</b>	-	-	133,3	133,5
<b>2</b>	6,88 ( <i>d</i> , 1,5)	6,83-6,88 ( <i>m</i> )	109,1	109,2
<b>3</b>	-	-	148,5	148,6
<b>4</b>	-	-	149,0	149,2
<b>5</b>	6,82 ( <i>d</i> , 8,0)	6,83-6,88 ( <i>m</i> )	110,9	111,1
<b>6</b>	6,86 ( <i>dd</i> , 1,5 e 8,0)	6,83-6,88 ( <i>m</i> )	118,1	118,3
<b>7</b>	4,73 ( <i>dd</i> , 4,6 e 7,2)	4,72-4,75 ( <i>m</i> )	85,6	85,7
<b>8</b>	3,08 ( <i>m</i> )	3,10 ( <i>m</i> )	53,9	54,1
<b>9eq</b>	4,23-4,30 ( <i>m</i> )	4,22-4,30 ( <i>m</i> )	71,6	71,8
<b>9ax</b>	3,89 ( <i>dd</i> , 2,9 e 9,5)	3,86-3,93 ( <i>m</i> )		
<b>1'</b>	-	-	136,7	136,9
<b>2'</b>	6,55 ( <i>s</i> )	6,55 ( <i>s</i> )	102,6	102,8
<b>3'</b>	-	-	153,3	153,4
<b>4'</b>	-	-	137,3	137,4
<b>5'</b>	-	-	153,3	153,4
<b>6'</b>	6,55 ( <i>s</i> )	6,55 ( <i>s</i> )	102,6	102,8
<b>7'</b>	4,73 ( <i>dd</i> , 4,6 e 7,2)	4,72-4,75 ( <i>m</i> )	85,9	86,0
<b>8'</b>	3,08 ( <i>m</i> )	3,10 ( <i>m</i> )	54,3	54,4
<b>9'eq</b>	4,23-4,30 ( <i>m</i> )	4,22-4,30 ( <i>m</i> )	71,8	71,9
<b>9'ax</b>	3,89 ( <i>dd</i> , 2,9 e 9,5)	3,86-3,93 ( <i>m</i> )		
<b>5 x -OCH<sub>3</sub></b>	3,80 ( <i>s</i> )	3,82 ( <i>s</i> )	55,8	55,9
	3,84 ( <i>s</i> )	3,86 ( <i>s</i> )	56,0	56,2
	3,86 ( <i>s</i> )	3,88 ( <i>s</i> )	60,7	60,8

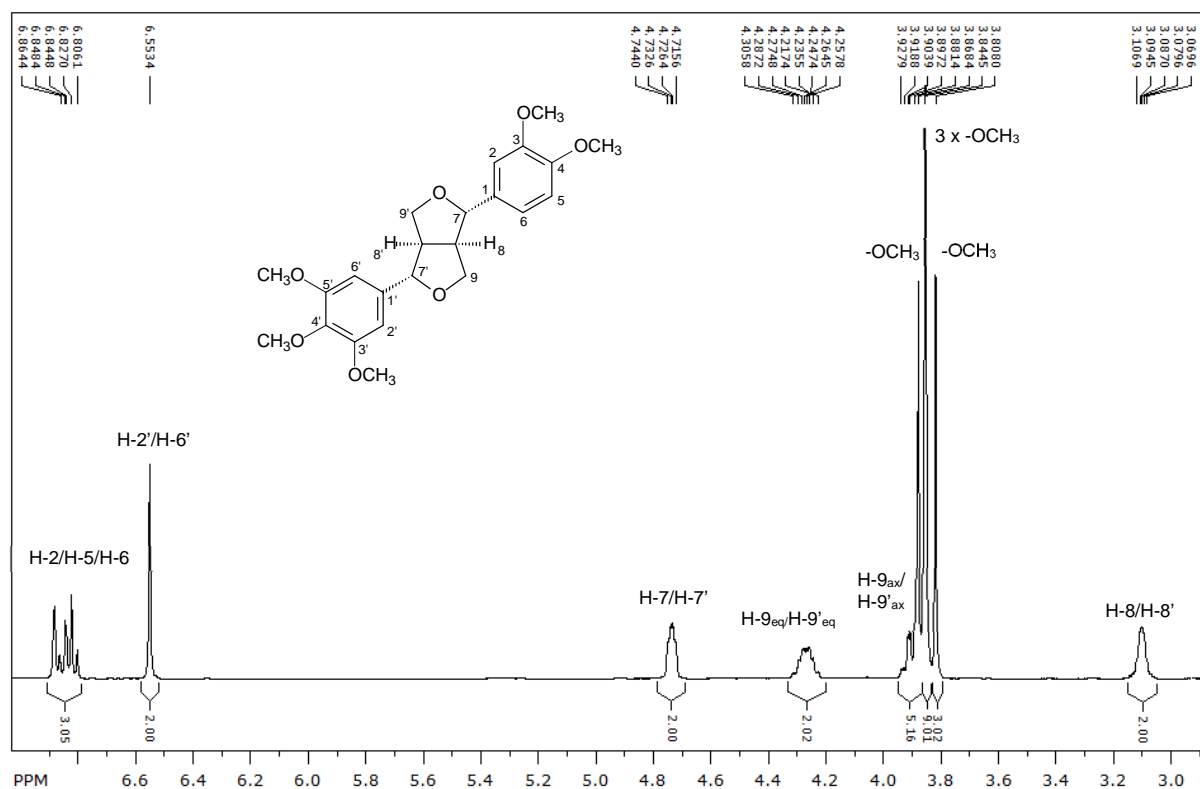


Figura 4.2 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância I (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

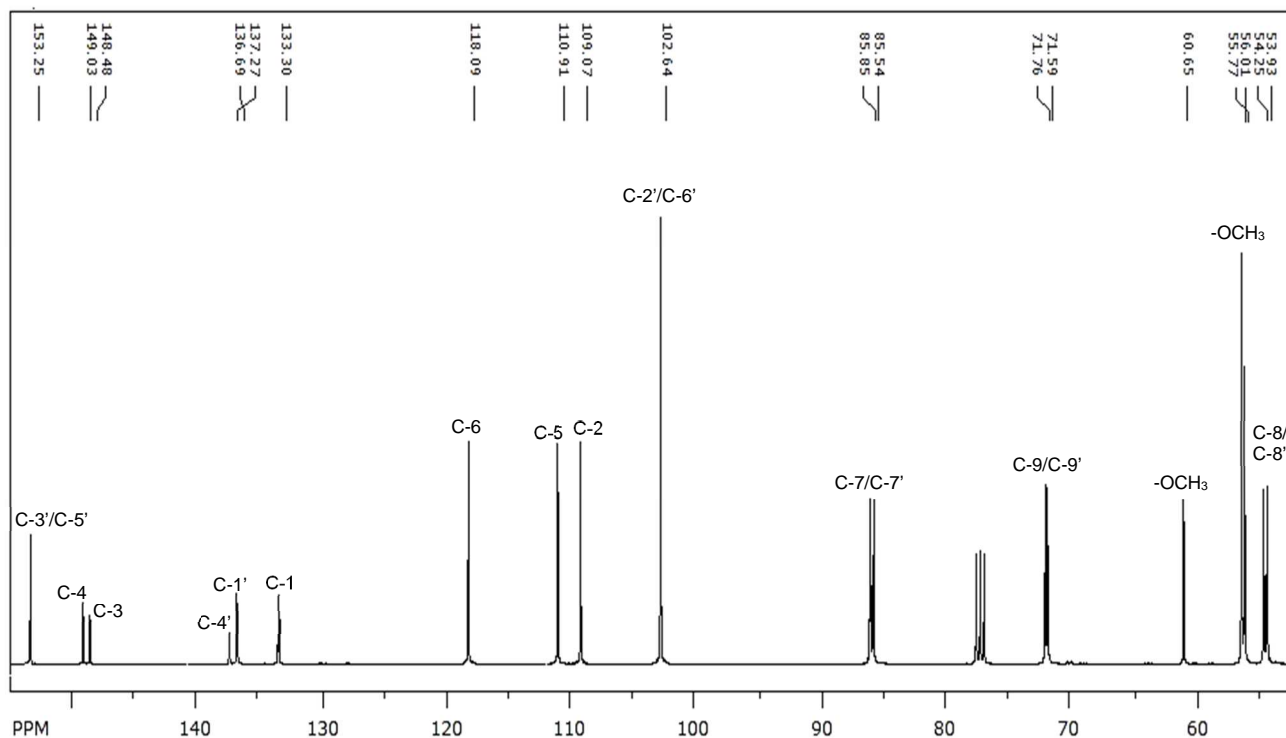


Figura 4.3 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância I (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



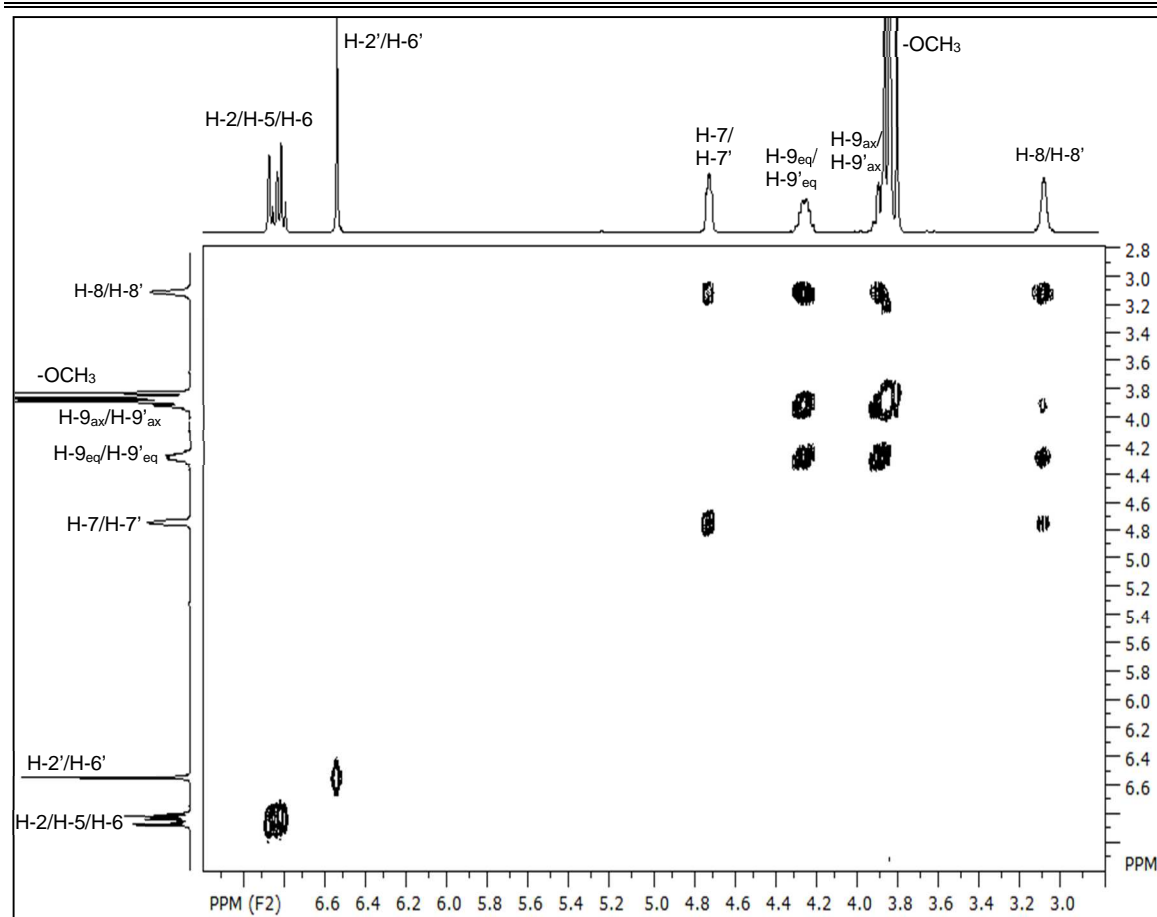


Figura 4.4 – Espectro de COSY da substância I (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

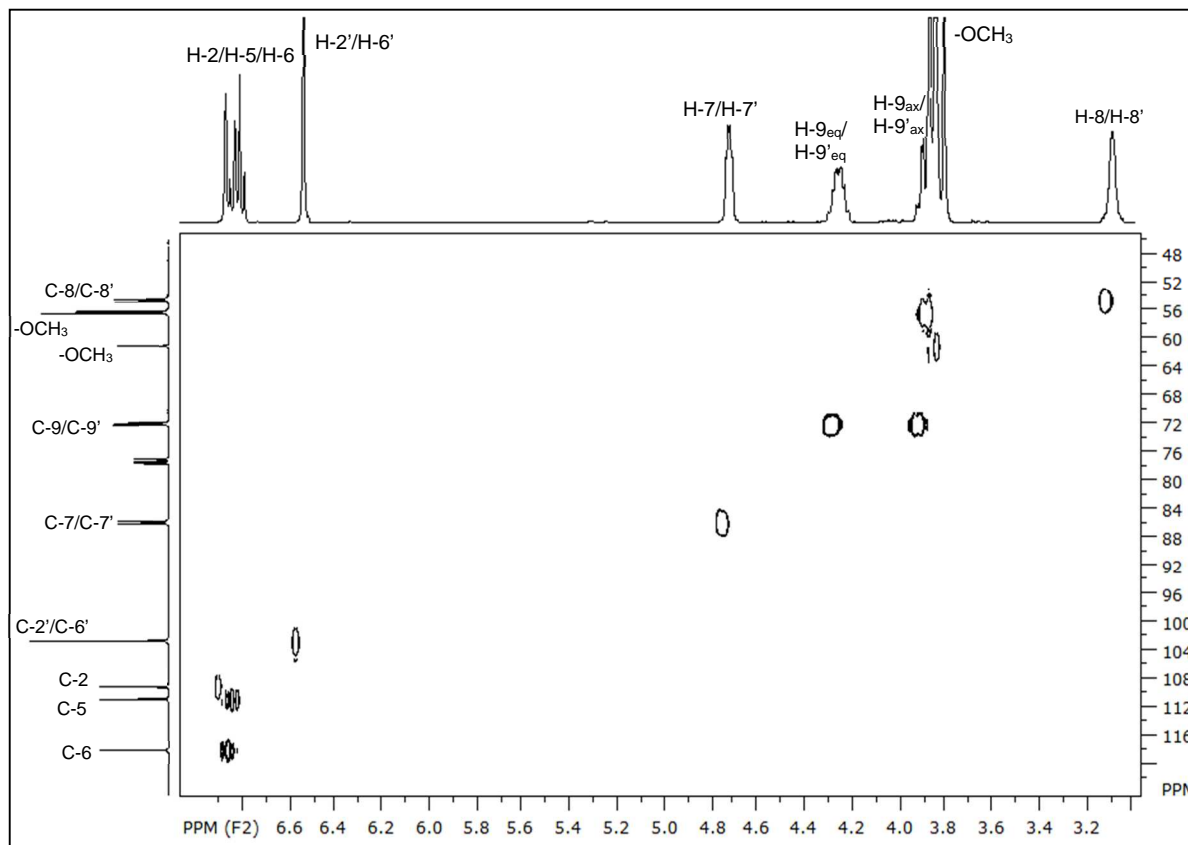


Figura 4.5 – Mapa de correlações HSQC da substância I (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

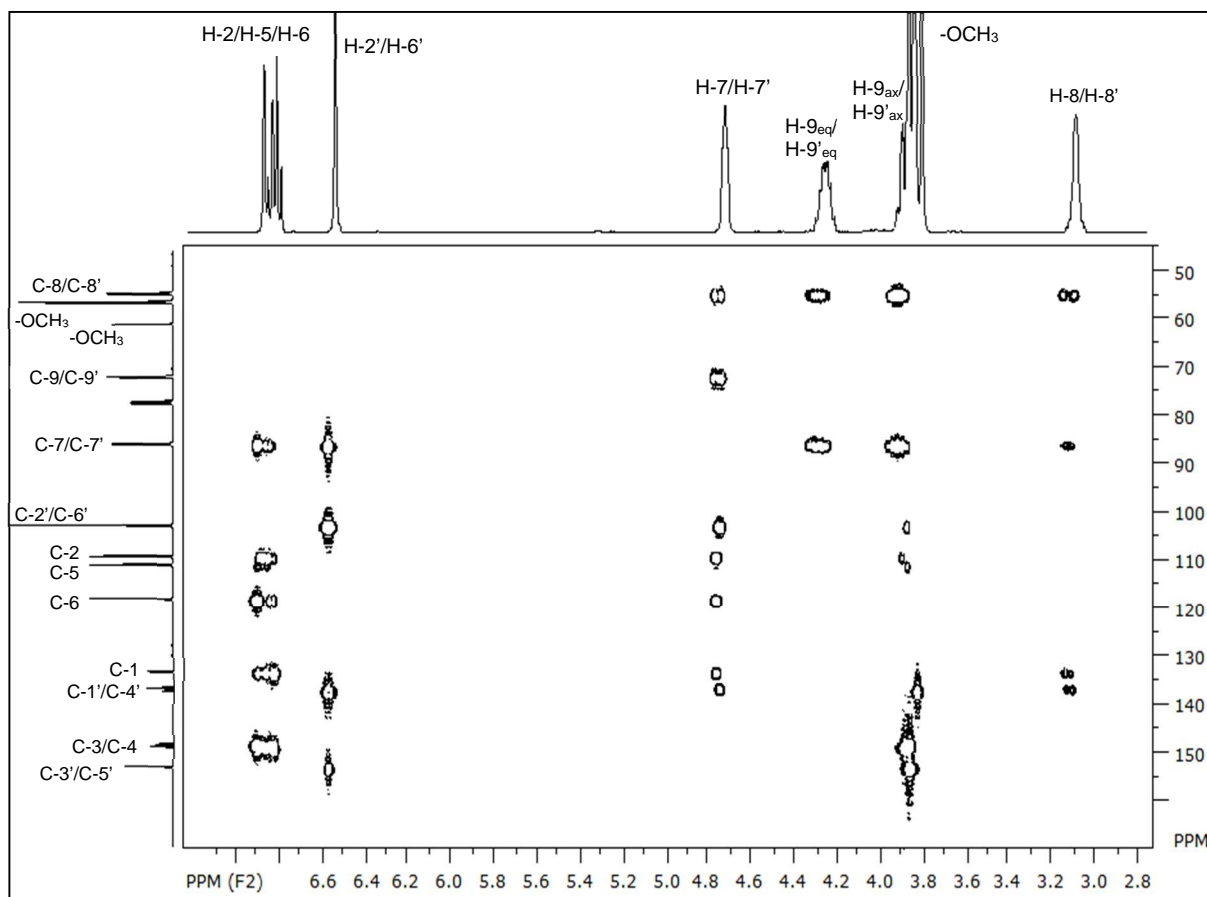


Figura 4.6 – Mapa de correlações HMBC da substância I (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

#### 4.2.2.1.2 – Identificação estrutural da substância II

A substância II foi obtida das frações CF4-2 e CF5.3-2 da partição hexânica das folhas de *A. mucosa* e foi estruturalmente identificada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC e comparação com a literatura (ESTRADA-REYES *et al.*, 2002).

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.7), foram observados os seguintes sinais:  $\delta_{\text{H}}$  4,76 (*dd*,  $J = 4,6$  e  $13,0$  Hz, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  4,21-4,28 (*m*, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  3,87-3,89 (*m*, 2H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,10-3,12 (*m*, 2H). Conforme discutido anteriormente, esses sinais caracterizam sistemas furofurânicos presentes em muitas lignanas.

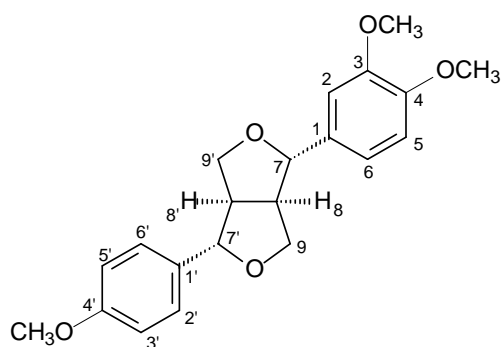
Com base na estrutura geral para esses sistemas, dados da literatura (ESTRADA-REYES *et al.*, 2002) e correlações observadas no espectro de COSY (Figura 4.9) e no mapa de correlações HSQC (Figuras 4.10), esses sinais podem ser atribuídos da seguinte forma: os quatro hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,87-3,89 (2H) e  $\delta_{\text{H}}$  4,21-4,28 (2H) se correlacionam com apenas um carbono no mapa de correlações HSQC, indicando serem esses os hidrogênios diastereotópicos H-9 e H-9' e, a partir da explicação dada anteriormente, esses valores de deslocamento químico para esses hidrogênios permitem atribuir-se a configuração diequatorial à molécula. Esses dois multipletos correlacionam-se com o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,10-3,12 no espectro de COSY, e este foi então atribuído aos hidrogênios H-8 e H-8'. Por último, a correlação observada entre o duplo dupletto em  $\delta_{\text{H}}$  4,76 e o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,10-3,12 permite atribuir o primeiro aos hidrogênios H-7 e H-7'. Os deslocamentos de carbono do sistema furofurânico puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de HSQC, onde tem-se o H-7 e H-7' correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  85,6 e 85,8 (C-7/C-7'), H-9(*ax* e *eq*) e H-9'(*ax* e *eq*) correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  71,5 e 71,8 (C-9/C-9') e por último H-8 e H-8' correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  54,0 e 54,2 (C-8/C-8').

Foram observados também, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sinais na região de hidrogênios aromáticos,  $\delta_{\text{H}}$  6,83-6,91 (*m*, 5H) e  $\delta_{\text{H}}$  7,26-7,29 (*m*, 2H) e sinais referentes à 3 grupos metoxila,  $\delta_{\text{H}}$  3,80 (*s*, 3H);  $\delta_{\text{H}}$  3,87 (*s*, 3H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (*s*, 3H) confirmando, assim, a substituição de três hidrogênios aromáticos por grupos metoxilas. No mapa de correlações HMBC (Figura 4.11) observa-se que as duas metoxilas em  $\delta_{\text{H}}$  3,87 e 3,90 correlacionam-se com os carbonos  $\delta_{\text{C}}$  148,6 e 149,2 mas não se correlacionam com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  159,2, carbono ao qual está ligado a terceira metoxila, o que confirma que essas duas metoxilas são substituintes de um

anel aromático enquanto a terceira é substituído do outro anel. Novamente, de acordo com o caminho biossintético das lignanas, um dos anéis possui duas metoxilas nas posições 3 e 4, enquanto o segundo é substituído na posição 4.

As atribuições exatas dos hidrogênios e carbonos aromáticos e das metoxilas da molécula foram atribuídos a partir dos experimentos de RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC (Figuras 4.8, 4.10 e 4.11) e comparação com a literatura, e são mostrados na Tabela 4.8.

A dispersão óptica rotatória da substância **II** foi determinada por experimento de  $\alpha_D$  onde se obteve o valor de  $\alpha_D = -217,4$  ( $c$  0,48,  $\text{CHCl}_3$ ) portanto, trata-se da (-)-membrina.



(-)-membrina (**II**)

**Tabela 4.8** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância II e comparação com a membrina (ESTRADA-REYES *et al.*, 2002).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância II	ESTRADA-REYES <i>et al.</i> , 2002	Substância II	ESTRADA-REYES <i>et al.</i> , 2002
1	-	-	133,0	133,1
2	6,83-6,91 (m)	6,82-6,92 (m)	109,2	109,2
3	-	-	148,6	148,6
4	-	-	149,2	149,2
5	6,83-6,91 (m)	6,82-6,92 (m)	111,0	111,0
6	6,83-6,91 (m)	6,82-6,92 (m)	118,3	118,2
7	4,76 (dd, 4,6 e 13,0)	4,76 (dd, 7,0 e 10,2)	85,8	85,8
8	3,10-3,12 (m)	3,11 (m)	54,2	54,2
9 <sub>eq</sub>	4,21-4,28 (m)	4,20 (m)	71,8	71,8
9 <sub>ax</sub>	3,87-3,89 (m)	3,84 (m)		
1'		-	133,1	133,1
2'	6,83-6,91 (m)	6,82-6,92 (m)	113,9	113,0
3'	7,26-7,29 (m)	7,26-7,30 (m)	127,3	127,3
4'	-	-	159,2	159,2
5'	7,26-7,29 (m)	7,26-7,30 (m)	127,3	127,3
6'	6,83-6,91 (m)	6,82-6,92 (m)	113,9	113,0
7'	4,76 (dd, 4,6 e 13,0)	4,76 (dd, 7,0 e 10,2)	85,6	85,6
8'	3,10-3,12 (m)	3,11 (m)	54,0	54,1
9' <sub>eq</sub>	4,21-4,28 (m)	4,20 (m)	71,5	71,5
9' <sub>ax</sub>	3,87-3,89 (m)	3,84 (m)		
-OCH <sub>3</sub>	3,80 (s)	3,81 (s)	55,3	55,3
	3,87 (s)	3,88 (s)	55,8	55,4
	3,90 (s)	3,90 (s)	55,9	56,0

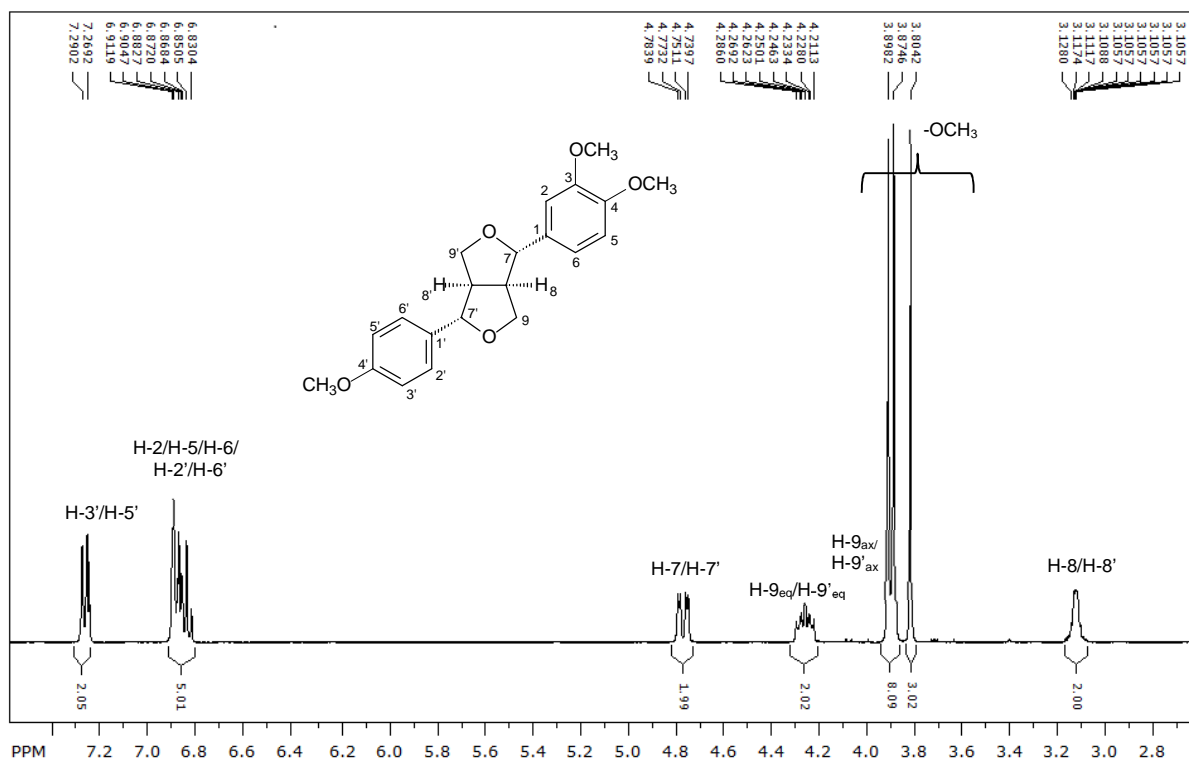


Figura 4.7 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância II (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

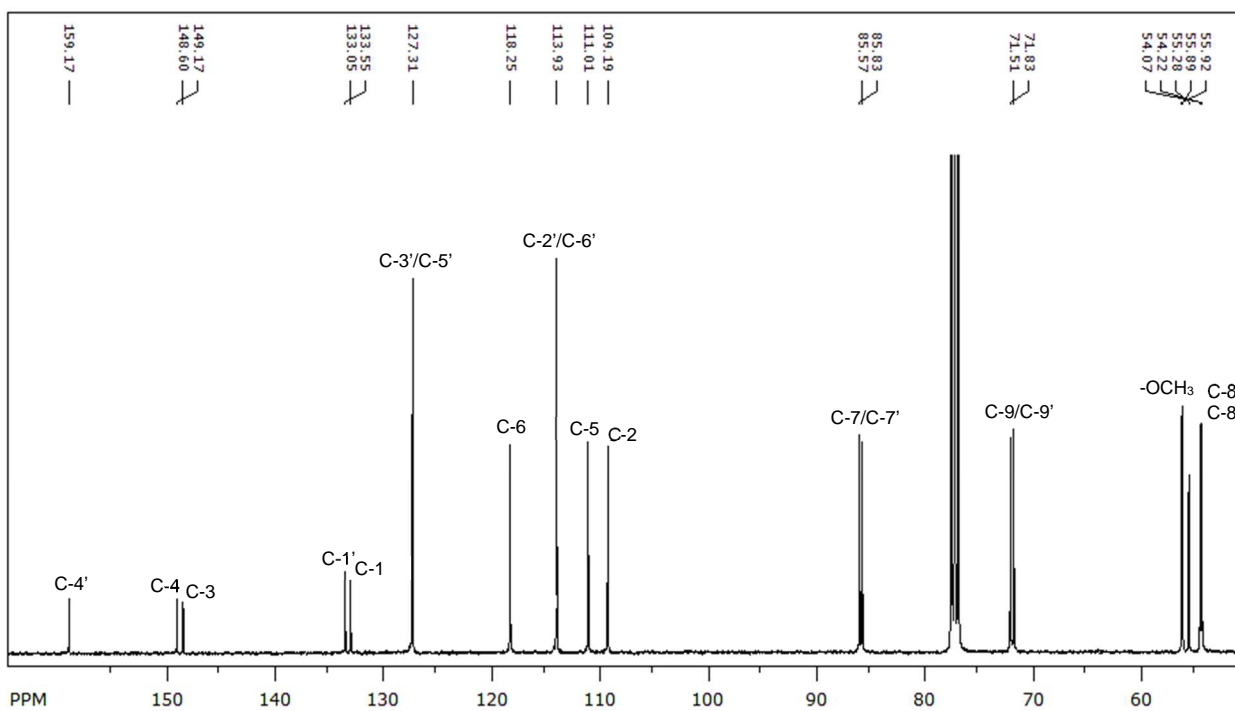


Figura 4.8 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância II (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

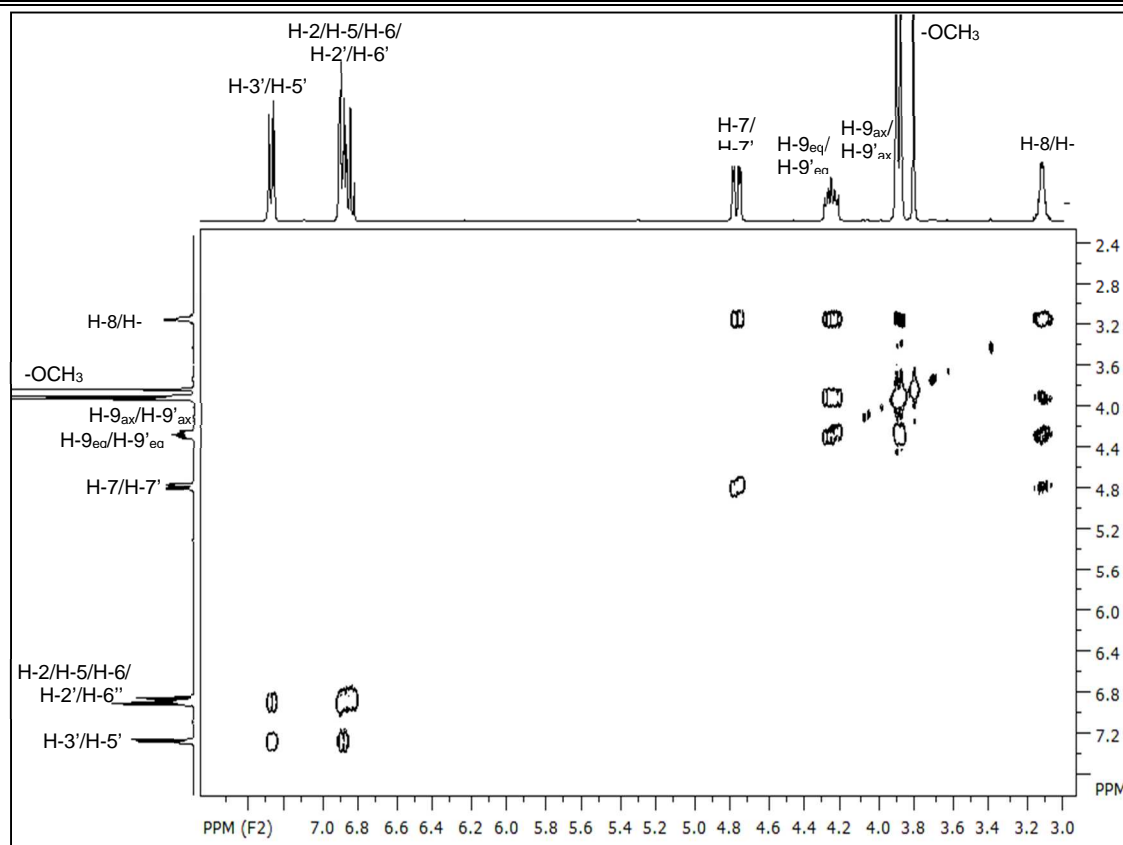


Figura 4.9 – Espectro de COSY da substância II (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

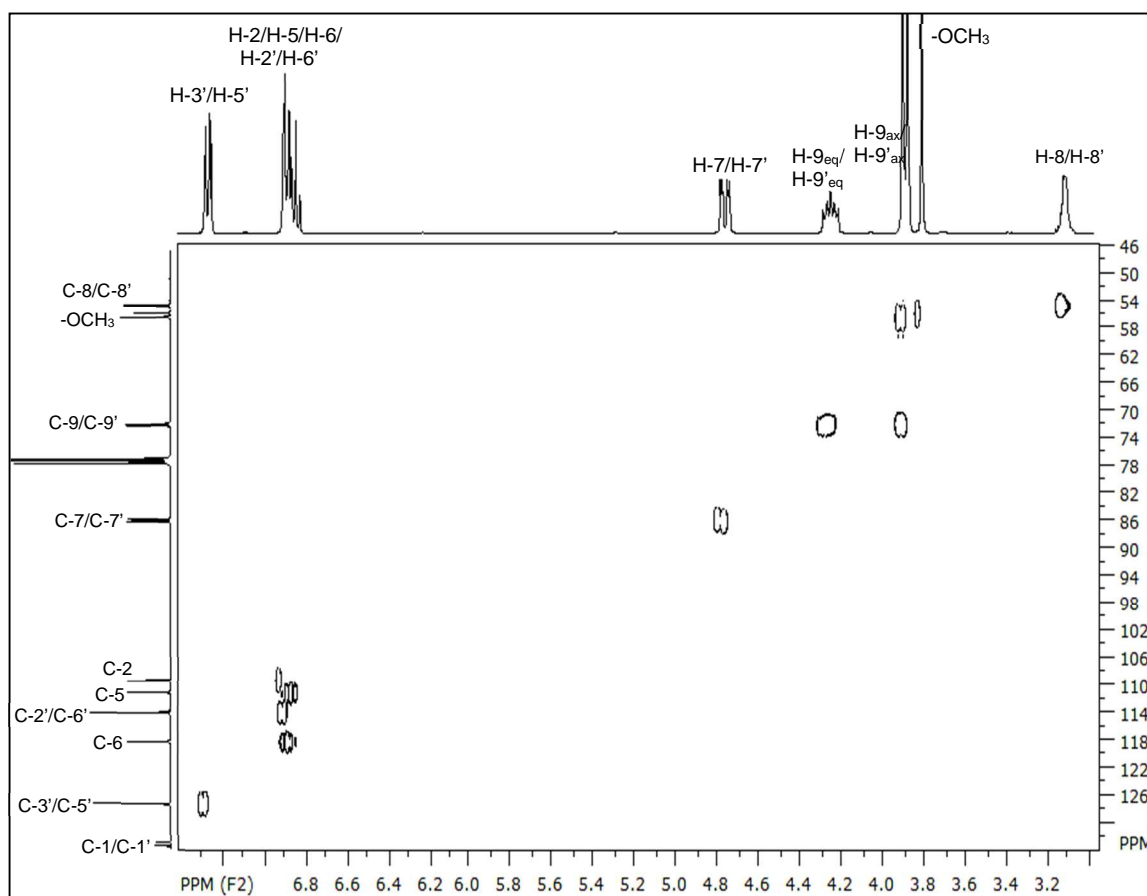


Figura 4.10 - Mapa de correlações HSQC da substância II (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

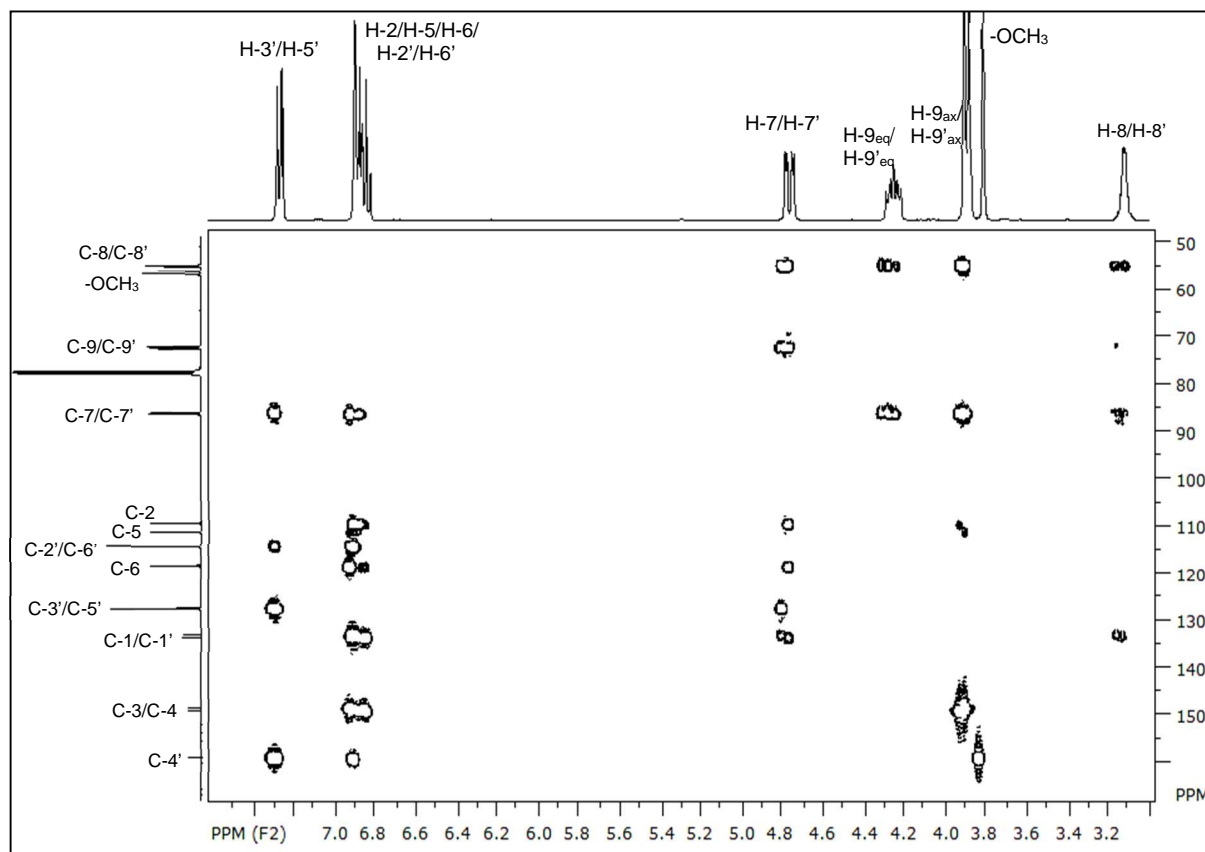


Figura 4.11 - Mapa de correlações HMBC da substância II (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



#### 4.2.2.1.3 – Identificação estrutural da substância III

A substância III foi obtida das frações CF4-3 e CF5.4-2, da partição hexânica das folhas de *A. mucosa* e foi estruturalmente identificada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC e comparação com a literatura (SEO, 2010).

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.12), foram observados os seguintes sinais:  $\delta_{\text{H}}$  4,75 (*d*,  $J = 4,0$  Hz, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  4,25 (*dd*,  $J = 7,2$  e  $9,2$  Hz, 2H 2H);  $\delta_{\text{H}}$  3,87-3,90 (*m*, 2H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,11 (*m*, 2H). Assim, como para as substâncias I e II, esses sinais caracterizam sistemas furofurânicos.

Com base na estrutura geral para esses sistemas, dados da literatura (SEO, 2010) e correlações observadas nos mapas de correlações COSY e HSQC (Figuras 4.14 e 4.15), os quatro hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,87-3,90 (2H) e  $\delta_{\text{H}}$  4,25 (2H) se correlacionam com apenas um carbono no mapa de correlações HSQC, indicando serem esses os hidrogênios diastereotópicos H-9 e H-9' e, a partir da explicação dada para a substância I, esses valores de deslocamento químico para esses hidrogênios permitem atribuir-se a configuração diequatorial à molécula. Esses dois sinais correlacionam-se com o multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,11 no mapa de correlações COSY, e este foi então atribuído aos hidrogênios H-8 e H-8'. Por último, a correlação observada entre o duplete em  $\delta_{\text{H}}$  4,75 e o multiplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,11 permite atribuir o primeiro aos hidrogênios H-7 e H-7'. Os deslocamentos de carbono do sistema furofurânico puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de HSQC, onde tem-se o H-7 e H-7' correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  85,8 (C-7/C-7'), H-9<sub>(ax e eq)</sub> e H-9'<sub>(ax e eq)</sub> correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  71,7 (C-9/C-9') e por último H-8 e H-8' correlacionando com  $\delta_{\text{C}}$  54,2 (C-8/C-8').

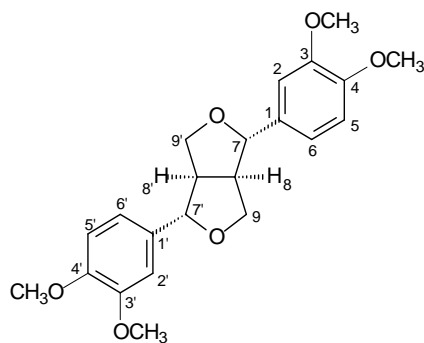
Foram observados também, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sinais na região de hidrogênios aromáticos,  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (*d*,  $J = 1,6$  Hz, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (*dd*,  $J = 1,6$  e  $8,3$  Hz, 2H) e  $\delta_{\text{H}}$  6,84 (*d*,  $J = 8,3$  Hz, 2H); e sinais referentes à 4 grupos metoxila,  $\delta_{\text{H}}$  3,90 (*s*, 6H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,88 (*s*, 6H), confirmando a substituição de quatro hidrogênios aromáticos por grupos metoxilas.

Com base nos valores de integração e multiplicidade observada para os hidrogênios do sistema furofurânico, verificam-se valores idênticos de deslocamento químico para os hidrogênios H-X e H-X', indicando assim, total equivalência química entre esses hidrogênios, o que permite afirmar que a molécula é simétrica. Dessa forma, conclui-se que cada um dos anéis aromáticos é substituído por dois grupos metoxila nas mesmas posições.

As posições 3/3' e 4/4' de substituição destas metoxilas foram determinadas pelo caminho biossintético das lignanas (BAYINDIR *et al.*, 2008; DEWICK, 2002). Dessa forma, para os sinais de hidrogênios aromáticos, pode-se atribuir o duplete em  $\delta_H$  6,91 aos hidrogênios H-2/H-2' que acoplam em *meta* ( $J = 1,6$  Hz) com os hidrogênios H-6/H-6' ( $\delta_H$  6,88; *dd*,  $J = 1,6$  e 8,3 Hz), que por sua vez, acoplam também em *orto* com os hidrogênios H-5/H-5' ( $\delta_H$  6,84; *d*, 8,3 Hz).

As atribuições de todos os hidrogênios e carbonos aromáticos foram feitas a partir dos experimentos de RMN de  $^{13}C$ , HSQC e HMBC (Figuras 4.13, 4.15 e 4.16) e estão relatados na Tabela 4.9. Dessa forma a substância **III** foi identificada como sendo a eudesmina.

A dispersão óptica rotatória da substância **III** foi determinada por experimento de  $\alpha_D$  onde se obteve o valor de  $\alpha_D = + 30,36$  ( $c$  0,083,  $CHCl_3$ ) portanto, trata-se da (+)-eudesmina.



**(+)-eudesmina (III)**

**Tabela 4.9** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância **III** e comparação com a eudesmina (SEO, 2010:  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 75 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância III	SEO, 2010	Substância III	SEO, 2010
1	-	-	133,5	133,3
2	6,91 ( <i>d</i> , 1,6)	6,83-6,89 ( <i>m</i> )	109,2	109,1
3	-	-	149,2	148,9
4	-	-	148,6	148,3
5	6,84 ( <i>d</i> , 8,3)	6,83-6,89 ( <i>m</i> )	111,0	110,9
6	6,88 ( <i>dd</i> , 1,6 e 8,3)	6,83-6,89 ( <i>m</i> )	118,3	118,1
7	4,75 ( <i>d</i> , 4,0)	4,75 ( <i>d</i> , 4,2)	85,8	85,7
8	3,11 ( <i>m</i> )	3,12 ( <i>m</i> )	54,1	54,2
9eq	4,25 ( <i>dd</i> , 7,2 e 9,2)	4,25 ( <i>dd</i> , 6,9 e 9,1)	71,7	71,7
9ax	3,87-3,90 ( <i>m</i> )	3,85-3,91 ( <i>m</i> )		
1'	-	-	133,5	133,3
2'	6,91 ( <i>d</i> , 1,6)	6,83-6,89 ( <i>m</i> )	109,2	109,1
3'	-	-	149,2	148,9
4'	-	-	148,6	148,3
5'	6,84 ( <i>d</i> , 8,3)	6,83-6,89 ( <i>m</i> )	111,0	110,9
6'	6,88 ( <i>dd</i> , 1,6 e 8,3)	6,83-6,89 ( <i>m</i> )	118,3	118,1
7'	4,75 ( <i>d</i> , 4,0)	4,75 ( <i>d</i> , 4,2)	85,8	85,7
8'	3,11 ( <i>m</i> )	3,12 ( <i>m</i> )	54,1	54,2
9'eq	4,25 ( <i>dd</i> , 7,2 e 9,2)	4,25 ( <i>dd</i> , 6,9 e 9,1)	71,7	71,7
9'ax	3,87-3,90 ( <i>m</i> )	3,85-3,91 ( <i>m</i> )		
4 x -OCH <sub>3</sub>	3,88 ( <i>s</i> )	3,87 ( <i>s</i> )	55,9	55,9
	3,90 ( <i>s</i> )	3,89 ( <i>s</i> )	55,9	55,9

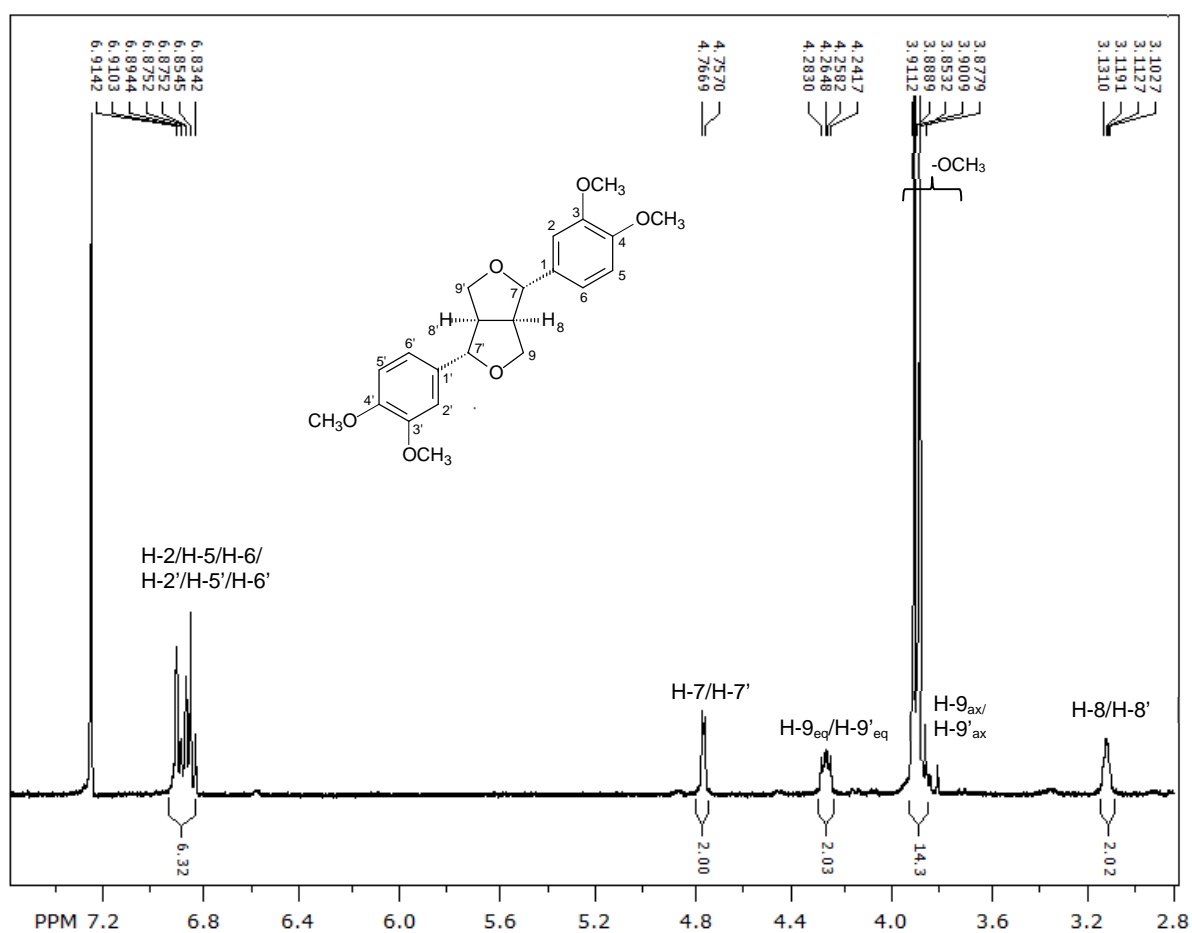


Figura 4.12 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância III (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

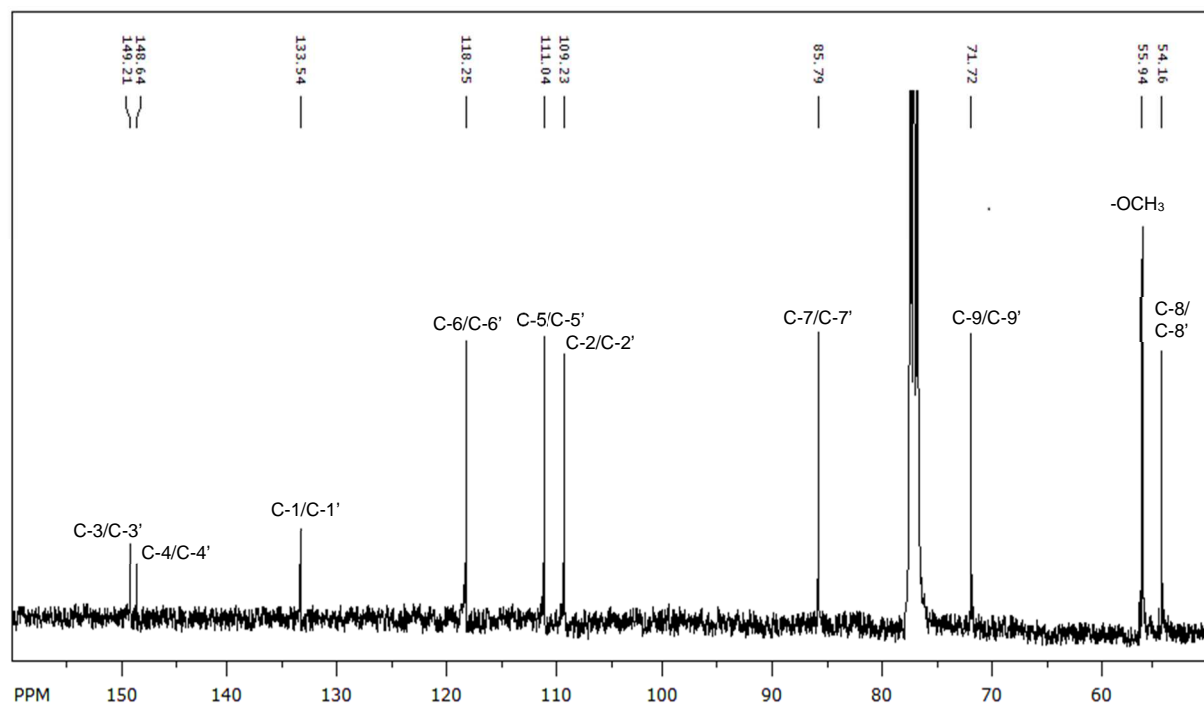


Figura 4.13 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância III (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

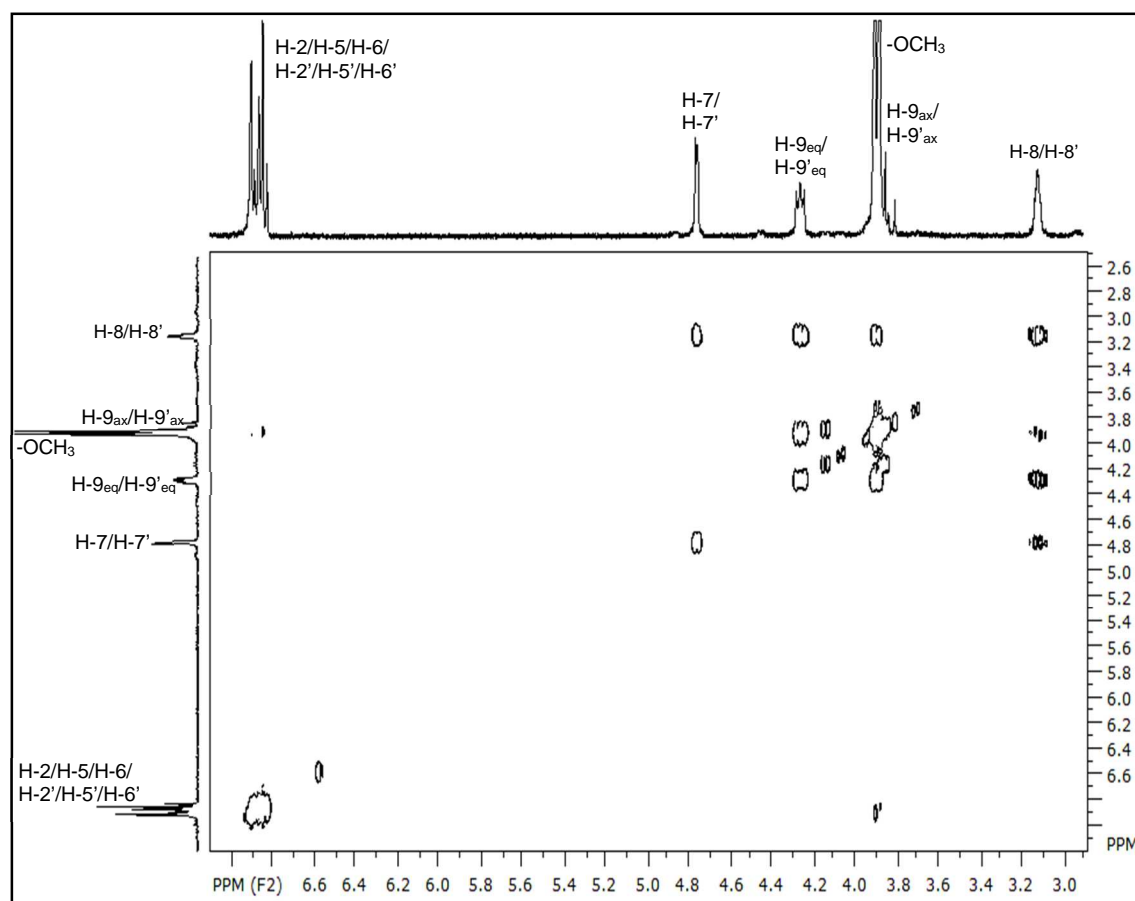


Figura 4.14 – Espectro de COSY da substância III (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

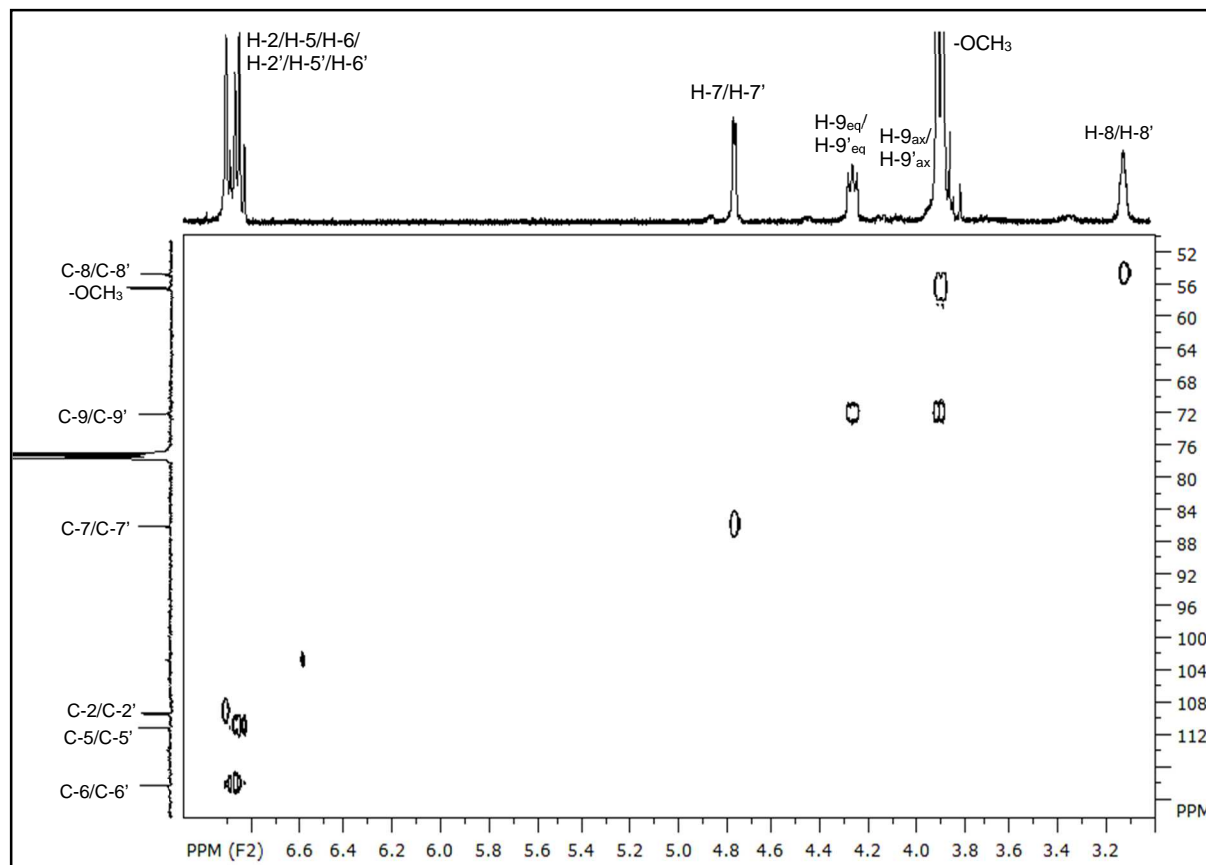


Figura 4.15 - Mapa de correlações HSQC da substância III (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

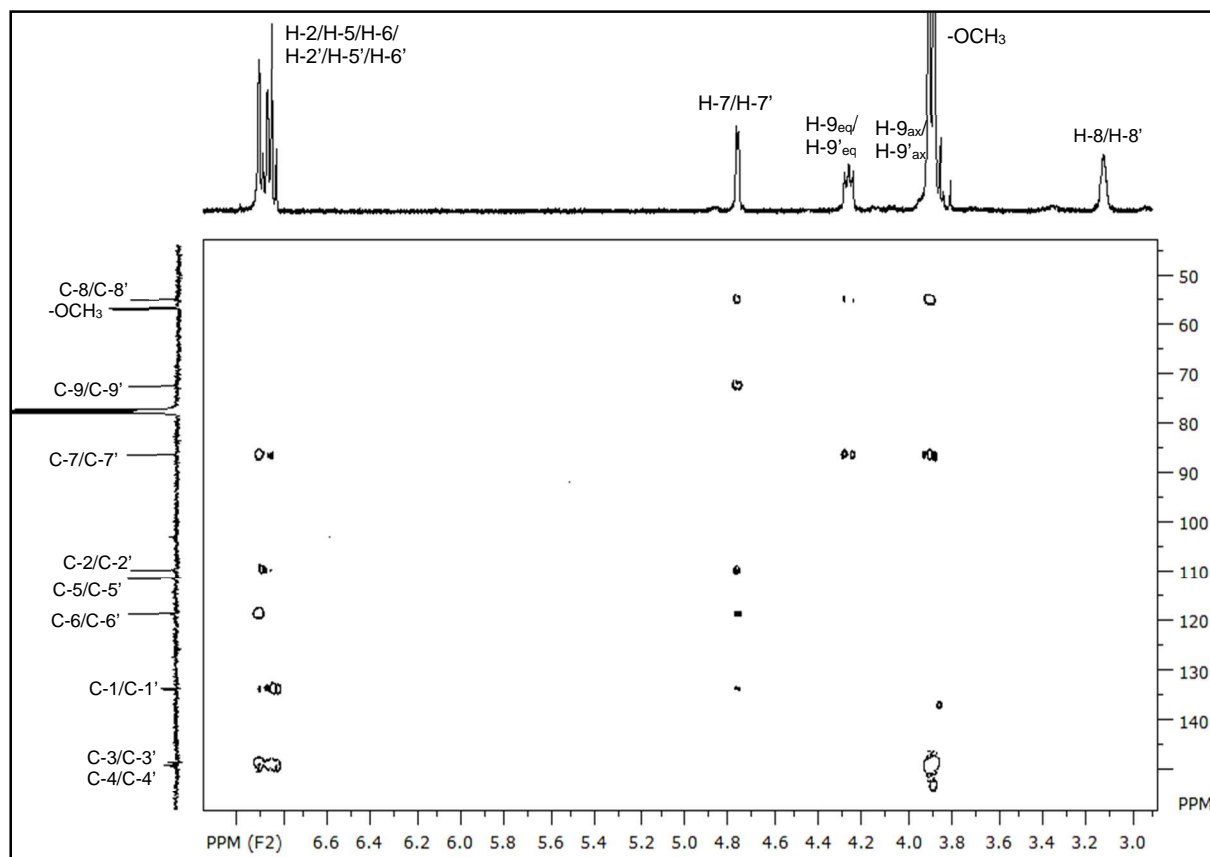


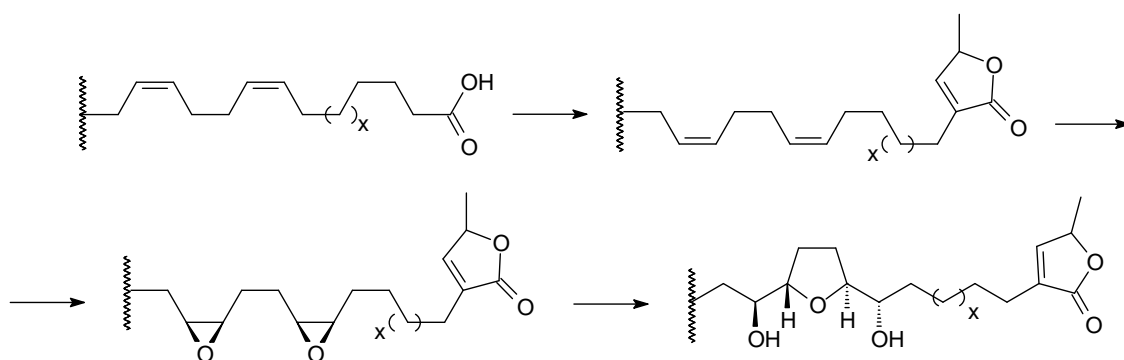
Figura 4.16 - Mapa de correlações HMBC da substância III (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

### 4.2.2.2 – Acetogeninas

Acetogeninas de anonáceas (*ing.* annonaceous acetogenins) constituem um grupo de produtos naturais isolados de plantas da família Annonaceae. A primeira acetogenina isolada e estruturalmente caracterizada desta família foi a uvaricina em 1982 (TEMPESTA *et al.*, 1982). A significativa atividade antitumoral da uvaricina despertou o interesse no estudo desta classe de compostos levando ao isolamento de mais de 400 acetogeninas entre 1982 e 2004 (BERMEJO *et al.*, 2005).

Estruturalmente, as acetogeninas são compostos de 35/37 carbonos em sua estrutura, derivados de ácidos graxos que contêm 32/34 carbonos, com as cadeias alquílicas terminando em unidades  $\gamma$ -lactônicas insaturadas ou não. Várias funções oxigenadas podem estar presentes ao longo da cadeia, como grupos hidroxilas, cetonas, epóxidos, tetrahydrofuranos e tetrahydropiranos, assim como ligações duplas e triplas (BERMEJO *et al.*, 2005).

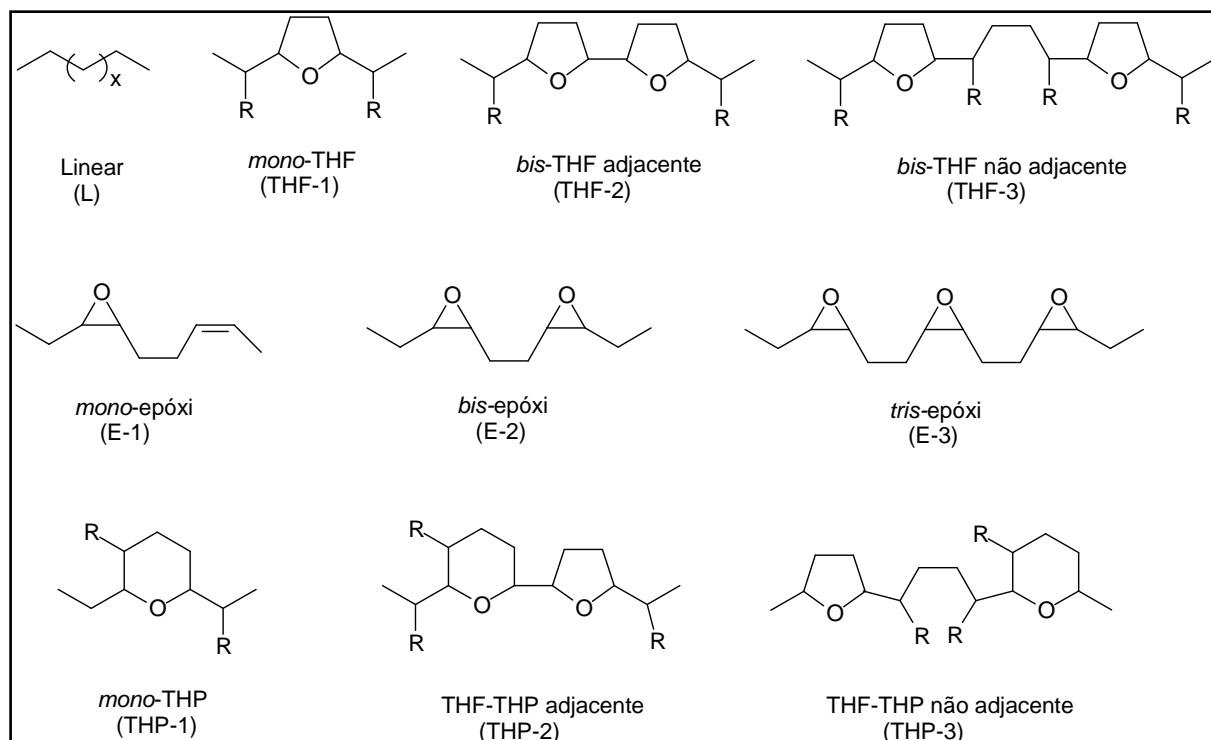
A biogênese das acetogeninas parece ocorrer via caminho do policetídeo. A sequência biossintética postulada para as acetogeninas se inicia pela formação de uma unidade  $\gamma$ -lactônica terminal na cadeia de ácido graxo insaturada. As ligações duplas da cadeia são então parcialmente ou completamente epoxidadas seguido de possíveis aberturas de anel intra e intermoleculares e reações de fechamento de anel resultando em núcleos estruturais característicos como os tetrahydrofuranos (THF) e os tetrahydropiranos (THP) (Figura 4.17).



**Figura 4.17** – Exemplo do caminho biossintético proposto para as acetogeninas (ZENG *et al.*, 1996).

Devido ao grande número de diferentes acetogeninas reportadas na literatura, foi introduzido um sistema de classificação, baseado nas características estruturais. As acetogeninas foram divididas em clássicas e não clássicas. As primeiras

apresentam estruturas lineares (L) ou com anéis tetrahydrofurânicos (THF-1 a 3) ou grupos epóxido (E-1 a 3), as segundas apresentam anéis tetrahidropirânicos (THP-1 a 3) em sua estrutura (Figura 4.18).



**Figura 4.18** – Estruturas gerais das acetogeninas naturais.

As acetogeninas recebem um sistema de numeração onde apenas os átomos de carbono são numerados, iniciando-se nas unidades lactônicas, onde o carbono carboxílico e o carbono  $\alpha$  à carboxila recebem a numeração 1 e 2, respectivamente, e a numeração prossegue na cadeia alquílica apenas para os carbonos, terminando em 32 ou 34 dependendo do tamanho da cadeia e, os demais carbonos do anel lactônico, recebem a numeração 33/34/35 ou 35/36/37.

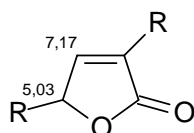


#### 4.2.2.2.1 – Identificação estrutural das substâncias IV, V e VI

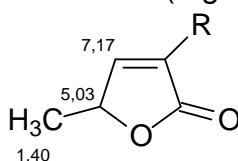
As substâncias **IV**, **V** e **VI** foram obtidas da fração C1-4 da partição hidroalcolica das sementes de *A. mucosa* e foram estruturalmente identificadas por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, espectrometria de massas (Figuras 4.19-4.34) e comparação com a literatura (BERMEJO *et al.*, 2005; GONZALEZ *et al.*, 1997; PETIT *et al.*, 1987 e 1989).

##### - Discussão dos dados espectroscópicos da substância IV

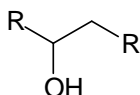
Pela análise do RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.20) foram observados os seguintes sinais:  $\delta_{\text{H}}$  7,17 ( $q_{\text{dist.}}$ ,  $J = 1,4$ , 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  5,03 ( $dq$ ,  $J = 1,4$  e 6,8, 1H) característicos do hidrogênio da dupla ligação e do oximetínico dos anéis lactônicos  $\alpha,\beta$ -insaturados substituídos por grupos alquila nas posições  $\alpha$  e  $\gamma$ , unidades comuns nas estruturas das acetogeninas de anonáceas.



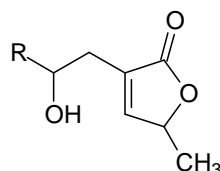
Esses hidrogênios acoplam entre si com uma constante de acoplamento de  $J = 1,4$  Hz, e ainda o hidrogênio oximetínico ( $\delta_{\text{H}}$  5,03) acopla com o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,40, integrado para 3 hidrogênios, a uma constante de  $J = 6,8$  Hz, permitindo atribuir esse último sinal à metila ligada à lactona. Todas as correlações entre esses hidrogênios são observadas no mapa de contornos COSY (Figura 4.22).



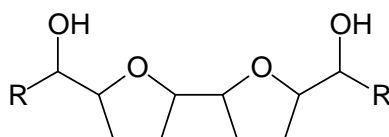
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados ainda dois sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,49 ( $ddt$ ,  $J = 1,6$ ; 3,3 e 15,3; 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  2,37 ( $ddt$ ,  $J = 1,6$ ; 8,3 e 15,3; 1H) que correlacionam-se com apenas um carbono no mapa de correlações HSQC (Figura 4.23) ( $\delta_{\text{C}}$  33,2) indicando se tratarem de hidrogênios diastereotópicos. A correlação observada, no mapa de contornos COSY, entre esses sinais e o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,78-3,89 ( $m$ , 6H) característico de hidrogênios oximetínicos, confirma serem os primeiros, hidrogênios de um grupo metilênico  $\beta$  ( $\delta_{\text{H}}$  2,49 e 2,37;  $\delta_{\text{C}}$  33,2) vizinhos a um grupo oximetínico.



Correlações observadas no experimento de HMBC (Figura 4.24) permitiram atribuir a posição deste grupo na molécula. Foram observadas correlações entre os hidrogênios  $\delta_H$  7,17 e 5,03 com o carbono  $\delta_C$  33,2 que permitiram concluir que o grupo discutido acima está ligado ao anel lactônico. Os átomos de carbono dessa unidade puderam ser atribuídos com base nos sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}C$  (Figura 4.21) e nas correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC.



Foram observados, no espectro de RMN de  $^1H$ , dois multipletos em  $\delta_H$  1,71-1,93, integrando para 4 hidrogênios cada, que são característicos de grupos metilênicos de anéis tetrahydrofurânicos (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2005), o que indica a presença de dois anéis THF na molécula. No mapa de correlações HMBC esses multipletos correlacionam-se com 6 átomos de carbonos oximetínicos em  $\delta_C$  83,1; 83,0; 81,1; 81,0; 73,9 e 71,7 sendo 4 deles os carbonos oximetínicos dos anéis THF, o que confirma a presença de duas hidroxilas vizinhas à esses anéis. Como não foram observadas, no mapa de contornos COSY, correlações entre os multipletos em  $\delta_H$  1,71-1,93 e os grupos metilênicos de cadeia hidrocarbônica ( $\delta_H$  1,23-1,47) isso confirma que a única formação possível para esses anéis é que eles sejam adjacentes com grupos hidroxilas vizinhos.



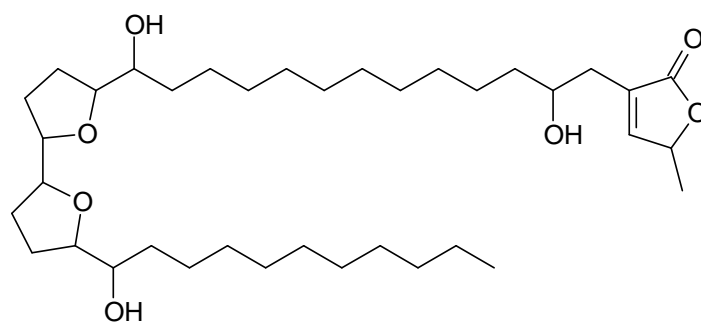
#### **- Análise comparativa dos dados espectroscópicos das substâncias IV, V e VI**

A análise dos espectros de RMN de  $^1H$ , COSY, HSQC e HMBC das três substâncias **IV**, **V** e **VI** mostraram que os dados discutidos anteriormente, para a substância **IV**, são semelhantes para **V** e **VI**. Todos os dados discutidos são mostrados na Tabela 4.10 para as 3 acetogeninas.

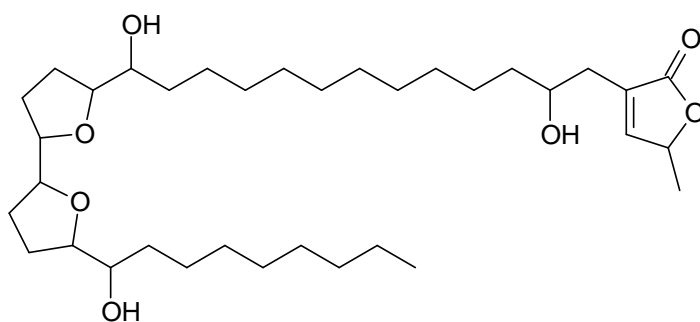
Os dados apresentados até o momento confirmam que as 3 substâncias apresentam os mesmos núcleos, anel  $\gamma$ -lactônico insaturado e grupo diol *bis*-THF adjacente.

O tamanho da cadeia alquílica e a posição do grupo *bis*-THF nessas cadeias foram determinados por espectrometria de massas (Figura 4.19), onde se observou os picos de íons moleculares  $[M-H]^-$  em  $m/z$  621 para as acetogeninas **IV** e **V** (diastereoisômeros com cadeia de 34 carbonos) e  $m/z$  593 para a acetogenina **VI** (cadeia de 32 carbonos). Dentre os picos  $m/z$  observados para os 3 compostos, a única diferença encontra-se nos picos  $m/z$  297 para as acetogeninas **IV** e **V**, e  $m/z$  269 para a acetogenina **VI**. Uma vez que a diferença entre esses picos é de 28 u. (duas unidades metilênicas), eles referem-se à fragmentos que carregam a cadeia alquílica lateral ao grupo *bis*-THF e confirmam a posição deste grupo no carbono C-14 da cadeia alquílica, nos 3 casos, conforme a proposta de formação deste fragmento no Esquema 4.1.

Assim, as estruturas dos compostos **IV**, **V** e **VI** foram determinadas conforme demonstrado adiante, sendo que **IV** e **V** apresentam a mesma estrutura planar diferenciando entre si apenas pela estereoquímica.



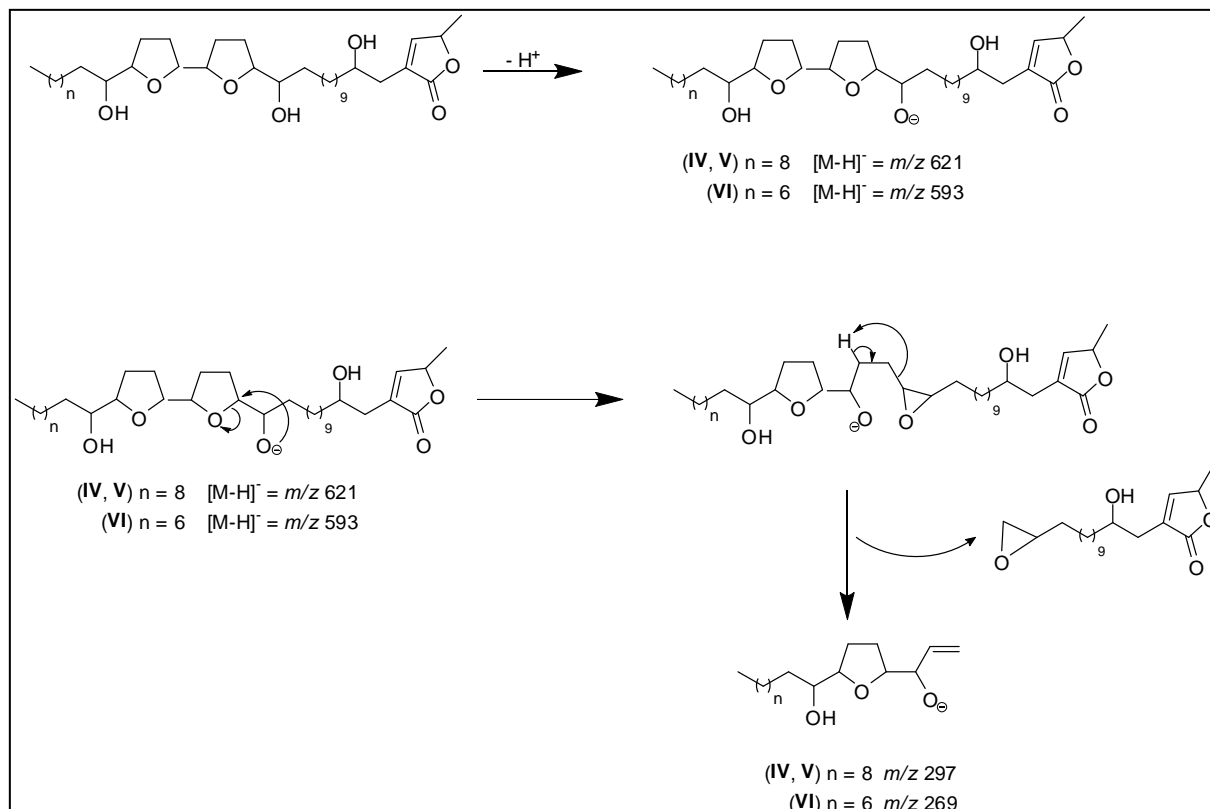
Substâncias **IV** e **V**



Substância **VI**

Tabela 4.10 – Análise comparativa dos dados espectroscópicos das substâncias IV, V e VI.

Hidrogênio	Substância IV	Substância V	Substância VI
<b>RMN de <sup>1</sup>H</b>			
H-35	7,17 ( <i>q<sub>dist.</sub></i> , <i>J</i> = 1,4; 1H)	7,18 ( <i>q<sub>dist.</sub></i> , <i>J</i> = 1,4; 1H)	7,18 ( <i>q<sub>dist.</sub></i> , <i>J</i> = 1,3; 1H)
H-36	5,03 ( <i>dq</i> , <i>J</i> = 1,4 e 6,8; 1H)	5,06 ( <i>dq</i> , <i>J</i> = 1,4 e 6,8; 1H)	5,05 ( <i>dq</i> , <i>J</i> = 1,3 e 6,8; 1H)
H-4/H-16/H-19/ H-20/H-23/H-24	3,78-3,89 ( <i>m</i> , 6H)	3,83-3,95 ( <i>m</i> , 6H)	3,80-3,92 ( <i>m</i> , 6H)
H-3 $\alpha$	2,49 ( <i>ddt</i> , <i>J</i> = 1,6; 3,3 e 15,3; 1H)	2,53 ( <i>ddt</i> , <i>J</i> = 1,5; 3,3 e 15,0; 1H)	2,52 ( <i>ddt</i> , <i>J</i> = 1,6; 3,4 e 15,2; 1H)
H-3 $\beta$	2,37 ( <i>ddt</i> , <i>J</i> = 1,6; 8,3 e 15,3; 1H)	2,39 ( <i>ddt</i> , <i>J</i> = 1,4; 8,4 e 15,0; 1H)	2,39 ( <i>ddt</i> , <i>J</i> = 1,3; 8,2 e 15,2; 1H)
H-17/H-18/H-21/H-22	1,71-1,93 ( <i>m</i> , 8H)	1,59-2,0 ( <i>m</i> , 8H)	1,73-1,97 ( <i>m</i> , 8H)
H-37	1,40 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,8; 3H)	1,42 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,8; 3H)	1,42 ( <i>d</i> , <i>J</i> = 6,8; 3H)
<b>COSY</b>			
	5,03 → 7,17 e 1,40	5,06 → 7,18 e 1,42	5,05 → 7,18 e 1,42
	2,49 e 2,37 → 3,78-3,89	2,53 e 2,39 → 3,83-3,95	2,52 e 2,39 → 3,80-3,92
	1,71-1,93 → 3,78-3,89	1,59-2,0 → 3,83-3,95	1,73-1,97 → 3,80-3,92
<b>HSQC</b>			
	2,49 e 2,37 → 33,2	2,53 e 2,39 → 33,3	2,52 e 2,39 → 33,3
<b>HMBC</b>			
	7,17 e 5,03 → 33,2	7,18 → 33,3	7,18 e 5,05 → 33,3
	1,71-1,93 → 83,1/83,0/81,1/81,0/73,9/71,7	1,59-2,0 → 83,2/82,8/82,5/82,2/74,1/71,3	1,73-1,97 → 83,0/82,9/81,1/81,0/74,0/71,9



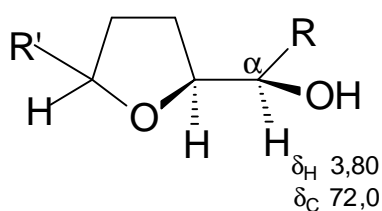
Esquema 4.1 – Proposta de formação dos íons  $m/z$  297 (IV e V) e  $m/z$  269 (VI).

#### - Determinação estereoquímica das substâncias IV, V e VI

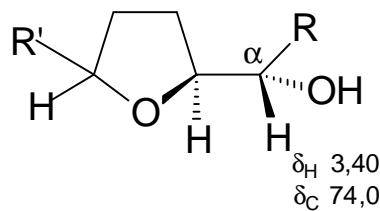
A determinação estereoquímica das 3 substâncias foi baseada nos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio das mesmas (Tabelas 4.11 a 4.13).

JOSSANG e colaboradores estabeleceram uma metodologia na qual as configurações relativas entre os carbonos oxigenados dos anéis tetrahidrofurânicos e os carbonos oximetínicos em  $\alpha$  aos mesmos podem ser definidas pelos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (JOSSANG *et al.*, 1990).

Segundo este modelo, quando os sinais para o carbono oximetínico  $\alpha$  ao anel THF (carbono contendo hidroxila) e para o hidrogênio deste carbono aparecem em  $\delta_C$  72,0 e  $\delta_H$  3,80, a estereoquímica é **eritro**, e quando esses sinais aparecem em  $\delta_C$  74,0 e  $\delta_H$  3,40 a estereoquímica é **treo**, conforme mostrado a abaixo. Esta metodologia pode ser também aplicada para acetogeninas monotetrahidrofurânicas e é também conhecida como Regra de Born (BORN *et al.*, 1990).

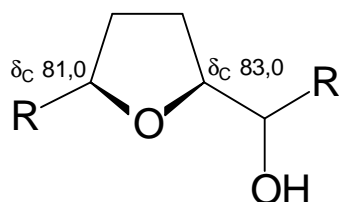


*eritro*

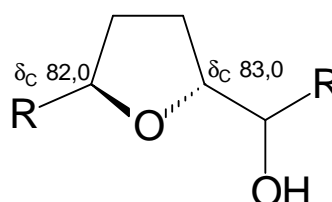


*treo*

O padrão *cis/trans* dos anéis THF pode ser estabelecido através da comparação dos deslocamentos químicos dos dois carbonos oxigenados do anel que apresenta grupos hidroxila nos carbonos adjacentes. Para o isômero *cis* tem-se que a diferença entre esses deslocamentos químicos foi igual a 2 ( $\Delta\delta = 2$ ) e para o isômero *trans* tem-se que essa diferença é inferior a 1,5 ( $\Delta\delta < 1,5$ ) conforme demonstrado abaixo:

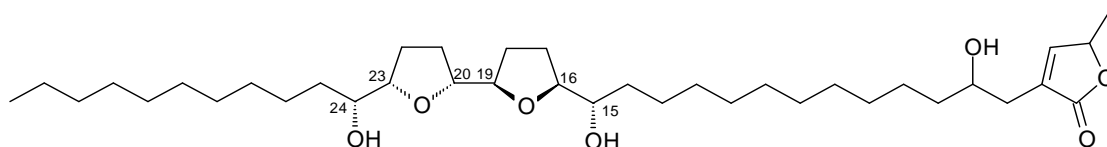


$\Delta\delta = 2$   
*cis*



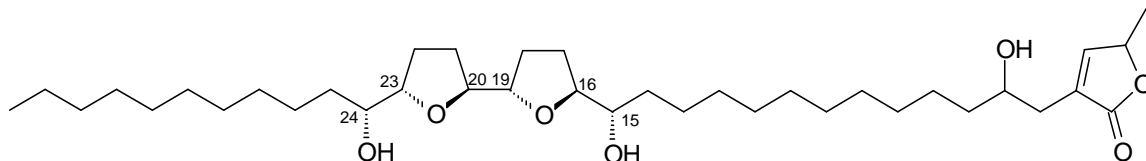
$\Delta\delta < 1,5$   
*trans*

De posse desses dados foi possível determinar a estereoquímica relativa das substâncias **IV**, **V** e **VI** baseando-se nos deslocamentos de carbonos e hidrogênios das mesmas. O esqueleto carbônico das substâncias **IV** e **VI** mostraram-se idênticos. No entanto elas diferem entre si na estereoquímica, a acetogenina **IV** apresenta a estereoquímica *treo/cis/treo/cis/eritro* enquanto a substância **V** apresenta a estereoquímica *treo/trans/treo/trans/eritro*. A substância **VI** apresenta a mesma estereoquímica de **IV**, *treo/cis/treo/cis/eritro*, diferindo desta no tamanho da cadeia por duas unidades metilênicas, conforme demonstrado abaixo:



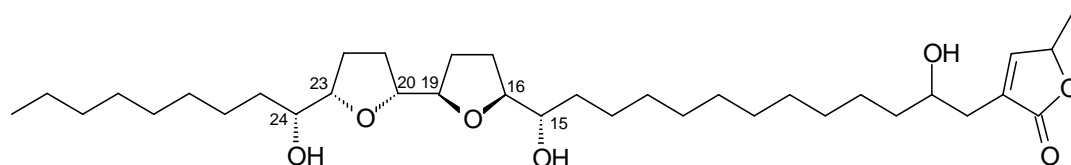
IV

	C-15	C-16	C-19	C-20	C-23	C-24
$\delta_H$	3,38	3,88	3,87	3,84	3,88	3,84
$\delta_C$	73,9	83,1	81,1	81,0	83,0	71,7



V

	C-15	C-16	C-19	C-20	C-23	C-24
$\delta_H$	3,39	3,84	3,92	3,84	3,84	3,86
$\delta_C$	74,0	83,2	82,5	82,2	82,8	71,9

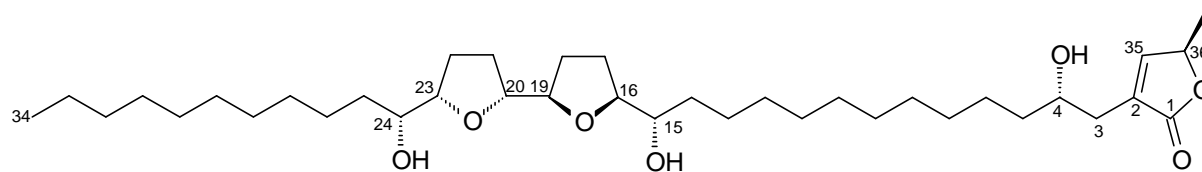


VI

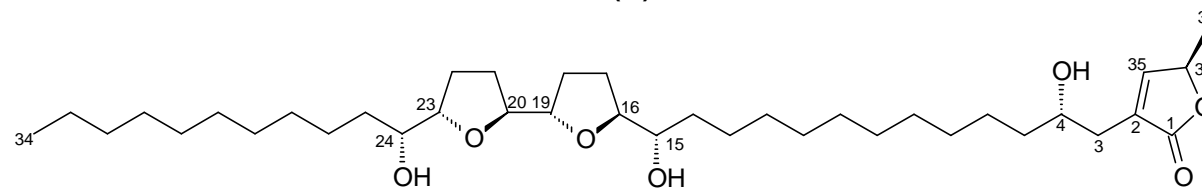
	C-15	C-16	C-19	C-20	C-23	C-24
$\delta_H$	3,40	3,90	3,89	3,84	3,86	3,85
$\delta_C$	74,0	83,0	81,1	81,0	82,9	71,9

A determinação da estereoquímica dos carbonos C-4 e do carbono oximetínico do anel lactônico foi feita através de comparação com a literatura, onde a substância rolliniastatina-1 foi obtida de *Rollinia mucosa* (atualmente classificada como *Annona mucosa*) e, através de experimentos de difração de raio-X foi estabelecida as configurações 4S e 36R para esses carbonos, respectivamente (PETIT *et al.*, 1987). Dessa forma, as substâncias IV e V foram determinadas como rolliniastatina-1 e rolliniastatina-2, respectivamente (BERMEJO *et al.*, 2005; GONZALEZ *et al.*, 1997; PETIT *et al.*, 1987 e 1989). Para a substância VI, apenas foram encontradas na literatura diastereoisômero sintético (MARSHALL & SABATINI, 2006), isômeros de posição do grupo diol *bis*-THF onde este grupo encontra-se substituindo no carbono C-12 (rollimembrina) (ALALI *et al.*, 1999) e isômeros com cadeia de 34 carbonos,

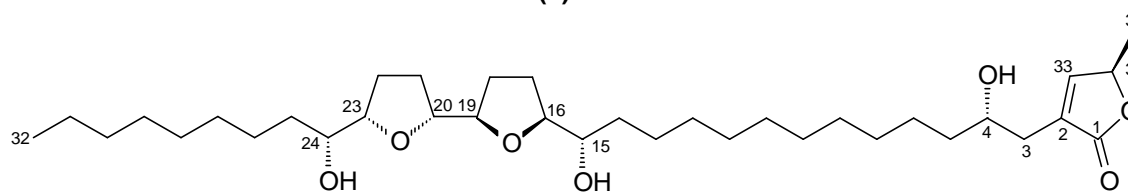
como é o caso da substância **IV**, assim, propõe-se que esta substância seja inédita na literatura.



**Rolliniastatina-1 (IV)**



**Rolliniastatina-2 (V)**



**Substância VI**



**Tabela 4.11** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância **IV** e comparação com a rolliniastatina-1 (PETIT *et al.*, 1987:  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 75 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância IV	PETIT <i>et al.</i> , 1987	Substância IV	PETIT <i>et al.</i> , 1987
1	-	-	174,6	174,5
2	-	-	131,1	131,1
3 $\alpha$	2,49 ( <i>ddt</i> , 1,6; 3,3 e 15,3)	2,50 ( <i>dddd</i> , 1,6; 3,5 e 15,1)	33,2	33,2
3 $\beta$	2,37 ( <i>ddt</i> , 1,6; 8,3 e 15,3)	2,36 ( <i>dddd</i> , 1,4; 8,1 e 15,1)		
4	3,82 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	69,9	69,9
5	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,45 ( <i>m</i> )	37,3	37,4
6	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	26,0	26,0
7-12	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	29,3-29,6	29,3-29,6
13	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	25,7	25,7
14	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,50 ( <i>m</i> )	34,1	34,1
15	3,38 ( <i>m</i> )	3,38 ( <i>m</i> )	73,9	74,0
16	3,88 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	83,0	83,0
17	1,71-1,93 ( <i>m</i> )	1,7-1,9 ( <i>m</i> )	28,6	28,7
18	1,71-1,93 ( <i>m</i> )	1,7-1,9 ( <i>m</i> )	23,7	27,8
19	3,87 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	81,1	81,1
20	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	81,0	81,0
21	1,71-1,93 ( <i>m</i> )	1,7-1,9 ( <i>m</i> )	27,8	27,8
22	1,71-1,93 ( <i>m</i> )	1,7-1,9 ( <i>m</i> )	28,3	28,4
23	3,88 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	83,0	83,0
24	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	71,7	71,8
25	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,45 ( <i>m</i> )	32,7	32,8
26	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	25,5	25,5
27-31	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	29,3-29,6	29,3-29,6
32	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	31,8	31,9
33	1,23-1,47 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	22,6	22,6
34	0,84 ( <i>t</i> , 6,7)	0,85 ( <i>t</i> )	14,0	14,1
35	7,17 ( <i>q<sub>dist</sub></i> , 1,4)	7,16 ( <i>ddd</i> , 1,5)	151,7	151,7
36	5,03 ( <i>dq</i> , 1,4 e 6,8)	5,02 ( <i>dddq</i> , 1,5)	77,9	77,9
37	1,40 ( <i>d</i> ,6,8)	1,41 ( <i>d</i> )	19,0	19,1

**Tabela 4.12** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância **V** e comparação com a rolliniastatina-2 (PETIT *et al.*, 1989:  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 100 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância V	PETIT <i>et al.</i> , 1989	Substância V	PETIT <i>et al.</i> , 1989
1	-	-	174,6	174,4
2	-	-	131,2	131,1
3 $\alpha$	2,53 ( <i>ddt</i> , 1,5; 3,3 e 15,0)	2,52 ( <i>dddd</i> , 1,6; 3,5 e 15,1)	33,3	33,2
3 $\beta$	2,39 ( <i>ddt</i> , 1,4; 8,4 e 15,0)	2,39 ( <i>dddd</i> , 1,6; 3,5 e 15,1)		
4	3,83 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	69,9	69,9
5	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,46 ( <i>m</i> )	37,4	37,3
6	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	26,0	25,9
7-12	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	29,3-29,6	29,0-29,6
13	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	25,6	25,9
14	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,50 ( <i>m</i> )	33,3	33,2
15	3,39 ( <i>m</i> )	3,38 ( <i>m</i> )	74,0	74,0
16	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	83,2	83,1
17	1,59-2,00 ( <i>m</i> )	1,7-2,0 ( <i>m</i> )	28,9	28,8
18	1,59-2,00 ( <i>m</i> )	1,7-2,0 ( <i>m</i> )	24,4	28,3
19	3,92 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	82,5	82,4
20	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	82,2	82,2
21	1,59-2,00 ( <i>m</i> )	1,7-2,0 ( <i>m</i> )	28,4	28,3
22	1,59-2,00 ( <i>m</i> )	1,7-2,0 ( <i>m</i> )	28,8	28,8
23	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	82,8	82,7
24	3,86 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	71,9	71,8
25	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,46 ( <i>m</i> )	32,4	33,4
26	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	25,5	25,5
27-31	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	29,3-29,6	29,0-29,6
32	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	31,9	31,8
33	1,25-1,51 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	22,6	22,6
34	0,87 ( <i>t</i> , 6,7)	0,87 ( <i>t</i> , 6,8)	14,1	14,0
35	7,18 ( <i>q<sub>dist</sub></i> , 1,4)	7,16 ( <i>ddd</i> , 1,2; 1,5; 1,5)	151,8	151,7
36	5,06 ( <i>dq</i> , 1,4 e 6,8)	5,05 ( <i>ddd</i> , 1,5; 1,5; 6,8)	77,9	77,9
37	1,42 ( <i>d</i> , 6,8)	1,42 ( <i>d</i> , 6,8)	19,0	19,0

**Tabela 4.13** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância **VI** e comparação com a rollimembrina (isômero de posição do grupo diol *bis*-THF) (GONZÁLEZ *et al.*, 1997:  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 100 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância VI	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1997	Substância VI	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1997
<b>1</b>	-	-	174,6	174,6
<b>2</b>	-	-	131,2	131,2
<b>3<math>\alpha</math></b>	2,52 ( <i>ddt</i> , 1,6; 3,4 e 15,2)	2,52 ( <i>dd</i> , 3,0 e 15,0)	33,3	33,3
<b>3<math>\beta</math></b>	2,39 ( <i>ddt</i> , 1,3; 8,2 e 15,2)	2,39 ( <i>dd</i> , 8,0 e 15,0)		
<b>4</b>	3,40 ( <i>m</i> )	3,81 ( <i>m</i> )	70,0	69,9
<b>5</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,46 ( <i>m</i> )	37,4	37,4
<b>6</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,30 ( <i>m</i> )	26,0	26,0
<b>7-12</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	29,3-29,6	29,6
<b>13</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,30 ( <i>m</i> )	25,7	25,7
<b>14</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,46 ( <i>m</i> )	34,2	34,2
<b>15</b>	3,40 ( <i>m</i> )	3,40 ( <i>m</i> )	74,0	74,0
<b>16</b>	3,90 ( <i>m</i> )	3,81 ( <i>m</i> )	83,0	83,0
<b>17</b>	1,73-1,97 ( <i>m</i> )	1,76-1,92 ( <i>m</i> )	28,7	28,7
<b>18</b>	1,73-1,97 ( <i>m</i> )	1,76-1,92 ( <i>m</i> )	27,9	27,9
<b>19</b>	3,89 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	81,1	81,1
<b>20</b>	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	81,0	81,0
<b>21</b>	1,73-1,97 ( <i>m</i> )	1,76-1,92 ( <i>m</i> )	28,4	28,4
<b>22</b>	1,73-1,97 ( <i>m</i> )	1,76-1,92 ( <i>m</i> )	23,7	23,7
<b>23</b>	3,86 ( <i>m</i> )	3,90 ( <i>m</i> )	82,9	83,0
<b>24</b>	3,85 ( <i>m</i> )	3,81 ( <i>m</i> )	71,9	71,9
<b>25</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,36 ( <i>m</i> )	32,8	32,8
<b>26</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,30 ( <i>m</i> )	25,5	25,5
<b>27-29</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	29,3-29,6	29,6
<b>30</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	31,9	31,9
<b>31</b>	1,25-1,49 ( <i>m</i> )	1,25 ( <i>m</i> )	22,7	22,6
<b>32</b>	0,87 ( <i>t</i> , 6,7)	0,87 ( <i>t</i> , 6,8)	14,1	14,0
<b>33</b>	7,18 ( <i>q<sub>dist</sub></i> , 1,3)	7,17 ( <i>d</i> , 1,25)	151,8	151,7
<b>34</b>	5,05 ( <i>dq</i> , 1,3 e 6,8)	5,04 ( <i>dq</i> , 1,25; 7,0)	77,9	77,9
<b>35</b>	1,42 ( <i>d</i> , 6,8)	1,42 ( <i>d</i> , 7,0)	19,1	19,1

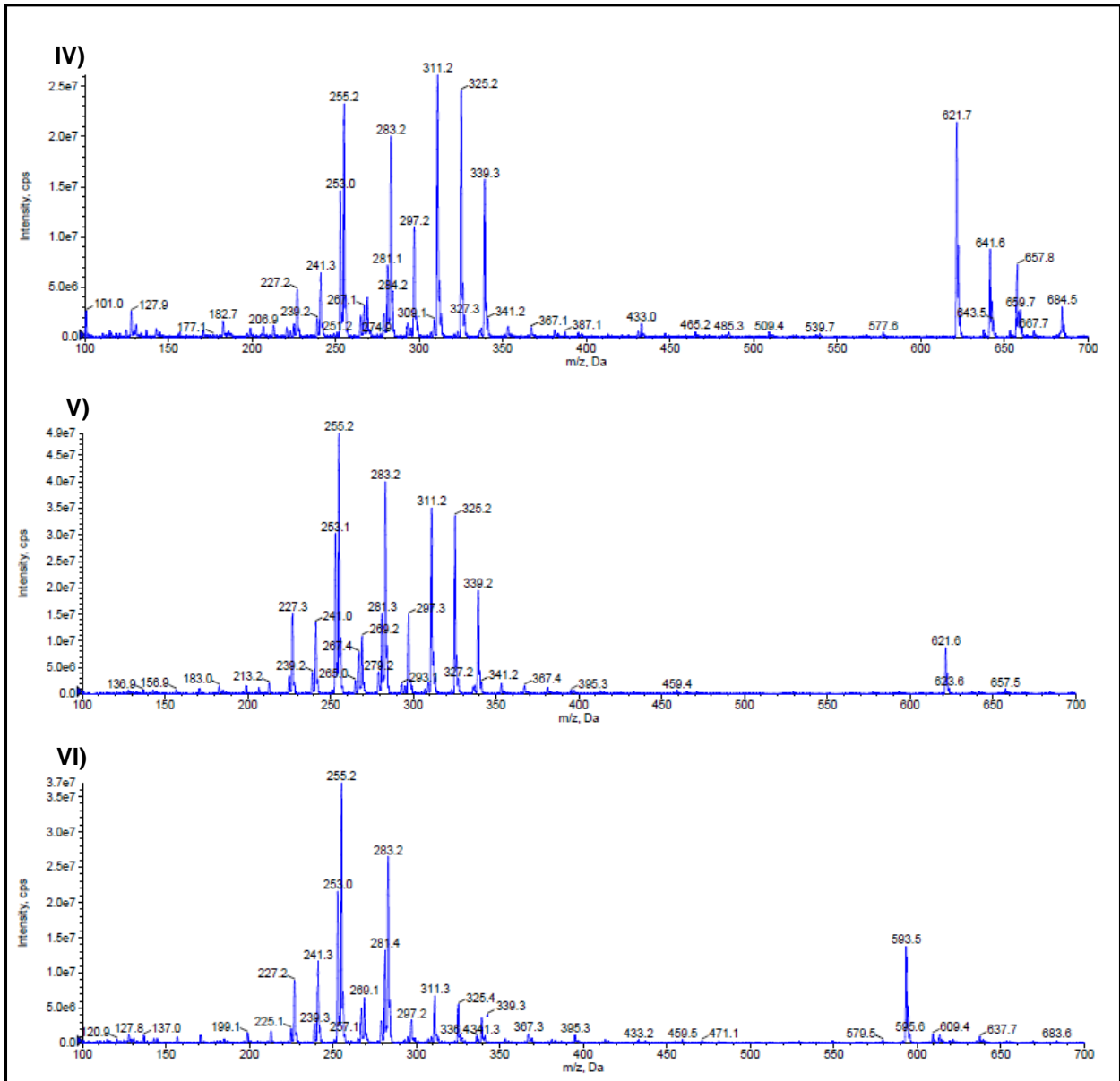


Figura 4.19 – Espectros de massas full-scan, no modo negativo, ionização por *electrospray*, das acetogeninas IV, V e VI.

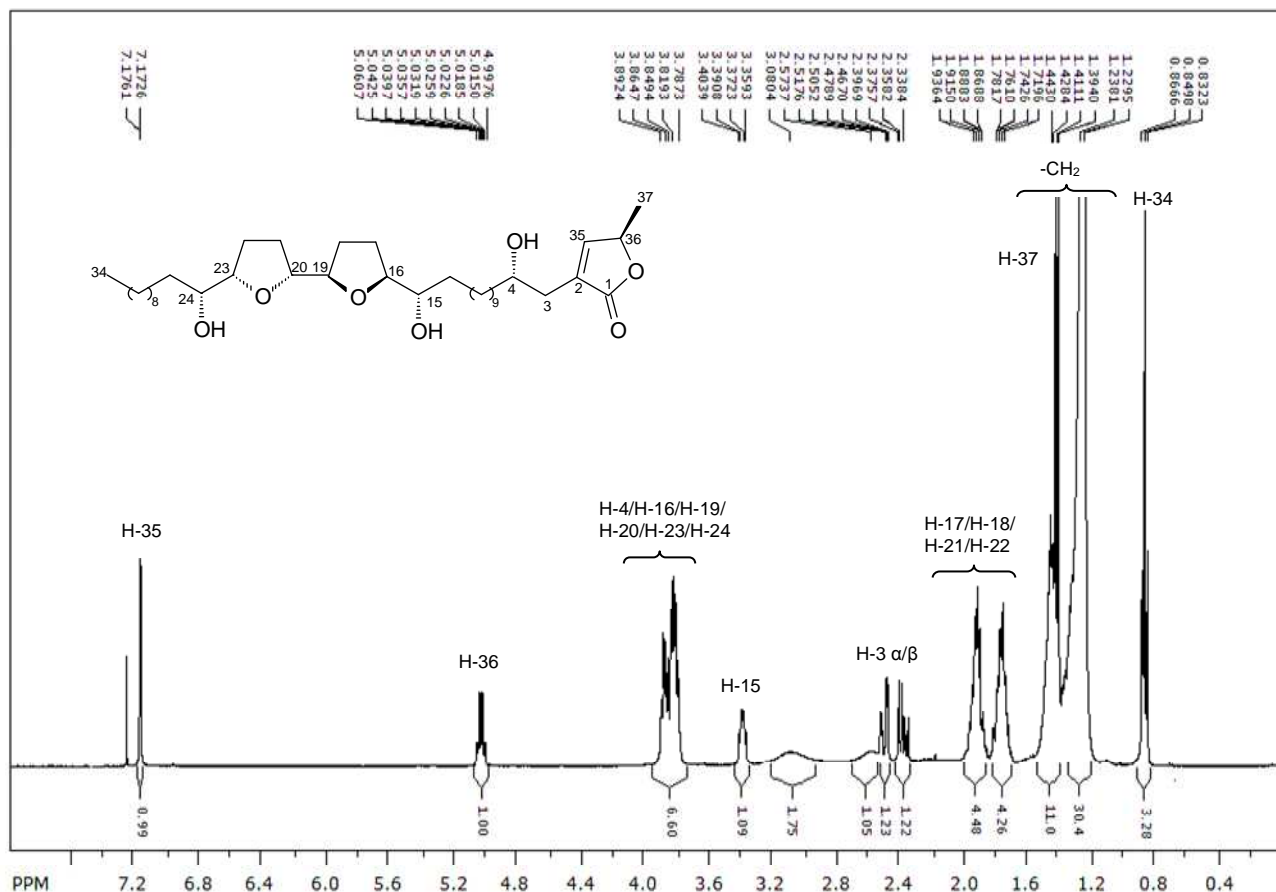


Figura 4.20 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IV (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

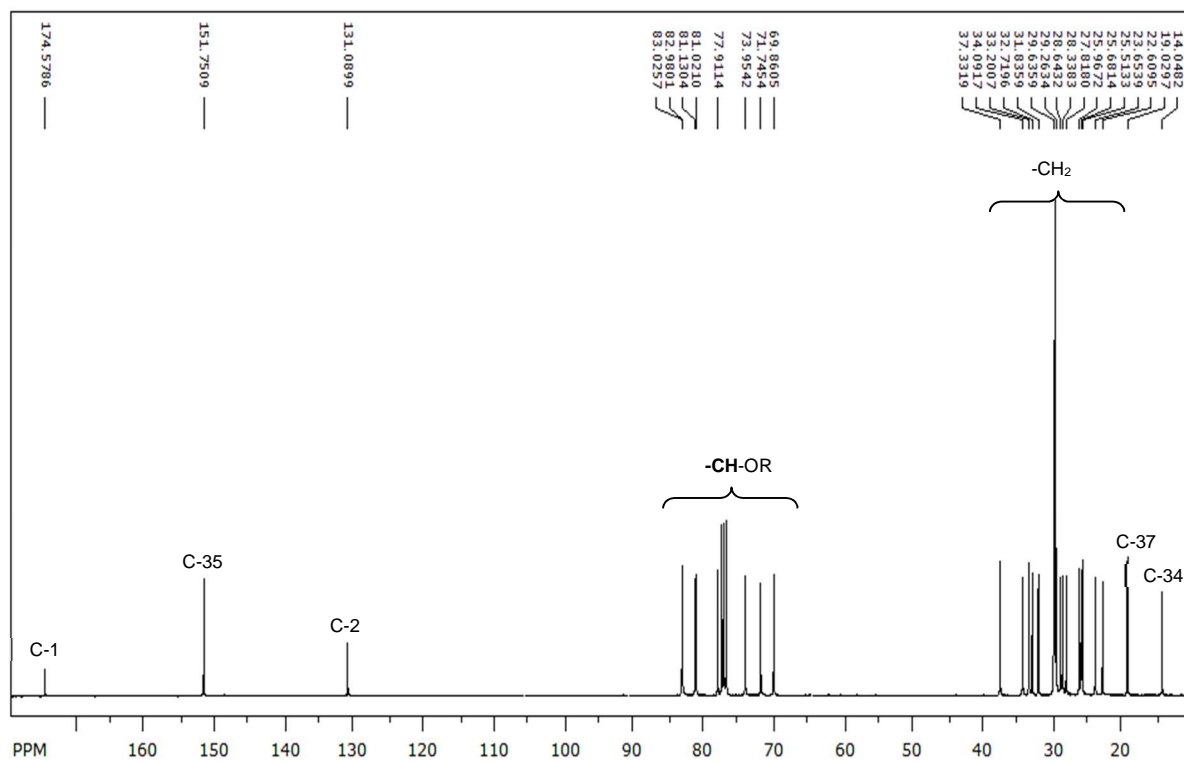


Figura 4.21 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância IV (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

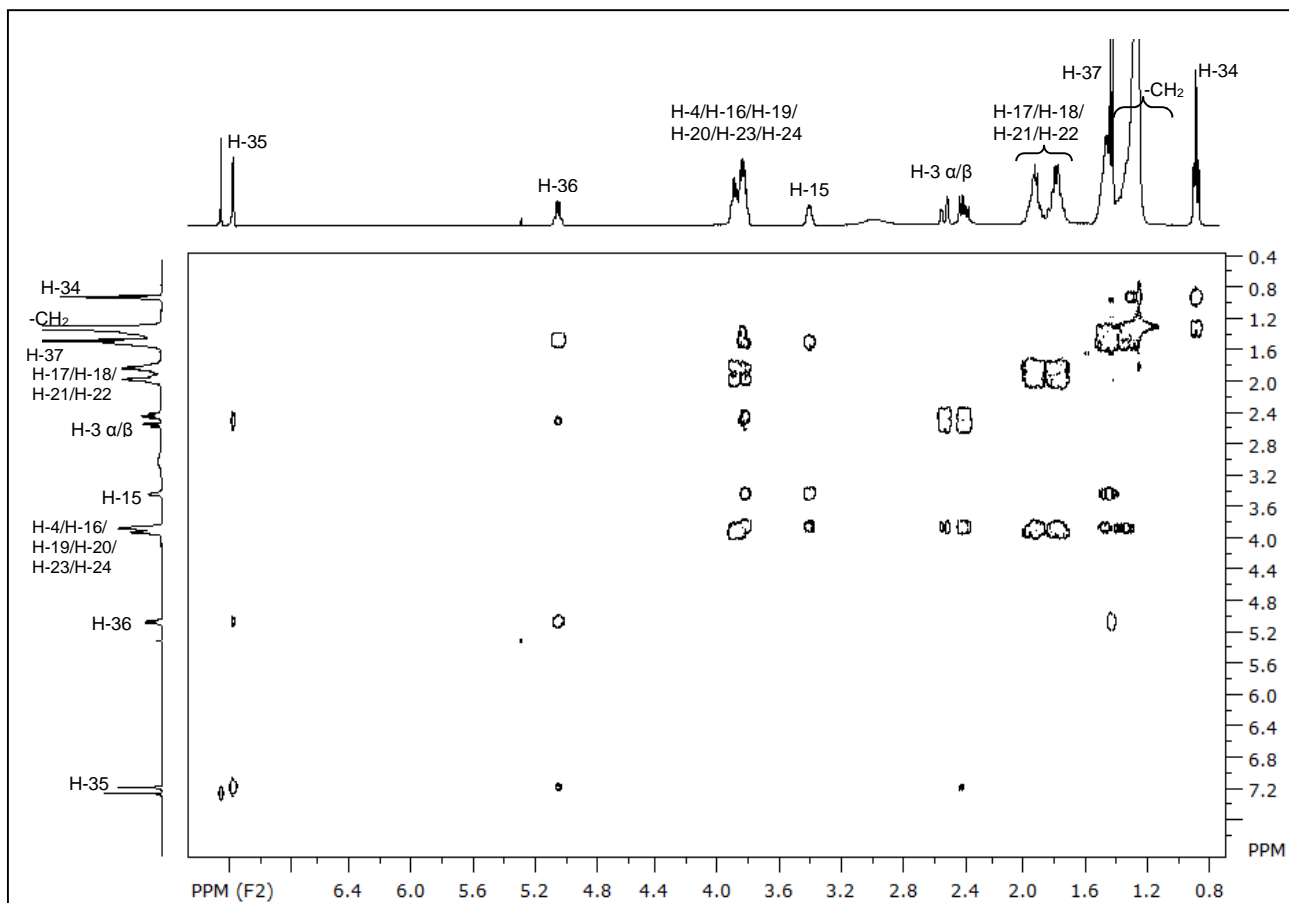


Figura 4.22 – Espectro de COSY da substância IV (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

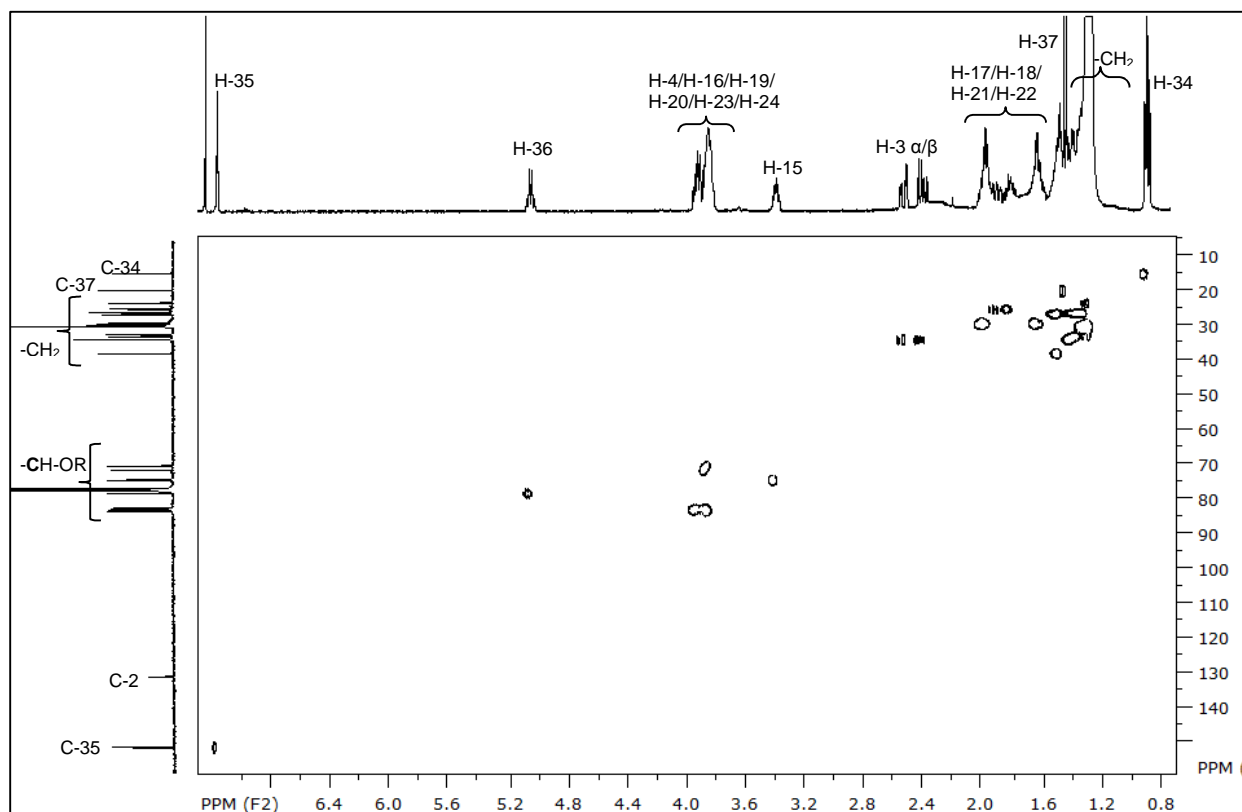


Figura 4.23 – Mapa de correlações HSQC da substância IV (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

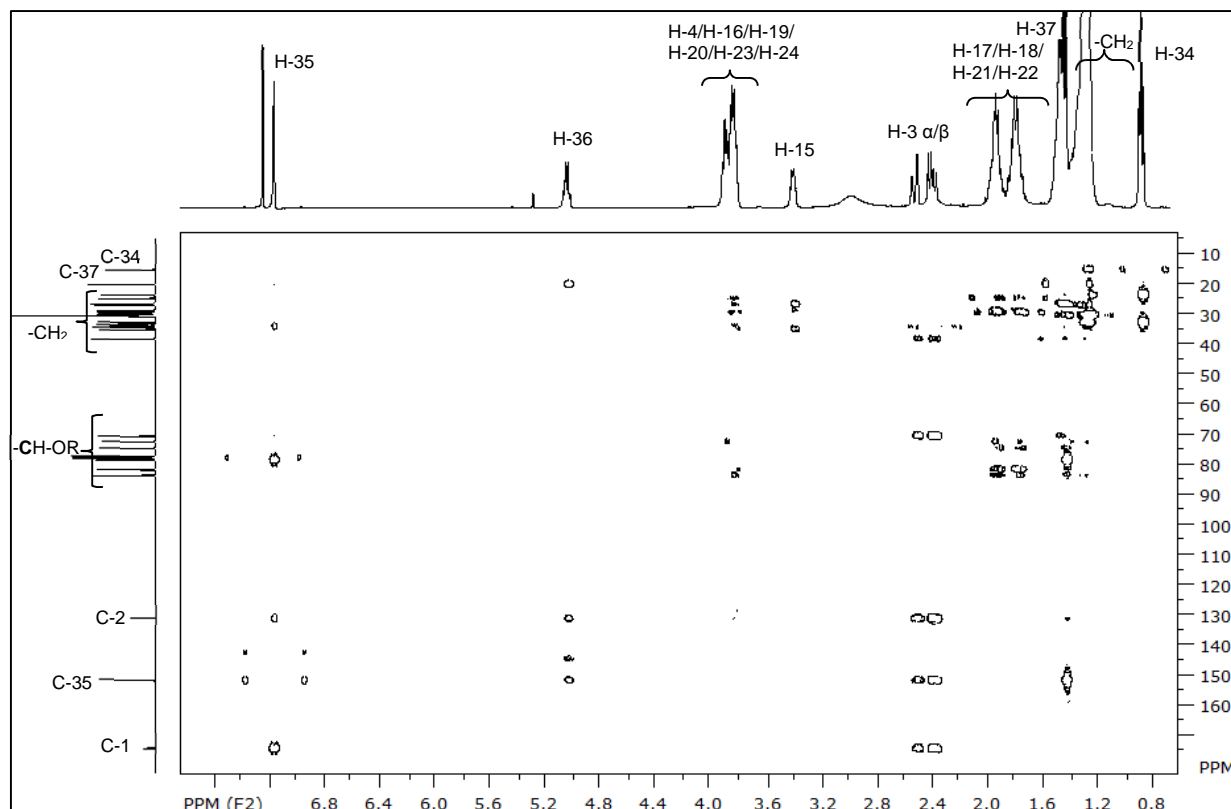


Figura 4.24 – Mapa de correlações HMBC da substância IV (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

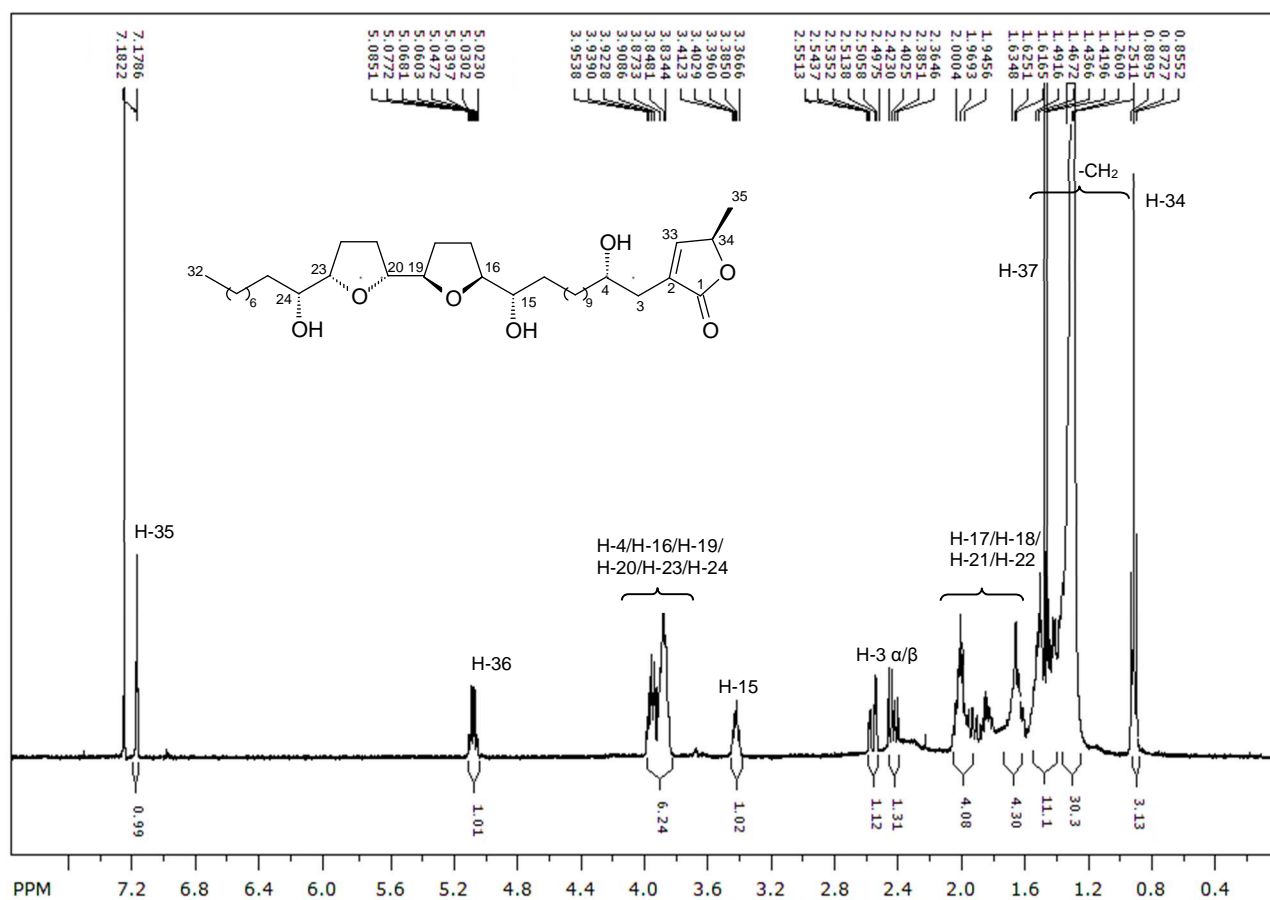


Figura 4.25 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância V (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

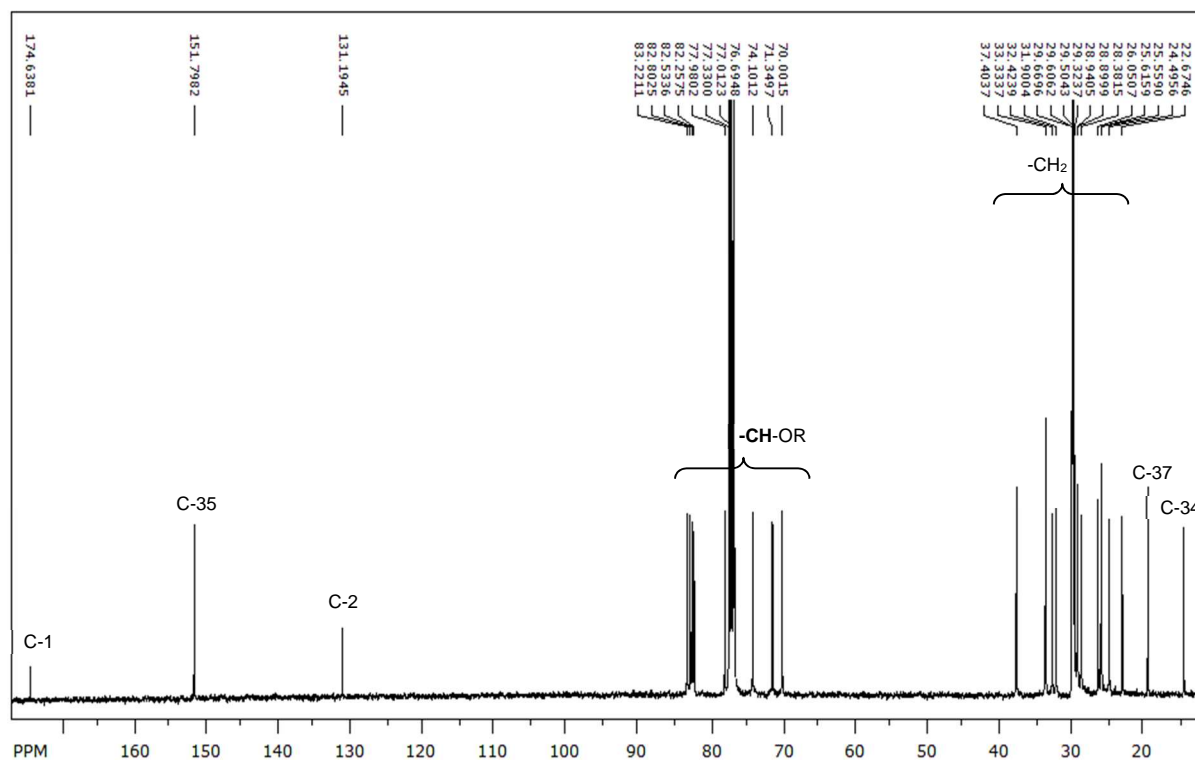


Figura 4.26 - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **V** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

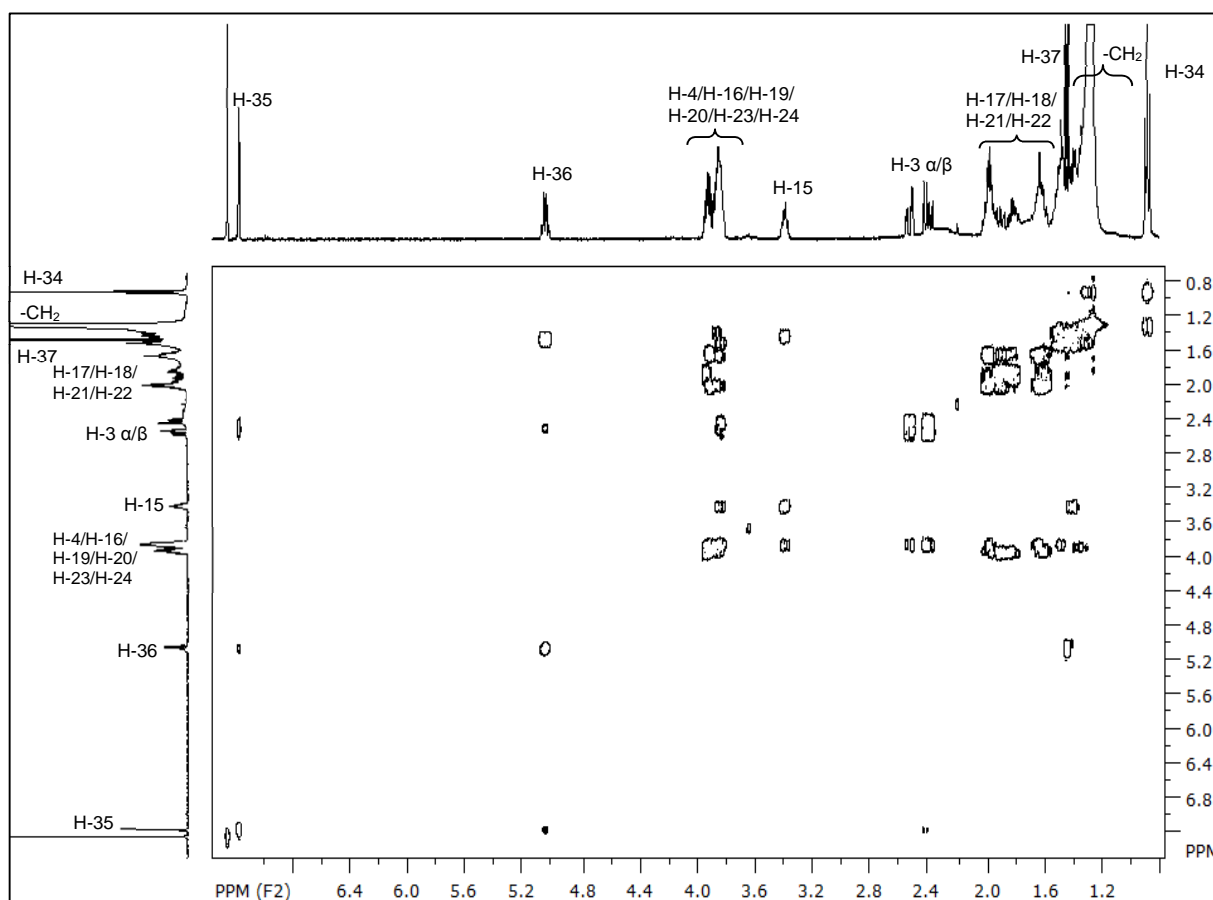


Figura 4.27 – Espectro de COSY da substância **V** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



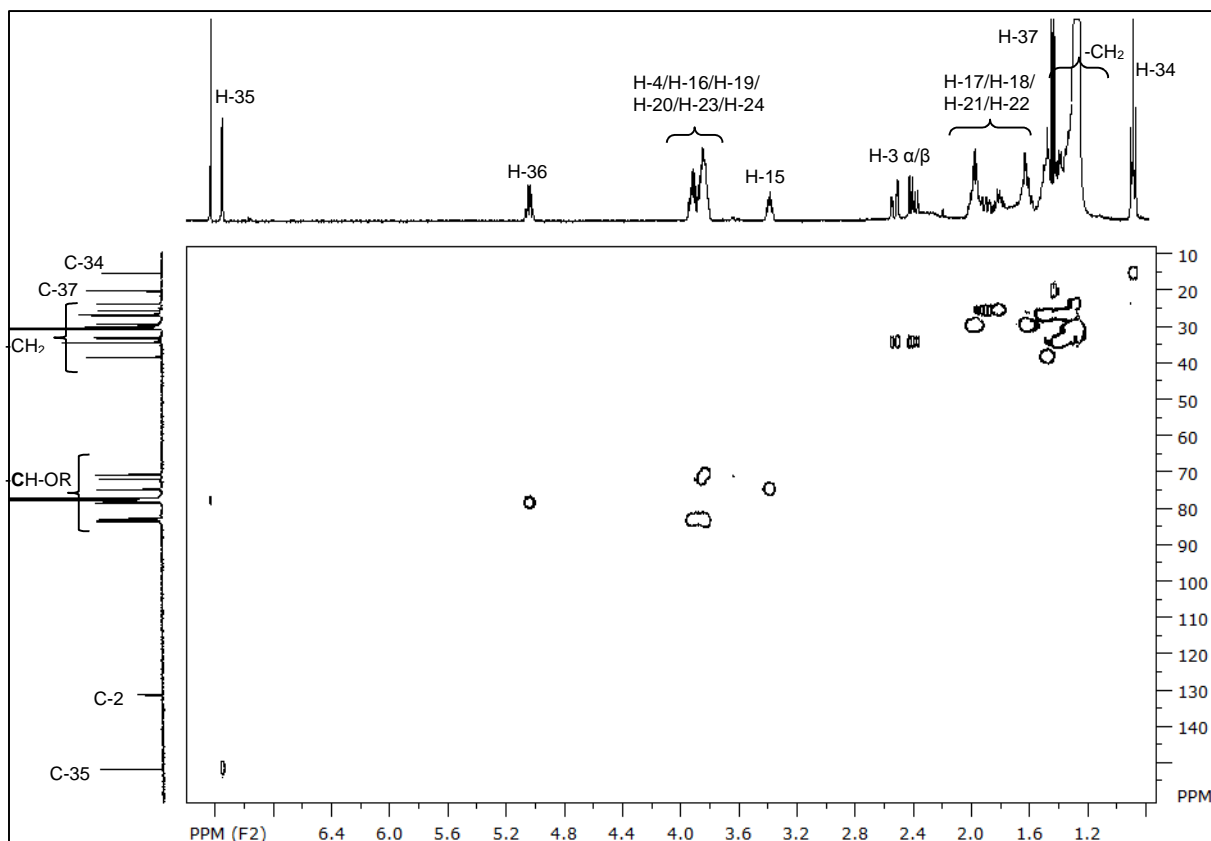


Figura 4.28 – Mapa de correlações HSQC da substância V (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

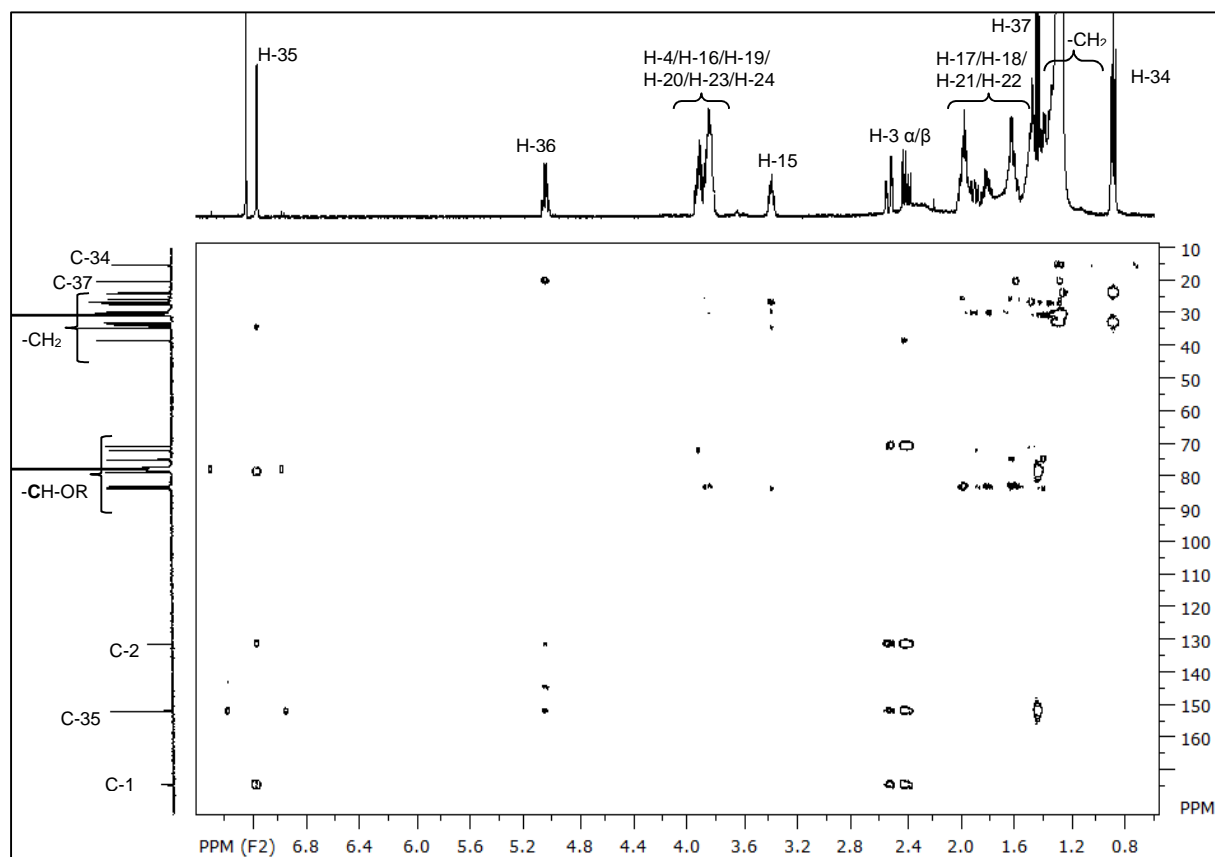


Figura 4.29 – Mapa de correlações HMBC da substância V (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

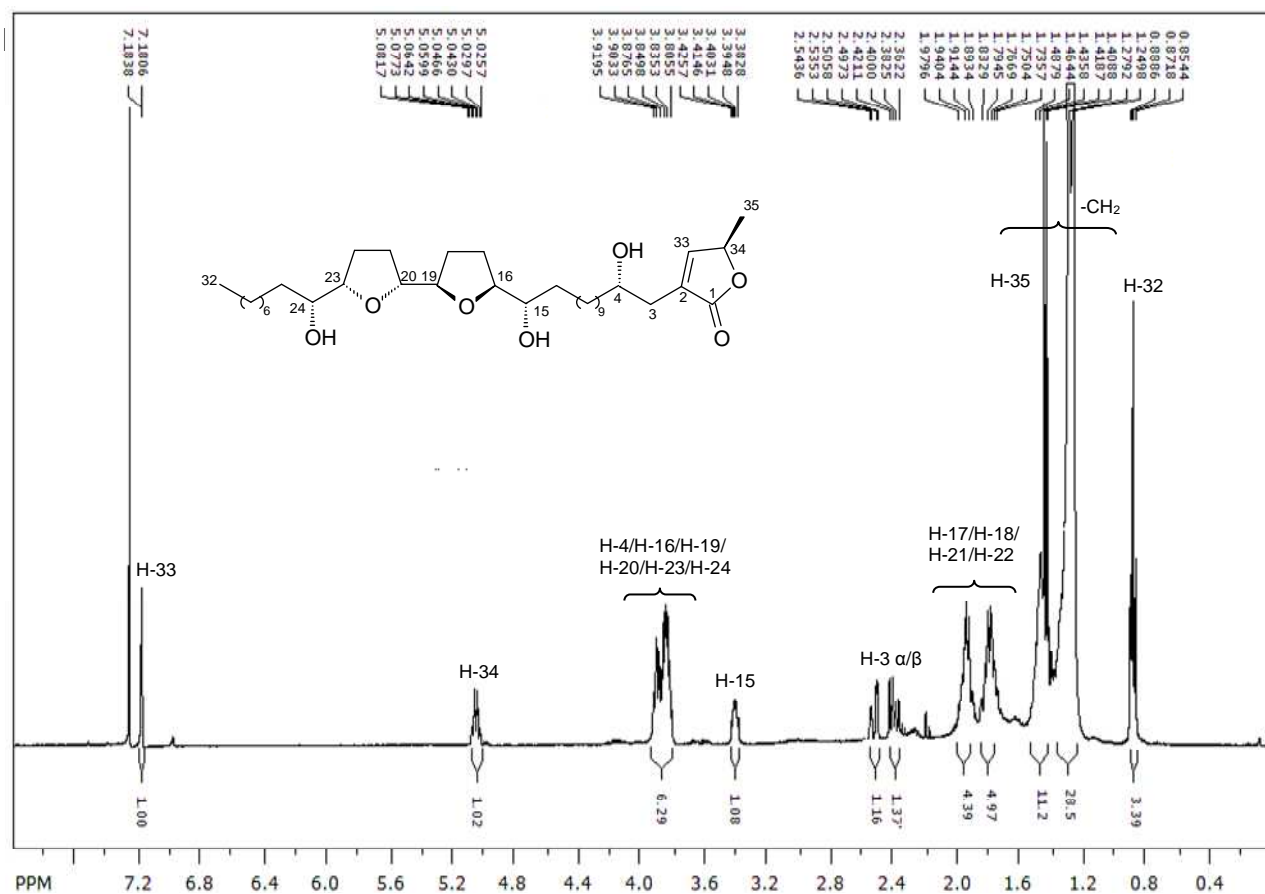


Figura 4.30 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VI (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

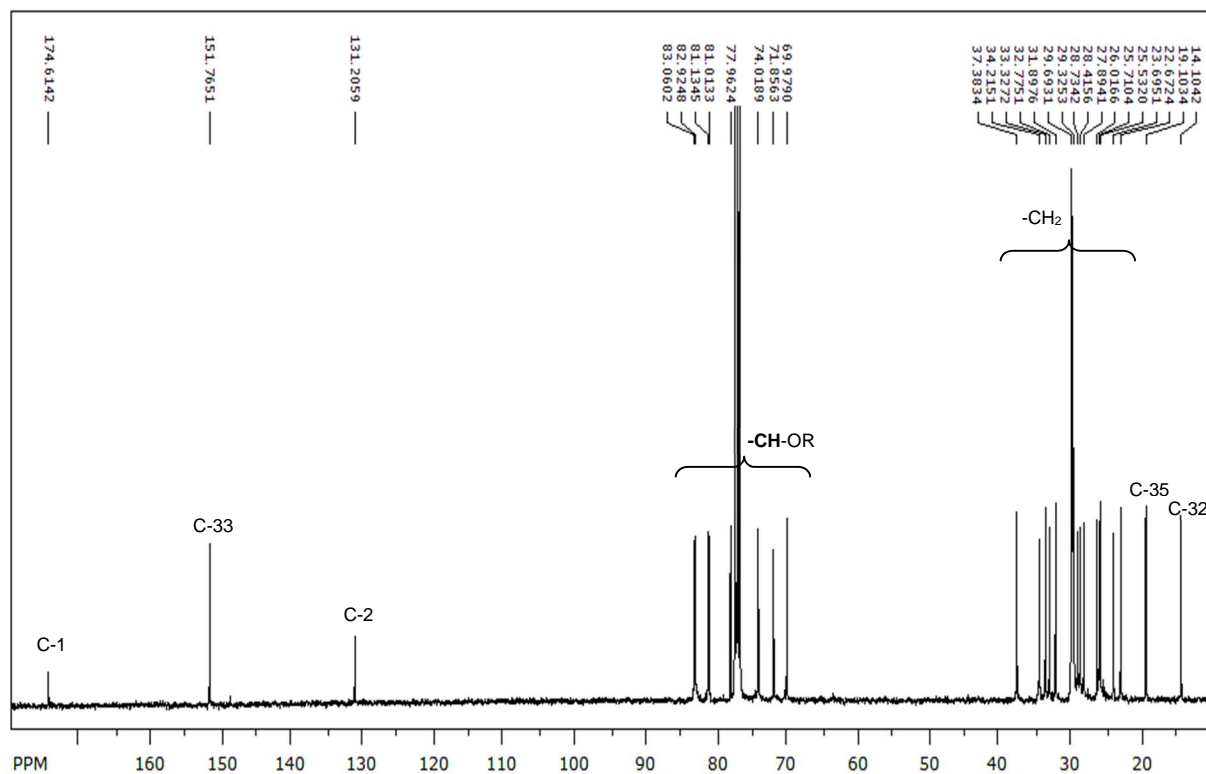


Figura 4.31 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância VI (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

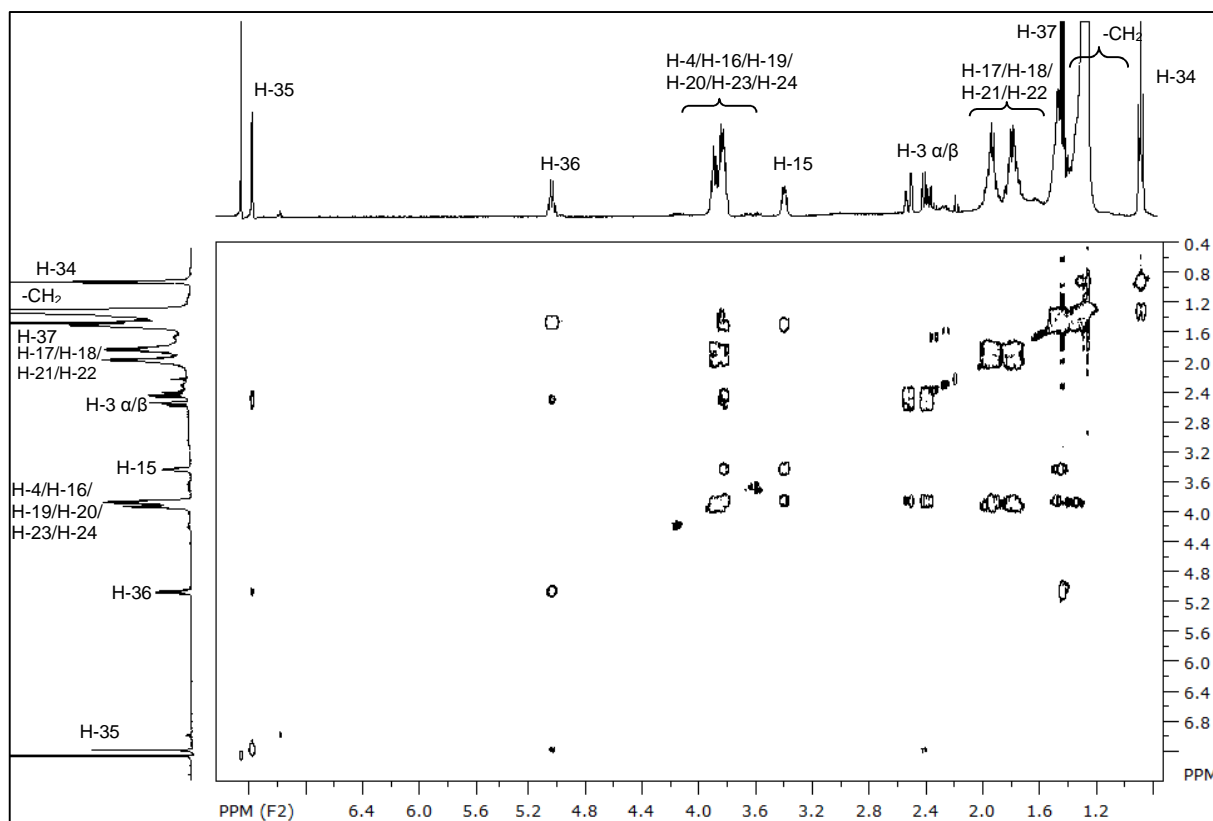


Figura 4.32 – Espectro de COSY da substância VI (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

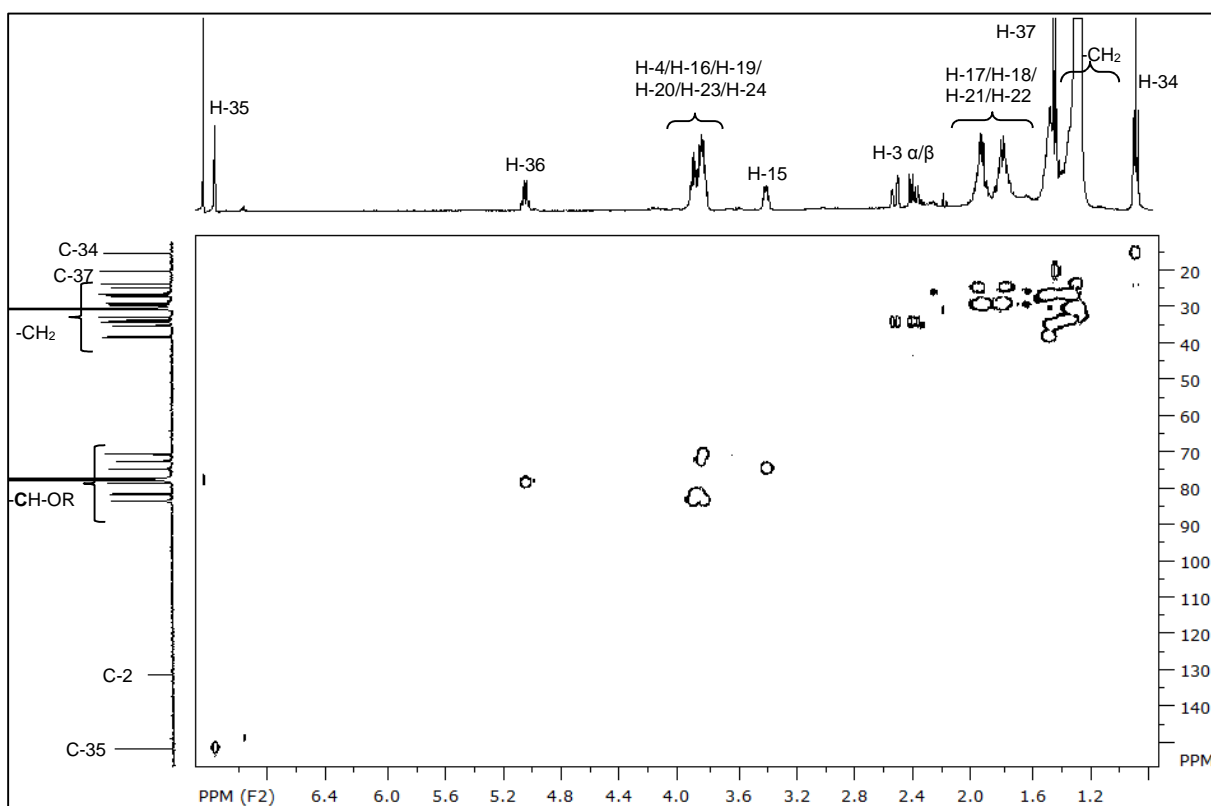


Figura 4.33 – Mapa de correlações HSQC da substância VI (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

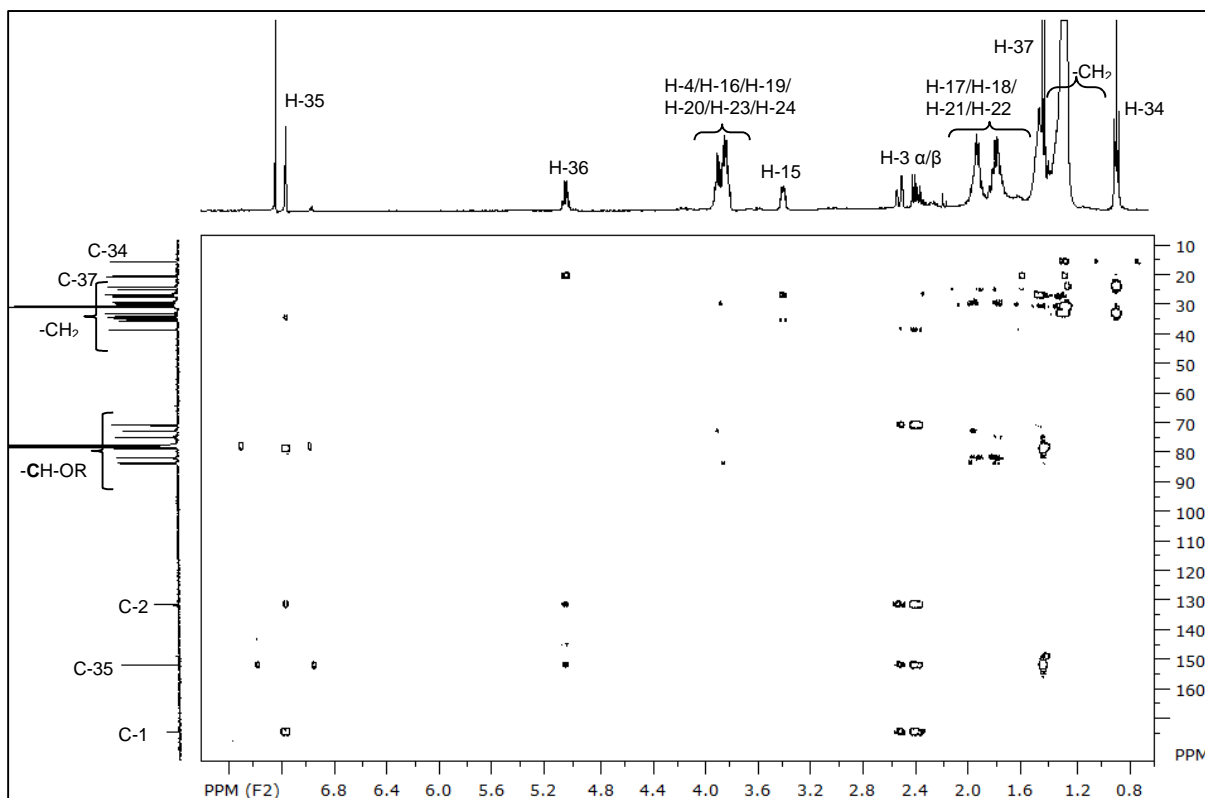
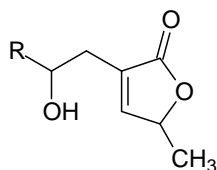


Figura 4.34 – Mapa de correlações HMBC da substância VI (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

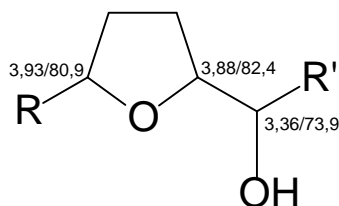
#### 4.2.2.2.2 – Identificação estrutural da substância VII

A substância **VII** foi obtida da fração C1-4 da partição hidroalcolica das sementes de *A. mucosa* e foi estruturalmente identificada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC, espectrometria de massas e comparação com a literatura (CHAVEZ *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 1995).

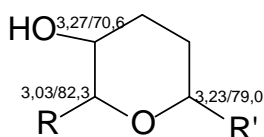
Pela análise do RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.36) foram observados os sinais referentes ao anel  $\gamma$ -lactônico insaturado e a presença da hidroxila em C-4, exatamente como observado para as substâncias descritas anteriormente. Sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,18 ( $q_{\text{dist.}}$ ,  $J = 1,3$ , 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  5,05 ( $dq$ ,  $J = 1,3$  e 6,6, 1H), característicos do anel lactônico, sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,44 ( $d$ ,  $J = 6,6$ , 3H) correspondente à metila ligada a este anel, sinais dos hidrogênios diastereotópicos H-3 $\alpha/\beta$  em  $\delta_{\text{H}}$  2,52 ( $ddt$ ,  $J = 1,6$ ; 3,3 e 15,0; 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  2,39 ( $ddt$ ,  $J = 1,3$ ; 8,2 e 15,0; 1H) que correlacionam-se com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  33,3 no HSQC (Figura 4.39) e com o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,83-3,93 ( $m$ , 4H) no mapa de contornos COSY (Figura 4.38), por último, foram observadas, no HMBC (Figura 4.40), correlações entre o hidrogênio  $\delta_{\text{H}}$  7,18 com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  33,3.



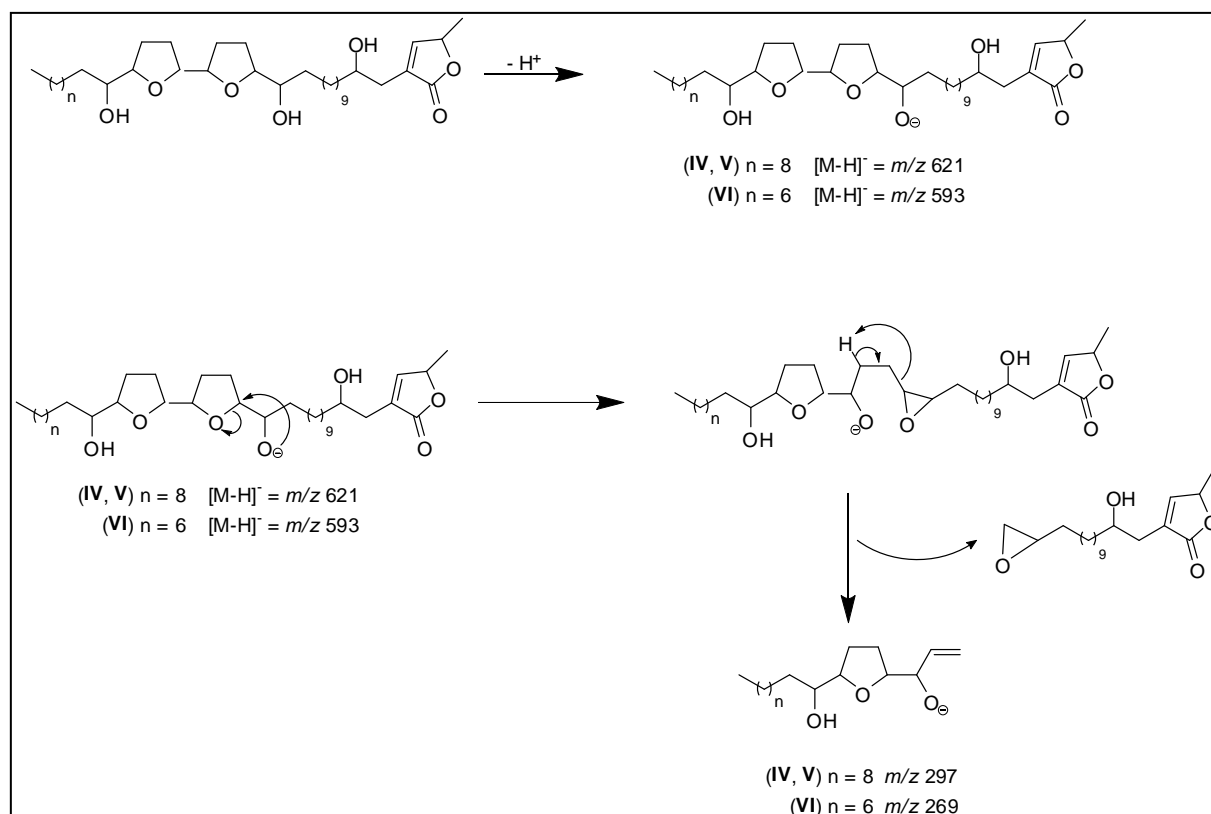
Foram observados sinais de 7 hidrogênios oximetínicos, um multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,81-3,95 (3,93; 3,88 e 3,84) integrado para 3 hidrogênios, três sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,36 ( $m$ , 1H), 3,27 ( $m$ , 1H) e 3,23 ( $m$ , 1H) e um último sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,03 ( $m$ , 1H). A correlação observada no mapa de contornos COSY entre o multipletto  $\delta_{\text{H}}$  3,81-3,95 e os sinais de H-3 em  $\delta_{\text{H}}$  2,52 e 2,39 confirma serem um desses hidrogênios o H-4. Como este sinal correlaciona-se ainda com o multipletto em  $\delta_{\text{H}}$  3,36 (1H), estes sinais foram atribuídos à carbonos oximetínicos de um anel THF com uma hidroxila em  $\alpha$ . Através da análise do HSQC os respectivos carbonos oximetínicos do THF, foram também atribuídos.



Os demais sinais de hidrogênios oximetínicos (3H),  $\delta_H$  3,27; 3,23 e 3,03 são consistentes com a presença de um anel tetrahidropirânico (THP) hidroxilado (SHI *et al.*,1995).

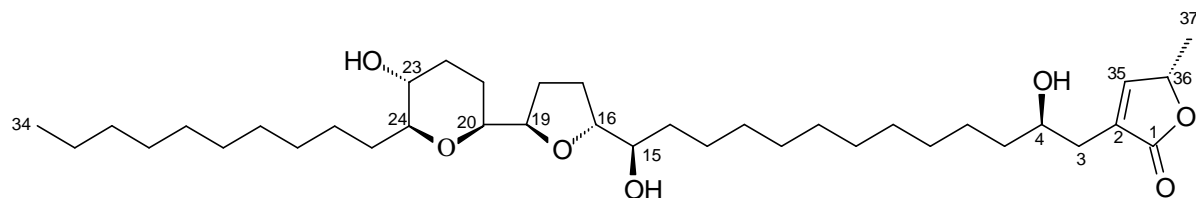


A correlação observada, no experimento de HMBC, entre o hidrogênio  $\delta_H$  3,23 e o carbono  $\delta_C$  80,8 confirma que os dois anéis são adjacentes. A disposição deste grupo na cadeia alquílica foi determinada por espectrometria de massas, onde observou-se a presença do pico do íon molecular em  $m/z$  621 e do pico em  $m/z$  297, assim como para as acetogeninas **IV** e **V**, correspondente ao fragmento que carrega a cadeia alquílica lateral ao grupo THF-THP e confirma a posição deste grupo no carbono C-14 da molécula, conforme a proposta de formação deste fragmento no Esquema 4.2.



**Esquema 4.2** – Proposta de formação do íon  $m/z$  297 para a substância **VII**.

Para determinar a estereoquímica relativa da molécula aplicou-se a Regra de Born e o modelo de Jossang para C-15/C16 e para o anel THF. Os deslocamentos do hidrogênio e do carbono H-15/C-15 em  $\delta_H$  3,36/ $\delta_C$  73,9, respectivamente, confirmam a relação **treo** para C-15/C-16. O padrão **trans** para o anel THF foi determinado com base nos deslocamentos de carbono para C-16 ( $\delta_C$  82,5) e C-19 ( $\delta_C$  80,8),  $\Delta\delta < 1,5$ . A configuração relativa dos centros estereogênicos do anel THP bem como a de C-19/C-20 foram estabelecidas por comparação dos dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono com a literatura e a substância **VII** foi identificada como sendo a jimenezina (Tabela 4.14) (CHAVEZ *et al.*,1998).



Jimenezina (**VII**)

**Tabela 4.14** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da substância **VII** e comparação com a jimenezina (CHAVEZ *et al.*, 1998:  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 125 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância VII	CHAVEZ <i>et al.</i> , 1998	Substância VII	CHAVEZ <i>et al.</i> , 1989
1	-	-	174,6	174,6
2	-	-	131,2	131,2
3 $\alpha$	2,52 ( <i>ddt</i> , 1,6; 3,3 e 15,0)	2,52 ( <i>dddd</i> , 1,5; 3,2 e 15,1)	33,3	33,3
3 $\beta$	2,39 ( <i>ddt</i> , 1,3; 8,2 e 15,0)	2,40 ( <i>dddd</i> , 1,6; 8,2 e 15,1)		
4	3,84 ( <i>m</i> )	3,85 ( <i>m</i> )	70,0	70,0
5	1,46 ( <i>m</i> )	1,47 ( <i>m</i> )	37,4	37,4
6-13	1,25-1,47 ( <i>m</i> )	1,2-1,4 ( <i>m</i> )	25,6-32,0	25,0-33,0
14	1,47 ( <i>m</i> )	1,47 ( <i>m</i> )	34,9	34,9
15	3,36 ( <i>m</i> )	3,35 ( <i>m</i> )	73,9	73,9
16	3,88 ( <i>m</i> )	3,90 ( <i>m</i> )	82,5	82,4
17	1,60-2,00 ( <i>m</i> )	1,62 e 1,93 ( <i>m</i> )	28,0	28,0
18	1,60-2,00 ( <i>m</i> )	1,60 e 2,0 ( <i>m</i> )	28,3	28,3
19	3,93 ( <i>m</i> )	3,94 ( <i>m</i> )	80,8	80,9
20	3,23 ( <i>m</i> )	3,24 ( <i>ddd</i> , 2,3; 2,3 e 11,5)	79,0	79,0
21	1,60-2,00 ( <i>m</i> )	1,64 e 1,77 ( <i>m</i> )	27,9	27,9
22	1,46 e 2,11 ( <i>m</i> )	1,45 e 2,13 ( <i>m</i> )	32,9	32,9
23	3,27 ( <i>m</i> )	3,28 ( <i>ddd</i> , 4,6; 9,2 e 10,8)	70,6	70,6
24	3,03 ( <i>m</i> )	3,00 ( <i>ddd</i> , 2,1; 9,0 e 9,2)	82,3	82,3
25	1,42 ( <i>m</i> )	1,42 ( <i>m</i> )	25,5	25,5
26-31	1,25-1,47 ( <i>m</i> )	1,2-1,4 ( <i>m</i> )	25,6-32,00	25,0-33,0
32	1,25-1,47 ( <i>m</i> )	1,2-1,4 ( <i>m</i> )	31,9	31,9
33	1,25-1,47 ( <i>m</i> )	1,2-1,4 ( <i>m</i> )	22,7	22,7
34	0,87 ( <i>t</i> , 6,8)	0,88 ( <i>t</i> , 6,8)	14,1	14,1
35	7,18 ( <i>q<sub>dist</sub></i> , 1,3)	7,18 ( <i>ddd</i> , 1,5; 1,5; 1,5)	151,8	151,7
36	5,05 ( <i>dq</i> , 1,3 e 6,6)	5,06 ( <i>qq</i> , 1,5 e 6,8)	78,0	78,0
37	1,44 ( <i>d</i> , 6,6)	1,43 ( <i>d</i> , 6,8)	19,1	19,1



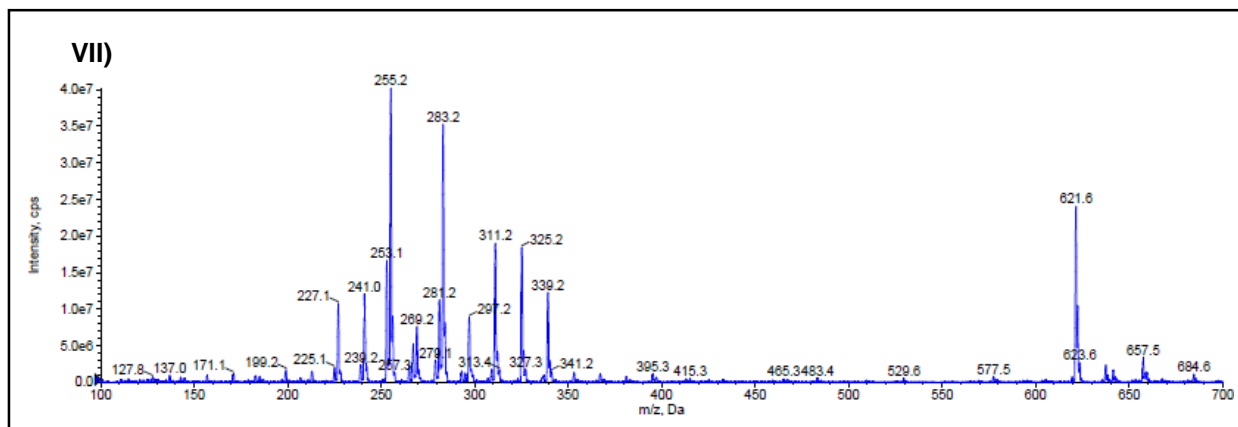


Figura 4.35 – Espectros de massas full-scan, no modo negativo, ionização por *electrospray* para a acetogenina VII.

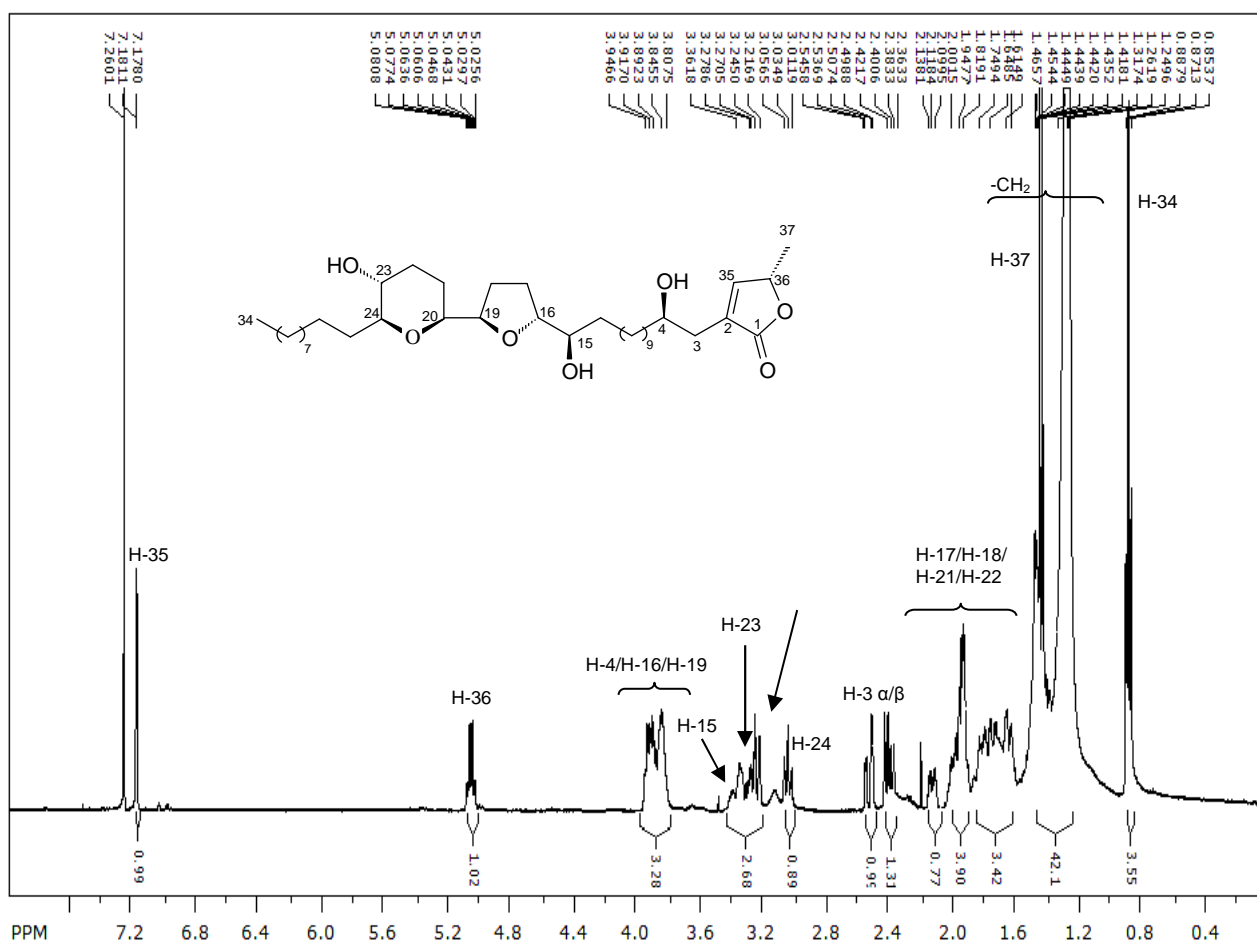


Figura 4.36 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VII (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

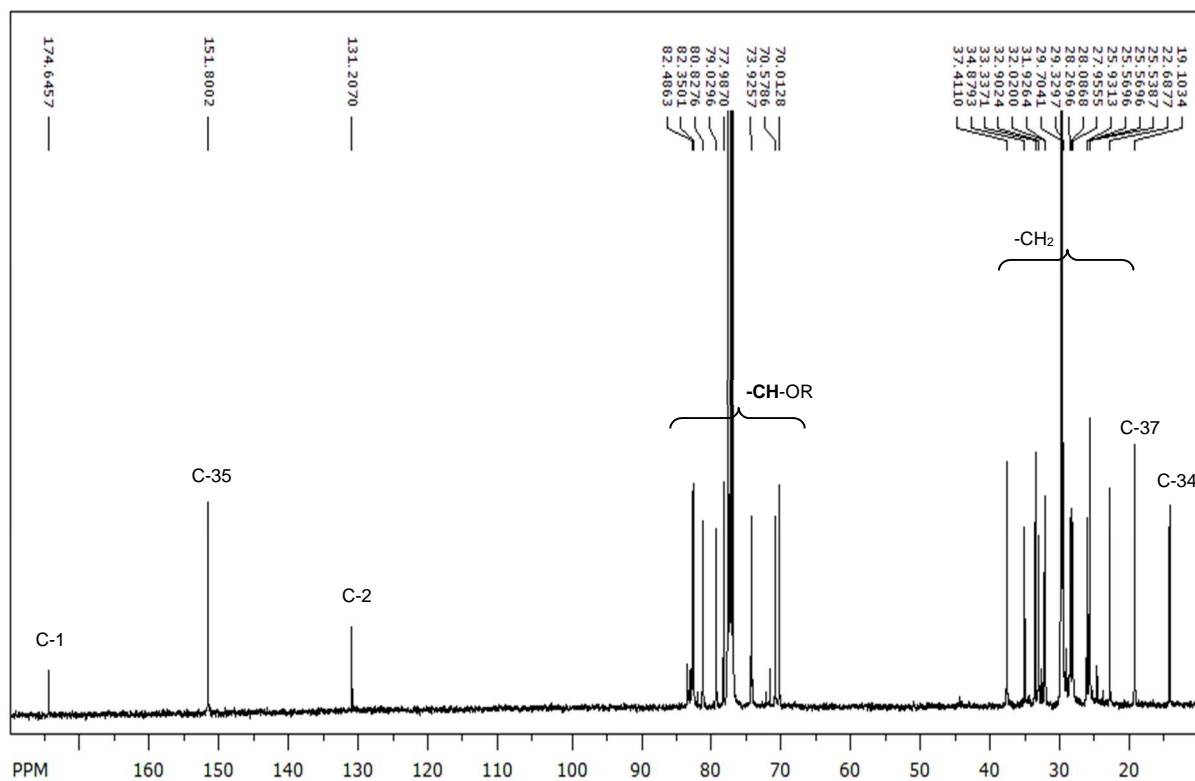


Figura 4.37 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância VII (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

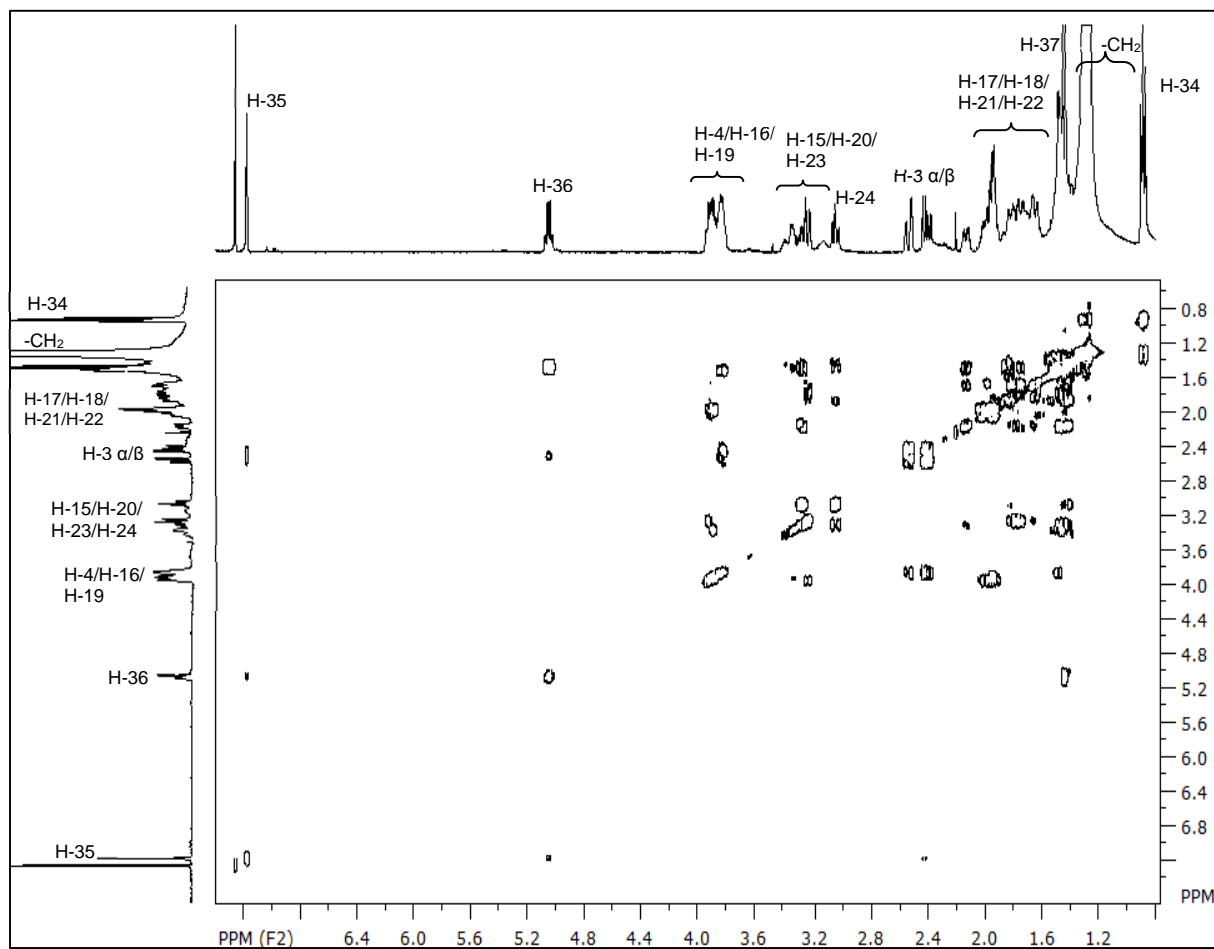


Figura 4.38 – Espectro de COSY da substância VII (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

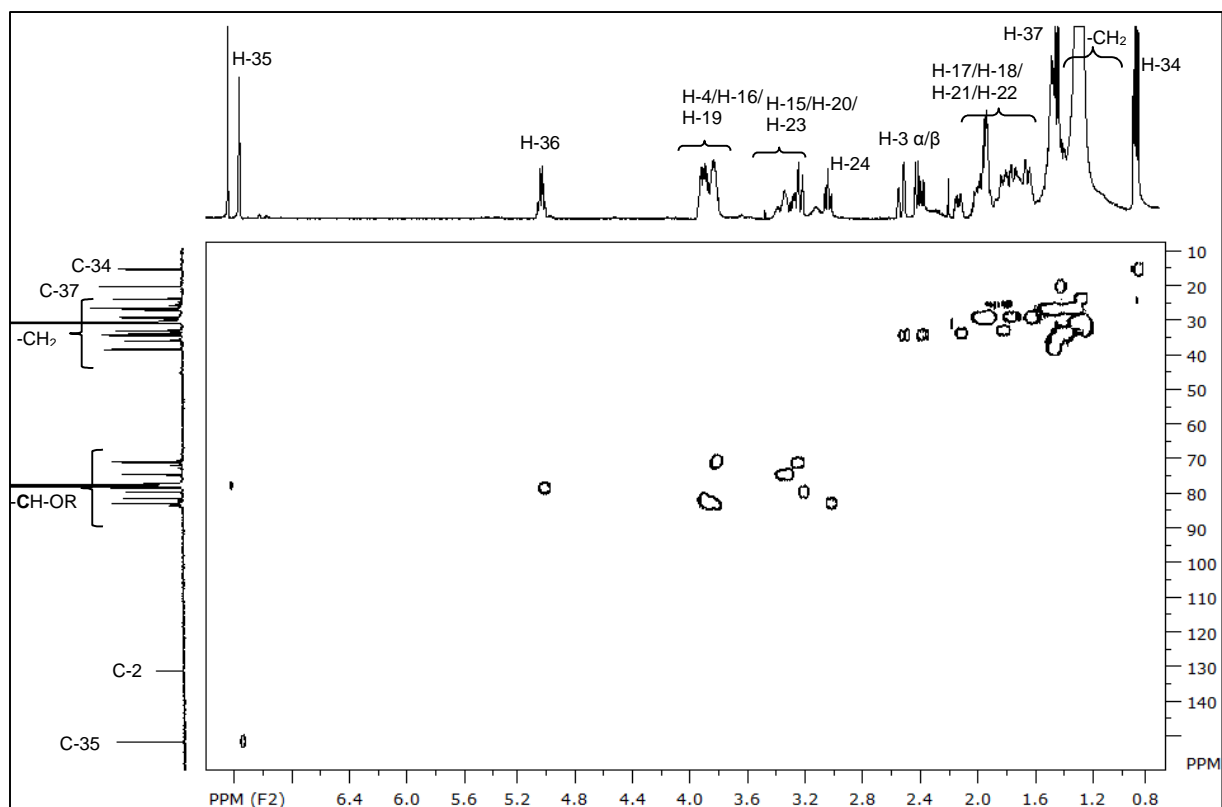


Figura 4.39 – Mapa de correlações HSQC da substância VII (400 MHz,  $CDCl_3$ ).

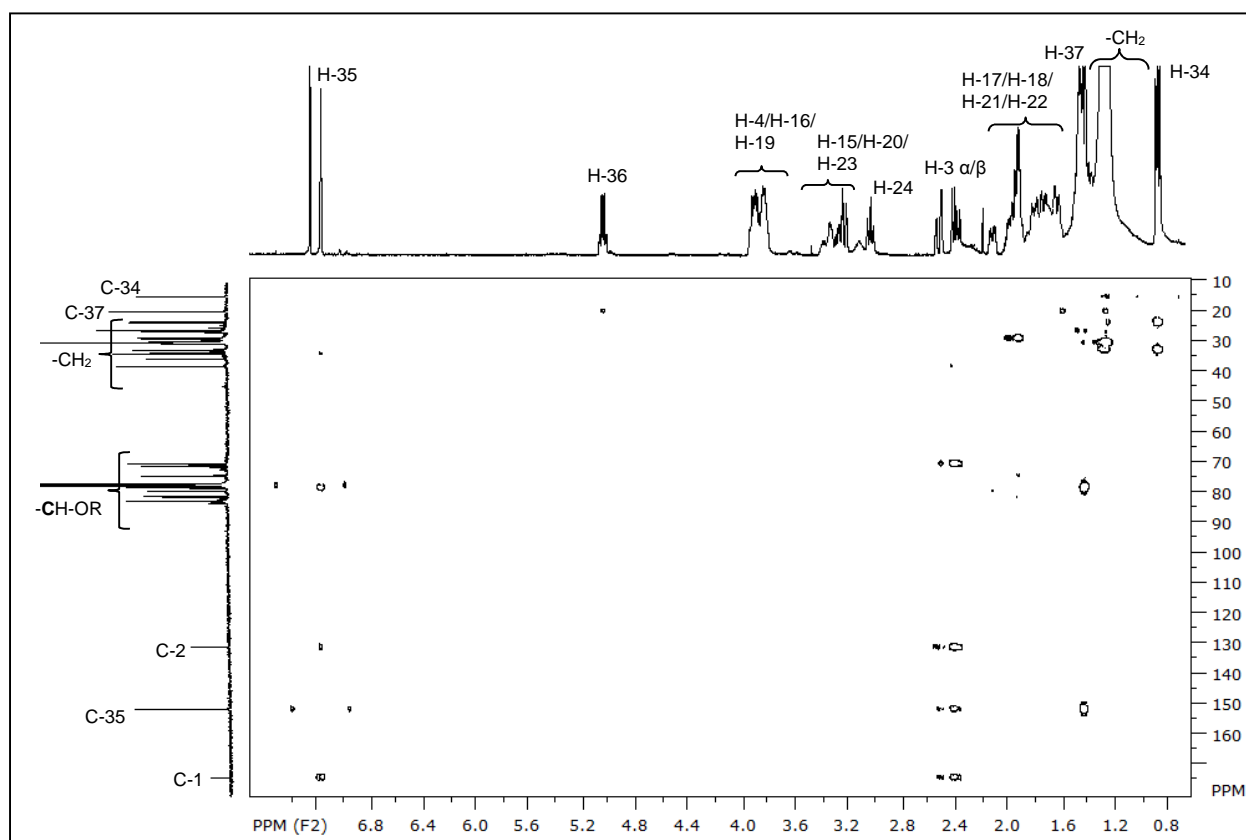
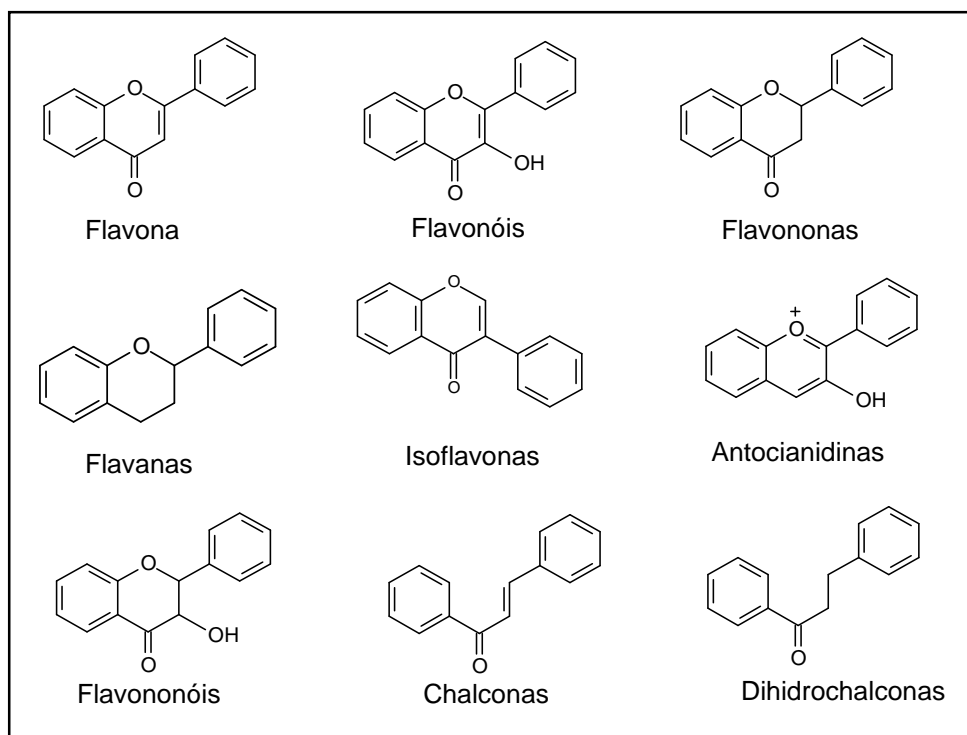


Figura 4.40 – Mapa de correlações HMBC da substância VII (400 MHz,  $CDCl_3$ ).

### 4.2.2.3 – Flavonoides

Os flavonoides constituem um grande grupo de metabólitos secundários que contempla mais de 10.000 estruturas identificadas (AGATI *et al.*, 2012). São conhecidos pelo seu forte poder antioxidante, além de outras atividades biológicas como antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana dentre outras (BUER *et al.*, 2010; HE e GIUSTI; 2009; PROCHAZKOVA *et al.*, 2011).

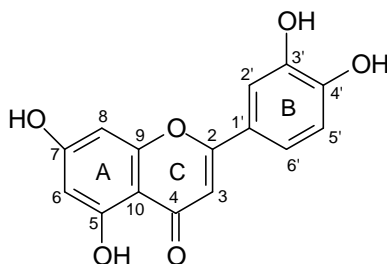
Os flavonoides estão divididos em nove subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanas, isoflavonas, antocianidinas, flavanonóis (flavan-3-ol ou catequinas) chalconas e dihidrochalconas (Figura 4.41) que são diferenciadas entre si por variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais (LIN *et al.*, 2008; WANG e HUANG, 2004).



**Figura 4.41** – Classificação dos flavonoides por subclasses.

O esqueleto flavonoídico é composto por dois anéis aromáticos, sistema benzopirânico, a partir do qual é iniciada a numeração dos carbonos e determinada a nomenclatura sistemática oficial IUPAC. Na nomenclatura usual (MARKHAN, 1982) os anéis são designados como A, B e C (Figura 4.42) e os átomos de carbono individuais são numerados com algarismos arábicos para os anéis A e C e algarismos

marcados linha (') para o anel B na seqüência os substituintes recebem numeração de acordo com a posição e a subclasse flavonoídica é então especificada.



**Figura 4.42** – Designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono na nomenclatura usual.

A substituição por unidades glicosídicas nos esqueletos flavonoídicos é muito comum e aumenta significativamente a quantidade de diferentes flavonoides possíveis e/ou existentes. A confirmação da presença de glicosídeos como substituintes pode ser obtida através de dados de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais. O sinal em torno de  $\delta_{\text{H}}$  5,0 ppm é característico de hidrogênio anomérico e, sinais na faixa de  $\delta_{\text{H}}$  4,0 e  $\delta_{\text{H}}$  3,0 ppm são característicos dos demais hidrogênios de glicosídeos. A presença de uma unidade de raminose pode ser confirmada através da observação de um duplete com deslocamento químico de aproximadamente  $\delta_{\text{H}}$  1,0 ppm ( $J = 6,0$  Hz) (HARBONE e MABRY, 1982). A configuração do glicosídeo ligado à aglicona pode ser determinada pela constante de acoplamento do hidrogênio anomérico (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15** – Configurações dos glicosídeos (HARBONE e MABRY, 1982).

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

#### 4.2.2.3.1 – Identificação estrutural da substância VIII

A substância **VIII** foi isolada das frações S1-5 a S1-8 e de subfrações da fração S1-4, obtida como um cristal amarelo, sendo a substância majoritária na partição estudada (MUFA). A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  de  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e comparação com a literatura (FATHIAZAD *et al.*, 2006).

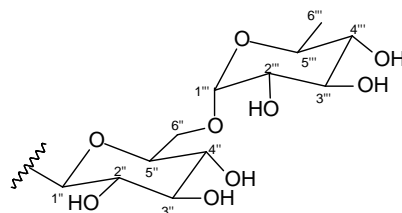
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.43) mostrou sinais característicos da aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3',4' no anel B com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,65 (*dd*,  $J = 2,3$  e  $8,5$  Hz, H-6');  $\delta_{\text{H}}$  7,51 (*d*,  $J = 2,3$  Hz, H-2') e  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (*d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5'). Os valores das constantes estão de acordo com o acoplamento em *orto* ( $J = 8,5$  Hz) entre H-6' e H-5' e acoplamento em *meta* ( $J = 2,3$  Hz) entre os hidrogênios H-6' e H-2'. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A,  $\delta_{\text{H}}$  6,36 (*d*,  $J = 1,8$  Hz, H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,16 (*d*,  $J = 1,8$  Hz, H-6), esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX *meta* neste anel.

Através da análise dos mapas de correlações HSQC (Figura 4.45), HMBC (Figura 4.46) e do RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.44), foram atribuídos todos os carbonos da aglicona (Tabela 4.16)

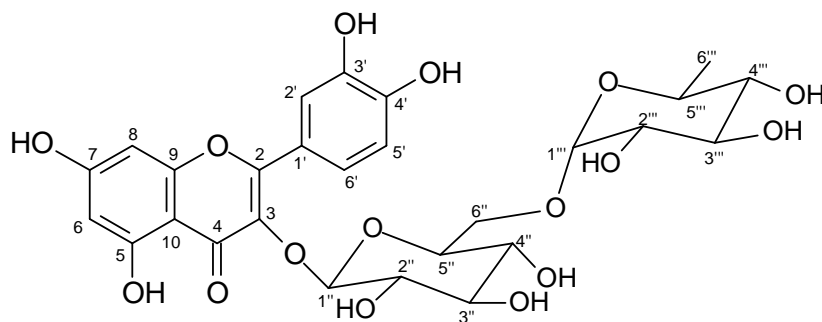
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , a observação de dois sinais de hidrogênios anoméricos confirma a presença de dois glicosídeos como substituintes na estrutura em questão. O sinal  $\delta_{\text{H}}$  5,30 se apresenta como um duplete com constante de acoplamento de 7,6 Hz que é característica de hidrogênio anomérico de  $\beta$ -D-glicose (H-1''), enquanto o sinal de hidrogênio anomérico  $\delta_{\text{H}}$  4,41 (*s*) (H-1''') juntamente com o duplete em  $\delta_{\text{H}}$  1,05 ( $J = 6,0$ ), característico de metila de raminose (H-6'''), indicam a presença de uma unidade  $\alpha$ -L-raminose. No mapa de correlação HSQC, puderam ser atribuídos os respectivos carbonos de cada hidrogênio, o sinal  $\delta_{\text{H}}$  5,30 se correlaciona com  $\delta_{\text{C}}$  100,0 (C-1''), o sinal  $\delta_{\text{H}}$  4,41 se correlaciona com  $\delta_{\text{C}}$  102,3 (C-1''') e o sinal  $\delta_{\text{H}}$  1,05 se correlaciona com  $\delta_{\text{C}}$  17,9 (C-6'''). Os demais hidrogênios oximetínicos das unidades glicosídicas estão entre  $\delta_{\text{H}}$  3,07-3,63, sendo os carbonos correspondentes encontrados na faixa  $\delta_{\text{C}}$  65,1-73,5.

No mapa de correlações HMBC, verificou-se correlação entre o sinal de hidrogênio anomérico da raminose,  $\delta_{\text{H}}$  4,41, com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  65,1 (C-6'''). Essa correlação confirma a unidade de raminose como açúcar ligado diretamente à glicose

pela posição C-6'' (grupo CH<sub>2</sub> da glicose) numa ligação O-glicosídica. Isto pode ser explicado devido à desblindagem do carbono C-6'' em  $\delta_c$  65,1; que geralmente, quando não há substituintes nesta posição são blindados em torno de  $\delta_c$  60,0. Além disso, observa-se correlação entre o hidrogênio anomérico da unidade glicose,  $\delta_H$  5,30 (H-1'') com o carbono quaternário  $\delta_c$  133,4 (C-3) do esqueleto flavonoídico, que permite concluir que é a unidade de glicose que está diretamente ligada ao flavonóide e que esta ligação ocorre no carbono C-3.



Assim, a substância **VIII** trata-se da quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicose-6''-O- $\alpha$ -L-raminosil (rutina), primeira vez relatada para a espécie *Annona mucosa*.



Quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicose-6''-O- $\alpha$ -L-raminosil (rutina) (**VIII**)

**Tabela 4.16** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) da substância **VIII** e comparação com a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicose-6''-O- $\alpha$ -L-raminopiranosil (FATHIAZAD *et al.*, 2006: DMSO- $d_6$ , 200 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 50 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), $J$ (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância VIII	FATHIAZAD <i>et al.</i> , 2006	Substância VIII	FATHIAZAD <i>et al.</i> , 2006
<b>2</b>	-	-	156,2	157,3
<b>3</b>	-	-	133,4	134,1
<b>4</b>	-	-	177,1	178,2
<b>5</b>	-	-	161,1	157,5
<b>6</b>	6,16 ( <i>d</i> , 1,8)	6,21 ( <i>d</i> , 2,0)	99,2	99,5
<b>7</b>	-	-	165,9	164,9
<b>8</b>	6,36 ( <i>d</i> , 1,8)	6,40 ( <i>d</i> , 2,0)	93,8	94,5
<b>9</b>	-	-	156,5	162,1
<b>10</b>	-	-	103,2	104,8
<b>1'</b>	-	-	121,9	122,5
<b>2'</b>	7,51 ( <i>d</i> , 2,3)	7,55 ( <i>d</i> , 2,1)	115,2	116,1
<b>3'</b>	-	-	144,9	145,6
<b>4'</b>	-	-	148,8	149,3
<b>5'</b>	6,80 ( <i>d</i> , 8,5)	6,86 ( <i>d</i> , 9,0)	115,8	117,1
<b>6'</b>	7,65 ( <i>dd</i> , 2,3 e 8,5)	7,56 ( <i>dd</i> , 9,0 e 2,1)	120,9	122,0
<b>1''</b>	5,30 ( <i>d</i> , 7,6)	5,35 ( <i>d</i> , 7,4)	100,0	101,6
<b>2''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	74,9
<b>3''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	77,3
<b>4''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	72,7
<b>5''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	76,7
<b>6''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1	67,9
<b>1'''</b>	4,41 ( <i>sl</i> )	5,12 ( <i>d</i> , 1,9)	102,3	102,2
<b>2'''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	70,8
<b>3'''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	71,2
<b>4'''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	71,4
<b>5'''</b>	3,07-3,63 ( <i>m</i> )	ND	65,1-73,5	69,1
<b>6'''</b>	1,05 ( <i>d</i> , 6,0)	1,0 ( <i>d</i> , 6,1)	17,9	18,6

ND = Não descrito;



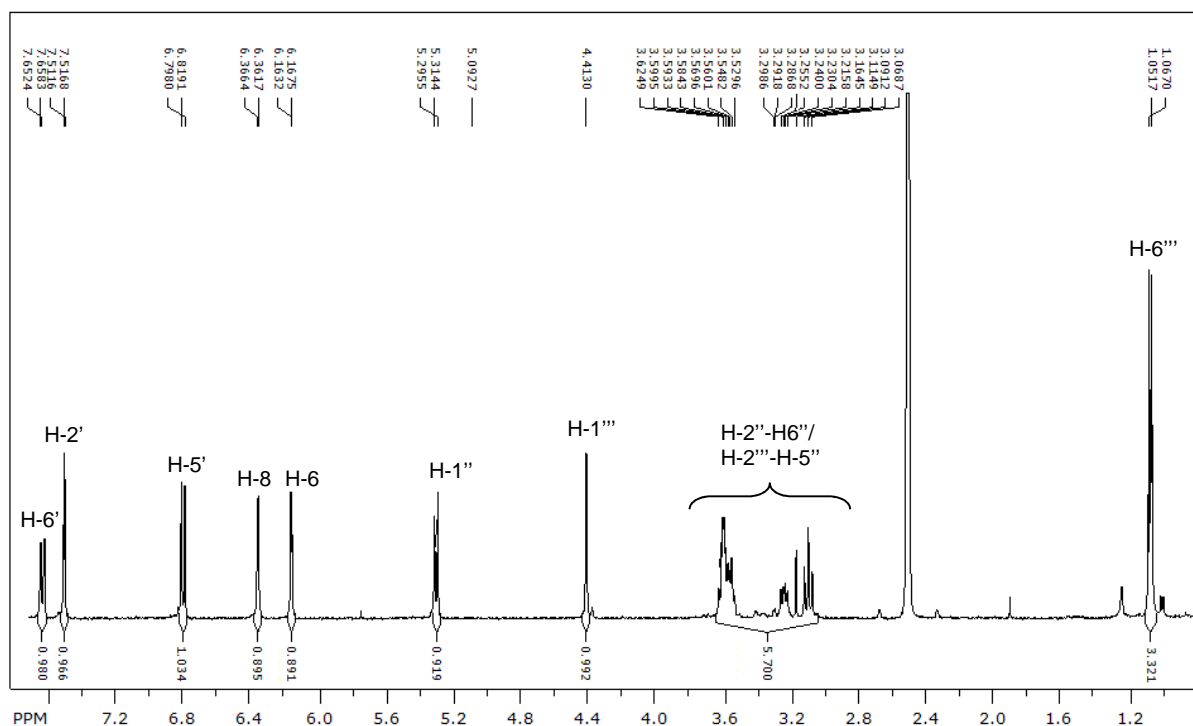


Figura 4.43 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VIII (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

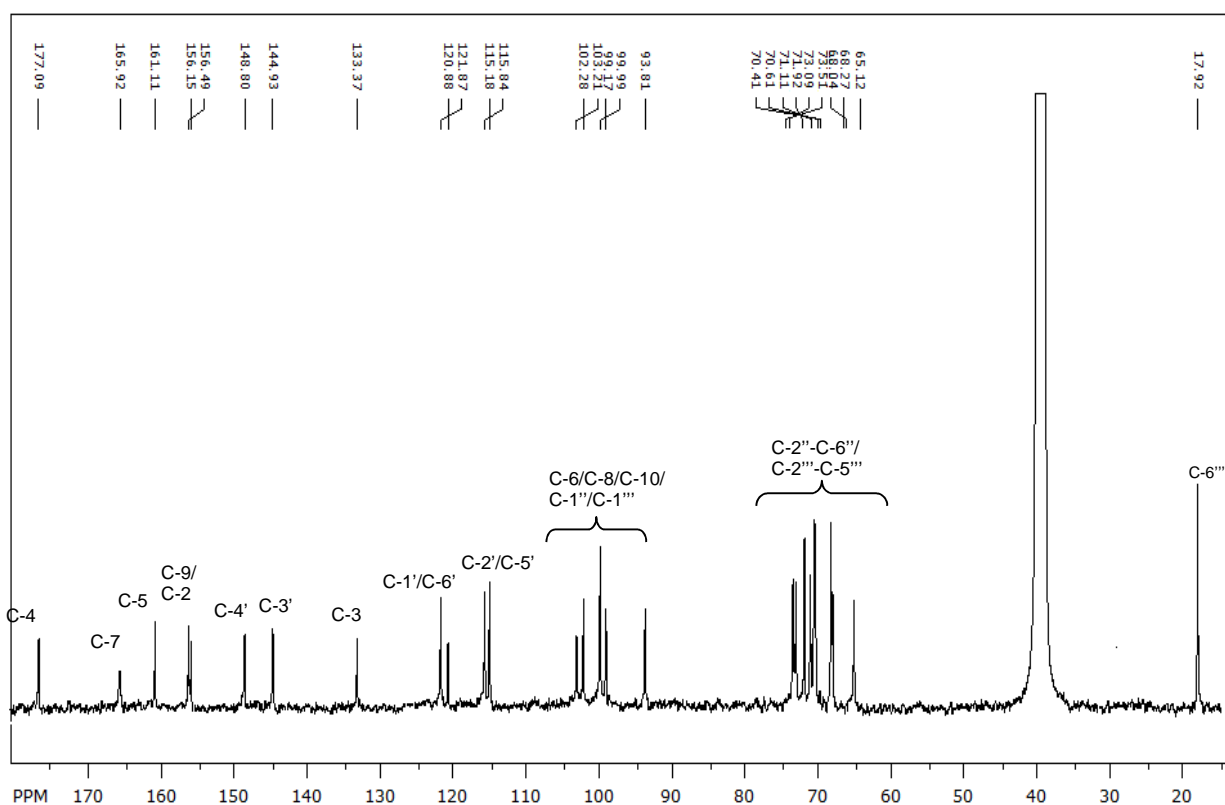


Figura 4.44 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância VIII (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ).

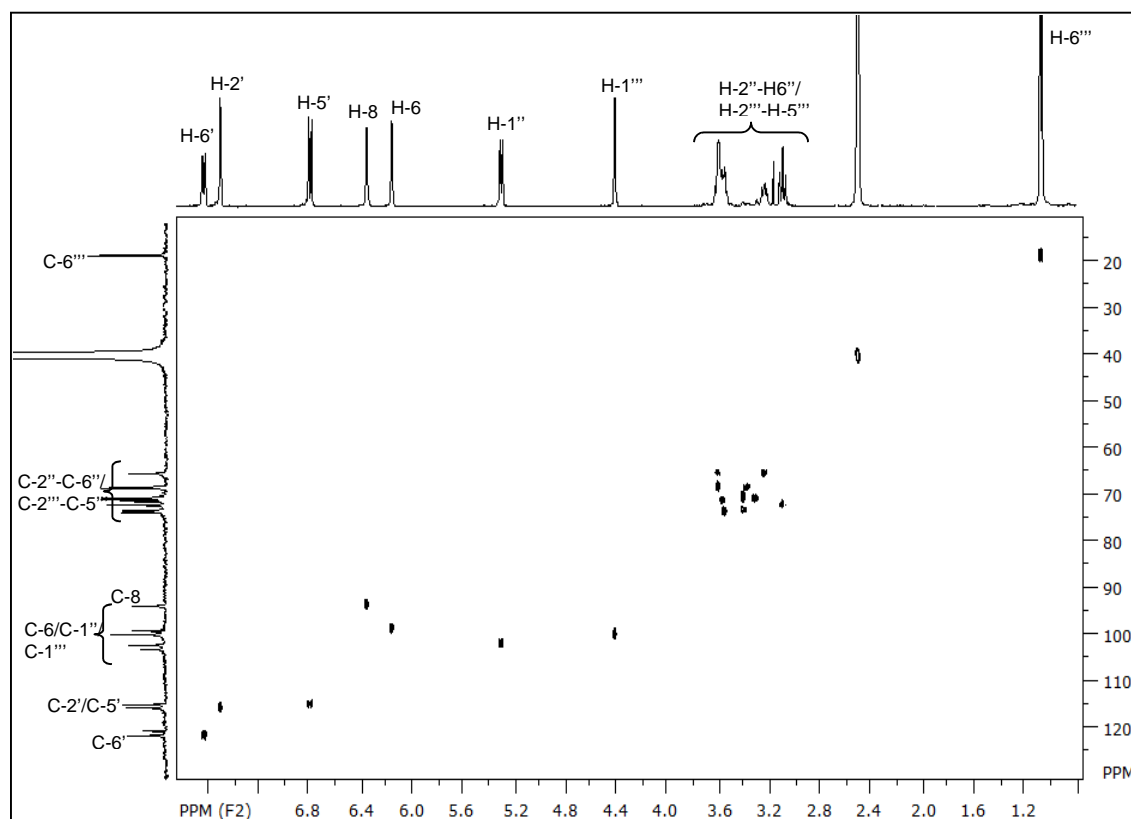


Figura 4.45 – Mapa de correlações HSQC substância VIII (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

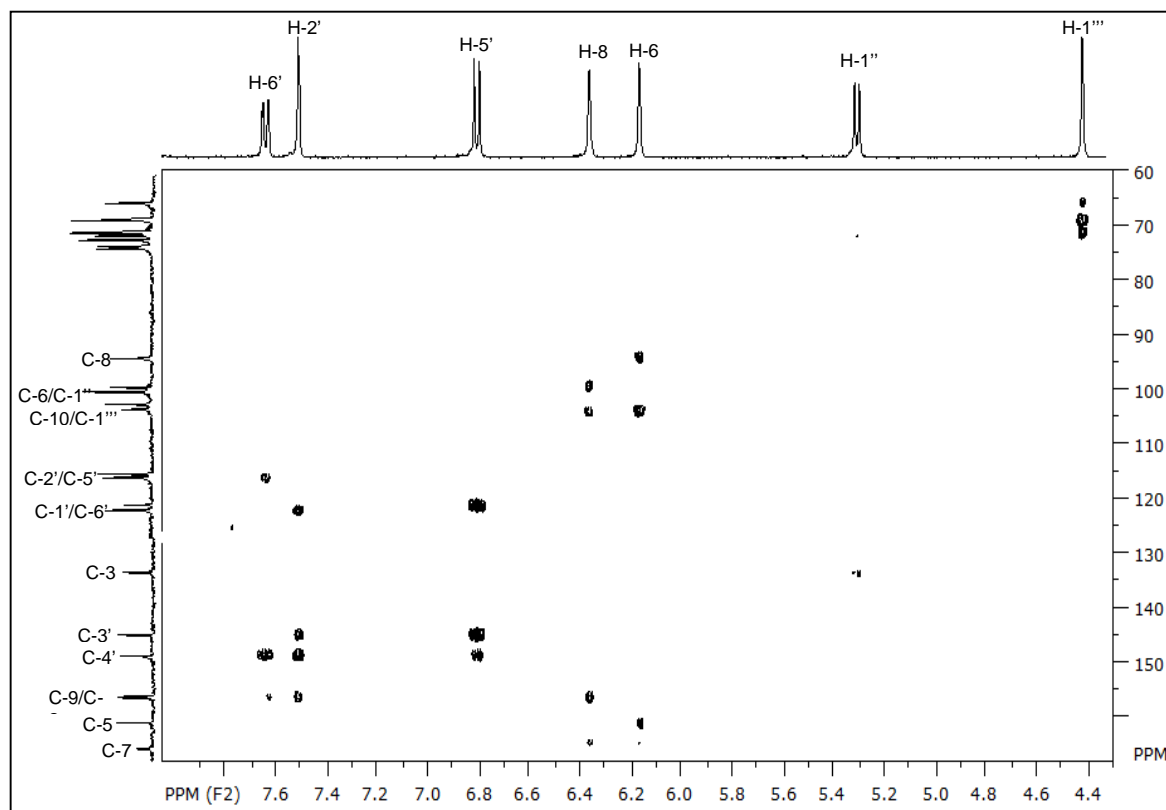


Figura 4.46 – Expansão do mapa de correlações HMBC substância VIII (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

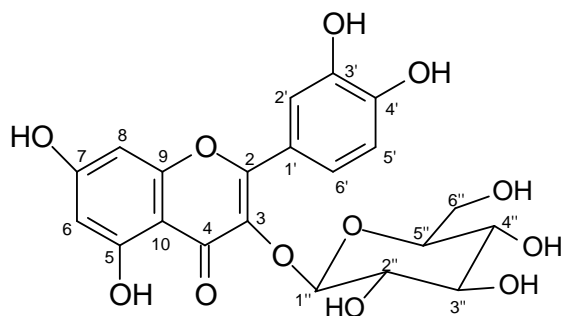
#### 4.2.2.3.2 – Identificação estrutural da substância IX

A substância **IX** foi isolada das frações S1-5 a S1-8 como um sólido amarelo. A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , HMBC e comparação com a literatura (BENNINI *et al.*, 1992).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.47) mostrou sinais, de forma geral, similares aos apresentados para a substância **VIII**, indicando tratar-se de uma aglicona quercetina. Foram observados sinais referentes a um sistema de substituição 3',4' no anel B com sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,70 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2');  $\delta_{\text{H}}$  7,58 (*dd*,  $J = 2,0$  e 8,5 Hz, H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,86 (*d*,  $J = 8,5$  Hz, H-5'). Os valores das constantes estão de acordo com o acoplamento em *orto* ( $J = 8,5$  Hz) entre H-6' e H-5' e acoplamento em *meta* ( $J = 2,0$  Hz) entre os hidrogênios H-6' e H-2'. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A,  $\delta_{\text{H}}$  6,38 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, H-6), sinais típicos de um sistema de acoplamento AX *meta* neste anel. Através da análise do mapa de correlação HMBC (Figura 4.49) e do RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.48), foram atribuídos todos os carbonos da aglicona (Tabela 4.17)

Foi observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinal característico de hidrogênio glicosídico. A presença de um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,24 com constante de 7,4 Hz caracteriza hidrogênio anomérico (H-1'') de  $\beta$ -D-glicose, os hidrogênios H-6'' apresentaram sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,21 (*m*) e  $\delta_{\text{H}}$  3,77 (*m*), os demais hidrogênios glicosídicos apresentaram sinais na faixa  $\delta_{\text{H}}$  3,32-3,59 (H-2''-H5''). Para os sinais no RMN de  $^{13}\text{C}$ , os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  104,3 e  $\delta_{\text{C}}$  62,5 foram atribuídos aos carbonos anomérico (C-1'') e metilênico (C-6'') da unidade glicosídica, e os sinais na faixa  $\delta_{\text{C}}$  71,2-78,4 atribuídos aos demais carbonos dessa unidade.

A substituição deste resíduo de açúcar na posição C-3 do esqueleto flavonoídico foi atribuída com base na correlação observada entre o sinal do hidrogênio anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,24 e o sinal do carbono C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  135,6 no mapa de correlações HMBC. A substância **IX** foi assim identificada como a quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo e este sendo o primeiro relato desta substância para a espécie *A. mucosa*.



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

**Tabela 4.17** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOD, 400 MHz) e de RMN de  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 100 MHz) da substância IX e comparação com a quercetina-3-O-β-D-glicosídeo (BENNINI *et al.*, 1992; DMSO- $d_6$ , 300 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ /75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância IX	BENNINI <i>et al.</i> , 1992	Substância IX	BENNINI <i>et al.</i> , 1992
2	-	-	159,0	156,3
3	-	-	135,6	133,5
4	-	-	179,5	177,5
5	-	-	163,1	161,2
6	6,19 ( <i>d</i> , 2,0)	6,20 ( <i>d</i> , 1,9)	99,9	98,7
7	-	-	166,2	164,2
8	6,38 ( <i>d</i> , 2,0)	6,40 ( <i>d</i> , 1,9)	94,7	93,5
9	-	-	158,5	156,3
10	-	-	105,7	103,9
1'	-	-	123,0	121,1
2'	7,70 ( <i>d</i> , 2,0)	7,52 ( <i>d</i> , 2,1)	116,0	115,2
3'	-	-	145,9	144,8
4'	-	-	149,9	148,4
5'	6,86 ( <i>d</i> , 8,5)	6,81 ( <i>d</i> , 8,5)	117,5	116,0
6'	7,58 ( <i>dd</i> , 8,5 e 2,0)	7,65 ( <i>dd</i> , 8,5 e 2,1)	123,2	122,0
1''	5,24 ( <i>d</i> , 7,4)	5,38 ( <i>d</i> , 7,6)	104,3	101,0
2''	3,32-3,59 ( <i>m</i> )	3,70-3,20 ( <i>m</i> )	71,2-78,4	74,1
3''	3,32-3,59 ( <i>m</i> )	3,70-3,20 ( <i>m</i> )	71,2-78,4	76,2
4''	3,32-3,59 ( <i>m</i> )	3,70-3,20 ( <i>m</i> )	71,2-78,4	70,0
5''	3,32-3,59 ( <i>m</i> )	3,70-3,20 ( <i>m</i> )	71,2-78,4	77,5
6''	3,21 ( <i>m</i> )/3,77 ( <i>m</i> )	3,70-3,20 ( <i>m</i> )	62,5	60,8

NI = Não identificado

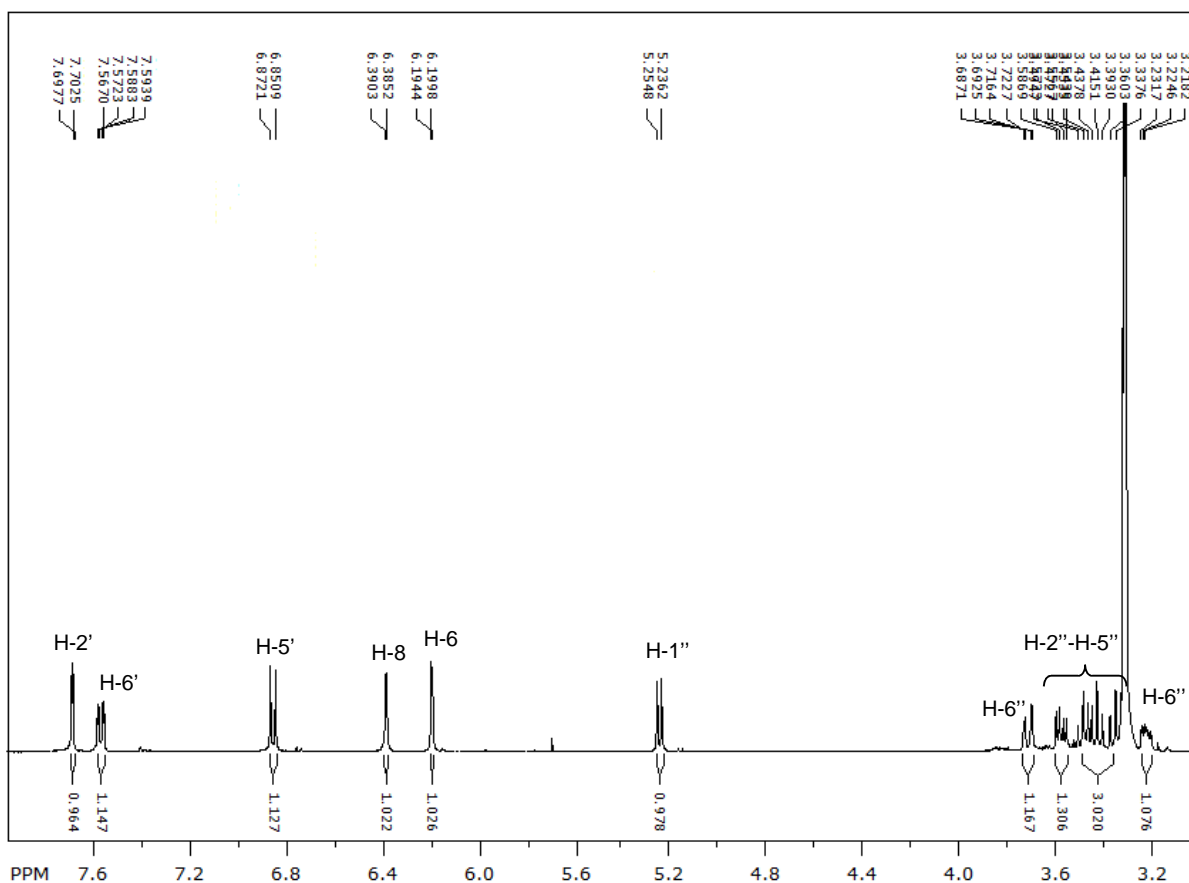


Figura 4.47 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância IX (400 MHz, MeOD).

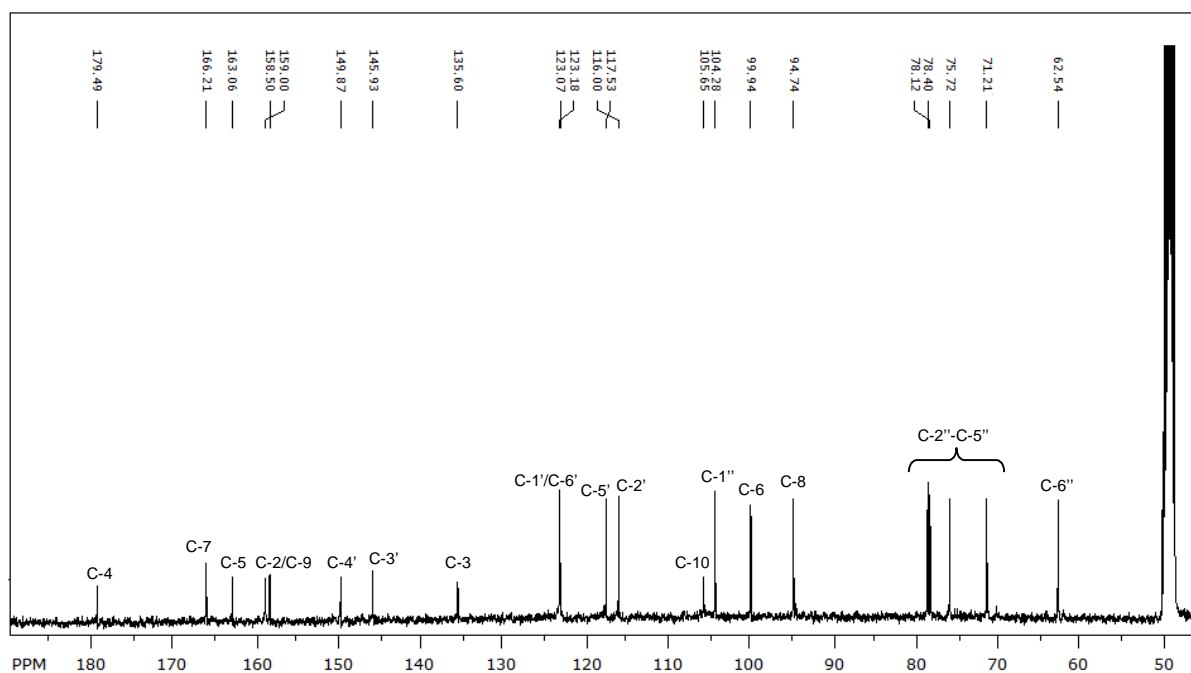


Figura 4.48 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância IX (100 MHz, MeOD).

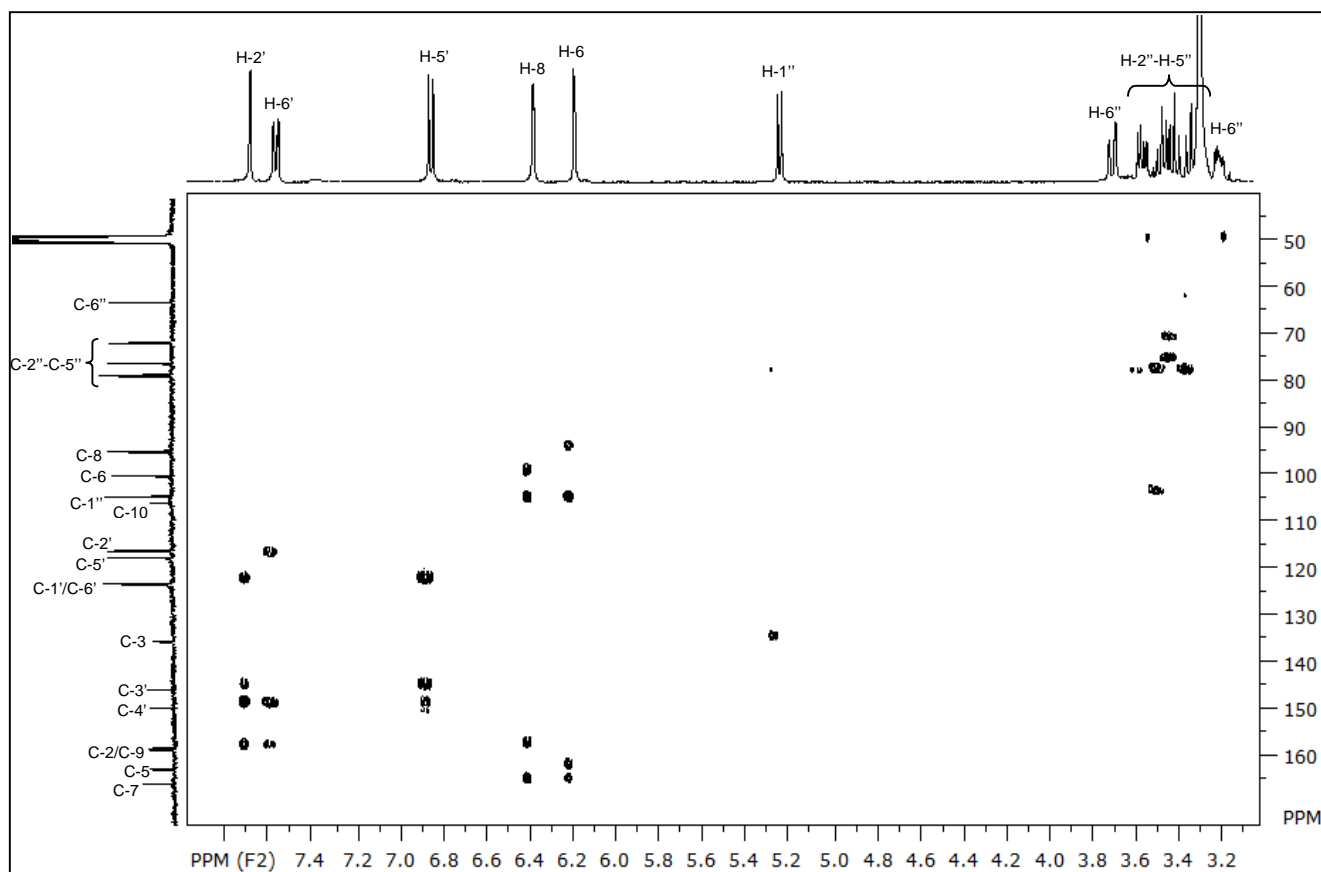


Figura 4.49 - Mapa de correlações HMBC da substância IX (400 MHz, MeOD).

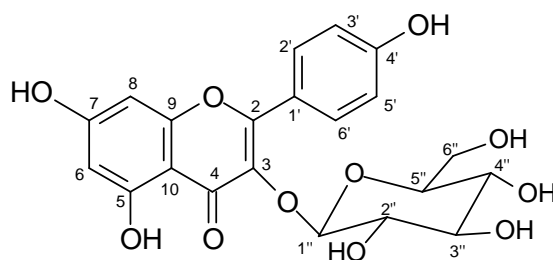
#### 4.2.2.3.3 – Identificação estrutural da substância X

A substância X foi isolada das frações S1-5 a S1-8, S6-2 e S7-2 como um sólido amarelo. A identificação desta substância foi realizada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , HMBC e comparação com a literatura (NUGROHO *et al.*, 2012).

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.50) mostrou sinais característicos da aglicona kaempferol. Foram observados dois dupletos bastante intensos na região dos hidrogênios ligados a anéis aromáticos, que indicou o padrão de substituição do anel B do flavonoide em questão. Sinais em  $\delta_{\text{H}}$  8,04 (*d*,  $J = 8,6$  Hz, H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,87 (*d*,  $J = 8,6$  Hz, H-3' e H-5') confirmam o padrão de substituição *para* no anel B. Este padrão é caracterizado por apresentar sinais em um mesmo deslocamento químico, devido à simetria do anel B e sua livre rotação e assim, o mesmo ambiente químico, sendo estes hidrogênios considerados como equivalentes. Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes a dois hidrogênios do anel A,  $\delta_{\text{H}}$  6,35 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, H-8) e  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, H-6) esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX *meta* neste anel. Através da análise do mapa de correlação HMBC (Figura 4.52) e do RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.51), foram atribuídos todos os carbonos da aglicona (Tabela 4.18)

Foram observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  sinais característicos de hidrogênios glicosídicos. A presença de um duplete em  $\delta_{\text{H}}$  5,21 com constante de 7,4 Hz caracteriza hidrogênio anomérico (H-1'') de  $\beta$ -D-glicose. Os hidrogênios H-6'' apresentaram sinais em  $\delta_{\text{H}}$  3,17 (*m*) e  $\delta_{\text{H}}$  3,67 (*m*) e os demais hidrogênios glicosídicos apresentaram sinais na faixa  $\delta_{\text{H}}$  3,32-3,54 (H-2''-H5''). Para os sinais no RMN de  $^{13}\text{C}$ , os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  104,2 e  $\delta_{\text{C}}$  62,6 foram atribuídos aos carbonos anomérico (C-1'') e metilênico (C-6'') da unidade glicosídica, e os sinais na faixa  $\delta_{\text{C}}$  71,3-78,4 atribuídos aos demais carbonos dessa unidade.

A substituição deste resíduo de açúcar na posição C-3 do esqueleto flavonoídico foi atribuída com base na correlação observada entre o sinal do hidrogênio anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,21 e o sinal do carbono C-3 em  $\delta_{\text{C}}$  135,4 no mapa de correlações HMBC. A substância X foi assim identificada como a kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo e este sendo o primeiro relato desta substância para a espécie *Annona mucosa*.



kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (astragalina) (X)

**Tabela 4.18** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOD, 400 MHz) e de projeção de  $^{13}\text{C}$  (MeOD, 100 MHz) da substância X e comparação com o kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (NUGROHO *et al.*, 2012: DMSO- $d_6$ , 500 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 125 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância X	NUGROHO <i>et al.</i> , 2012	Substância X	NUGROHO <i>et al.</i> , 2009
2	-	-	158,7	156,3
3	-	-	135,4	133,2
4	-	-	179,3	177,4
5	-	-	161,6	161,2
6	6,19 ( <i>d</i> , 2,0)	6,21 ( <i>d</i> , 2,1)	100,5	98,7
7	-	-	163,0	164,2
8	6,35 ( <i>d</i> , 2,0)	6,43 ( <i>d</i> , 2,1)	95,2	93,6
9	-	-	158,9	156,3
10	-	-	105,2	103,9
1'	-	-	122,8	120,9
2'	8,04 ( <i>d</i> , 8,6)	8,04 ( <i>d</i> , 8,8)	132,0	130,8
3'	6,87 ( <i>d</i> , 8,6)	6,89 ( <i>d</i> , 8,8)	116,1	115,0
4'	-	-	159,0	159,9
5'	6,87 ( <i>d</i> , 8,6)	6,89 ( <i>d</i> , 8,8)	116,1	115,0
6'	8,04 ( <i>d</i> , 8,6)	8,04 ( <i>d</i> , 8,8)	132,0	130,8
1''	5,21 ( <i>d</i> , 7,4)	5,54 ( <i>d</i> , 7,2)	104,2	100,9
2''	3,32-3,54 ( <i>m</i> )	ND	71,3-78,4	74,2
3''	3,32-3,54 ( <i>m</i> )	ND	71,3-78,4	76,4
4''	3,32-3,54 ( <i>m</i> )	ND	71,3-78,4	69,9
5''	3,32-3,54 ( <i>m</i> )	ND	71,3-78,4	77,4
6''	3,17 ( <i>m</i> )/3,67 ( <i>m</i> )	ND	62,6	60,8

ND = Não descrito



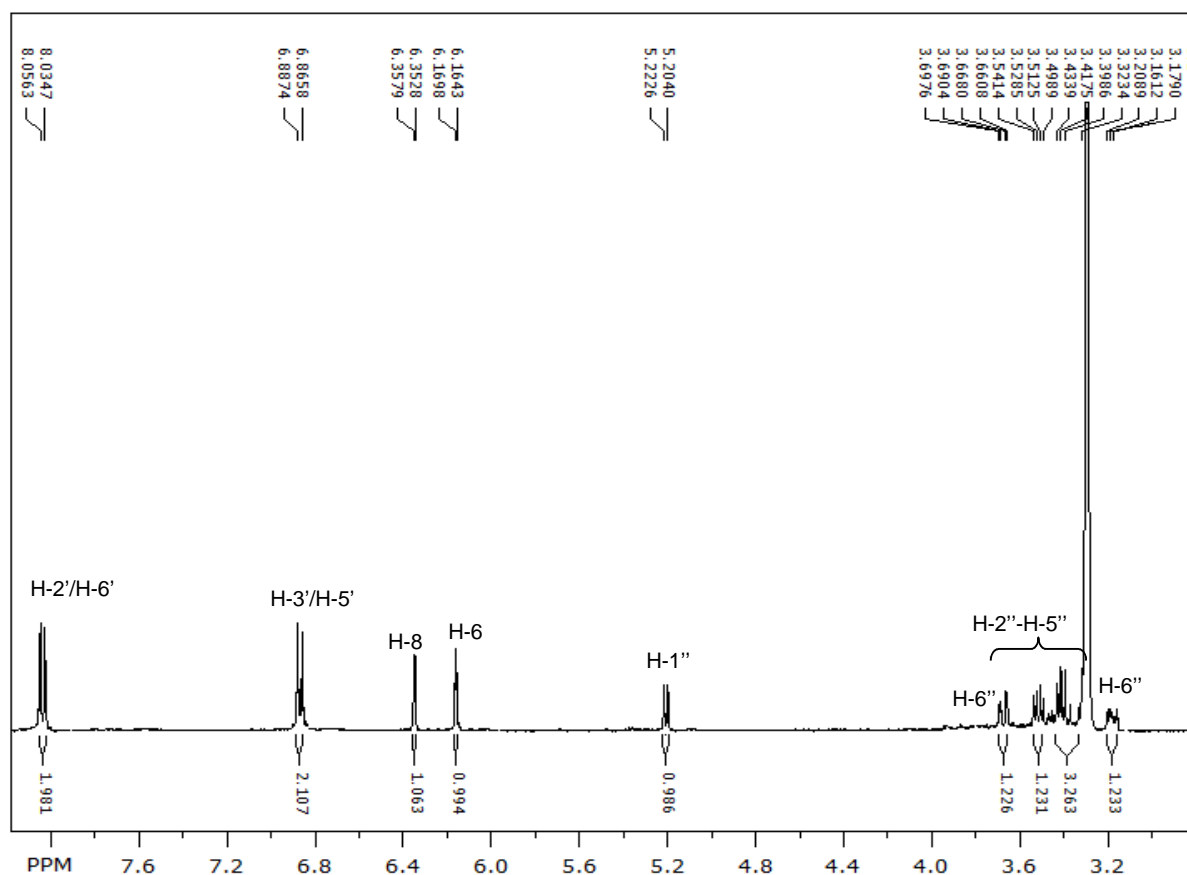


Figura 4.50 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância X (400 MHz, MeOD).

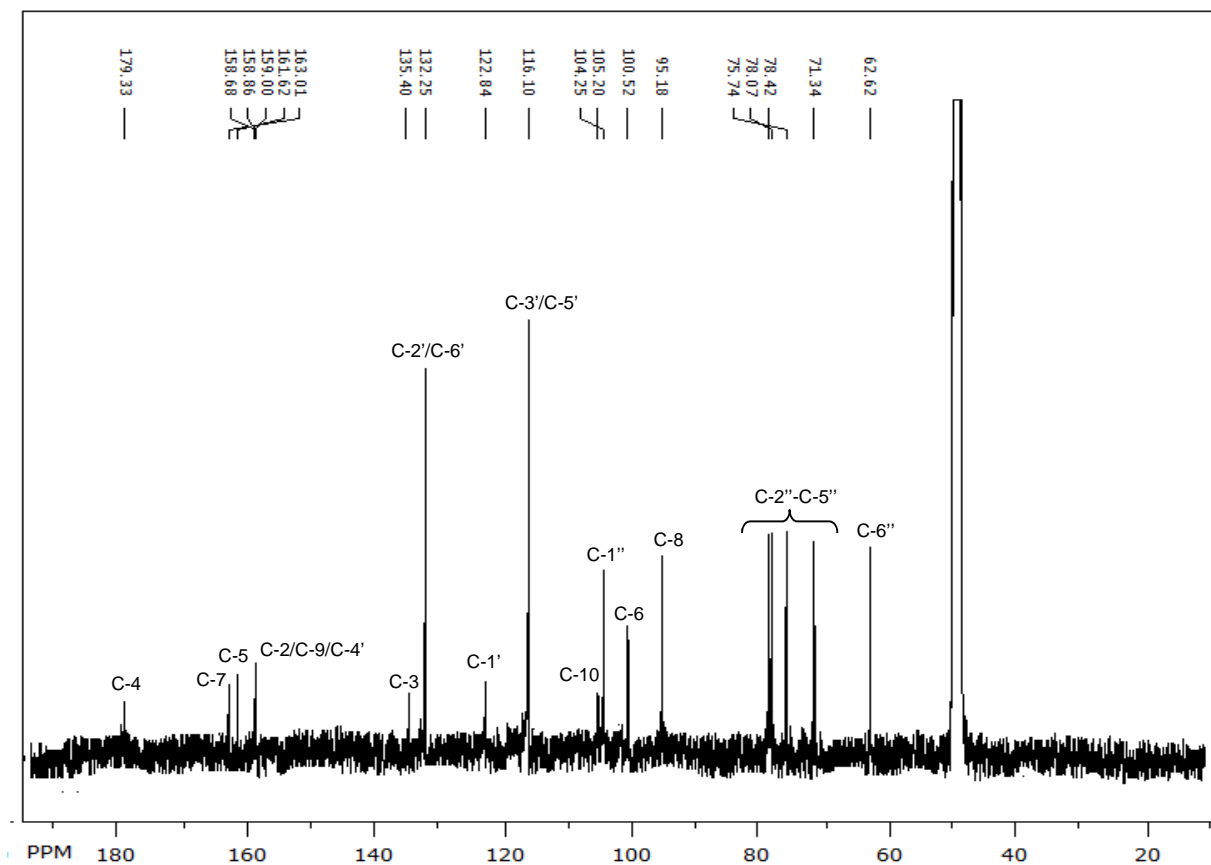
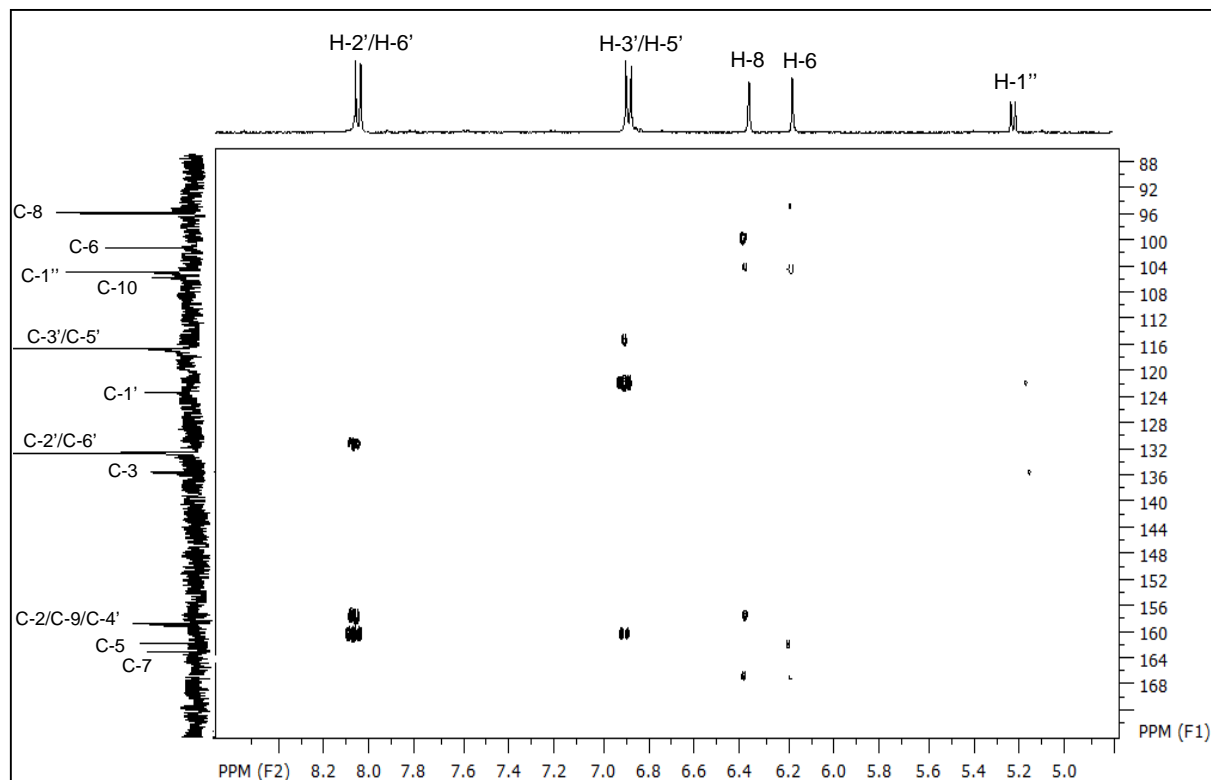


Figura 4.51 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância X (100 MHz, MeOD).



**Figura 4.52** – Expansão do mapa de correlações HMBC da substância X (400 MHz, MeOD).

#### 4.2.2.3.4 – Identificação estrutural da substância XI

A substância **XI** foi identificada em mistura com a substância **IX** (isoquercetina), onde a amostra se apresentou como um óleo amarelo. A identificação estrutural foi realizada através de técnicas espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC e comparação com a literatura (SANTOS *et al.*, 2005).

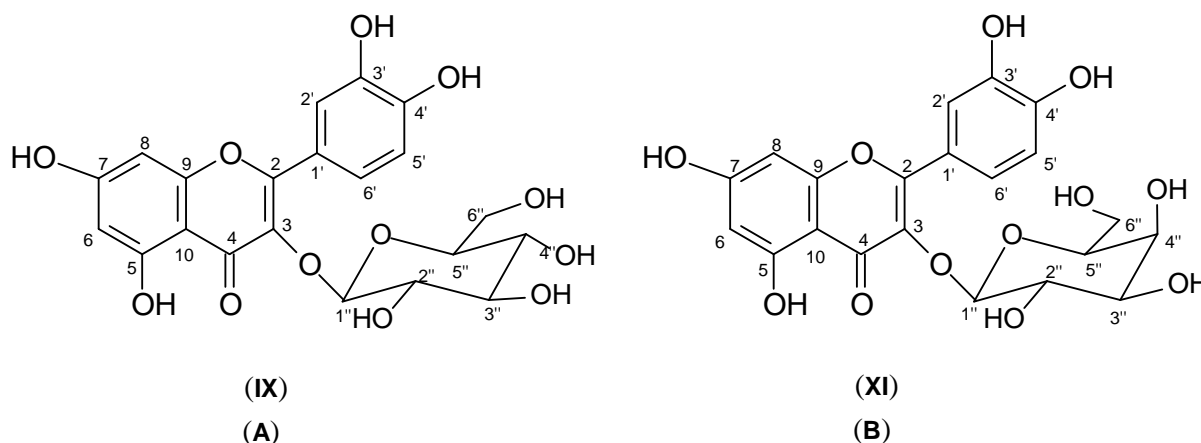
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.53) foram observados dois sinais de hidrogênios anoméricos  $\delta_{\text{H}}$  5,43 (*d*,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{H}_{\text{A}-1''}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  5,36 (*d*,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{H}_{\text{B}-1''}$ ) com integração de 1:0,25 respectivamente. Os dois sinais apresentam constante de acoplamento de 7,6 Hz, valor característico para os piranosídeos glicose, galactose e xilose (HARBONE e MABRY, 1982). Dado o valor de integração para os hidrogênios glicosídicos, 7,5H, que corresponde a 6 hidrogênios da substância majoritária (**A**) (1H), e 6 hidrogênios da substância minoritária (**B**) (0,25H), permite concluir que as duas substâncias apresentam as unidades glicosídica e galactosídica como substituintes.

A análise dos sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos mostra sinais com integração característicos da aglicona quercetina para as duas substâncias. Para o anel B do composto majoritário, houve sobreposição entre os sinais referentes aos hidrogênios  $\text{H}_{\text{A}-2'}$  e  $\text{H}_{\text{A}-6'}$  e se observou um multiplete,  $\delta_{\text{H}}$  7,55, integrando para dois hidrogênios. O sinal  $\delta_{\text{H}}$  6,81 (*d*,  $J = 9,0$  Hz) com constante característica de acoplamento *orto* refere-se ao hidrogênio  $\text{H}_{\text{A}-5'}$ . Para o composto minoritário, foram observados sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,51 (*d*,  $J = 2,0$  Hz,  $\text{H}_{\text{B}-2'}$ );  $\delta_{\text{H}}$  7,64 (*dd*,  $J = 2,0$  e 8,6 Hz,  $\text{H}_{\text{B}-6'}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6,80 (*d*,  $J = 8,6$  Hz,  $\text{H}_{\text{B}-5'}$ ) onde os valores das constantes estão de acordo com o acoplamento em *orto* ( $J = 8,6$  Hz) entre  $\text{H}_{\text{A}-6'}$  e  $\text{H}_{\text{A}-5'}$  e acoplamento em *meta* ( $J = 2,0$  Hz) entre os hidrogênios  $\text{H}_{\text{A}-6'}$  e  $\text{H}_{\text{A}-2'}$ . Foram observados, ainda, dois sinais correspondentes aos hidrogênios do anel A,  $\delta_{\text{H}}$  6,35 (*d*,  $J = 1,8$  Hz,  $\text{H}_{\text{A}-8}/\text{H}_{\text{B}-8}$ ) e  $\delta_{\text{H}}$  6,14 (*d*,  $J = 1,8$  Hz,  $\text{H}_{\text{A}-6}/\text{H}_{\text{B}-6}$ ), esses sinais são típicos de um sistema de acoplamento AX *meta* neste anel. Como os dois sinais estão integrados para aproximadamente 1,25H esses sinais referem-se ao anel A dos dois compostos. Esses dados permitem concluir que as duas substâncias são flavonoides derivados da quercetina, um substituído com unidade glicosídica e o outro com unidade galactosídica.

Através da análise dos mapas de correlação HSQC (Figura 4.55) e HMBC (Figura 4.56) e do RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.54), foram atribuídos todos os carbonos das agliconas para os dois compostos.

A posição de substituição para os dois resíduos de açúcar na posição C-3 das duas substâncias pôde ser confirmada através das correlações entre os dois hidrogênios anoméricos  $\delta_H$  5,43 ( $H_{A-1''}$ ) e  $\delta_H$  5,36 ( $H_{B-1''}$ ) com os carbonos em  $\delta_C$  133,2 ( $C_{A-3}$ ) e  $\delta_C$  133,4 ( $C_{B-3}$ ), respectivamente. Os demais hidrogênios das unidades de açúcar foram verificados na faixa  $\delta_H$  3,07-3,79 (integrado para 7,5 hidrogênios) enquanto os demais carbonos dessas unidades foram verificados na faixa  $\delta_C$  60,1-77,6.

Assim, as duas substâncias foram identificadas como quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (já descrita anteriormente) (**A**) e quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactosídeo (hiperina) (**B**), ambas relatadas pela primeira vez para a espécie *Annona mucosa*. Os dados de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  para a hiperina são mostrados na Tabela 4.19.



Quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicosídeo (isoquercetina) (**IX**) e  
Quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactosídeo (hiperina) (**XI**)

**Tabela 4.19** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) da substância **XI** e comparação com a quercetina-3-O- $\beta$ -D-galactosídeo (SANTOS *et al.*, 2005: DMSO- $d_6$ , 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 100 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Substância XI	SANTOS <i>et al.</i> , 2005	Substância XI	SANTOS <i>et al.</i> , 2005
2	-	-	156,4	156,9
3	-	-	133,4	134,0
4	-	-	177,3	178,0
5	-	-	161,2	161,7
6	6,14 ( <i>d</i> , 1,8)	6,20 ( <i>d</i> , 1,8)	99,0	99,3
7	-	-	165,5	164,9
8	6,35 ( <i>d</i> , 1,8)	6,41 ( <i>d</i> , 1,8)	93,7	94,1
9	-	-	156,0	156,8
10	-	-	103,4	104,3
1'	-	-	121,6	121,6
2'	7,51 ( <i>d</i> , 2,0)	7,54 ( <i>d</i> , 2,2)	115,9	116,5
3'	-	-	144,9	145,4
4'	-	-	148,7	149,0
5'	6,80 ( <i>d</i> , 8,6)	6,82 ( <i>d</i> , 8,4)	115,2	115,6
6'	7,64 ( <i>dd</i> , 2,0 e 8,6)	7,60 ( <i>dd</i> , 2,2 e 8,8)	121,1	122,5
1''	5,36 ( <i>d</i> , 7,6)	5,37 ( <i>d</i> , 7,5)	101,9	102,4
2''	3,07-3,79 ( <i>m</i> )	3,57 ( <i>m</i> )	67,9-77,6	71,8
3''	3,07-3,79 ( <i>m</i> )	3,38 ( <i>m</i> )	67,9-77,6	73,7
4''	3,07-3,79 ( <i>m</i> )	3,66 ( <i>m</i> )	67,9-77,6	68,5
5''	3,07-3,79 ( <i>m</i> )	3,34 ( <i>m</i> )	67,9-77,6	76,3
6''	3,07-3,79 ( <i>m</i> )	3,31 ( <i>m</i> ) 3,46 ( <i>m</i> )	60,1	60,5

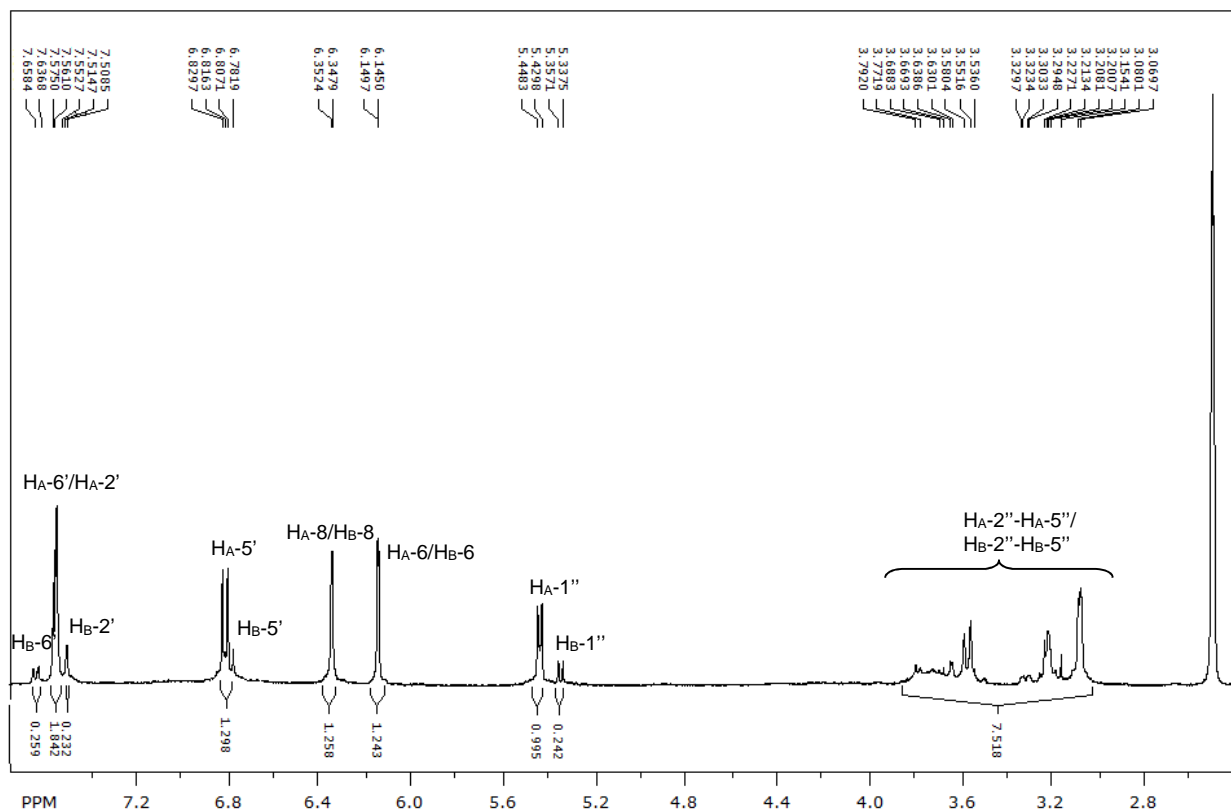


Figura 4.53 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da mistura de substâncias IX e XI (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )

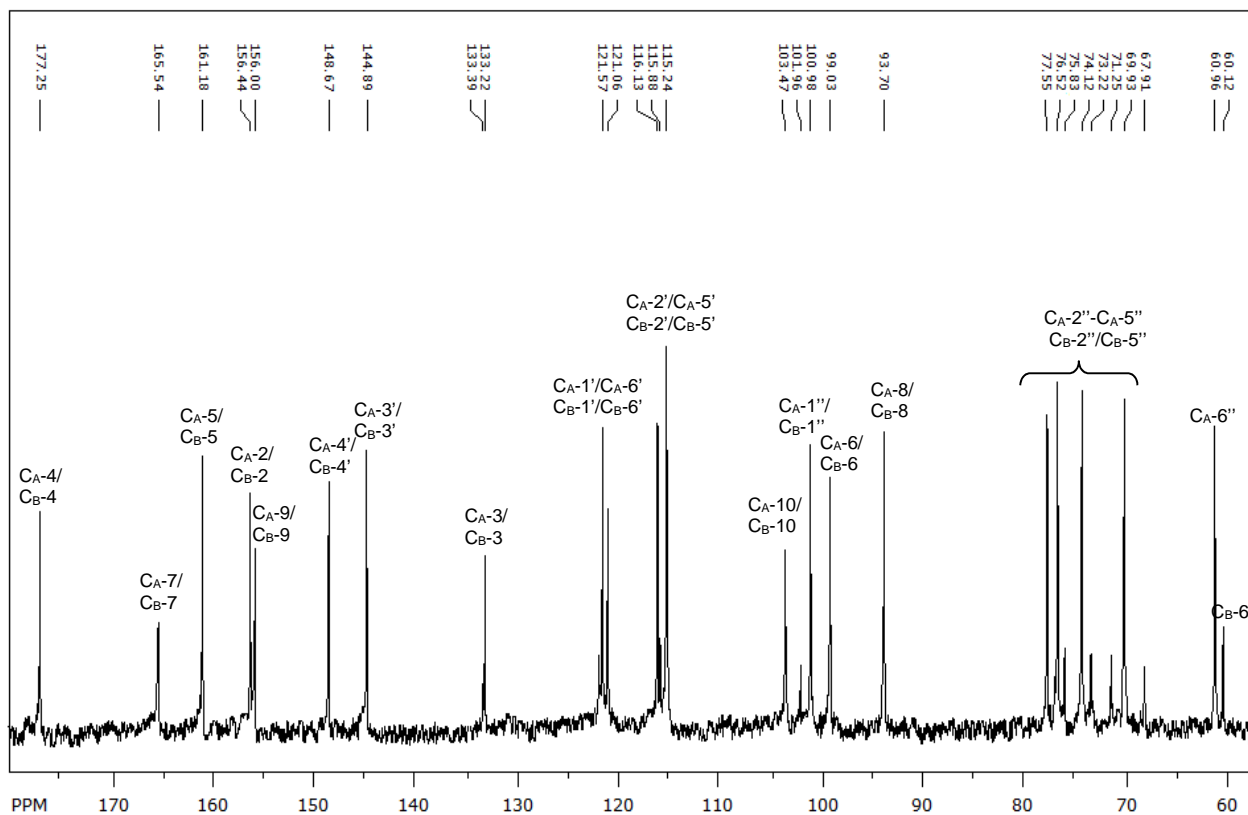


Figura 4.54 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias IX e XI (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ).

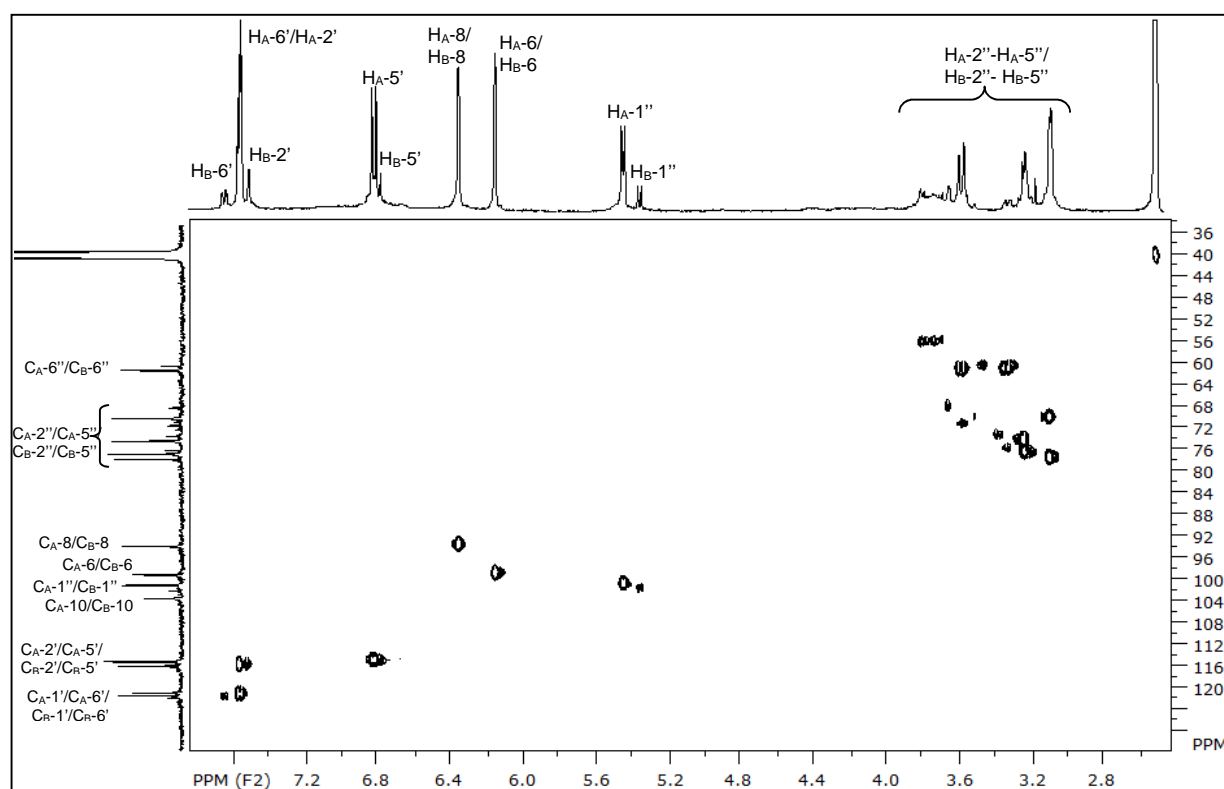


Figura 4.55 - Mapa de correlações HSQC das substâncias IX e XI (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

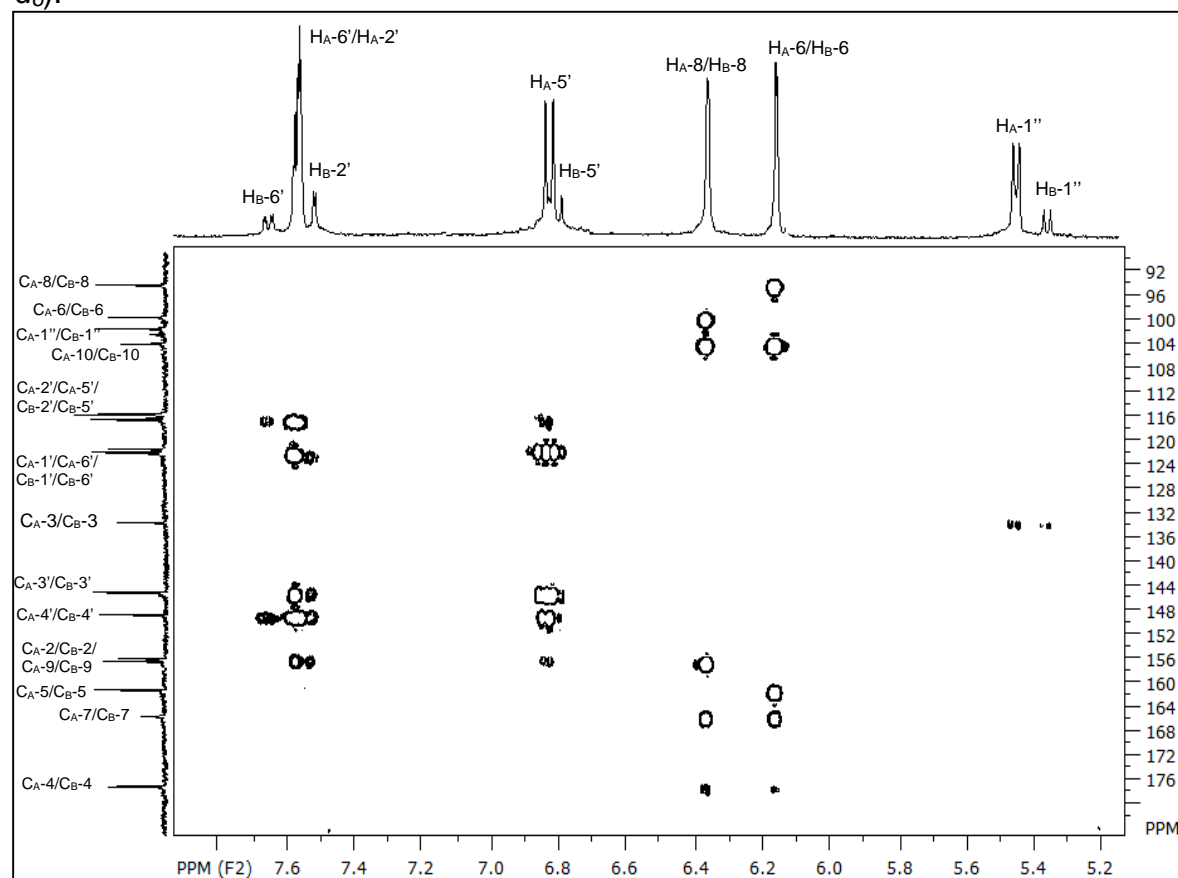


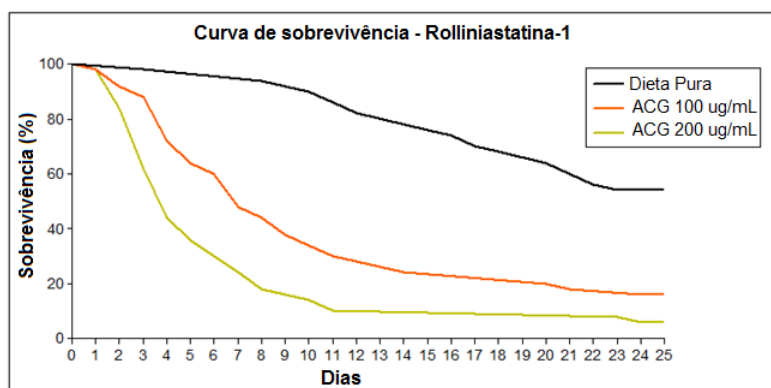
Figura 4.56 – Expansão do mapa de correlações HMBC das substâncias IX e XI (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

### 4.3 – Avaliação das atividades biológicas da rolliniastatina-1

O estudo fitoquímico de *A. mucosa* levou ao isolamento de 4 acetogeninas, no entanto, apenas a substância **IV** (rolliniastatina-1) foi isolada em grande quantidade. Diante disso, esta substância foi submetida a um *screening* de diferentes ensaios biológicos, a fim de selecionar em quais ensaios as demais substâncias serão submetidas.

Assim, a rolliniastatina-1 foi avaliada quanto ao seu potencial inseticida frente às formigas cortadeiras e ao gorgulho do milho, potencial fungicida frente ao fungo *L. gongylophorus*, potencial antitumoral frente à linhagem MDA-MB-231 de câncer de mama (célula triplo negativa que não tem receptor hormonal), e de inibição enzimática frente à enzima acetilcolinesterase.

No ensaio por ingestão com as operárias de formigas cortadeiras, a rolliniastatina-1 apresentou forte potencial inseticida nas concentrações 100 e 200 µg/mL, onde provocou 84 e 94% de mortalidade acumulada, respectivamente (Gráfico 4.4). Destacando-se ainda, o efeito inseticida imediato, uma vez que a substância alcançou 50% de mortalidade em apenas 7 (100 µg/mL) e 4 dias (200 µg/mL).



**Gráfico 4.4** – Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão com amostras de rolliniastatina-1 nas concentrações 100 e 200 µg/mL.

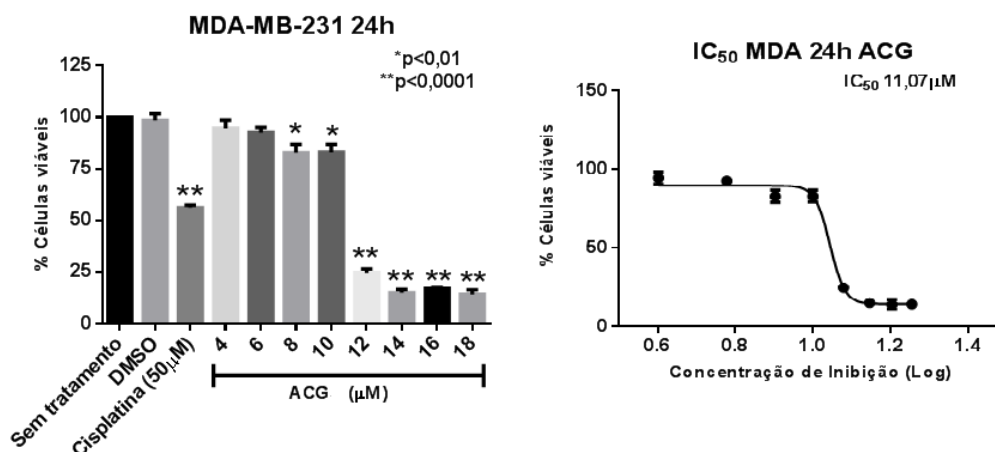
Para o ensaio frente ao gorgulho do milho, a rolliniastatina-1 foi avaliada na concentração de apenas 58 ppm (concentração igual à utilizada para ensaio com a fração de origem) e provocou mortalidade média de 51,1% dos gorgulhos ao fim do 10º dia de experimento. Esta concentração é bem próxima às doses utilizadas para os insetos atualmente registrados para o controle da referida espécie-praga (AGROFIT – Ministério da Agricultura) mesmo não passando por um processo de



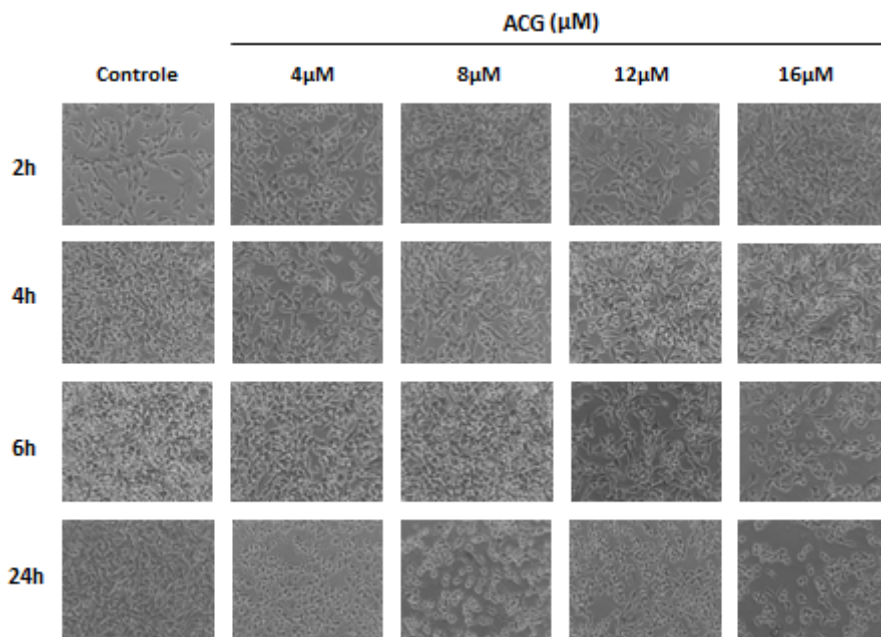
formulação que incrementa consideravelmente a atividade biológica. Além disso, foi observado, ao fim do experimento, que todos os insetos apresentaram sintomas de perda da coordenação locomotora, o que pode influenciar na dinâmica populacional da praga.

No ensaio frente ao fungo *L. gongylophorus* a rolliniastatina-1 não se mostrou ativa, provocando inibição de apenas 36% do crescimento micelial em relação ao controle.

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. Neste ensaio, a rolliniastatina-1 foi avaliada em 8 concentrações diferentes, estabelecidas por ensaios prévios, e foi construída uma curva de concentração-resposta para determinar o IC<sub>50</sub> (Figura 4.45). A rolliniastatina-1 inibiu a proliferação de células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231, apresentando IC<sub>50</sub> de 11,07 μM. É importante destacar ainda que à concentração de apenas 12,0 μM apenas 25% das células permaneceram viáveis em relação ao controle no período de 24 h, enquanto que no controle positivo com cisplatina se obteve mais de 50% de células viáveis neste mesmo intervalo de tempo. Foram também avaliadas as mudanças morfológicas das células tumorais tratadas com rolliniastatina-1 (4, 8, 12 e 16 μM) via análise de microscopia de luz nas células expostas à rolliniastatina-1 por 2, 4, 6 e 24 h (Figura 4.57). Observou-se que a partir do tempo de 6 h na concentração de 12 μM, já se observa mudanças morfológicas na célula, podendo-se notar diminuição da densidade das mesmas, e adquirir formato circular, em relação ao controle.



**Figura 4.57** - Avaliação da toxicidade e curva de concentração-resposta de rolliniastatina-1 às células de câncer de mama da linhagem MDA-MB-231.



**Figura 4.58** – Efeito da rolliniastatina-1 na morfologia das células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231.

No ensaio de inibição enzimática, avaliou-se o percentual de inibição da enzima acetilcolinesterase pela rolliniastatina-1 à concentração de 200  $\mu\text{M}$ , empregando-se amostras controle negativo (ausência de acetilcolina) e controle positivo (ausência do ligante). Esse ensaio é feito através do emprego de bioreator, coluna cromatográfica em que a enzima acetilcolinesterase é imobilizada na fase estacionária. A amostra, uma solução de rolliniastatina-1 (200  $\mu\text{M}$ ) e acetilcolina (15  $\mu\text{M}$ ), é então analisada via CL-EM com o bioreator, e o montante de colina produzida é quantificado. A rolliniastatina-1 estimulou a enzima acetilcolinesterase, uma vez que a quantidade de colina produzida no teste na presença da enzima foi de 12,71  $\mu\text{M}$ , superior aos 11,61  $\mu\text{M}$  produzidos na ausência da enzima, ou seja, a rolliniastatina-1 estimulou a enzima acetilcolinesterase em 9,49%.

## 5 – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico biomonitorado das partes vegetais de *A. mucosa* revelou o potencial inseticida dessa espécie e levou ao isolamento e identificação estrutural de 11 metabólitos secundários, sendo 3 lignanas, 4 acetogeninas e 4 flavonoides.

Os resultados dos ensaios biológicos frente à formiga cortadeira e ao gorgulho do milho mostraram grande potencial inseticida da fração hidroalcoólica do extrato das sementes. Uma vez que o estudo fitoquímico dessa fração mostrou ser a mesma composta, majoritariamente, por acetogeninas, esses resultados comprovam informações da literatura sobre o potencial inseticida dessa classe de compostos (LIAW *et al.*, 2010). A avaliação do potencial inseticida destas substâncias isoladas está em andamento e as pequenas diferenças entre as estruturas das acetogeninas isoladas, estereoquímica, tamanho de cadeia e grupos funcionais (THF-THF e THF-THP), permitirá uma análise inicial do efeito de cada um desses fatores na atividade inseticida desta classe de substâncias.

Os resultados do ensaio biológico com o fungo simbionte da formiga cortadeira evidenciaram maior potencial fungicida das frações apolares das folhas e, uma vez que o estudo fitoquímico da fração hexânica levou ao isolamento de lignanas furofurânicas, este resultado está de acordo com a literatura acerca dessa classe de compostos com potencial fungicida (PAGNOCCA *et al.*, 1996). Esses resultados foram a base para a escolha do princípio ativo a ser empregado no desenvolvimento de nanoformulações para controle de pragas que está relatado no Capítulo III do presente trabalho.

Apesar de a fração acetato de etila não se mostrar bioativa frente aos ensaios biológicos realizados, a identificação de flavonoides é inédita para esta espécie e assim, esses resultados contribuem para a quimiosistemática da planta.

Os resultados do “*screening*” de ensaios biológicos apresentados para a acetogenina rolliniastatina-1, provaram o potencial inseticida e antitumoral desta substância conforme é relatado em literatura para esta classe de compostos. Esses resultados são importantes uma vez que esta substância é encontrada em grande quantidade nas sementes de *Annona mucosa* e é de fácil obtenção. Além disso, com base nesses resultados, as demais acetogeninas isoladas neste trabalho, porém em pequena quantidade, serão avaliadas no ensaio biológico antitumoral com células de câncer de mama, e inseticida frente às formigas cortadeiras.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATI, G.; AZZARELO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. "Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance". *Plant Sci.*, **196**: 67-76, 2012.
- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. "<sup>13</sup>C NMR spectroscopy of lignin and neolignan derivatives". *Magn. Reson. Chem.*, **23**: 389-418, 1985.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. "Annonaceous acetogenins: recent progress". *J. Nat. Prod.*, **62**: 504-540, 1999.
- ALMEIDA, F. A. C.; GOLDFARB, A. C.; GOUVEIA, J. P. G. "Avaliação de extratos vegetais e métodos de aplicação no controle de *Sitophilus spp*". *Rev. Bras. Prod. Agroindust.*, Campina Grande, **1**: 13-20, 1999.
- ALMEIDA, R. N. A.; PEÑAFLORES, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y. ; BUENO, O. C.; HEBLIN, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C. & SILVA, M. F. G. F. "Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller". *BioAssay*, **2**: 1-8, 2007.
- ANDRADE, L. N.; BIZAIA, N.; CAETANO, B. L.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; SILVA FILHO, A. A.; CALEFI, P. S.; NASSAR, E. J.; BASTOS, J. K.; CIUFFI, K. J. "Synthesis of (-)-hinokinin by oxidation of (-)-cubebin catalyzed by biomimetic metalloporphyrin catalytic systems". *Catal. Commun.*, **10**: 669-672, 2009.
- AYLWARD, F. O.; CURRIE, C. R.; SUEN, G. "The evolutionary innovation of nutritional symbioses in leaf-cutting ants". *Insects*, **3**: 41-61, 2012.
- BAYINDIR, U.; ALFERMANN, A. W.; FUSS, E. "Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb". *The Plant Journal*, **55**: 810-820, 2008.
- BENCKISER, G. "Ants and sustainable agriculture: A review". *Agron. Sustain.*, **30**: 191-199, 2010.
- BENNINI, B. B.; CHULIA, A. J.; KAOUADJI, M.; THOMASSON, F. "Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*". *Phytochemistry*, **31**: 2483-2486, 1992.
- BERMEJO, A.; FIGADÉRE, 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.
- BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. "Perspectivas no controle de formigas cortadeiras". *Série Técnica IPEF*, **11**: 31-46, 1997.
- BOMMARCO, R.; KLEIJN, D.; POTTS, S. G. "Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security". *Trends Ecol. Evol.*, **28**: 230-238, 2013.
- BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A. D.; NOOME, D. A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. "Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**: 35-67, 2015.
- BORN, L.; LIEB, F.; LORENTZEN, J. P.; MOESCHLER, H.; NONFON, M.; SOLLNER, R.; WENDISCH, D. "Die relative configuration der aus *Annona squamosa* isolierten acetogenine Annonin I (Squamocin) und Annonin VI". *Planta Med.*, **56**: 312-319, 1990.
- BOTTON, M.; LORINI, I.; LOECK, A. E.; AFONSO, A. P. S. "O gorgulho do milho *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) como praga em frutíferas de clima temperado". *Circular Técnica – Embrapa, Bento Gonçalves – RS*, 2005.
- BUENO, A. F.; BATISTELA, M. J.; BUENO, R. C. O. F.; FRANÇA-NETO, J. B.; NISHIKAWA, M. A. N.; FILHO, A. L. "Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean". *Crop Prot.*, **30**: 937-945, 2011.

- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BETELLA, G.; MORINI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. "Toxicity of sesame extracts to the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)". *Sociobiology*, **44**: 599-606, 2004a.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BROCHINI, J.; SINHORI, K.; MORINI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. "Activity of sesame leaf extracts to the leaf cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera : Formicidae)". *Sociobiology*, **44**: 511-518, 2004b.
- BUENO, F. A.; GODOY, M. P. F.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI Jr, M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. "Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus". *Sociobiology*, **45**: 389-399, 2005.
- BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. "Flavonoids: New roles for old molecules". *J. Integr. Plant Biol.*, **52**: 98-111, 2010.
- CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E. F.; PRICE, S. L.; GERARDO, N. M.; WONG, B.; STUART, A. E.; LARGET, B.; ABBOT, P.; CURRIE, C. R. "Specificity In the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseunocardia* bacteria". *Proc. R. Soc. B*, **278**: 1814-1822, 2011.
- CHAHBOUNE, N.; BARRACHINA, I.; ROYO, I.; ROMERO, V.; SÁEZ, J.; TORMO, J. R.; PEDRO, N.; ESTORNELL, E.; ZAFRA-POLO, M. C.; PELÁEZ, F.; CORTES, D. "Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors". *Bioorg. Med. Chem.*, **14**: 1089-1094, 2006.
- CHAGNON, M.; KREUTZWEISER, D.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; VAN DER SLUIJS, J. P. "Risks of large-scale use of systematic insecticides to ecosystem functioning and services". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**: 119-134, 2015.
- CHATROU, L. W.; ESCRIBANO, M. P.; VIRUEL, M. A.; MAAS, J. W.; RICHARDSON, J. E.; HORMAZA, J. I. "Flanking regions of monomorphic microsatellite loci a new source of data for plant species-level phylogenetics". *Mol. Phylogenet. Evol.*, **53**: 726-733, 2009.
- CHÁVEZ, D.; ACEVEDO, L. A.; MATA, R. "Jimenezin, a novel annonaceous acetogenins from the seeds of *Rollinia mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran – tetrahydropyran ring systems". *J. Nat. Prod.*, **61**: 419-421, 1998.
- CHÁVEZ, D.; ACEVEDO, L. A.; MATA, R. "Tryptamine derived amides and acetogenins from the seeds of *Rollinia mucosa*". *J. Nat. Prod.*, **62**: 1119-1122, 1999.
- CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. "Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*". *J. Nat. Prod.*, **59**: 904-906, 1996a.
- CHEN, Y. Y.; CHANG, F. R.; YEN, H. F.; WU, Y. C. "Epomusenins A and B, two acetogenins from fruits of *Rollinia mucosa*". *Phytochemistry*, **42**: 1081-1083, 1996b.
- CHEN, Y.; CHEN, J. W.; Li, X. "Cytotoxic bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*". *J. Nat. Prod.*, **74**: 2477-2481, 2011.
- COLE, M. D. "Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review". *Bioch. Syst. Ecol.*, **22**: 837-856, 1994.
- COLOM, O. A.; NESKE, A.; CHAHBOUNE, N.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARDON, A. "Tucupentol, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin from *Annona Montana*, as a potent inhibitor of mitochondrial complex I". *Chem. Biod.*, **6**: 335-340, 2009.
- COPPING, L. G.; DUKE, S. O. "Natural products that have been used commercially as crop protection agents". *Pest Manag. Sci.*, **63**: 524-554, 2007.
- COSTA, M. S.; COSSOLIN, J. F. S.; PEREIRA, M. J. B.; SANTANA, A. E. G.; LIMA, M. D.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. "Larvicidal and cytotoxic potential of

- squamocin on the mifgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Cilicidae)". *Toxins*, **6**: 1169-1176, 2014.
- COUVREUR, T. L. P.; PIRIE, M. D.; CHATROU, L. W.; SAUNDERS, R. M. K.; SU, Y. C. F.; RICHARDSON, J. E.; ERKENS, R. H. J. "Early evolutionary history of the flowering plant family Annonaceae: Steady diversification and boreotropical geodispersal". *J. Biogeogr.*, **38**: 664-680, 2011.
- CROMBIE, L. Recent advances in the chemistry of insect control II. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1990, p. 296.
- DANG, Q. L.; KIM, W. K.; NGUYEN, C. M.; CHOI, Y. H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; PARK, M. S.; LIM, C. H.; LUU, N. H.; KIM, J. C. "Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens". *J. Agric. Food Chem.*, **59**: 11160-11167, 2011.
- DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. "DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels". *Life*, **59** (3): 151-162, 2007.
- DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. "Natural products in crop protection". *Bioorg. Med. Chem.*, **17**: 4022-4034, 2009.
- DELLA LUCIA, T. C. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. "Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges". *Pest. Manag. Sci.*, **70**: 14-23, 2014.
- DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach. England, John Wiley & Sons, 2002.
- DINELLI, G.; MAROTTI, I.; BOSI, S.; BENEDETTELLI, S.; GHISELLI, L.; CORTACERO-RAMÍREZ, S.; CARRASCO-PANCORBO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. "Lignan profile in seeds of modern and old Italian soft wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars as revealed by CE-MS analyses". *Electrophoresis*, **28**: 4212-4219, 2007.
- ENDERS, D.; MILOVANOVIC, M. "Asymmetric synthesis of (+)-hinokinin, (+)-dehydrocubebin and cubebin dimethyl ether, a new lignin from *Phyllanthus niruri*". *Z. Naturforsch.*, **62b**: 117-120, 2007.
- ESTRADA, C.; WCISLO, W. T.; VAN DAEL, S. A. "Symbiotic fungi alter plant chemistry that discouraged leaf-cutting ants". *New Phytol.*, **198**: 241-251, 2013.
- ESTRADA-REYES, R.; ALVAREZ, A. L. C.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ROCHA, L.; HEINZE, G.; MORENO, J.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ M. "Lignans from leaves of *Rollinia mucosa*". *Z. Naturforsch.*, **57c**: 29-32, 2002.
- ESTRADA-REYES, R.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ROCHA, L.; HEINZE, G.; ESQUINCA, A. R. G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ M. "Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex" *Pharm. Biol.*, **48**: 70-75, 2010.
- EVISON, S. E. F.; HUGHES, W. O. H. "Genetic caste polymorphism and the evolution of polyandry in *Atta* leaf-cutting ants". *Naturwissenschaften*, **98**: 643-649, 2011.
- FAO – Food and Agriculture Organization, 2009, "How to feed the world in 2050" Acessado em: 05/12/2015.
- FATHIAZAD, F.; DELAZAR, A.; AMIRI, R.; SARKER, S. D.; "Extraction of flavonoids and quantification of rutin from waste tobacco leaves". *Iran. J. Pharm. Res.*, **3**: 222-227, 2006.
- FIASCHI, P.; PIRANI, R. "Review of plant biogeographic studies in Brazil". *J. Syst. Evol.*, **47**: 477-496, 2009.
- FIGUEIREDO, S. F. L.; VIANA, V. R. C.; SIMÕES, C.; ALBARELLO, N.; TRUGO, L. C.; KAPLAN, M. A. C.; KRUL, W. R. "Lignans from leaves, seedlings and micropropagated plants of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill. – Annonaceae". *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **56**: 121-124, 1999.

- FIGUEIREDO, S. F. L.; ALBARELLO, N.; VIANA, V. R. C. "Micropogation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill". *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **37**: 471-475, 2001.
- FOLEY, J. A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K. A.; CASSIDY, E. S.; GERBER, J. S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N. D.; O'CONNELL, C.; RAY, D. K.; WEST, P. C.; BALZER, C.; BENNETT, E. M.; CARPENTER, S. R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.; ROCKSTROM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.; ZAKS, D. P. M. "Solutions for a cultivated planet". *Nature*, **478**: 337-342, 2011.
- FRITZ, S.; SEE, L.; MACCALUM, I.; YOU, L.; BUN, A.; MOLTCHANOVA, E.; DUERAUER, M.; ALBRECHT, F.; SCHILL, C.; PERGER, C.; HAVLIK, P.; MOSNIER, A.; THORNTON, P.; WOOD-SICHA, U.; HERRERO, M.; BECKERRESHEF, I.; JUSTICE, C.; HANSEN, M.; GONG, P.; AZIZ, S. A.; CIPRIANI, A.; CUMANI, R.; CECHIL, G.; CONCHEDDA, G.; FERREIRA, S.; GOMEZ, A.; HAFNI, M.; KAYITAKIRE, F.; MALANDING, J.; MUELLER, R.; NEWBY, T.; NONGUIERMA, A.; OLUSEGUN, A.; ORTNER, S.; RAJAK, D. R.; ROCHA, J.; SCHEPASCHENKO, D.; SCHEPASCHENKO, M.; TEREKHOV, A.; TIANGWA, A.; VANCUTSEM, C.; VINTROU, E.; WENBIN, W.; VAN DER VELDE, M.; DUNWOODY, A.; KRAXNER, F.; OBERSTEINER, M. "Mapping global cropland and field size". *Global Change Biol.*, **21**: 1980-1992, 2015.
- GAJALAKSHMI, S.; DIVYA, R.; DEEPIKA, V. D.; MYTHILI, S.; SATHIAVELU, A. "Pharmacological activities of *Annona squamosa*: A review". *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **10**: 24-29, 2011.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILEVIRA NETO, S.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ALVES, S. B.; ZUCCHI, R. A.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. Manual de Entomologia Agrícola. 2ª ed., São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2002, p.659.
- GERWICK, B. C.; SPARKS, T. C. "Natural products for pest control: an analysis of their role, value and future". *Pest Manag. Sci.*, **70**: 1169-1185, 2014.
- GONZALEZ, M. C.; TORMO, J. R.; BERMEJO, A.; ZAFRA-POLO, M. C.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. "Rollimembrin, a novel acetogenin inhibitor of mammalian mitochondrial complex I". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**: 1113-1118, 1997.
- GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. "Lignóides com atenção especial à química das neoliganas". *Química Nova*, **7**: 250-273, 1984.
- GU, Z. M.; ZHOU, D.; LEWIS, N. J.; WU, J.; SHI, G.; MCLAUGHLIN J. L. "Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry". *Bioorg. Med. Chem.*, **5**: 1911-1916, 1997.
- GUADAO, A.; GUTIRREZ, C.; PEA, E.; CORTES, D.; COLOMA, A. G. "Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins". *J. Nat. Prod.*, **63**: 773-776, 2000.
- GUEDES, R. N. C.; LIMA, J. O. G.; SANTOS, J. P.; CRUZ, C. D. "Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae)". *J. Stor. Prod. Res.*, **31**: 145-150, 1995.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. The Flavonoids: Advances in Research, Chapman & Hall, London, 1982, p. 535.
- HE, J.; GIUSTI, M. M. "Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties". *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **1**: 163-187, 2010.
- HENRICK, C. A. "Pyrethroids". IN: Agrochemicals from natural products. GODFREY, C. R. A. (Ed.) New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1994, p. 63-146.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. The Ants. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

- HUSSAIN, S.; PENG, S.; FAHAD, S.; KHALIQ, A.; HUANG, J.; CUI, K.; NIE, L. "Rice management interventions to mitigate greenhouse gas emissions: A review". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**: 3342-3360, 2015.
- ITTERSUM, M. K.; CASSMAN, K. G.; GRASSINI, P.; WOLF, J.; TITTONELL, P.; HOCHMAN, Z. "Yield gap analysis with local to global relevance – A review". *Field Crops Res.*, **143**: 4-17, 2013.
- JACOBSON, M. B. "Botanical pesticides: past, present and future". IN: ARNASAN, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. Insecticides of plant origin. American Chemical Society, Washington, DC 1989.
- JOSSANG, A.; DUBAELE, B.; CAVÉ, A. "Deus nouvelles acetogenines monotetrahydrofuranniques cytotoxiques: L'annomonicine et la montanacine". *Tetrahedron Lett.*, **31**: 1861-1864, 1990.
- KASSA, A.; ZIMMERMANN, G.; STEPHAN, D.; VIDAL, S. "Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncates* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to entomopathogenic fungi from Ethiopia". *Biocontrol Sci. Technol.*, **12**: 727-736, 2002.
- KISHORE, N.; MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K.; TRIPATHI, V.; LALL, N. "Natural products as leads for potential mosquitocides". *Phytochem. Rev.*, **13**: 587-627, 2014.
- KOJIMA, N.; TANAKA, T. "Medicinal chemistry of annonaceous acetogenins: Design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues". *Molecules*, **14**: 3621-3661, 2009.
- KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M.; YEN, H. F.; WU, Y. C. "Antiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*". *Phytochemistry*, **57**: 421-425, 2001.
- KUO, R. Y.; CHEN, C. Y.; LIN, A. S.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. "A new phenanthrene alkaloid, romucosine I, from *Rollinia mucosa* Baill". *Z. Naturforsch.*, **59b**: 334-336, 2004.
- LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. "Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran larvae". *Phytoparasitica*, **32**: 30-37, 2004.
- LIAW, C. C.; CHANG, F. R.; WU, M. J.; WU, Y. C. "A novel constituent from *Rollinia mucosa*, Rollicosin and a new approach to develop annonaceous acetogenins as potential antitumor agents". *J. Nat. Prod.*, **66**: 279-281, 2003.
- LIAW, C. C.; WU, T. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. "Historic perspectives on annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials". *Planta Med.*, **76**: 1390-1404, 2010.
- LIN, L.; CHEN, P. e HARNLY, J. M. "New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas". *J. Agric. Food. Chem.*, **56**: 8130-8140, 2008.
- LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. "Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil". *Rev. Bras. Frutic.*, **36**: 125-131, 2014.
- MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T. "New species of *Annonaceae* from the neotropics and miscellaneous notes". *Bluema*, **55**: 259-275, 2010.
- MAN, S.; GAO, W.; WEI, C.; LIU, C. "Anticancer drugs from traditional toxic chinese medicines". *Phytother. Res.*, **26**: 1449-1465, 2012.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. "Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras". *Bahia Agric.*, **7**: 18-21, 2006.
- MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press; London, UK; 1982, p. 113.



- MARSHALL, J. A. & SABATINI, J. J. "An outside-in approach to adjacent bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins with C<sub>2</sub> core symmetry. Total synthesis of Asimicin and C32 analogue". *Org. Lett.*, **8**: 3557-3560, 2006.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - AGRONEGÓCIO BRASILEIRO: *Uma oportunidade de investimentos*. 2004. Disponível em: <<http://www.ministério da agricultura>>. Acesso em: 05/12/2015.
- MIRESMAILLI, S.; ISMAN, M. B. "Botanical insecticides inspired by plant – herbivore chemical interactions". *Trends Plant. Sci.*, **19**: 29-35, 2014.
- MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C.; ARMBRECHT, I.; FARJIBRENER, a.; CALLE, Z. "Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control". *Int. J. Pest Manag.*, **58**: 225-247, 2012.
- MOSS, G. P. "Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC recommendations 2000)". *Pure Appl. Chem.*, **72**: 1493-1523, 2000.
- MREMA, E. J.; RUBINO, F. M.; BRANBILLA, G.; MORETTO, A.; TSATSAKIS, A. M.; COLOSIO, C. "Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity". *Toxicology*, **307**: 74-88, 2013.
- NOWAK, M. A.; TARNITA, C. E.; WILSON, E. O. "The evolution of eusociality". *Nature*, **466**: 1057-1062, 2006.
- NUGROHO, A.; KIM, M. H.; CHOI, J.; CHOI, J. S.; JUNG, W. T.; LEE, K. T.; PARK, H. J. "Phytochemical studies of the phenolic substances in *Aster glehni* extract and its sedative and anticonvulsant activity". *Arch. Pharm. Res.*, **35**: 423-430, 2012.
- NWOSU, L. C.; ADEDIRE, C. O.; OGUNWOLU, E. O.; ASHANO, M. O. "Relative susceptibility of 20 elite maize varieties to infestation and damage by the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)". *Int. J. Trop. Insect Sci.*, **35**: 185-192, 2015.
- PAGNOCCA, F. C.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. "Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants", *J. Chem. Ecol.*, **22**: 1325-1330, 1996.
- PAN, J. Y.; CHEN, S. L.; YANG, M. H.; WU, J.; SINKKONEN, J.; ZOU, K. "An update on lignans: natural products and synthesis". *Nat. Prod. Rep.*, **26**: 1251-1292, 2009.
- PELTER, A.; WARD, R. S.; RAO, E. V.; SASTRY, K. V. "Revised structures for pluviatilol, methyl pluviatilol and xanthoxylol – General methods for the assignment of stereochemistry to 2,6-diaryl-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane lignans". *Tetrahedron*, **32**: 2783-2788, 1976.
- PETERNELLI, E. F. O.; BARBOSA, L. C. A.; DELLA LUCIA, T. M. C. "Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) from *Mabea fistulifera* Elaiosome". *Quim. Nova*, **31**: 475-478, 2008.
- PETTIT, G. R.; CRAGG, G. M.; POLONSKY, J.; HERALD, D. L.; GOSWAMI, A.; SMITH, C. R.; MORETTI, C.; SCHMIDT, J. M.; WEISLEDER, D. "Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*". *Can. J. Chem.*, **65**: 1433-1435, 1987.
- PETIT, G. R.; RIESEN, R.; LEET, J. E.; POLONSKY, J.; SMITH, C. R.; SCHMIDT, J. M.; DUFRESNE, C.; SCHAUFELBERGER, D.; MORETTI, C. "Isolation and structure of Rolliniastatin 2: A new cell growth inhibitory acetogenin from *Annona mucosa*". *Heterocycles*, **28**: 213-217, 1989.
- PICANÇO, M. C. P. "Fatores de perdas em cultivares de milho safrinha". *Acta Sci. Agron.*, **26**: 161-167, 2004.
- PIERSON, J. T.; DIETSGEN, R. G.; SHAW, P. N.; ROBERTS-THOMSON, S. J.; MONTEITH, G. R.; GIDLEY, M. J. "Major Australian tropical fruits biodiversity:

- Bioactive compounds and their bioactivities". *Mol. Nutr. Food Res.*, **56**: 357-387, 2012.
- POMILIO, A. B.; BATTISTA, M. E.; VITALE, A. A. "Naturally-occurring cyclopeptides: Structures and bioactivity". *Curr. Org. Chem.*, **10**: 2074-2121, 2006.
- PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WIHELMOVA, N. "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids". *Fitoterapia*. **82**: 513-523, 2011.
- PURCELL, J.; BRUTSCH, T.; CHAPUISAT, M. "Effects of the social environment on the survival and fungal resistance of ant brood". *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **66**: 467-474, 2012.
- RAINER, H. "Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-HIL". *Ann. Nathist. Mus. Wien*, **108B**: 191-205, 2007.
- RIBEIRO, B. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, E. E.; SANTOS, J. P. "Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)". *J. Stor. Prod. Res.*, **39**: 21-31, 2003.
- ROY, M.; BHATTACHARYYA, P. K.; PAL, S.; CHAUDHURY, A.; DITYACHAUDHURY, N. "Dehydrodihydrorotenone and flemichapparín-B in *Tephrosia cândida*". *Phytochemistry*, **26**: 2423-2424, 1987.
- RUSSEL, G. C.; FENEMORE, P. G. "New lignans from leaves of *Macropiper excelsum*". *Phytochemistry*, **12**: 1799-1803, 1973.
- SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. "Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: Taxonomic significance". *Phytochemistry*, **55**: 567-573, 2000.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. "Flavonoídes O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)". *Rev. Bras. Farmacog.*, **15**: 321-325, 2005
- SCHMIDT, T. J.; ALFERMANN, A. W.; FUSS, E. "High-performance liquid chromatography-mass spectrometric identification of dibenylbutyrolactone-type lignans: insights into electrospray ionization tandem mass spectrometric fragmentation of lign-7-eno-9,9'-lactones and application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. (Common Flax)". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**: 3642-3650, 2008.
- SEO, YOUNGWAN. "Antioxidant activity of the chemical constituents from the flower buds of *Magnolia denudata*". *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **15**: 400-406, 2010.
- SHI, G.; ALFONSO, D.; FATOPE, M. O.; ZENG, L.; GU, Z.; ZHAO, G.; HE, K.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. "Mucocin: A new annonaceous acetogenin bearing a tetrahydropyran ring". *J. Am. Chem. Soc.*, **117**: 10409-10410, 1995.
- SHI, G.; KOZLOWSKI, J. F.; SCHWEDLER, J. T.; WOOD, K. V.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. "Muconin and mucocin: Additional nonclassical bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*". *J. Org. Chem.*, **61**: 7988-7989, 1996a.
- SHI, G.; YE, Q.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. "Rollinecins A and B: Two new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*". *J. Nat. Prod.*, **59**: 548-551, 1996b.
- SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. "Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources". *J. Insect Physiol.*, **49**: 307-313, 2003.
- SILVA, F. F.; PAZINI, J. B. "Combatendo as formiga cortadeiras em cultivos florestais". *Revista Campo e Negócios*, **1**: 30-32, 2012.
- SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; LUCARINI, R.; SATO, D. N.; PAVAN, F. R.; FREITAS, N. H. A.; ANDRADE, L. N.; PEREIRA, A. C.; BIANCO, T. N. C.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; SILVA, R.; SILVA FILHO, A. A. "Antimycobacterial activity of natural and semi-synthetic lignans". *Z. Naturforsch.*, **64c**: 779-784, 2009.

- SILVA, P. H.; TRIVELIN, P. C. O.; GUIRADO, N.; AMBROSANO, E. J.; MENDES, P. C. D.; ROSSI, F.; ARÉVALO, R. A. "Controle alternativo de *Sitophilus zeamais* MOTS., 1855 (Col.: Curculionidae) em grãos de milho". *Rev. Bras. Agroecol.*, **2**: 902-905, 2007.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.; Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7<sup>a</sup> ed.; Wiley, 2005.
- SIMON-DELISO, M.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, A. D.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M. "Systematic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites". *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **22**: 5-34, 2015.
- SOUTO, L. S.; GUERRA, M. B. B.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; SILVA, W. L. "Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado". *Rev. Árvore*, **31**: 163-167, 2007.
- SOUZA, A.; ZANETTI, R.; CALEGARIO, N. "Nível do dano econômico para formigas-cortadeiras em função do índice de produtividade florestal de eucaliptais em uma região da Mata Atlântica". *Neotrop. Entomol.*, **40**: 483-488, 2011.
- SPARKS, T. C. "Insecticide discovery: An evaluation and analysis". *Pestic. Biochem. Physiol.*, **107**: 8-17, 2013.
- TEMPESTA, N. S.; KRIEK, G. R.; BATES, R. B. "Uvaricin, a new antitumor agente from *Uvaria accuminata* (Annonaceae)". *J. Org. Chem.*, **47**: 16: 3151-3153, 1982.
- TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE, H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. "Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families". *Phytomedicine*, **12**: 382-390, 2005.
- TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L. "Global food demand and the sustainable intensification of agriculture". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **108**: 20260-20264, 2011.
- TREMATERRA, P. "Preferences of *Sitophilus zeamais* to different types of Italian commercial rice and cereal pasta". *Bull. Insectology*, **62**: 103-106, 2009.
- VASCONCELOS, H. L.; FOWLER, H. G. "Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants". IN: MEER, R. K. V.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. (Ed.). Applied myrmecology: a world perspective. San Francisco: Westview Press, 1990, p.410-419.
- WANG, S.; HUANG, K. "Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". *J. Chrom. A*, **1032**: 273-179, 2004.
- WÉLÉ, A.; MAYER, C.; QUENTIN, D.; ZHANG, Y.; BLOND, A.; BODO, B. "3D-structure of cycloreticulín C and glabrin A, cyclopeptides from the seeds of *Annona reticulata*". *Tetrahedron*, **65**: 275-281, 2009.
- ZAFRA-POLO, M. C.; GONZÁLEZ, M. C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTES, D. "Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I". *Phytochemistry*, **42**: 253-271, 1996.
- ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MAYHE-NUNES, A. J.; MEDEIROS, A. G. B.; SOUZA-SILVA, A. "Combate sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo". *Rev. Árvore*, **27**: 387-392, 2003.
- ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G. T.; LEMES, P. G. "An overview of integrated management of leaf-cutting ants

- (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations”. *Forests*, **5**: 439-454, 2014.
- ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; SHI, G.; GU, Z. M.; HE, K.; MCLAUGHLIN, J. L. “Recent advances in annonaceous acetogenins”. *Nat. Prod. Rep.*, **13**: 275-306, 1996.

## **CAPÍTULO II**

### **Síntese total de mímicos de acetogeninas**

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Produtos naturais como estruturas-modelo para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas

Desde o século passado, os produtos naturais têm sido a maior fonte de diversidade estrutural e compostos de relevância biológica oriundos das mais diversas fontes como plantas superiores, microorganismos e organismos marinhos (KINGHORN *et al.*, 2011; MISHRA e TIWAKI, 2011). Os produtos naturais continuam a desempenhar um importante papel na descoberta de novas moléculas bioativas ao atuarem como estruturas-modelo para o desenvolvimento desses novos compostos (CAMP *et al.*, 2012; CRAGG e NEWMAN, 2013; NEWMAN e CRAGG, 2012).

No entanto, diversas dificuldades encontradas na pesquisa com produtos naturais como: (i) dificuldade de acesso e oferta do material de trabalho; (ii) a complexidade dos produtos naturais (iii) o tempo gasto nestes trabalhos e (iv) preocupações acerca dos direitos de propriedade intelectual (HARVEY, 2008) levam à necessidade de desenvolvimento de novas metodologias para a descoberta de novas drogas.

Dentre as novas tecnologias desenvolvidas e empregadas para guiar pesquisas por compostos bioativos de forma racional pode-se destacar: (i) desenvolvimento de processos de “*screening*” simplificados para os produtos naturais; (ii) fontes de produtos naturais mais ricas; (iii) avanços em metodologias de síntese orgânica associadas à modelos de correlação estrutura-atividade (*ing.* SAR); (iv) biossíntese combinatória; (v) e emprego de biologia molecular para o entendimento da estrutura tridimensional e modelagem das interações dos compostos aos sítios ativos das proteínas (*docking*) (LAM, 2007; REYMOND *et al.*, 2010).

Do descobrimento de uma molécula bioativa até a produção de um produto para o mercado, uma das etapas essenciais é a síntese laboratorial deste composto, que envolve estudos de síntese total ou de análogos com modificações estruturais (REYMOND *et al.*, 2010; NEWMAN e CRAGG, 2012). Essas modificações são feitas a partir de esqueletos de produtos naturais bioativos e orientadas de forma a se obter o composto com as melhores propriedades biológicas e menor complexidade estrutural (LAM, 2007; LEE, 2010).

## 1.2 – Acetogeninas e seu potencial biológico

Uma grande variedade de complexos produtos naturais têm sido preparados por síntese total ou modificados a partir dos grupos funcionais presentes nas moléculas. Embora essa estratégia leve à uma menor diversidade em termos de variedade estrutural, ela é considerada atrativa por permitir gerar novas moléculas com propriedades biológicas melhoradas em relação ao produto natural de origem (LAM, 2007).

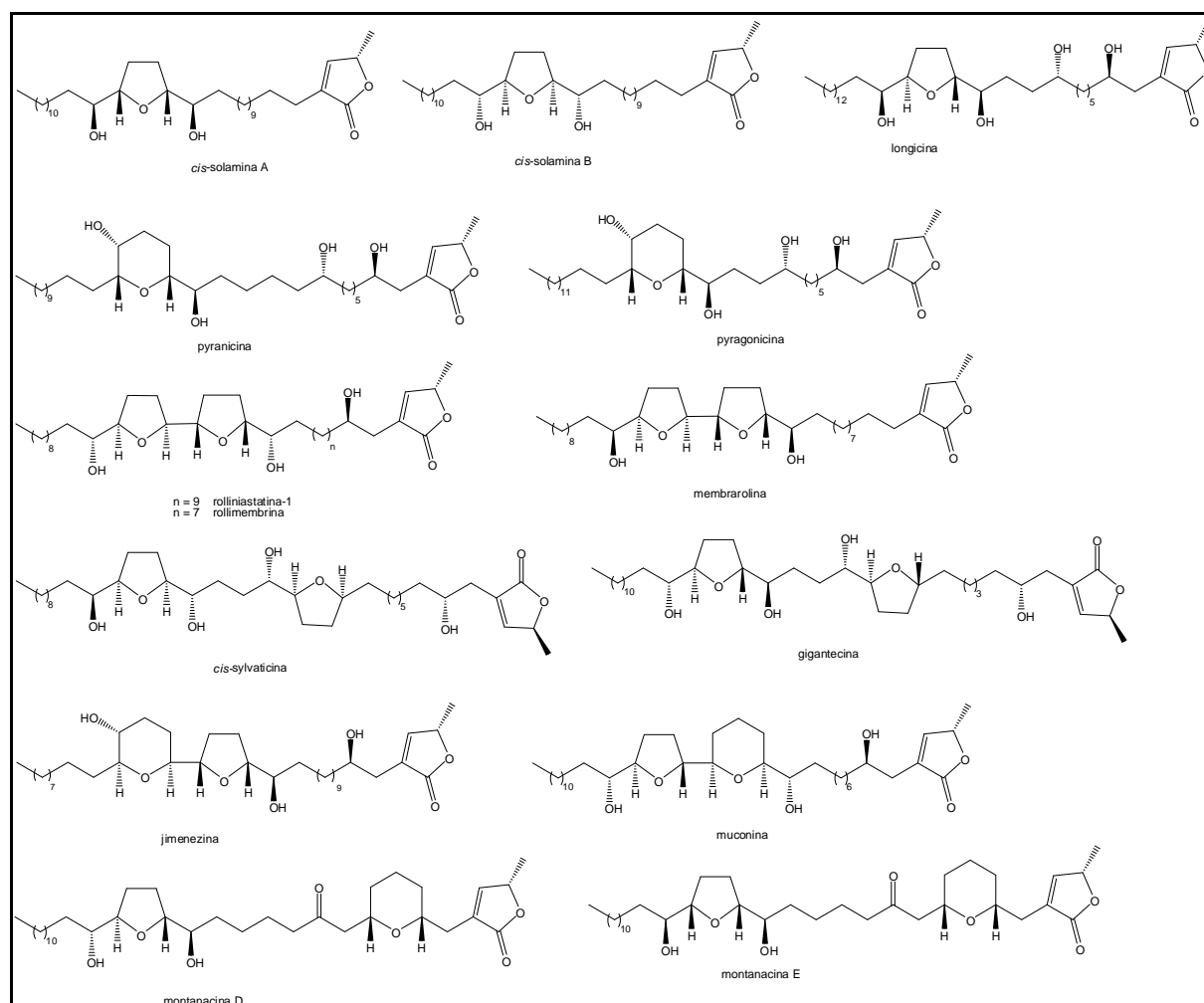
Dentre as muitas classes de produtos naturais alvo de estudos sintéticos, as acetogeninas de anonáceas, conhecidas por seu potencial antitumoral e inseticida, representam um grande desafio devido à sua complexidade estrutural uma vez que possuem muitos estereocentros (LI *et al.*, 2008; LIAW *et al.*, 2010). O grande potencial antitumoral e inseticida das acetogeninas estão intimamente relacionados com seu efeito inibitório da enzima NADH-ubiquinona oxidoreductase do complexo I do sistema mitocondrial (KOJIMA *et al.*, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2012).

A maioria das acetogeninas são caracterizadas pela presença de duas unidades funcionais, o anel diol-tetrahidrofurânico (THF) e a unidade  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, separados por uma cadeia alquílica longa, e cada uma dessas unidades pode desempenhar um papel importante nas interações das acetogeninas com a enzima tornando-as potente inibidores do complexo I do sistema mitocondrial (KUWABARA *et al.*, 2000). Nessa perspectiva, diversos grupos de pesquisa vêm desenvolvendo trabalhos de síntese total e/ou de mímicos de ACGs na busca por novas moléculas bioativas.

Desde 1996, mais de 100 sínteses totais de acetogeninas foram publicadas na literatura, onde sínteses convergentes e/ou lineares foram desenvolvidas a partir de materiais quirais de baixo custo ou reações assimétricas, além de semi-sínteses de ACGs naturais, derivatização e preparo de análogos (LI *et al.*, 2008).

Há relatos de sínteses totais de ACGs das mais variadas estruturas: mono-THF como as *cis*-solaminas A e B e a longicina (CECIL e BROWN, 2002; HANESSIAN *et al.*, 2005; KONNO *et al.*, 2010); mono-THP como a piranicina e a piragonicina (STRAND e REIN, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2006); *bis*-THF adjacentes como rolliniastatina-1, rollimembrina e membrarollina (HEAD *et al.*, 2004; KEUM *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 2009); *bis*-THF não adjacente como *cis*-silvaticina e a gigantecina (BHUNNOO *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 2008; CRIMMINS e SHE, 2004); THF-THP

adjacente como a jimenezina e a muconina (BANDUR *et al.*, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2002) e ainda THF-THP não adjacente como as montanacinas D e E (TAKAHASHI *et al.*, 2008 e 2009) dentre outras (Figura 1.1).



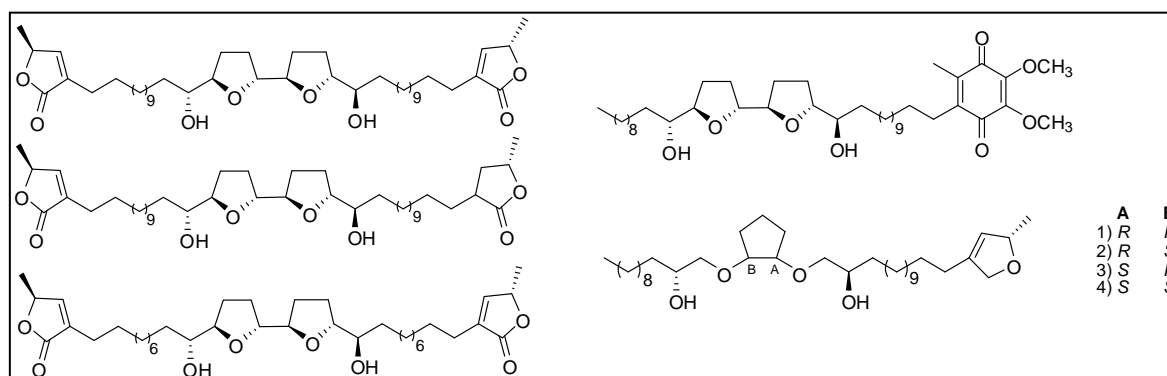
**Figura 1.1** – Estruturas de algumas acetogeninas de anonáceas alvos de estudos de síntese total.

### 1.3 – Síntese de mímicos de acetogeninas

A maioria das metodologias de síntese total de ACGs reportadas na literatura requerem 20 ou mais etapas reacionais envolvendo em sua maioria, etapas estereoseletivas de baixo rendimento. Por outro lado, simplificações estruturais das ACGs mas mantendo as funcionalidades essenciais para a atividade biológica pode resultar em compostos com potencial biológico similar às ACGs naturais mas com rota sintética mais simples e de fácil conclusão (FUJITA *et al.*, 2005; ICHIMARU *et al.*, 2007).



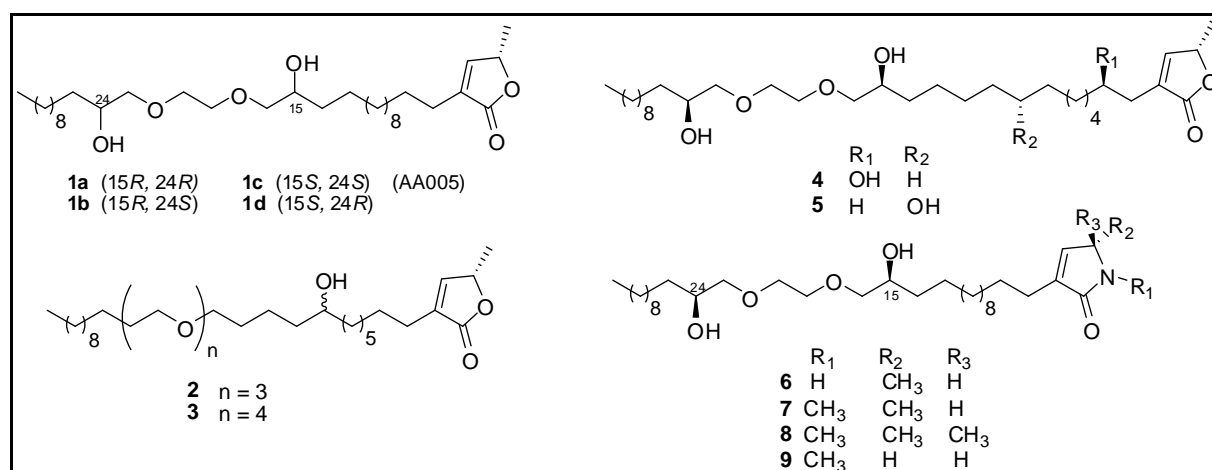
O grupo de pesquisa de Hideto Miyoshi (Universidade de Kyoto, Japão) publicou diversos trabalhos envolvendo a síntese de mímicos de acetogeninas. Em 2000, foi sintetizada uma série de compostos com dois anéis lactônicos conectados ao núcleo bis-THF por cadeias alquílicas flexíveis e foi avaliado o efeito inibitório desses mímicos no complexo mitocondrial I. Os resultados sugeriram que as unidades  $\gamma$ -lactônicas e *bis*-THF contribuem cooperativamente para a interação das moléculas com as enzimas do complexo I (KUWABARA *et al.*, 2000). Mostraram também que o anel lactônico poderia ser substituído por um anel ubiquinona, substância chamada de Q-acetogenina e que o núcleo *bis*-THF poderia ser substituído por um esqueleto *bis*-eter 1,2-ciclopentanodiol mantendo a forte atividade inibitória das moléculas (FUJITA *et al.*, 2005; ICHIMARU *et al.*, 2004; YABUNAKA *et al.*, 2003) (Figura 1.2).



**Figura 1.2** – Exemplos dos mímicos sintetizados pelo grupo de Hideto Miyoshi (Universidade de Kyoto).

Esse mesmo grupo sintetizou ainda uma série de mímicos a partir da bullatacina que foram chamados de  $\Delta$ lac-acetogeninas, que são compostos com duas cadeias alquílicas ligadas ao núcleo *bis*-THF sem presença de anel lactônico. A  $\Delta$ lac-acetogenina contendo duas cadeias laterais alquílicas de 10 carbonos apresentou efeito inibitório comparável à bullatacina natural, e verificou-se também que a diminuição no tamanho desta cadeia assim como acetilações e remoção de um ou dos dois grupos hidroxila adjacentes ao núcleo *bis*-THF diminuem o potencial inibitório desses compostos (HAMADA *et al.*, 2004). Derivados dessas  $\Delta$ lac-acetogeninas comprovaram que a presença e estereoquímica do núcleo *bis*-THF e das hidroxilas adjacentes são importantes fatores estruturais para a atividade desses compostos, e em alguns casos, a presença de alquil-fenil éteres na terminação da cadeia alquílica também contribuiu para o aumento do efeito inibitório (ICHIMARU *et al.*, 2004 e 2007).

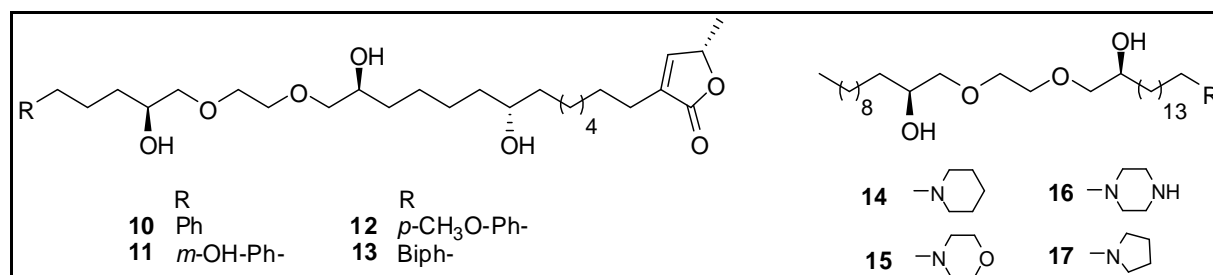
Outro grupo de pesquisa que contribuiu amplamente para o estudo da atividade biológica de mímicos de acetogeninas foi o grupo do Professor Yu-Lin Wu do Instituto de Química Orgânica de Shanghai. Foi sintetizada uma série de mímicos poliéter lineares, compostos estruturalmente simplificados em relação aos modelos de ACGs naturais e de rota sintética curta e de fácil obtenção (Figura 1.3). Os primeiros compostos sintetizados foram mímicos da isodesacetilivaricina (**1a-1d**) que mostraram significativa atividade contra células tumorais humanas sendo o composto **1c** (chamado de AA005) o mais potente (ZENG *et al.*, 2000). Posteriormente, foram sintetizados mímicos poliéteres de corossolina e bullatina (**2** e **3**) com atividade antitumoral compatível com os compostos naturais modelos (YAO *et al.*, 2000). Buscando avaliar o efeito de grupos hidroxila ao longo da cadeia alquílica, característica que é comumente observada em muitas ACGs naturais, novos mímicos foram sintetizados a partir do composto AA005, compostos **4** e **5**. Os resultados mostraram que a introdução do grupo (4*R*)-hidroxila aumenta em 15 vezes a atividade antitumoral de AA005, enquanto que a introdução do grupo (10*R*)- ou (10*S*)-hidroxila tem pouco efeito na atividade. Estruturalmente, é importante destacar que o composto **4** é mímico poliéter da bullatacina, uma das ACGs naturais mais potentes (JIANG *et al.*, 2002 e 2004). Ainda partindo do potencial de AA005, derivados contendo uma unidade lactama em substituição à lactona terminal foram sintetizados e apresentaram atividade comparável ao composto modelo (LIU *et al.*, 2007).



**Figura 1.3** – Série de mímicos poliéter lineares sintetizados pelo grupo do Prof. Yu-Lin Wu (Instituto de Química Orgânica de Shanghai).

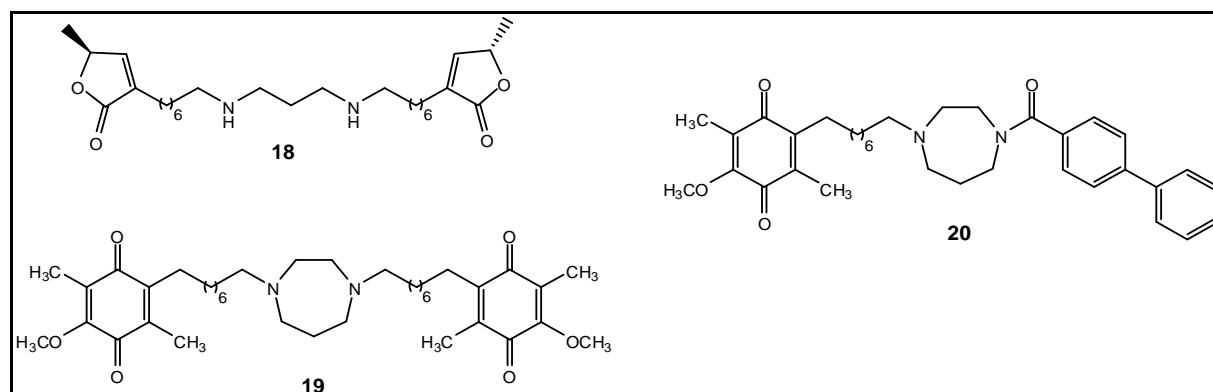
Recentemente, Yao e colaboradores sintetizaram uma segunda geração de mímicos de acetogeninas partindo de AA005. Derivados em que parte da cadeia

alquílica hidrofóbica foi substituída por grupos fenila e bifenilas foram obtidos onde verificou-se que o derivado contendo um grupo bifenila foi mais potente e seletivo em relação à células cancerígenas e normais (XIAO *et al.*, 2011a). Recentemente, derivados em que uma variedade de N-heterociclos alifáticos substitui a  $\gamma$ -lactona terminal foram obtidos e o composto **14** contendo um grupo piperazina foi o mais potente contra 3 linhagens de células cancerígenas (CHEN *et al.*, 2014).



**Figura 1.4** – Segunda geração de mímicos de acetogeninas partindo de AA005.

Uma nova série de 18 mímicos bivalentes de AA005 foi obtida em que, de forma geral, os compostos sintetizados possuem análogos de ubiquinona ou  $\gamma$ -lactona nas terminações das cadeias alquílicas e o núcleo poliéter substituído por diferentes fragmentos diamina (como exemplo, os compostos **18** e **19**). Além disso, 6 mímicos monovalentes foram também obtidos em que a terminação de um lado da cadeia alquílica é substituída por grupo fenila (como exemplo, o composto **20**) (LIU *et al.*, 2014, XIAO *et al.*, 2011b).

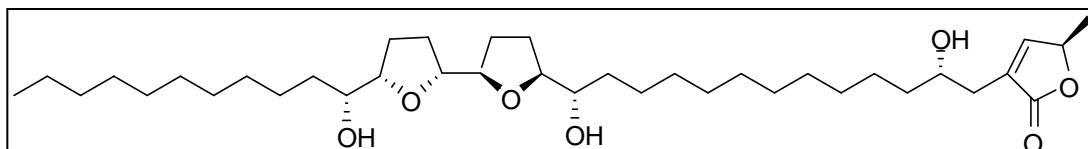


**Figura 1.5** – Série de mímicos bivalentes e monovalentes contendo fragmentos diaminas.

Modificações estruturais no núcleo  $\gamma$ -lactona são também reportados em literatura, onde este núcleo foi substituído por um N-heterociclo (KOJIMA *et al.*, 2008 e 2013) ou contendo um núcleo furo-furânico (POPSAVIN *et al.*, 2008; SRECO *et al.*,

2011). Em todos esses casos os mímicos apresentaram atividade biológica comparável ou até maior que as acetogeninas naturais utilizadas como modelo.

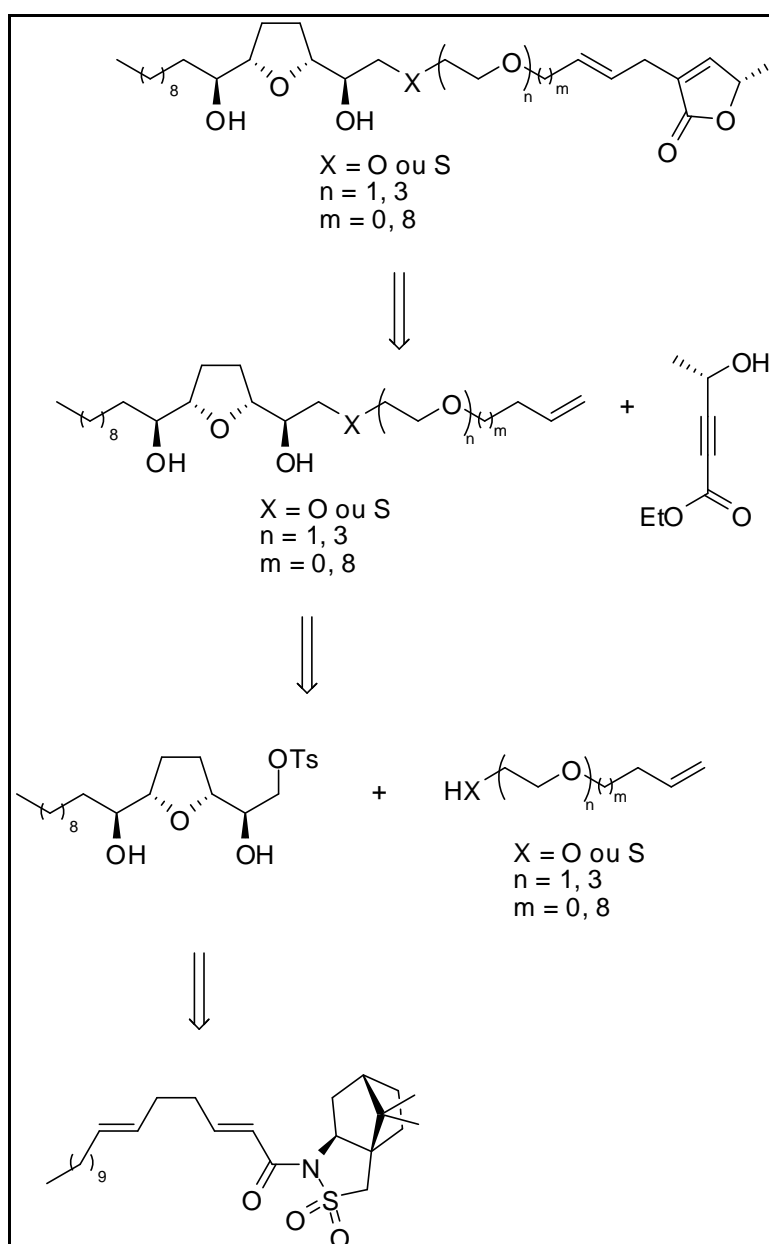
Esses resultados provaram que moléculas mais simples que mantenham as principais características das ACGs naturais mantêm o potencial biológico e são, em muitos dos casos, mais fáceis de serem sintetizadas. Nessa perspectiva, o presente trabalho desenvolveu uma rota sintética para mímicos de *bis*-THF acetogeninas naturais como a rolliniastatina-1 (Figura 1.6) isolada de *Annona mucosa*.



**Figura 1.6** – Estrutura da Rolliniastatina-1.

## 2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de uma rota sintética e obtenção de mímicos da acetogenina natural rolliniastatina-1. Sendo a rolliniastatina-1 uma *bis*-THF acetogenina, a proposta se baseou em sintetizar mímicos contendo o primeiro anel *cis*-THF com variadas cadeias poliéter adjacentes mimetizando o segundo anel THF. A estereoquímica *cis* pôde ser obtida empregando-se a ciclização oxidativa mediada por permanganato (Esquema 2.1)



Esquema 2.1 – Análise retrossintética para os mímicos propostos.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

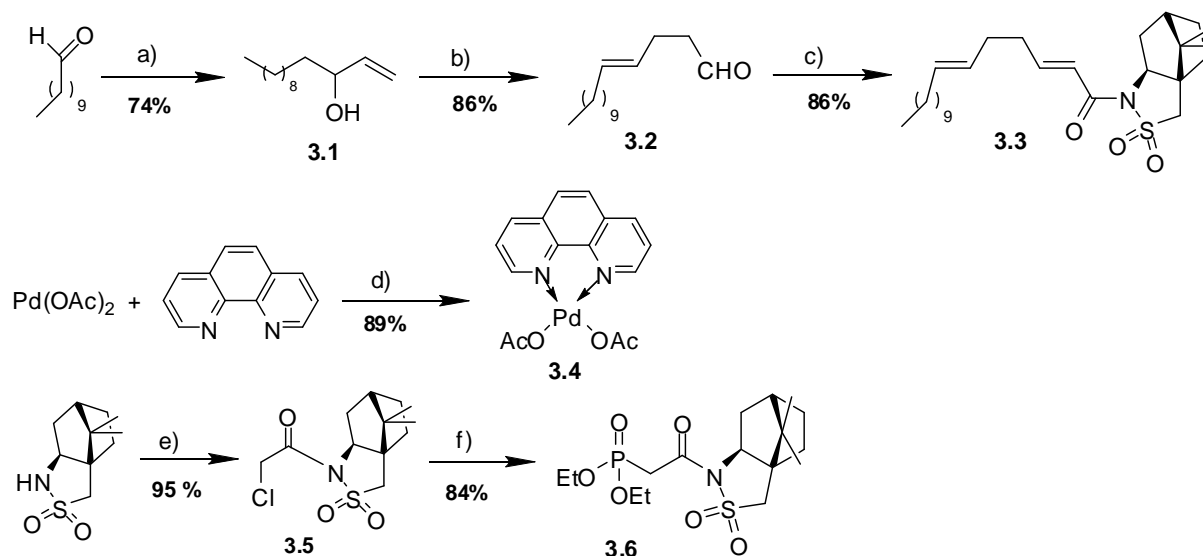
Este trabalho foi desenvolvido na Universidade de Southampton – Inglaterra, sob orientação do Prof. Dr. Richard Brown, durante realização de estágio de doutorado sanduíche, financiado por bolsa BEPE – Fapesp, no período compreendido entre Novembro/2013 a Setembro/2014.

#### 3.1 – Síntese do fragmento contendo o anel THF com estereoquímica *treo-cis-treo*

Baseando na estrutura da acetogenina natural rolliniastatina-1, substância com anel *bis*-THF e estereoquímica *treo-cis-treo*, a primeira parte do trabalho envolveu a síntese de um fragmento contendo a cadeia alquílica de 9 grupos metilênicos adjacente à um anel THF-diol (THF- $\alpha,\alpha'$ -diol) com a estereoquímica proposta.

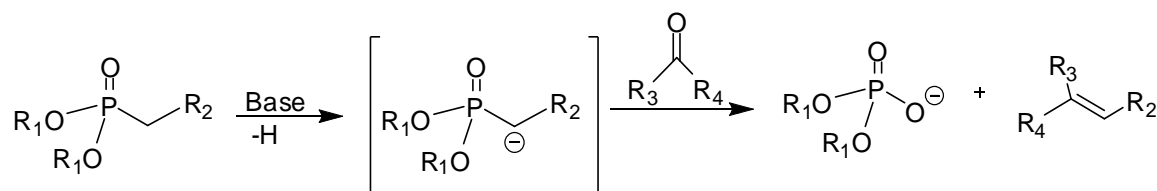
A reação chave dessa parte do trabalho foi a ciclização oxidativa, em que, para se controlar a estereoquímica do produto obtido foi necessário o emprego de um auxiliar quiral. Trabalhos anteriores, publicados pelo grupo do Prof. Brown, mostraram que o emprego do auxiliar quiral camforsultam, resultou na diastereoseletividade desejada na ciclização oxidativa de *trans*-dienos.

Para a obtenção do *trans*-dieno, o material de partida foi o undecanal, que foi submetido à reação de Grignard com cloreto de vinilmagnésio resultando no álcool alílico **3.1**. Em seguida, este álcool foi submetido à um processo sequencial de troca vinil etílica – Rearranjo de Claisen. Para esta reação empregou-se o complexo de paládio(II)-fenantrolina (**3.4**) como catalisador e a reação resultou na formação do aldeído  $\gamma,\delta$ -insaturado **3.2** sob condições reacionais amenas (WEI *et al.*, 2006) com excelentes rendimentos, de 86% para a reação de formação do aldeído e de 89% para a síntese do catalisador de paládio. Na etapa seguinte, obtenção do *trans*-dieno contendo o auxiliar quiral (**3.3**), foi empregada a metodologia de Horner-Wadsworth-Emmons, reação entre o fosfonato **3.6** e o aldeído  $\gamma,\delta$ -insaturado **3.2** (Esquema 3.1). Para a síntese do fosfonato **3.6** contendo o auxiliar quiral partiu-se do S-camforsultam que foi submetido à uma reação de substituição nucleofílica à carbonila com cloreto de cloroacetila resultando no haleto de alquila intermediário **3.5** com 95% de rendimento. Este por sua vez, foi convertido no intermediário fosfonado **3.6** através de reação entre o trialquilfosfito e o haleto de alquila **3.5**, com 84% de rendimento.



**Esquema 3.1** – Síntese do *trans*-dieno **3.3**. *Reagentes e condições*: a)  $\text{CH}_2=\text{CHMgCl}$ , THF, 0 °C; b) éter butil vinílico, **3.4**, refluxo à 110 °C, 48 h; c) **3.6**, DIPEA, LiCl, ACN, 0 °C; d) DME, t.a.; e) NaH, cloreto de cloroacetila,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , -60 °C; f)  $\text{P}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$ , vial selado, 160 °C.

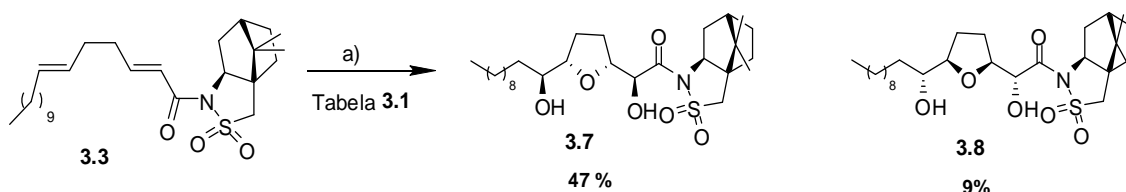
A reação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) é uma das metodologias sintéticas mais empregadas para introdução de ligações duplas C=C de forma seletiva e com estereoquímica controlada (Esquema 3.2). Se trata de uma reação baseada no emprego de derivados fosfonados, o que permite a formação *in situ* de carbânions fosfonados de forte natureza nucleofílica. Conseqüentemente, esta forte natureza nucleofílica deste carbânion formado, permite que a reação ocorra em condições amenas e assim, com uma grande variedade de grupos funcionais sendo tolerantes ao meio reacional e o emprego de aldeídos e cetonas menos eletrofílicos. Entre as diversas vantagens da reação HWE, a reação é quimiosseletiva, permite diferenciação entre aldeídos e cetonas, permite completa seletividade da estereoquímica da nova ligação dupla formada, aceita uma grande variedade de diferentes grupos retiradores de elétrons adjacentes ao grupo fosfonado, que podem posteriormente ser submetidos a diversas reações como hidrólise, reações de óxido-redução ou adição de organometálicos, além das diversas reações às quais o produto dieno-HWE pode ser submetido como, por exemplo, as ciclizações oxidativas, que é a próxima etapa da rota sintética do presente trabalho (BISCEGLIA e ORELLI, 2015; STEINBACH *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015).



R<sub>1</sub>/R<sub>3</sub> = Grupos alquila ou fenila  
 R<sub>2</sub> = Grupos retiradores de elétrons  
 R<sub>4</sub> = H ou grupos alquila

**Esquema 3.2** – Esquema geral de uma reação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) (STEINBACH *et al.*, 2015).

A próxima etapa reacional, a ciclização oxidativa mediada por permanganato, é a etapa chave da rota sintética (Esquema 3.3). Na busca pelas melhores condições reacionais com maior rendimento do diastereoisômero majoritário **3.7**, diferentes condições foram testadas (Tabela 3.1).



**Esquema 3.3** – Ciclização oxidativa assimétrica mediada por permanganato. *Reagentes e condições:* a) Ver Tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Diferentes condições reacionais testadas para a ciclização oxidativa assimétrica mediada por permanganato.

Reação	Condições	Elaboração da reação	Rendimento de 3.7
1	NaMnO <sub>4</sub> 0,4M, sol. tampão pH 6,5, AcOH:Acetona 2:3	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	24%
2	NaMnO <sub>4</sub> 0,4M, AcOH:Acetona 2:3	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	46%
3	KMnO <sub>4</sub> em pó, AcOH:Acetona 2:3	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	18%
4	KMnO <sub>4</sub> em pó, Adogen 464, AcOH:Acetona 2:3	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	47%
5	KMnO <sub>4</sub> em pó, Adogen 464, AcOH:Acetona 2:3	i) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ii) NaHCO <sub>3</sub> sol. sat.	42%

As condições reacionais testadas mostraram que é necessário aumentar a disponibilidade de permanganato no meio reacional para se obter melhores rendimentos. Ao comparar as reações 2 e 3 verifica-se maior rendimento do diastereoisômero **3.7** na reação 2 onde se emprega solução aquosa de NaMnO<sub>4</sub> como fonte de íons permanganato enquanto que, na reação 3, KMnO<sub>4</sub> em pó é a fonte



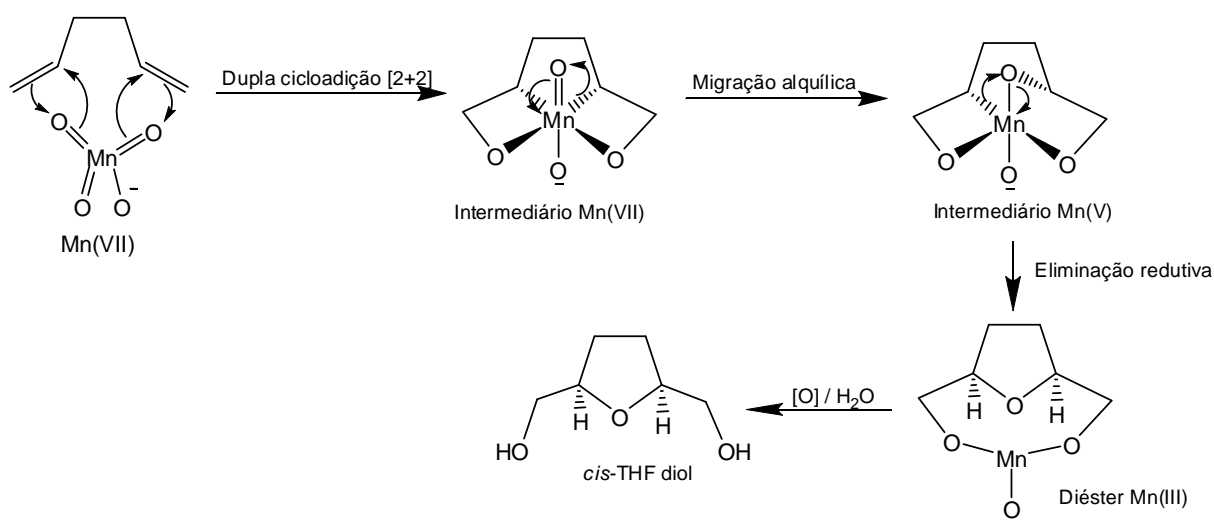
desses íons. Por outro lado, quando mantém-se a mesma fonte de íons permanganato, como sendo  $\text{KMnO}_4$  em pó, observa-se que o uso de catalisador de transferência de fase, adogen 464, aumenta de 18% (reação 3) para mais de 40% (reações 4 e 5) o rendimento da reação. Isso ocorre por que, a reação acontece no meio aquoso, e o emprego do catalisador de transferência de fase tem a função de favorecer a transferência dos íons permanganato do sólido para o meio reacional. É importante observar que mesmo empregando o catalisador de transferência de fase o rendimento da reação é ainda baixo, em torno de 45%.

Outro ponto analisado foi o procedimento de elaboração da reação. Observou-se que durante o processo de purificação dos produtos por cromatografia em coluna de sílica gel, o auxiliar quiral *S*-camforsultam livre foi obtido. Isso significa que, a clivagem deste grupo estava ocorrendo durante a etapa de purificação, o que contribuiu ainda mais para o baixo rendimento observado. Acreditou-se que este fato era consequência do ácido acético remanescente no material bruto que era adicionado à coluna cromatográfica e por este motivo, uma reação teste em que, na etapa de elaboração da reação, o material bruto foi lavado com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , para neutralização do ácido acético, foi realizada. No entanto, novas dificuldades foram encontradas e o que se verificou foi que o rendimento reacional não aumentou devido ao uso de solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  na etapa de elaboração. Uma possível explicação para esta observação é que, sendo os diastereoisômeros **3.7** e **3.8** solúveis em água, estes eram perdidos devido ao excesso de fase aquosa agora empregado na lavagem com  $\text{NaHCO}_3$ . Dessa maneira, não há melhora de rendimento quando comparadas as reações 4 e 5.

Ciclizações oxidativas de 1,5-dienos é uma metodologia poderosa e econômica para se construir anéis THF-diol em apenas uma etapa, em que se forma 4 novas ligações C-O e ao mesmo tempo, 4 novos centros quirais (SHEIKH, 2014). Entre as várias metodologias de ciclização estabelecidas na literatura para a síntese de anéis THF, aquelas em que a reação é promovida por um metal oxidante são as mais atrativas. Dentre estas metodologias destacam-se as ciclizações oxidativas mediadas por íons permanganato, tetróxido de ósmio e tetróxido de rutênio (PICCIALLI, 2007).

As ciclizações catalisadas por íons permanganato remontam aos anos 20 pela tentativa de oxidação do acetato de geranila com permanganato. No entanto, apenas em 1964, foi que os pesquisadores KLEIN e ROJAHN elucidaram que na reação em questão, o acetato de geranila sofre uma ciclização sendo convertido em um *cis*-THF-

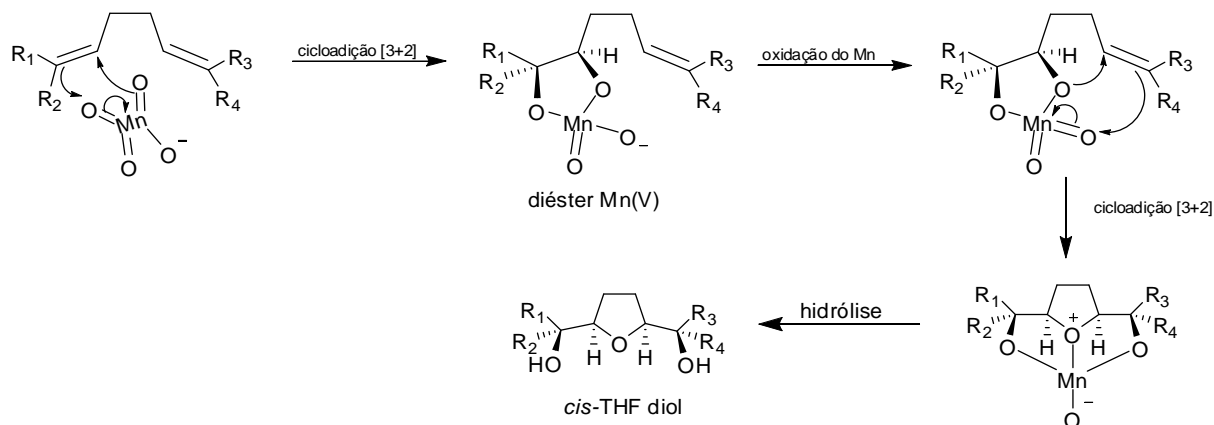
diol (SHEIKH, 2014). Este resultado levou à duas propostas mecanísticas concomitantes pelos pesquisadores WALBA e BALDWIN. O mecanismo proposto por WALBA *et al.*, 1979, baseia-se em cicloadições [2+2] do tipo Sharpless. Após o ataque inicial do Mn(VII) ao dieno e formação de um complexo- $\pi$ , um intermediário octaédrico contendo Mn(VII) seria produzido via duas cicloadições [2+2]. Migração alquílica do Mn(VII) para um dos átomos de oxigênio forneceria o intermediário Mn(V), que sofre então eliminação redutiva liberando o diéster Mn(III), seguido de oxidação e hidrólise gerando o *cis*-THF-diol (Esquema 3.4).



**Esquema 3.4** – Proposta mecanística de WALBA *et al.* baseada em cicloadições [2+2].

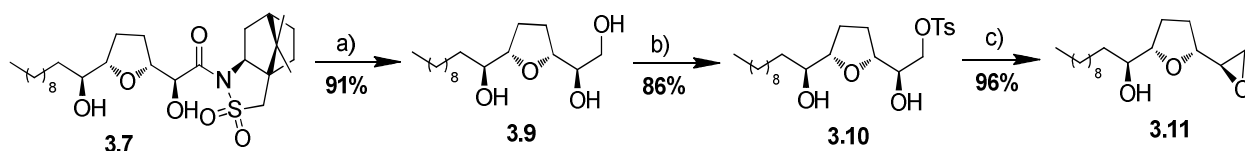
O mecanismo proposto por BALDWIN *et al.*, 1979, baseia-se na formação do diéster Mn(V) via cicloadição [3+2] à uma das duplas ligações, seguido de oxidação do Mn(V) à Mn(VI) e nova cicloadição intramolecular à dupla remanescente gerando um diéster Mn(IV) que então sofre hidrólise liberando o *cis*-THF-diol (Esquema 3.5).

Cálculos DFT, investigações cinéticas e espectroscópicas suportam o mecanismo de ciclização oxidativa via cicloadição [3+2] concertadas. No entanto, não há na literatura evidências que suportem o restante do mecanismo e este permanece ainda não completamente esclarecido (HOUK e STRASSNER, 1999; STRASSNER e BUSOLD, 2001).



**Esquema 3.5** – Proposta mecanística de BALDWIN *et al.*, baseada em cicloadições [3+2].

Após separação dos diastereoisômeros, as etapas seguintes foram realizadas com o isômero majoritário **3.7**. Inicialmente, foi feita a clivagem do auxiliar quiral por redução com NaBH<sub>4</sub> para obter o triol **3.9** que foi subsequentemente convertido no monotosilato **3.10** através de uma metodologia de tosilção específica de hidroxilas primárias com 86% de rendimento. Este monotosilato, por sua vez, foi tratado com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> resultando no epóxido **3.11** com 96% de rendimento via ataque nucleofílico intramolecular do íon alcóxido, gerado *in situ*, e liberação do grupo tosilato (Esquema 3.6).

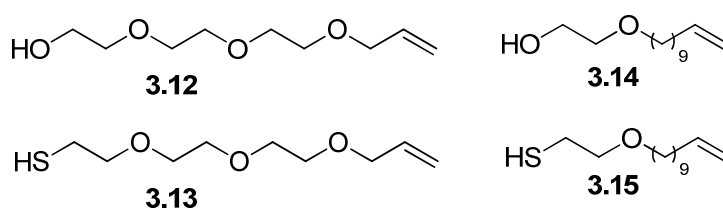


**Esquema 3.6** – Síntese do epóxido **3.11**. *Reagentes e condições*: a) NaBH<sub>4</sub>, THF:H<sub>2</sub>O 1:0.001; b) i) Bu<sub>2</sub>SnO, benzeno anidro, refluxo, ii) TsCl, TBAB, t.a.; c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, t.a.

### 3.2 – Síntese dos fragmentos contendo a cadeia poliéter

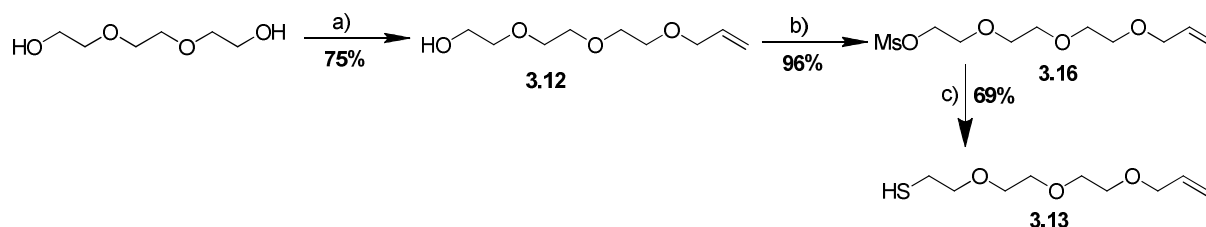
Para a síntese da segunda parte do mímico foi sugerido uma série de fragmentos com diferentes cadeias poliéter e tamanho de cadeia alquílica, o que permitiria a avaliação da influência dessas duas características na atividade biológica dos compostos. Para a construção dos mímicos finais, era necessário, na estrutura

dos fragmentos, uma função orgânica capaz de atuar como nucleófilo, para o acoplamento com o primeiro fragmento contendo o anel THF, e ainda uma dupla ligação terminal para a reação alder-ene de construção do anel butenolídeo, comum às acetogeninas naturais. As estruturas então propostas estão representadas na Figura 3.1



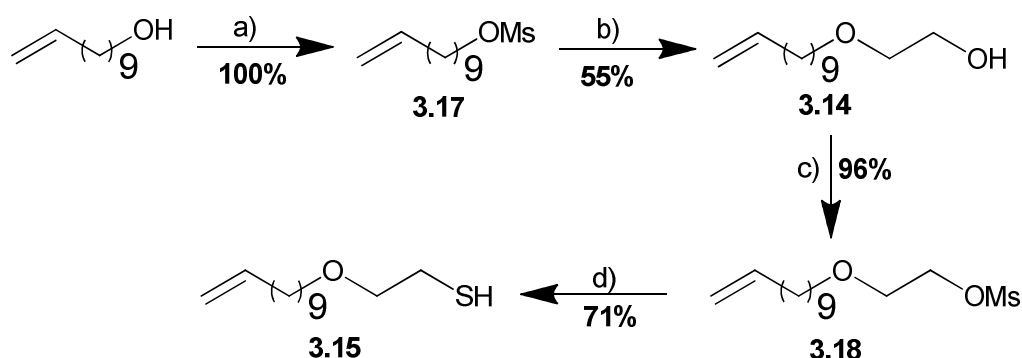
**Figura 3.1** – Fragmentos inicialmente propostos para a segunda parte dos mímicos.

O álcool **3.12** foi diretamente obtido a partir de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular entre o trietilenoglicol e iodeto de alila com 75% de rendimento empregando-se *tert*-butóxido de potássio como base para desprotonação do etilenoglicol na proporção molar de 1:0,5 garantindo assim a desprotonação de apenas uma das hidroxilas (DOYLE & HU, 2000). Para a síntese do tiol **3.13**, inicialmente fez-se necessário converter a hidroxila terminal de **3.12** em um bom grupo abandonador e este álcool foi então convertido no seu derivado mesilato (**3.16**) por reação com cloreto de mesila e DIPEA como base com 96% de rendimento. Dessa forma, o tiol **3.13** foi obtido por adição de ureia ao mesilato via reação de substituição nucleofílica com o mesilato e posterior hidrólise do grupo tioureia à grupo tiol com hidróxido de sódio. Esta metodologia é conhecida como Método do Sal Isotiourônio e o produto tiol foi obtido com 69% de rendimento (Esquema 3.7) (DANIEL *et al.*, 2011).



**Esquema 3.7** – Síntese dos fragmentos **3.12** e **3.13**. *Reagentes e condições:* a) Iodeto de alila, *t*-BuOK, THF, t.a., 24 h; b) MsCl, DIPEA, 0 °C; c) Tioureia, NaOH, EtOH, refluxo.

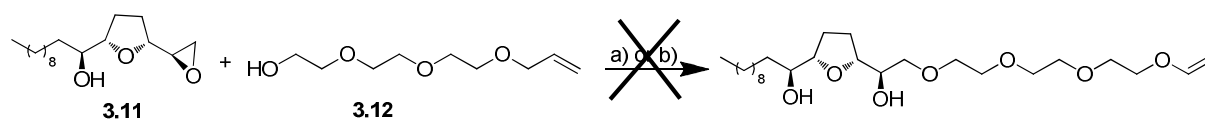
Rota sintética similar foi empregada para a síntese dos fragmentos **3.14** e **3.15**. Inicialmente, o 10-undecen-1-ol foi convertido no seu derivado mesilato **3.17** com 100% de rendimento, e este por sua vez foi submetido à uma substituição nucleofílica com etileno glicol empregando-se hidreto de sódio como base, e o fragmento **3.14** foi obtido com 55% de rendimento. Conversão deste fragmento em mesilato seguido da aplicação do Método do Sal Isotiourônio, o fragmento tiol **3.15** foi obtido com 71% de rendimento (Esquema 3.8).



**Esquema 3.8** – Síntese dos fragmentos **3.14** e **3.15**. *Reagentes e condições:* a) MsCl, DIPEA, 0 °C; b) etileno glicol, NaH, DMF, 0 °C; c) MsCl, Et<sub>3</sub>N, DCM, 0 °C; d) tiourea, NaOH, EtOH, refluxo.

### 3.3 – Síntese final dos mímicos

Para as etapas finais dos mímicos, o primeiro desafio era a reação de acoplamento entre o epóxido **3.11** com os fragmentos contendo as cadeias poliéter. A reação mais comum para epóxidos é a reação de abertura de anel com reações do tipo S<sub>N</sub>2, em que o carbono do epóxido atua como um centro eletrofílico. Uma vez que nucleófilos reativos são usualmente ânions, as condições reacionais são essencialmente básicas. Nessa perspectiva, as primeiras tentativas foram feitas empregando-se NaH (Esquema 3.9) (HIOKI *et al.*, 2004).



**Esquema 3.9** – Tentativas falhas da reação de acoplamento. *Reagentes e condições:* a) NaH, BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O, THF, 0 °C; b) NaH, DMPU, THF, - 78 °C.

Essas reações falharam devido ao forte comportamento básico do nucleófilo alcóxido gerado *in situ* e a presença da hidroxila livre no epóxido **3.11**. Neste caso, o alcóxido desprotona essa hidroxila e reações paralelas ocorrem. A alternativa encontrada para superar este problema foi proteger o grupo hidroxila antes da reação de acoplamento. Várias tentativas de proteção da hidroxila foram feitas na molécula contendo o epóxido **3.11** ou no intermediário anterior, o tosilato **3.10** (Tabela 3.2).

**Tabela 3.2** – Tentativas de proteção da hidroxila livre em **3.11** e **3.10**.

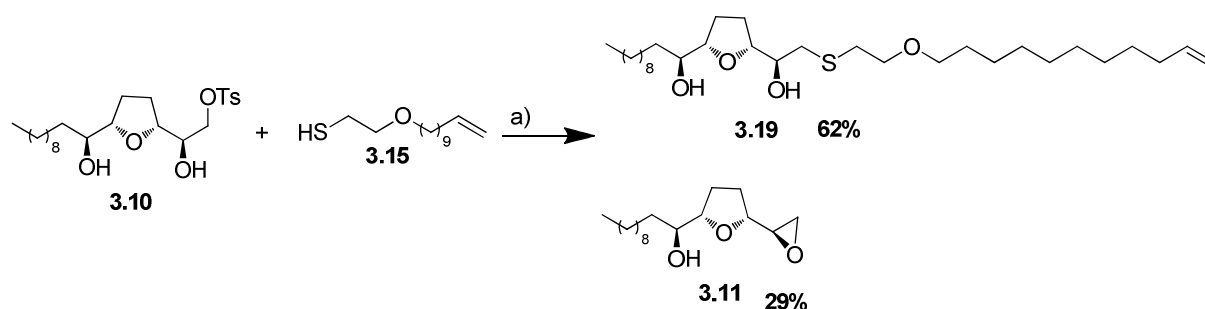
Reaç.	Material de partida	Condições reacionais	Eq. molar	Proc. de elaboração	Rendimento (Produto protegido)
1	Epóxido	TBDMSOTf, 2,6-lutidina, DCM, 0 °C	1:2:2	H <sub>2</sub> O	-----
2	Epóxido	TBDMSOCl, imidazol, DCM, 0 °C	1:2:5	H <sub>2</sub> O	-----
3	THF-tosilato	TMSCl, imidazol, DCM, -5 °C	1:5:6	NH <sub>4</sub> Cl	MP
4	THF-tosilato	TMSCl, imidazol, DCM, -5 °C	1:10:12	H <sub>2</sub> O	MP
5	THF-tosilato	MOMCl, DIPEA, DCM, 0 °C	1:2.4:2.6	HCl, NaHCO <sub>3</sub>	MP + monoprottegido
6	THF-tosilato	MOMCl, DIPEA, DCM, 0 °C	1:5:6	NH <sub>4</sub> Cl	MP + monoprottegido
7	THF-tosilato	MOMCl, DIPEA, DCM, 0 °C	1:10:12	NH <sub>4</sub> Cl	95%

As primeiras tentativas das reações de proteção foram realizadas com o epóxido como material de partida usando o grupo *tert*-butildimetilsilil de derivados cloreto e triflato. Com o derivado triflato, TBDMSOTf, a reação foi rápida mas não gerou o produto desejado, por outro lado, a reação com o derivado cloreto, TDBMSOCl foi uma reação lenta e não se completou após 3 dias. Foi então que se optou pela proteção da hidroxila livre do intermediário THF-tosilato, e as tentativas foram realizadas empregando-se TMSCl e MOMCl como reagentes de proteção. As reações com TMSCl se completaram em apenas 1h, mas o grupo protetor foi clivado durante o procedimento de elaboração da reação e o material de partida foi recuperado em ambas as tentativas 3 e 4. Para as reações com MOMCl o produto obtido foi uma mistura do composto monoprottegido e material de partida nas duas primeiras tentativas, reações 5 e 6. Isso ocorreu, provavelmente, devido ao uso de um reagente antigo presente no laboratório. Na última tentativa, a proteção das duas

hidroxilas foi alcançada pelo uso de excesso de MOMCl, com 95% de rendimento em reação teste.

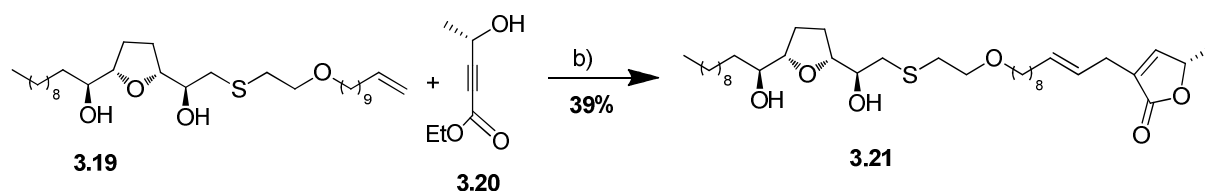
Infelizmente, não havia tempo suficiente para realizar a reação de proteção de quantidade suficiente de THF-tosilato para, na sequência, realizar a reação de acoplamento com os fragmentos contendo a cadeia poliéter. Paralelamente às tentativas de proteção das hidroxilas, reações de acoplamento entre o intermediário THF-tosilato **3.10** (sem proteção das hidroxilas) e o fragmento tiol **3.15** foram realizadas. Acreditou-se que esta reação poderia ocorrer com sucesso devido ao forte poder nucleofílico do ânion sulfeto gerado pela desprotonação do tiol quando comparado à sua basicidade e assim ser possível completar-se a síntese de pelo menos um mímico em tempo hábil.

Esta reação de acoplamento foi então obtida com 62% de rendimento empregando-se NaH como base em THF anidro. Como subproduto foi ainda obtido o epóxido **3.11** com 29% de rendimento, resultado de reação de substituição nucleofílica intramolecular (Esquema 3.10)



**Esquema 3.10** – Reação de acoplamento e obtenção da olefina **3.19**. *Reagentes e condições:* a) NaH, THF, 0 °C;

A última etapa da síntese dos mímicos consistia em uma reação alder-ene de adição entre a olefina **3.19** e o alcino **3.20**, catalisada por Ru, que resultou no mímico **3.21** com 39% de rendimento (Esquema 3.11).



**Esquema 3.11** – Síntese final do mímico de ACG **3.21**. *Reagentes e condições:* b) [CpRu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, DMF, t.a.

## **4 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

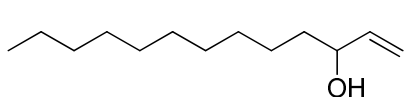
### **4.1 – Procedimentos Gerais**

Todas as reações em condições anidras foram realizadas sob atmosfera inerte utilizando-se vidraria seca por aquecimento com chama. Os solventes THF (sobre Na/benzofenona), DCM, MeOH e ACN (sobre CaH<sub>2</sub>) foram destilados para uso e demais reagente foram purificados empregando-se metodologias previamente estabelecidas. Cromatografia em camada delgada (CCDA) foi feita utilizando-se folhas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), análises das placas de CCDA foram feitas em luz UV (254 nm) e/ou reveladores como soluções de KMnO<sub>4</sub>, PMA (ácido fosfomolibdico) ou DNFH (2,4-dinitrofenilhidrazina). A purificação do material reacional foi feita por cromatografia em coluna empregando-se sílica gel SI 60 (40-63 micron, Aldrich). Análises no infravermelho são dados em comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>) e obtidos em instrumento Perkin-Elmer 1600 FT-IR. Análises de RMN <sup>1</sup>H NMR e RMN <sup>13</sup>C foram feitas em CDCl<sub>3</sub> como solvente em espectrômetro Bruker DPX400 (400 e 100 MHz respectivamente). Deslocamentos químicos são reportados em unidades  $\delta$  utilizando CHCl<sub>3</sub> como padrão interno ( $\delta_H$  7,27 ppm e  $\delta_C$  77,00 ppm). Constantes de acoplamento (*J*) são dadas em Hz. Os pontos de ebulição dos compostos sólidos foram medidos utilizando o aparelho Gallenkamp Electrothermal. Medidas de dispersão óptica rotatória foram feitas utilizando o polarímetro PolAr 2001 com fonte de luz de 589 nm. Espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas Fisons VG single quadrupolo com analisador plataforma Micromass e *eletrospray* (IES) como fonte de ionização.



## 4.2 – Procedimentos reacionais

### Tridec-1-en-3-ol (3.1)



C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O  
198,34 g/mol

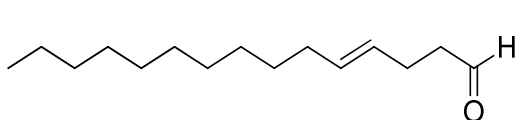
A uma solução de undecanal (10 g, 12,1 mL, 58,7 mmol) em THF anidro (60 mL), à 0 °C e sob atmosfera de N<sub>2</sub>, foi adicionado cloreto de vinil magnésio (1,6 M, 44 mL, 70,6 mmol). Após 30 min, foi adicionada solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl e a mistura reacional foi agitada por mais 10 min. As fases orgânica e aquosa foram separadas e a fase aquosa extraída com éter etílico (3 x 150 mL). As fases orgânicas foram combinadas e secas com MgSO<sub>4</sub>, filtradas e concentradas à vácuo gerando um óleo amarelo que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:Et<sub>2</sub>O 30%) resultando no álcool alílico (3.1) como um óleo incolor (8,61 g, 43,4 mmol, 74%).

**IV**  $\nu_{\max}$  (composto puro): 3349 (l), 2954 (F), 2853 (F), 1464 (m).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  5,88 (1H, *ddd*, *J* = 6,0 e 10,4, 17,2 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 5,22 (1H, *dt*, *J* = 1,6 e 17,2 Hz, CHH=CH), 5,10 (1H, *dt*, *J* = 1,6 e 10,4 Hz, CHH=CH), 4,10 (1H, *q*, *J* = 6,0 Hz, CH-OH), 1,55-1,49 (3H, *m*, CH<sub>2</sub>CHOH, OH), 1,41-1,22 (16H, *m*, CH<sub>2</sub>), 0,89 (3H, *t*, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  141,3 (CH), 114,5 (CH<sub>2</sub>), 73,3 (CH), 37,1 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,6-29,3 (5 CH<sub>2</sub>), 25,3 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

### (4E)-Pentadec-4-enal (3.2)



C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O  
224,38 g/mol

A reação foi realizada a partir de adaptação da metodologia descrita por WEI *et al.*, 2006. À uma solução do álcool alílico (3.1) (3 g, 15,1 mmol) em butil vinil éter (3 g, 15,1 mmol) foi adicionado o catalisador de paládio (3.4) (60 mg, 0,15 mmol). A mistura reacional foi gentilmente aquecida à 110 °C por 48 h, quando foi então resfriada à temperatura ambiente, filtrada em celite, lavada com Et<sub>2</sub>O, concentrada à vácuo rendendo um óleo amarelo. A purificação deste óleo por cromatografia em coluna de

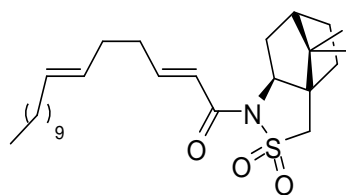
sílica gel (Hex:Et<sub>2</sub>O 20%) resultou no aldeído desejado (**3.2**) como um óleo incolor (2,93 g, 3,1 mmol, 86%).

**IV**  $\nu_{\max}$  (composto puro): 2954 (F), 2922 (F), 1728 (F), 1463 (f).

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9,77 (1H, *t*, *J* = 1,6 Hz, CHO), 5,47 (1H, *dt*, *J* = 6,4 e 15,2 Hz, CH=CH), 5,40 (1H, *dt*, *J* = 6,4 e 15,2 Hz, CH=CH), 2,49 (2H, *dt*, *J* = 1,6 e 7,2 Hz, CH<sub>2</sub>CHO), 2,33 (2H, *q*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,97 (2H, *q*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1,23-1,34 (16H, *m*, CH<sub>2</sub>), 0,89 (3H, *t*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>).

**RMN** <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  202,4 (CHO), 132,1 (CH), 127,6 (CH), 43,5 (CH<sub>2</sub>), 32,5 (CH<sub>2</sub>) 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (2CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>), 25,2 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

### (2S)-N-(2E,6E)-2,6-heptadecanoilcamfor-10,2-sultam (**3.3**)



C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>3</sub>S  
463,72 g/mol

À uma solução do aldeído (**3.2**) (2,5 g, 11,14 mmol) em ACN anidro (40 mL) foi adicionada uma solução do derivado fosfonado de camforsultam (**3.6**) (4,4 g, 11,14 mmol) em ACN anidra e então a mistura reacional foi resfriada à 0 °C, quando LiCl (708 mg, 16,7 mmol) e DIPEA (2,16 g, 2,9 mL, 16,7 mmol) foram adicionados. A mistura reacional foi agitada à 0 °C por 45 min, aquecida à temperatura ambiente e agitada por mais 4h, quando foi diluída com água e extraída com acetato de etila (3 x 40 mL). As fases orgânicas reunidas foram então lavadas com solução saturada de NaCl (60 mL), seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo gerando um óleo amarelo que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:Et<sub>2</sub>O 20%) resultando no dieno (**3.3**) como um óleo incolor (4,46 g, 9,62 mmol, 86%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ : +60,7 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1,01).

**IV**  $\nu_{\max}$  (composto puro): 2954 (F), 2922 (F), 1682 (F), 1639 (F), 1330 (F), 1215 (F), 1133 (F).

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7,09 (1H, *dt*, *J* = 7,2 e 15,2 Hz, CH=CHCON), 6,57 (1H, *dt*, *J* = 1,6 e 15,2 Hz, =CHCON), 5,45 (1H, *dt*, *J* = 6,4 e 15,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>), 5,38

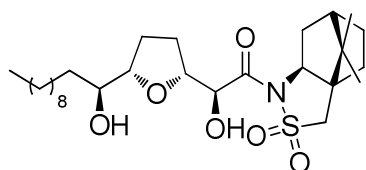
(1H, *dt*,  $J = 6,4$  e  $15,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$ ), 3,93 (1H, *dd*,  $J = 5,1$  e  $7,6$  Hz, CHN), 3,51 (1H, *d*,  $J = 13,6$  Hz,  $\text{CHHSO}_2$ ), 3,44 (1H, *d*,  $J = 13,6$  Hz,  $\text{CHHSO}_2$ ), 2,31 (2H, *q*,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCON}$ ), 2,19-2,06 (4H, *m*,  $2 \times \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ), 2,0-1,88 (5H, *m*), (18H, *m*), 1,18 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 0,98 (3H, *s*,  $\text{CH}_3\text{C}$ ), 0,89 (3H, *t*,  $J = 6,4$  Hz,  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  164,1 (C), 150,3 (CH), 131,9 (CH), 128,2 (CH), 121,0 (CH), 65,2 (CH), 53,2 ( $\text{CH}_2$ ), 48,4 (C), 47,8 (C), 44,7 (CH), 38,5 ( $\text{CH}_2$ ), 32,9 ( $\text{CH}_2$ ), 32,6 ( $\text{CH}_2$ ), 31,9 ( $\text{CH}_2$ ), 31,0 ( $\text{CH}_2$ ), 29,6-29,2 ( $6\text{CH}_2$ ), 26,5 ( $\text{CH}_2$ ), 22,7 ( $\text{CH}_2$ ), 20,9 ( $\text{CH}_3$ ), 19,9 ( $\text{CH}_3$ ), 14,1 ( $\text{CH}_3$ ).

**EMBR (IES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 486 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ), 464 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ).

**EMAR (IES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** valor calculado: 486,3012; valor encontrado: 486,3006 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

**(2S)-N-[(2S)-2-hidróxi-2-(2R,5S)-5-((1S)-1-hidróxiundecil)tetrahydro-2-furaniletanoil]-camfor-10,2-sultam (3.7)**



$\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{NO}_6\text{S}$   
513,72 g/mol

À solução do dieno (**3.3**) (2 g, 4,31 mmol) e Adogen 464 (176 mg, 0,043 mmol) em AcOH:Acetona 2:3 (100 mL) à  $-30$  °C, sob agitação vigorosa, foi adicionado  $\text{KMnO}_4$  e pó (954 mg, 6,0 mmol). Após 20 min, a reação foi interrompida pela adição de solução saturada de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  à  $0$  °C (100 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 100 mL), seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada à vácuo gerando um óleo amarelo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 20-50%) resultou no diastereoisômero majoritário (**3.7**) como um óleo viscoso (1,03 g, 2,01 mmol, 47%) e no diastereoisômero minoritário (**3.8**) em mistura com (2S)-10,2-camforsultam (207 mg, 0,4 mmol, 9%).

$[\alpha]^{24}_{\text{D}}$ : +33,0 ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c$  0,58).

**IV  $v_{\text{max}}$  (composto puro):** 3484 (m), 2922 (F), 2853 (F), 1686 (F), 1330 (F), 1218 (F), 1134 (F).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  4,60-4,55 (2H, *m*,  $\text{CHOHCON}$ , CHO), 3,96 (1H, *dd*,  $J = 5,2$  e  $8,0$  Hz, CHN), 3,87 (1H, *dt*,  $J = 4,4$  e  $7,2$  Hz, CHO), 3,52 (1H, *d*,  $J = 14,0$  Hz,  $\text{CHHSO}_2$ ), 3,48-3,44 (1H, *m*, CHO), 3,45 (1H, *d*,  $J = 14,0$  Hz,  $\text{CHHSO}_2$ ), 2,26-2,21

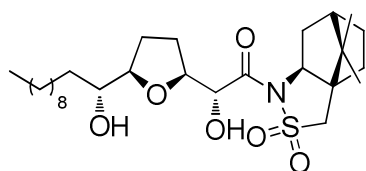
(1H, *m*, CHHCHN), 2,13-2,03 (3H, *m*, CH<sub>2</sub> THF, CHHCHN), 1,97-1,85 (5H, *m*, CH<sub>2</sub> THF, sult), 1,51-1,26 (20H, *m*), 1,16 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>C), 0,97 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>C), 0,88 (3H, *t*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 171,7 (C), 83,1 (CH), 78,6 (CH), 74,0 (CH), 73,6 (CH), 65,8 (CH), 53,0 (CH<sub>2</sub>), 49,0 (C), 47,8 (C), 44,5 (CH), 38,2 (CH<sub>2</sub>), 34,5 (CH<sub>2</sub>), 32,9(CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (3xCH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 28,4 (CH<sub>2</sub>), 28,2 (CH<sub>2</sub>), 26,4 (CH<sub>2</sub>), 25,8 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 20,8 (CH<sub>3</sub>), 19,9 (CH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 536 ([M+Na]<sup>+</sup>), 514 ([M+H]<sup>+</sup>).

**EMAR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** valor calculado: 536,3016; valor encontrado: 536,3022 ([M+Na]<sup>+</sup>).

**(2S)-N-[(2R)-2-hidróxi-2-(2S,5R)-5-((1R)-1-hidróxiundecil)tetrahydro-2-furaniletanoil]-camfor-10,2-sultam (3.8)**



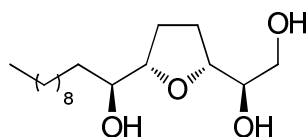
C<sub>27</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>6</sub>S  
513,72 g/mol

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 4,67 (1H, *sl*, CHOHCON), 4,48 (1H, *ddd*, *J* = 2,0; 4,8 e 7,2 Hz, CHO), 3,94 (1H, *t*, *J* = 6,4 Hz, CHN), 3,76 (1H, *dt*, *J* = 4,8 e 7,2 Hz, CHO), 3,50 (1H, *d*, *J* = 13,7 Hz, CHHSO<sub>2</sub>), 3,49-3,39 (1H, *m*, CHOH), 3,44 (1H, *d*, *J* = 13,7 Hz, CHHSO<sub>2</sub>), 2,20-2,14 (1H, *m*, CHHCHN), 2,06-1,98 (3H, *m*, CH<sub>2</sub> THF, CHHCHN), 1,93-1,83 (5H, *m*, CH<sub>2</sub> THF, sult), 1,51-1,20 (20H, *m*), 1,14 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>C), 0,97 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>C), 0,87 (3H, *t*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 173,0 (C), 82,9(CH), 80,1 (CH), 74,1 (CH), 73,5 (CH), 64,8 (CH), 52,9 (CH<sub>2</sub>), 49,0 (C), 47,9 (C), 44,4 (CH), 37,6 (CH<sub>2</sub>), 34,5 (CH<sub>2</sub>), 32,5 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7-29,5 (3xCH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 28,1(CH<sub>2</sub>), 27,7(CH<sub>2</sub>), 26,5(CH<sub>2</sub>), 25,6 (CH<sub>2</sub>), 22,6 (CH<sub>2</sub>), 20,3 (CH<sub>3</sub>), 19,9 (CH<sub>3</sub>), 14,0 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 536 ([M+Na]<sup>+</sup>), 514 ([M+H]<sup>+</sup>).

**(1R)-1-(2R,5S)-5-[(1S)-1-hidróxiundecil]tetrahydro-2-furaniletane-1,2-diol (3.9)**



C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>  
302,45 g/mol

À uma solução do diastereoisômero (**3.7**) (1,95 g, 3,8 mmol) em THF:H<sub>2</sub>O (1:0,001) (50 mL) foi adicionado NaBH<sub>4</sub> (158 mg, 4,18 mmol). A solução resultante foi agitada à temperatura ambiente por 3 h, quando foi interrompida pela adição de solução saturada de NaCl (50 mL). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL) e as fases orgânicas reunidas, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo gerando um óleo incolor. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 50% à EtOAc:MeOH 10%) resultou no triol desejado (**3.9**) como um óleo incolor (1,05 g, 3,47 mmol, 91%).

$[\alpha]^{24}_D$ : -6,1 (CHCl<sub>3</sub>, c 0,52).

**IV**  $\nu_{max}$  (**composto puro**): 3334 (m), 2921 (F), 2852 (F), 1462 (F), 1295 (m), 1063 (F).

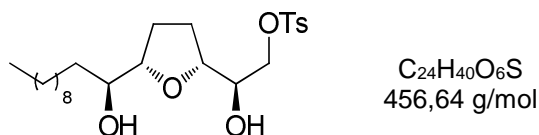
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  4,02 (1H, *m*, CHO), 3,85 (1H, *q*, *J* = 6,0 Hz, CHO), 3,70-3,66 (2H, *m*, HOCHCH<sub>2</sub>OH), 3,56 (1H, *m*, CHOH), 3,44 (1H, *m*, CHOH), 1,98-1,82 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>THF), 1,51-1,43 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CHOH), 1,36-1,21 (16H, *m*), 0,88 (3H, *t*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  82,8(CH), 80,3 (CH), 74,1 (CH), 73,9 (CH), 65,0 (CH<sub>2</sub>), 34,3 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (5xCH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 28,0 (CH<sub>2</sub>), 27,9 (CH<sub>2</sub>), 25,7(CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z***: 325 ([M+Na]<sup>+</sup>), 303 ([M+H]<sup>+</sup>).

**EMAR (IES<sup>+</sup>) *m/z***: valor calculado: 325,2349; valor encontrado: 325,2353 ([M+Na]<sup>+</sup>).

**(2R)-2-hidróxi-2-(2R,5S)-5-[(1S)-1-hidróxiundecil]tetrahydro-2-furaniletil-4-metil-1-benzenosulfonate (3.10)**



À uma solução do triol (**3.9**) (500 mg, 1,65 mmol) em benzeno anidro (20 mL) foi adicionado Bu<sub>2</sub>SnO (493 mg, 1,98 mmol) e a mistura reacional refluxada por 3 h e posteriormente resfriada à temperatura ambiente quando TsCl (347 mg, 1,82 mmol) e TBAB (268 mg, 0,83 mmol) foram adicionados. Após 2h, o solvente foi removido e o material bruto purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 20% - 50%) resultando no tosilato (**3.10**) como um sólido branco (565 mg, 86%).

$[\alpha]^{24}_D$ : -9,2 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.0).

pf: 71-73 °C.

**IV**  $\nu_{\max}$  (**composto puro**): 3430 (F), 3321 (l), 2950 (F), 2914 (F), 2848 (F), 1596 (m), 1469 (m), 1368 (F), 1171 (F), 1114 (m).

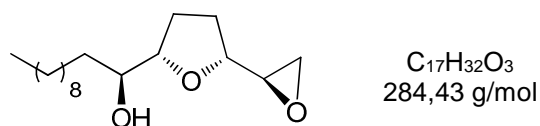
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  7,81 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, CHAr), 7,35 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, CHAr), 4,09 (2H, *d*, *J* = 6,4 Hz, CH<sub>2</sub>OTs), 4,0 (1H, *dt*, *J* = 2,8 e 6,8 Hz, CHO), 3,84 (1H, *dt*, *J* = 4,0 e 7,2 Hz, CHO), 3,75 (1H, *dt*, *J* = 2,8 e 6,4 Hz, CHOH), 3,45-3,41 (1H, *m*, CHOH), 2,45 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>Ar), 2,0-1,82 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>THF), 1,48-1,40 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CHOH), 1,34-1,20 (16H, *m*), 0,89 (3H, *t*, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  144,9 (C), 132,8 (C), 129,8 (CH), 128,0 (CH), 82,5 (CH), 78,4 (CH), 74,1 (CH), 71,6 (CH), 71,5 (CH<sub>2</sub>), 34,5 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (4xCH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 28,1 (CH<sub>2</sub>), 27,8 (CH<sub>2</sub>), 25,7 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 21,6 (CH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z***: 479 ([M+Na]<sup>+</sup>), 457 ([M+H]<sup>+</sup>).

**EMAR (IES<sup>+</sup>) *m/z***: valor calculado: 479,2438; valor encontrado: 479,2432 ([M+Na]<sup>+</sup>).

**(S)-1-[(2S,5R)-5-[(2R)-oxiran-2-il]tetrahydrofuran-2-il]undecan-1-ol (3.11)**



À solução do tosilato (**3.10**) (100 mg, 0,22 mmol) em MeOH anidro (1,5 mL) foi adicionado K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> seco (33,5 mg, 0,242 mmol) e agitada à temperatura ambiente por 2 h, quando o solvente foi removido à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 50%) resultou no epóxido (**3.11**) como um óleo incolor (59,5 mg, 96%).

$[\alpha]^{24}_D$ : -4.1 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.85).

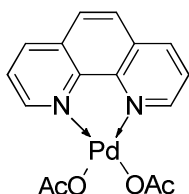
**IV**  $\nu_{\max}$  (**composto puro**): 3395 (l), 2922 (F), 2852 (F), 1465 (F), 1255 (m), 1068 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**:  $\delta$  4,06 (1H, *dt*, *J* = 2,8 e 7,2 Hz, CHO), 3,86 (1H, *dt*, *J* = 4,4 e 6,8 Hz, CHO), 3,45-3,29 (1H, *m*, CHOH), 3,01 (1H, *dt*, *J* = 2,8 e 4,4 Hz, CHOCH<sub>2</sub>), 2,82 (1H, *dd*, *J* = 2,8 e 5,2 Hz, CHOCHH), 2,79-2,76 (1H, *m*, CHOCHH), 2,15-1,88 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>THF), 1,48-1,41 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CHOH), 1,35-1,20 (16H, *m*), 0,89 (3H, *t*, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 83,0 (CH), 77,1 (CH), 74,3 (CH), 54,5 (CH), 44,3 (CH<sub>2</sub>) 34,7 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 29,2 (CH<sub>2</sub>), 28,1 (CH<sub>2</sub>), 25,8 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) m/z:** 307 ([M+Na]<sup>+</sup>), 285 ([M+H]<sup>+</sup>).

#### **Catalisador Pd(OAc)<sub>2</sub>-fenantrolina (3.4)**

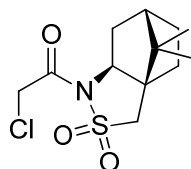


C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Pd  
404,71 g/mol

A reação foi realizada a partir de adaptação da metodologia descrita por WEI *et al.*, 2006. À um balão, sob atmosfera de N<sub>2</sub> e à temperatura ambiente, foram adicionados acetato de paládio (II) (100 mg, 0,445 mmol), 1,10-fenantrolina (80,2 mg, 0,445 mmol) e DME anidro (2 mL). A mistura reacional foi agitada à esta temperatura por 30 min, quando observou-se a formação de um precipitado amarelo que foi filtrado à vácuo, lavado com éter etílico e seco em sistema de alto vácuo para a obtenção do catalisador (3.4) como um sólido amarelo (160 mg, 0,395 mmol, 89%).

**IV v<sub>max</sub> (composto puro):** 3378 (l), 1593 (F), 1367 (m), 1317 (F), 1303 (F).

#### **(2S)-N-(2-cloroetanoil)-camfor-10,2-sultam (3.5)**



C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>3</sub>S  
291,79 g/mol

À uma solução de (2S)-camfor-10,2-sultam (753 mg, 3,5 mmol) em THF anidro (30 mL) foi adicionado em pequenas porções NaH (60% óleo-mineral, 151 mg, 3,84 mmol). Após agitação à temperatura ambiente por 1 h a mistura reacional foi resfriada à -60 °C e cloreto de cloroacetila (475 mg, 0,335 mL, 4,2 mmol) foi adicionado. A mistura reacional foi então aquecida à temperatura ambiente e mantida sob agitação por 20 h, quando foi interrompida pela adição de solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl (5 mL) e H<sub>2</sub>O (10 mL), extraída com DCM (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas e

lavadas com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (40 mL), seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:DCM 75%) resultou no cloreto (**3.5**) como um sólido branco (0,9683 g, 3,32 mmol, 95%).

$[\alpha]^{24}_D$ : +111,6 (CHCl<sub>3</sub>, c 0,95).

pf: 128-129 °C.

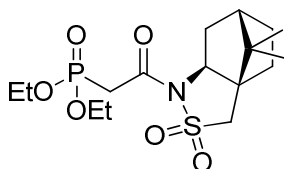
**IV**  $\nu_{max}$  (**composto puro**): 2952 (F), 1700 (F), 1321 (F), 1267 (F), 1235 (m), 1212 (F), 1131 (F), 1063 (F).

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4,50 (2H, s, CH<sub>2</sub>Cl), 3,92 (1H, dd, *J* = 5,2 e 8,0 Hz, CHN), 3,53 (1H, d, *J* = 13,6 Hz, CHHSO<sub>2</sub>), 3,47 (1H, dt, *J* = 13,6 Hz, CHHSO<sub>2</sub>), 2,22-2,08 (2H, m, CH<sub>2</sub>CHN), 1,98-1,88 (3H, m, sult), 1,47-1,34 (2H, m, sult), 1,15 (3H, s, CH<sub>3</sub>C), 0,99 (3H, s, CH<sub>3</sub>C).

**RMN** <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  164,7 (C), 65,5 (CH), 52,7 (CH<sub>2</sub>), 49,2 (C), 47,9 (C), 44,5 (CH), 38,0 (CH<sub>2</sub>), 32,8 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (CH<sub>2</sub>), 26,4 (CH<sub>2</sub>), 20,7 (CH<sub>3</sub>), 19,8 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>)** *m/z*: 315 ([M+Na]<sup>+</sup>), 292 ([M+H]<sup>+</sup>).

### Dietil-2-oxo-2-*N*-((2*S*)-camfor-10,2-sultam)-etilfosfonato (**3.6**)



C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>6</sub>PS  
393,13 g/mol

Em um vial de alta pressão foi adicionado o cloreto (**3.5**) (600 mg, 2,1 mmol) e trietilfosfito (384 mg, 0,402 mL, 2,3 mmol). O vial foi vedado e aquecido em um bloco que aquecimento à 160 °C por 15 h. Após este período, o vial foi resfriado à temperatura ambiente e o excesso de trietilfosfito foi removido à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:DCM 85%) resultou fosfonato desejado (**3.6**) como um óleo amarelo (0,693 g, 1,76 mmol, 84%).

$[\alpha]^{24}_D$ : +62,4 (CHCl<sub>3</sub>, c 0,94).

**IV**  $\nu_{max}$  (**composto puro**): 2963 (F), 1691 (F), 1326 (F), 1254 (F), 1167 (m), 1134 (m), 1018 (F).

**RMN** <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4,19-4,11 (4H, m, 2xPOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3,85 (1H, dd, *J* = 5,2 e 7,6 Hz, CHN), 3,52 (1H, dd, *J* = 15,6 e 20,4 Hz, P(O)CHHCO), 3,47 (1H, d, *J* = 13,6 Hz, CHHSO<sub>2</sub>), 3,41 (1H, d, *J* = 13,6 Hz, CHHSO<sub>2</sub>), 3,17 (1H, dd, *J* = 15,6 e 22,8 Hz,

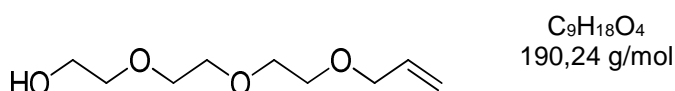


P(O)CHHCO), 2,14-2,0 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CHN), 1,93-1,82 (3H, *m*, sult), 1,41-1,32 (2H, *m*, sult), 1,29 (6H, *dt*, *J* = 3,2 e 6,8, 2xOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1,14 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>C), 0,93 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>C).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 163,4 (*d*, *J*<sub>C-P</sub> = 5,5 Hz, CO), 65,1 (CH), 62,7 (*d*, *J*<sub>C-P</sub> = 4,4 Hz, POCH<sub>2</sub>), 62,4 (*d*, *J*<sub>C-P</sub> = 4,8 Hz, POCH<sub>2</sub>), 52,7 (CH<sub>2</sub>), 48,2 (C), 47,7 (C), 44,6 (CH), 38,0 (CH<sub>2</sub>), 34,8 (*d*, *J*<sub>C-P</sub> = 102 Hz, PCH<sub>2</sub>), 32,6 (CH<sub>2</sub>), 26,3 (CH<sub>2</sub>), 20,6 (CH<sub>3</sub>), 16,2 (*d*, *J*<sub>C-P</sub> = 4,9 Hz, POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 16,1 (*d*, *J*<sub>C-P</sub> = 4,9 Hz, POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 416 ([M+Na]<sup>+</sup>), 394 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 2-{2-[2-(Alilóxi)etóxi]etóxi}etanol (3.12)



À uma solução de *t*-BuOK (746 mg, 6,65 mmol) em THF (180 mL) anidro, foi adicionado trietileno glicol (2 g, 13,3 mmol) à temperatura ambiente. A mistura resultante foi agitada por 30 min e solução de iodeto de alila (12 g, 0,61 mL, 6,65 mmol) dissolvido em TFH anidro (20 mL) foi adicionada. Após agitação por 24 h, a mistura reacional foi filtrada em celite, lavada com acetato de etila e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (EtOAc 100%) resultou no álcool desejado (3.12) como um óleo amarelo claro (0,95 g, 5,0 mmol, 75%).

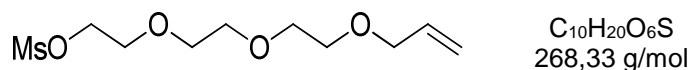
**IV  $\nu_{\max}$  (composto puro):** 3443 (l), 2866 (F), 1452 (m), 1348 (m), 1249 (m), 1093 (F), 924 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5,89 (1H, *ddt*, *J* = 6,0; 10,4 e 17,2 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 5,27 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 17,2 Hz, CHH=CH), 5,17 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 10,4 Hz, CHH=CH), 4,0 (2H, *d*, *J* = 6,0 Hz, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3,74-3,59 (12H, *m*, 6xCH<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 134,6 (CH), 117,1 (CH<sub>2</sub>), 72,4 (CH<sub>2</sub>), 72,2 (CH<sub>2</sub>), 70,6 (2xCH<sub>2</sub>), 70,3 (CH<sub>2</sub>), 69,3 (CH<sub>2</sub>), 61,7 (CH<sub>2</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 213 ([M+Na]<sup>+</sup>), 191 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 2-(2-(2-(alilóxi)etóxi)etóxi)etil metanosulfonato (3.16)



À uma solução do álcool (**3.12**) (100 mg, 0,53 mmol) e DIPEA (95,9 mg, 0,129 mL, 0,742 mmol) em DCM anidro (5 mL) sob atmosfera de N<sub>2</sub> e à 0 °C, foi adicionado MsCl gota a gota (97,1 mg, 0,066 mL, 0,848 mmol). Após 10 min, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional agitada à temperatura ambiente por 1 h. A reação foi então lavada com NaOH (1 M, 3 mL), solução saturada de NaCl (5 mL), seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 30%) resultou no mesilato desejado (**3.16**) como um óleo incolor (137 mg, 0,51 mmol, 96%).

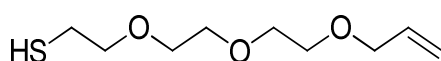
**IV**  $\nu_{\max}$  (**composto puro**): 2869 (F), 1454 (m), 1347 (F), 1171 (F), 1097 (F), 1015 (F), 915 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  5,89 (1H, *ddt*,  $J = 5,6; 10,4$  e  $16,8$  Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 5,26 (1H, *dq*,  $J = 1,2$  e  $16,8$  Hz, CHH=CH), 5,17 (1H, *dq*,  $J = 1,2$  e  $10,4$  Hz, CHH=CH), 4,36 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>OMs), 4,0 (2H, *dt*,  $J = 1,2$  e  $5,6$  Hz, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3,76-3,56 (10H, *m*, 5xCH<sub>2</sub>O), 3,06 (3H, *s*, S(O<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  134,6 (CH), 117,1 (CH<sub>2</sub>), 72,1 (CH<sub>2</sub>), 70,5 (3xCH<sub>2</sub>), 69,3 (CH<sub>2</sub>), 69,2 (CH<sub>2</sub>), 68,9 (CH<sub>2</sub>), 37,6 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** 269 ([M+Na]<sup>+</sup>), 291 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 2-(2-(2-(alilóxi)etóxi)etóxi)etanotiol (**3.13**)



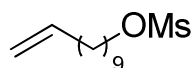
C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>S  
206,30 g/mol

Uma solução do mesilato (**3.16**) (700 mg, 2,61 mmol) e tiourea (209 mg, 2,74 mmol) em EtOH (15 mL) foi refluxada à 90 °C por 20 h. A mistura reacional foi então resfriada à temperatura ambiente e NaOH (261 mg, 6,53 mmol), diluído em uma mistura de EtOH:H<sub>2</sub>O (7:0,7 mL), foi adicionado e a mistura reacional foi novamente refluxada por mais 3 h, em seguida resfriada à temperatura ambiente, acidificada e o solvente foi então removido à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 30%) resultou no tiol desejado (**3.13**) como um óleo incolor (372 mg, 1,8 mmol, 69%).

**IV**  $\nu_{\max}$  (**composto puro**): 2860 (m), 1350 (m), 1290 (m), 1096 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5,92 (1H, *ddt*, *J* = 5,6; 10,4 e 17,2 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 5,27 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 17,2 Hz, CHH=CH), 5,18 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 10,4 Hz, CHH=CH), 4,0 (2H, *dt*, *J* = 1,6 e 5,6 Hz, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3,68-3,60 (10H, *m*, 5xCH<sub>2</sub>O), 2,70 (2H, *dt*, *J* = 6,8 e 8,0 Hz, CH<sub>2</sub>SH), 1,59 (1H, *t*, *J* = 8,0 Hz, SH).

### Undec-10-enilmetanossulfonato (3.17)



C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>S  
248,38 g/mol

À uma solução de 10-undecen-1-ol (510 mg, 0,6 mL, 3,0 mmol) e DIPEA (822 mg, 1,1 mL, 6,36 mmol) em DCM anidro (20 mL) sob atmosfera de N<sub>2</sub> e à 0 °C, foi adicionado MsCl gora a gota (833 mg, 0,56 mL, 7,27 mmol). Após 10 min, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional agitada à temperatura ambiente por 1 h. A reação foi então lavada com NaOH (1 M, 15 mL), solução saturada de NaCl (20 mL), seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 30%) resultou no mesilato desejado (3.17) como um óleo incolor (746 mg, 3,0 mmol, 100%).

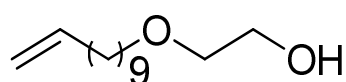
**IV  $\nu_{\max}$  (composto puro):** 2924 (F), 2854 (m), 1351 (F), 1172 (F), 944 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5,81 (1H, *ddt*, *J* = 6,4; 10,0 e 17,2 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 4,99 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 17,2 Hz, CHH=CH), 4,93 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 10,0 Hz, CHH=CH), 4,22 (2H, *t*, *J* = 6,4, CH<sub>2</sub>OMs), 3,0 (3H, *s*, S(O<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 2,1-2,0 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 1,78-1,71 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMs), 1,42-1,24 (12H, *m*, 6xCH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 139,1 (CH), 114,1 (CH<sub>2</sub>), 70,1 (CH<sub>2</sub>), 37,3 (CH<sub>3</sub>), 33,7 (CH<sub>2</sub>), 29,3 (2xCH<sub>2</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>), 29,0 (CH<sub>2</sub>), 28,9 (CH<sub>2</sub>), 28,8 (CH<sub>2</sub>), 25,4 (CH<sub>2</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 271 ([M+Na]<sup>+</sup>).

### 2-(undec-10-en-1-óxi)etanol (3.14)



C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O<sub>2</sub>  
214,34 g/mol

À uma solução de NaH (120 mg, 3 mmol) em DMF (15 mL), sob atmosfera de N<sub>2</sub> e à 0 °C, foi adicionado etileno glicol (186 mg, 0,167 mL, 3 mmol) gota a gota. A mistura

reacional foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por 45 min quando foi então resfriada à 0 °C e uma solução do mesilato (**3.17**) (500 mg, 2 mmol) em DMF (3 mL) foi adicionada, a mistura reacional foi então aquecida à 70 °C por 2 h. A reação foi interrompida com adição de solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl (15 mL) e extraída com acetato de etila (3 x 15 mL). As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com água (2 x 25 mL) para remover o excesso de DMF, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 50%) resultou no álcool desejado (**3.14**) como um óleo amarelo (239 mg, 1,1 mmol, 55%).

**IV**  $\nu_{\max}$  (**composto puro**): 3399 (l), 2923 (F), 2853 (F), 1640 (m), 1460 (m), 1120 (F), 1062 (F), 908 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  5,82 (1H, *ddt*, *J* = 6,8; 10,0 e 17,2 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 4,99 (1H, *dq*, *J* = 2,4 e 17,2 Hz, CHH=CH), 4,93 (1H, *d*, *J* = 10,0 Hz, CHH=CH), 3,72 (2H, *q*, *J* = 4,8, CH<sub>2</sub>OH), 3,53 (2H, *t*, *J* = 4,8, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 3,47 (2H, *t*, *J* = 6,8, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 2,03 (2H, *q*, *J* = 6,8, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 1,62-1,55 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 1,40-1,27 (12H, *m*, 6xCH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  139,2 (CH), 114,1 (CH<sub>2</sub>), 71,7 (CH<sub>2</sub>), 71,4 (CH<sub>2</sub>), 61,8 (CH<sub>2</sub>), 33,8 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (CH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (2xCH<sub>2</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>), 28,9 (CH<sub>2</sub>), 26,1 (CH<sub>2</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 237 ([M+Na]<sup>+</sup>), 215 ([M+H]<sup>+</sup>).

### 2-(undec-10-en-1-yloxy)ethylmethanesulfonate (**3.18**)



À uma solução do álcool (**3.14**) (160 mg, 0,75 mmol) e Et<sub>3</sub>N (121 mg, 0,164 mL, 1,2 mmol) em DCM anidro (7 mL) sob atmosfera de N<sub>2</sub> e à 0 °C, foi adicionado MsCl gota a gota (120 mg, 0,081 mL, 1,05 mmol). Após 10 min, o banho de gelo foi removido e a mistura reacional agitada à temperatura ambiente por 1 h. A reação foi então lavada com NaOH (1 M, 5 mL), solução saturada de NaCl (7 mL), seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 30%) resultou no mesilato desejado (**3.18**) como um óleo incolor (210 mg, 0,72 mmol, 96%).

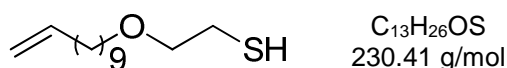
**IV  $\nu_{\max}$  (composto puro):** 2924 (F), 2854 (F), 1351 (F), 1173 (F), 969 (m), 912 (F).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  5,81 (1H, *ddt*,  $J = 6,8; 10,0$  e  $16,8$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 4,99 (1H, *dq*,  $J = 2,0$  e  $16,8$  Hz,  $\text{CHH}=\text{CH}$ ), 4,93 (1H, *d*,  $J = 10,0$  Hz,  $\text{CHH}=\text{CH}$ ), 4,37 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{OMs}$ ), 3,69 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$ ), 3,48 (2H, *t*,  $J = 6,8$ ,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OMs}$ ), 3,06 (3H, *s*,  $\text{S}(\text{O}_2)\text{CH}_3$ ), 2,04 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1,60-1,54 (2H, *m*,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 1,40-1,27 (12H, *m*,  $6\times\text{CH}_2$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  139,2 (CH), 114,1 ( $\text{CH}_2$ ), 71,6 ( $\text{CH}_2$ ), 69,3 ( $\text{CH}_2$ ), 68,4 ( $\text{CH}_2$ ), 37,6 ( $\text{CH}_3$ ) 33,8 ( $\text{CH}_2$ ), 29,5 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 29,4 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 29,1 ( $\text{CH}_2$ ), 28,9 ( $\text{CH}_2$ ), 26,0 ( $\text{CH}_2$ ).

**EMBR (IES $^+$ )  $m/z$ :** 315 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ).

### 2-(undec-10-en-1-ilóxi)etanotiol (3.15)



Uma solução do mesilato (**3.18**) (210 mg, 0,72 mmol) e tioureia (57,5 mg, 0,756 mmol) em EtOH (5 mL) foi refluxada à 90 °C por 20 h. A mistura reacional foi então resfriada à temperatura ambiente e NaOH (72 mg, 1,8 mmol), diluído em uma mistura de EtOH:H<sub>2</sub>O (1:0.1 mL), foi adicionado e a mistura reacional foi novamente refluxada por mais 3 h, em seguida resfriada à temperatura ambiente, acidificada e o solvente foi então removido à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 30%) resultou no tiol desejado (**3.15**) como um óleo incolor (118 mg, 0,51 mmol, 71%).

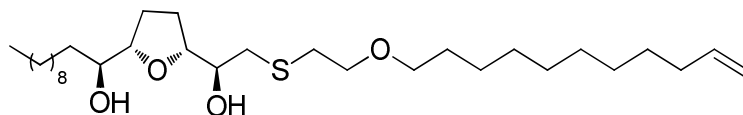
**IV  $\nu_{\max}$  (composto puro):** 2923 (F), 2852 (F), 1463 (m), 1108 (F), 908 (F).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  5,82 (1H, *ddt*,  $J = 6,8; 10,0$  e  $17,2$  Hz,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 4,99 (1H, *dq*,  $J = 2,0$  e  $17,2$  Hz,  $\text{CHH}=\text{CH}$ ), 4,93 (1H, *d*,  $J = 10,0$  Hz,  $\text{CHH}=\text{CH}$ ), 3,56 (2H, *t*,  $J = 6,4$ ,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 3,45 (2H, *t*,  $J = 6,4$ ,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 2,68 (2H, *dt*,  $J = 6,4$  e  $8,0$ ,  $\text{CH}_2\text{SH}$ ), 2,03 (2H, *q*,  $J = 6,8$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 1,62-1,54 (3H, *m*,  $\text{SH}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ ), 1,39-1,26 (12H, *m*,  $6\times\text{CH}_2$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  139,2 (CH), 114,1 ( $\text{CH}_2$ ), 72,3 ( $\text{CH}_2$ ), 71,1 ( $\text{CH}_2$ ), 33,8 ( $\text{CH}_2$ ), 29,6 ( $\text{CH}_2$ ), 29,5 ( $\text{CH}_2$ ), 29,4-29,3 ( $2\times\text{CH}_2$ ), 29,1 ( $\text{CH}_2$ ), 28,9 ( $\text{CH}_2$ ), 26,1 ( $\text{CH}_2$ ), 24,4 ( $\text{CH}_2$ ).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 231 ([M+H]<sup>+</sup>).

**(S)-1-[(2S,5R)-5-[(S)-1-hidróxi-2-((2-(undec-10-enilóxi)etil)tio)etil]tetrahidrofuran-2-il]undecan-1-ol (3.19)**



$C_{30}H_{58}O_4S$   
514.84 g/mol

À uma solução de NaH (6 mg, 0,217 mmol) em THF anidro (1 mL) à 0 °C, foi adicionada uma solução do tiol **3.15** (50 mg, 0,217 mmol) em THF (1 mL) gota a gota, após agitação à esta temperatura por 10 min, a mistura reacional foi aquecida à temperatura ambiente e agitada por mais 40 min. Em seguida, foi resfriada à 0 °C e a solução do tosilato (**3.10**) em THF foi adicionada, e deixada aquecer até à temperatura ambiente, agitada por mais 1.5 h e interrompida pela adição de solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl e extraída com acetato de etila (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica (Hex:EtOAc 30%) resultou na olefina (**3.19**) como um óleo incolor (69 mg, 0,135 mmol, 62%).

**[α]<sup>24</sup><sub>D</sub>:** +14,2 (CHCl<sub>3</sub>, c 0,7).

**IV *v*<sub>max</sub> (composto puro):** 3378 (l), 2922 (F), 2852 (F), 1640 (m), 1464 (F), 1364 (m), 1289 (m), 1104 (F).

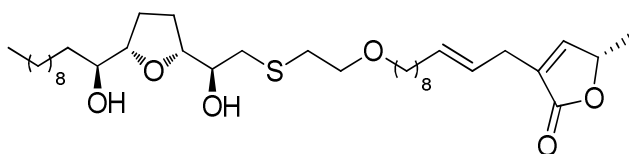
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5,81 (1H, *ddt*, *J* = 6,8; 10,0 e 17,2 Hz, CH=CH<sub>2</sub>), 4,99 (1H, *dq*, *J* = 1,6 e 17,2 Hz, CHH=CH), 4,93 (1H, *d*, *J* = 10,0 Hz, CHH=CH), 4,0 (1H, *dt*, *J* = 3,2 e 6,8 Hz, CHO), 3,90-3,86 (1H, *m*, CHO), 3,64-3,57 (3H, *m*, CHOH, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 3,46-3,41 (3H, *m*, CHOH, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 2,88-2,70 (4H, *m*, CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>), 2,06-1,88 (6H, *m*, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> 2xCH<sub>2</sub>THF), 1,61-1,54 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1,52-1,43 (2H, *m*, CH<sub>2</sub>CHOH), 1,35-1,24 (28H, *m*, 14xCH<sub>2</sub>), 0,88 (3H, *t*, *J* = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 139,2 (CH), 114,1 (CH<sub>2</sub>), 82,6 (CH), 80,8 (CH), 74,2 (CH), 72,5 (CH), 71,3 (CH<sub>2</sub>), 70,6 (CH<sub>2</sub>), 37,6 (CH<sub>2</sub>), 34,5 (CH<sub>2</sub>), 33,8 (CH<sub>2</sub>), 32,2 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (4xCH<sub>2</sub>), 29,5 (CH<sub>2</sub>), 29,4 (2xCH<sub>2</sub>), 29,3 (CH<sub>2</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>), 28,9 (CH<sub>2</sub>), 28,2 (CH<sub>2</sub>), 28,1 (CH<sub>2</sub>), 26,1 (CH<sub>2</sub>), 25,8 (CH<sub>2</sub>), 22,7 (CH<sub>2</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) *m/z*:** 537 ([M+Na]<sup>+</sup>), 515 ([M+H]<sup>+</sup>).

**EMAR (IES<sup>+</sup>) m/z:** valor calculado: 537,3948; valor encontrado: 537,3841 ([M+Na]<sup>+</sup>);  
valor calculado: 515,4129; valor encontrado: 515,4123 ([M+H]<sup>+</sup>).

**(S)-3-[(E)-11-[2-(((S)-2-hidróxi-2-((2R,5S)-5-((S)-1-hidróxiundecil)tetrahidrofuran-2-il)etil)tio)etóxi]undec-2-enil]-5-metilfuran-2(5H)-ona (3.21)**



C<sub>35</sub>H<sub>62</sub>O<sub>6</sub>S  
610.93 g/mol

À uma solução da olefina **3.19** (51,7 mg, 0,1 mmol) e do alcino **3.20** (14,2 mg, 0,1 mmol) em DMF (4 mL) foi adicionado o catalisador [CpRu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (5,84 mg, 0,015 mmol) e a mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 6 h quando foi então filtrada em sílica gel e lavada com éter etílico. A fase orgânica foi lavada com água (3 x 5 mL), seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada à vácuo. Purificação por cromatografia em coluna de sílica gel (Hex:EtOAc 5-60%) resultou no mímico desejado (**3.21**) como um óleo incolor (24 mg, 0,039 mmol, 39%).

**[α]<sup>24</sup><sub>D</sub>:** +23,7 (CHCl<sub>3</sub>, c 0,82).

**IV**  $\nu_{\max}$  (**composto puro**): 3410 (l), 2922 (F), 2852 (F), 1754 (F), 1463 (m), 1318 (m), 1095 (F), 1023 (F), 968 (F).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 6,99 (1H, q, J = 2,0 Hz, CH=C), 5,57 (1H, dt, J = 6,4 e 15,6 Hz, CH=CHCH<sub>2</sub>C), 5,46 (1H, dt, J = 6,4 e 15,6 Hz, CH=CHCH<sub>2</sub>C), 5,03 (1H, qq, J = 2,0 e 6,8 Hz, CHCH<sub>3</sub>), 4,0 (1H, dt, J = 3,6 e 6,4 Hz, CHO), 3,91-3,86 (1H, m, CHO), 3,64-3,57 (3H, m, CHOH, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 3,46-3,41 (3H, m, CHOH, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 2,95 (1H, d, J = 6,0 Hz, CH<sub>2</sub>C), 2,83-2,73 (4H, m, CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>), 2,05-1,88 (6H, m, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>; 2xCH<sub>2</sub>THF), 1,59-1,54 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1,50-1,45 (2H, m, CH<sub>2</sub>CHOH), 1,35-1,24 (26H, m, 13xCH<sub>2</sub>), 1,41 (1H, d, J = 6,8 Hz, CH=CHCH<sub>2</sub>C), 0,88 (3H, t, J = 6,8 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 173,5 (C), 149,4 (CH), 134,1 (CH), 133,5 (C), 124,3 (CH), 82,6 (CH), 80,9 (CH), 77,6 (CH), 74,2 (CH), 72,5 (CH), 71,3 (CH<sub>2</sub>), 70,5 (CH<sub>2</sub>), 37,7 (CH<sub>2</sub>), 34,6 (CH<sub>2</sub>), 32,4 (CH<sub>2</sub>), 32,2 (CH<sub>2</sub>), 31,9 (CH<sub>2</sub>), 29,7 (CH<sub>2</sub>), 29,6 (4xCH<sub>2</sub>), 29,4 (2xCH<sub>2</sub>), 29,3 (2xCH<sub>2</sub>), 29,1 (CH<sub>2</sub>), 28,4 (CH<sub>2</sub>), 28,2 (CH<sub>2</sub>), 28,1 (CH<sub>2</sub>), 26,1 (CH<sub>2</sub>), 25,8 (CH<sub>2</sub>), 22,6 (CH<sub>2</sub>), 19,1 (CH<sub>3</sub>), 14,1 (CH<sub>3</sub>).

**EMBR (IES<sup>+</sup>) m/z:** 633 ([M+Na]<sup>+</sup>), 611 ([M+H]<sup>+</sup>).

**EMAR (IES<sup>+</sup>)  $m/z$ :** valor calculado: 633,4159; valor encontrado: 6334173 ([M+Na]<sup>+</sup>).



## **5 – CONCLUSÕES**

O trabalho desenvolvido resultou na síntese de um mímico de acetogenina a partir de rota sintética nova que poderá ser empregada para obtenção de novos compostos, além daqueles possíveis a partir dos fragmentos obtidos neste trabalho.

A reação sequencial de troca vinil etílica – Rearranjo de Claisen forneceu uma nova metodologia para a síntese de aldeídos  $\gamma,\delta$  –insaturados o que economiza etapas sintéticas da metodologia antiga empregada pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Richard Brown.

Os resultados da reação de ciclização oxidativa mediada por permanganato mostraram ser esta reação muito sensível e de baixos rendimentos mesmo em diferentes condições reacionais.

Embora não foi obtida uma série de mímicos de ACGs, a partir dos intermediários obtidos e da rota sintética estabelecida novos compostos serão sintetizados pelo grupo de pesquisa para avaliação de suas atividades biológicas frente à ensaios antitumorais e inseticidas para posterior estabelecimento da correlação estrutura-atividade biológica destes compostos.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, J. E.; CROSSLEY, M. J.; LEHTONES, E. M. M. "Stereospecificity of oxidative cycloaddition reactions of 1,5-dienes". *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 918-920, 1979.
- BANDUR, N. G.; BRUCKNER, D.; HOFFMANN, R. W.; KOERT, U. "Total synthesis of jimenezin via an intramolecular allylboration". *Org. Lett.*, 8 (17): 3829-3831, 2006.
- BHUNNOO, R. A.; HOBBS, H.; LAINÉ, D. I.; LIGHT, M. E.; BROWN, R. C. D. "Synthesis of the non-adjacent bis-THF core of *cis*-sylvaticin using a double oxidative cyclisation". *Org. Biomol. Chem.*, 7: 1017-1024, 2009.
- BISCEGLIA, J. A.; ORELLI, L. O. "Recent progress in the Horner-Wadsworth-Emmons reactions". *Curr. Org. Chem.*, 19: 744-775, 2015.
- BROWN, L. J.; SPURR, I. B.; KEMP, S. C.; CAMP, N. P.; GIBSON, K. R.; BROWN, R. C. D. "Total synthesis of *cis*-sylvaticin". *Org. Lett.* 10: 2489-2492, 2008.
- CAMP, D.; DAVIS, R. A.; CAMPITELLI, M.; EBDON, J.; QUINN, R. J. "Drug-like properties: Guiding principles for the design of natural product libraries". *J. Nat. Prod.*, 75: 72-81, 2012.
- CECIL, A. R. L.; BROWN, R. C. D. "Synthesis of *cis*-solamin using a permanganate-mediated oxidative cyclization". *Org. Lett.*, 4 (21): 3715-3718, 2002.
- CHEN, Y. J.; JIN, S.; XI, J.; YAO, Z. J. "New cytotoxic annonaceous acetogenins mimetics having a nitrogen-heterocyclic terminal and their application to cell imaging". *Tetrahedron*, 70: 4921-4928, 2014.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. "Natural products: A continuing source of novel drug leads". *Biochim. Biophys. Acta*, 1830 (6): 3670-3695, 2013.
- CRIMMINS, M. T.; SHE, J. "Enantioselective total synthesis of (+)-gigantecin: Exploiting the asymmetric glycolate aldol reaction". *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 12790-12791, 2004.
- DANIEL, M. C.; GROW, M. E.; PAN, H.; BEDNAREK, M.; GHANN, W. E.; ZABETAKIS, K.; CORNISH, J. "Gold nanoparticle-cored poly(propyleneimine) dendrimers as a new platform for multifunctional drug delivery systems". *New J. Chem.*, 35: 2366-2374, 2011.
- DOYLE, M. P.; HU, W. "Selectivity in reactions of allyldiazoacetates as a function of catalyst and ring size from  $\gamma$ -lactones to macrocyclic lactones". *J. Org. Chem.*, 65: 26: 8839-8847, 2000.
- FUJITA, D.; ICHIMARU, N.; ABE, M.; MURAI, M.; HAMADA, T.; NISHIOKA, T.; MYIOSHI, H. "Synthesis of non-THF analogues of acetogenin toward simplified mimics". *Tetrahedron Lett.*, 46: 5775-5779, 2005.
- HAMADA, T.; ICHIMARU, N.; ABE, M.; FUJITA, D.; KENMOCHI, A.; NISHIOKA, T.; ZWICKER, K.; BRANDT, U.; MIYOSHI, H. "Synthesis and inhibitory action of novel acetogenin mimics with bovine heart mitochondrial complex I". *Biochemistry*, 43: 3651-3658, 2004.
- HANESSIAN, S.; GIROUX, S.; BUFFAT, M. "Total synthesis and structural confirmation of (+)-longicin". *Org. Lett.*, 7 (18): 3989-3992, 2005.
- HARVEY, A. L. "Natural products in drug discovery". *Drug Discov. Today*, 13 (19-20): 894-901, 2008.
- HEAD, G. D.; WHITTINGHAM, W. G.; BROWN, R. C. D. "Synthesis of membranacin". *Synlett*, 8: 1437-1439, 2004.
- HIOKI, A.; YOSHIO, S.; MOTOSUE, M.; OSHITA, Y.; NAKAMURA, Y.; MISHIMA, D.; FUKUYAMA, Y.; KODAMA, M.; UEDA, K.; KATSU, T. "Enantioselective total

- synthesis of eurylene, 14-deacetyl eurylene and their 11-epimers: The relation between ionophoric nature and cytotoxicity". *Org. Lett.*, **6**: 6: 961-964, 2004.
- HOUK, K. M.; STRASSNER, T. "Establishing the (3+2) mechanism for the permanganate oxidation of alkenes by theory and kinetic isotope effects". *J. Org. Chem.*, **64**: 800-802, 1999.
- ICHIMARU, N.; ABE, M.; KENMOCHI, A.; HAMADA, T.; NISHIOKA, T.; MIYOSHI, H. "Synthesis of <sup>13</sup>C-labeled ubiquinone-acetogenin hybrid inhibitors of mitochondrial complex I". *J. Pestic. Sci.*, **29**: 127-129, 2004.
- ICHIMARU, N.; YOSHINAGA, N.; NISHIOKA, T.; MIYOSHI, H. "Effect of stereochemistry of  $\Delta$ lac-acetogenins on the inhibition of mitochondrial complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase)". *Tetrahedron*, **63**: 1127-1139, 2007.
- JIANG, S.; LI, Y.; CHEN, X. G.; HU, T. S.; WU, Y. L., YAO, Z. J. "Parallel fragment assembly strategy towards multiple-ether mimicry of anticancer annonaceous acetogenins". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**: 329-334, 2004.
- JIANG, S.; LIU, Z. H.; SHENG, G.; ZENG, B. B.; CHENG, X. G.; WU, Y. L.; YAI, Z. J. "Mimicry of annonaceous acetogenins: Enantioselective synthesis of a (4R)-hydroxy analogue having potent antitumor activity". *J. Org. Chem.*, **67**: 3404-3408, 2002.
- KEUM, G.; HWANG, C. H.; KANG, S. B.; KIM, Y.; LEE, E. "Stereoselective synthesis of rolliniastatin 1, rollimembrin and membranacin". *J. Am. Chem. Soc.*, **127**: 10396-10399, 2005.
- KINGHORN, A. D.; PAN, L., FLETCHER, J. N.; CHAI, H. "The relevance of higher plants in lead compound discovery programs". *J. Nat. Prod.*, **74**: 1539-1555, 2011.
- KOJIMA, N.; FUSHIMI, T.; MAEZAKI, N.; TANAKA, T.; YAMORI, T. "Synthesis of hybrid acetogenin,  $\alpha,\beta$ -unsaturated-  $\gamma$ -lactone-free nitrogen-containing heterocyclic analogues, and their cytotoxicity against human cancer cell lines". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**: 1637-1641, 2008.
- KOJIMA, N.; FUSHIMI, T.; TATSUKAWA, T.; YOSHIMITSU, T.; TANAKA, T.; YAMORI, T.; DAN, S.; IWASAKI, H.; YAMASHITA, M. "Structure-activity relationships of hybrid acetogenins: Powerful growth inhibitory effects of their connecting groups between heterocycle and hydrophobic carbon chain bearing THF ring on human cancer cell lines". *Eur. J. Med. Chem.*, **63**: 833-839, 2013.
- KONNO, H.; MAKABE, H.; HATTORI, Y.; NOSAKA, K.; AKAJI, K. "Synthesis of solamin type mono-THF acetogenins using cross-metathesis". *Tetrahedron*, **66**: 7946-7953, 2010.
- KUWABARA, K.; TAKADA, M.; IWATA, J.; TATSUMOTO, K.; SAKAMOTO, K.; IWAMURA, H.; MIYOSHI, H. "Design synthesis and mitochondrial complex I inhibitory activity of novel acetogenins mimics". *Eur. J. Biochem.*, **267**: 2538-2546, 2000.
- LAM, K. S. "New aspects of natural products in drug discovery". *Trends Microbiol.*, **15** (6): 279-289, 2007.
- LEE, K. H. "Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach". *J. Nat. Prod.*, **73**: 500-516, 2010.
- LI, N.; SHI, Z.; TANG, Y.; CHEN, J.; LI, X. "Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae". *Beilstein J. Org. Chem.*, **4** (48): 1-62, 2008.
- LIAW, C. C.; WU, T. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. "Historic perspectives on annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials". *Planta Med.*, **76**: 1390-1404, 2010.
- LIU, H. X.; HUANG, G. R.; ZHANG, H. M.; WU, J. R.; YAO, Z. J. "Annonaceous acetogenin mimics bearing a terminal lactam and their cytotoxicity against cancer cells". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**: 3426-3430, 2007.

- LIU, Y.; LIU, Y.; LI, Z.; ZHOU, G. B.; YAO, Z. J.; JIANG, S. "Identification of novel bivalent mimetics of annonaceous acetogenins via a scaffold-hopping strategy". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**: 1650-1653, 2014.
- MISHRA, B. B.; TIWAKI, V. K. "Natural products: An evolving role in future drug discovery". *Eur. J. Med. Chem.*, **46**: 4769-4807, 2011.
- MORRIS, C. L.; HU, Y.; HEAD, G. D.; BROWN, L. J.; WHITTINGHAM, W. G.; BROWN, R. C. D. "Oxidative cyclization reactions of trienes and dienynes: Total synthesis of membrrollin". *J. Org. Chem.*, **74**: 981-988, 2009.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. "Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010". *J. Nat. Prod.*, **75**: 311-335, 2012.
- PICCIALLI, V. "Oxidative cyclization of dienes and polyenes mediated by transition-metal-oxo species". *Synthesis*, **17**: 2585-2607, 2007.
- POPSAVIN, V.; SRECO, B.; BENEDEKOVIC, G.; POPSAVIN, M.; FRANCUZ, J.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G. "Design, synthesis and antiproliferative activity of two new heteroannelated (-)-muricatacin mimics". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**: 5182-5185, 2008.
- REYMOND, J. L.; VAN DEURSEN, R.; BLUM, L. C.; RUDDIGKEIT, L. "Chemical space as source for new drugs". *Med. Chem. Commun.*, **1**: 30-38, 2010.
- SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. A.; ROMANHA, A. J.; ALVES, T. M. A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; COSTA, F. B.; CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEONI, L. L.; LOPES, N. P.; AMORIM, R. C. N.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; SOEIRO, M. N. C.; STEINDEL, M.; TEMPONE, A. G. "The potential of secondary metabolites from plants as drug leads against protozoan neglected diseases – Part II". *Curr. Med. Chem.*, **19**: 2176-2228, 2012.
- SHEIKH, A. S. "Comparative perspective and synthetic applications of transition metal mediated oxidative cyclisation of 1,5-dienes towards *cis*-2,5-disubstituted tetrahydrofurans". *Org. Biomol. Chem.*, **12**: 9492-9504, 2014.
- SRECO, B.; BENEDEKOVIC, G.; POPSAVIN, M.; HADZIC, P.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G.; DIVJAKOVIC, V.; POPSAVIN, V. "Heteroannelated (+)-muricatacin mimics: synthesis, antiproliferative properties and structure-activity relationships". *Tetrahedron*, **67**: 9358-9367, 2011.
- STEINBACH, T.; WAHLEN, C.; WURM, F. R. "Poly(phosphonate)-mediated Horner-Wadsworth-Emmons reactions". *Polym. Chem.*, **6**: 1192-1202, 2015.
- STRAND, D.; REIN, T. "Total synthesis of pyranicin". *Org. Lett.*, **7** (2): 199-202, 2005.
- STRASSNER, T.; BUSOLD, M. "A density functional theory study on the mechanism of the permanganate oxidation of substituted alkenes". *J. Org. Chem.*, **66**: 672-676, 2001.
- TAKAHASHI, S.; HONGO, Y.; OGAWA, N.; KOSHINO, H.; NAKATA, T. "Convergent synthesis of pyragonacin". *J. Org. Chem.*, **71**: 6305-6308, 2006.
- TAKAHASHI, S.; HONGO, Y.; TSUKAGOSHI, Y.; KOSHINO, H. "Structural determination of montanacin D by total synthesis". *Org. Lett.*, **10** (19): 4223-4226, 2008.
- TAKAHASHI, S.; KUBOTA, A.; NAKATA, T. "Total synthesis of muconin". *Tetrahedron Lett.*, **43**: 8661-8664, 2002.
- TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, R.; HONGO, Y.; KOSHINO, H.; YAMAGUCHI, K.; MIYAG, T. "Synthesis of all possible isomers corresponding to the proposed structure of montanacin E, and their antitumor activity". *J. Org. Chem.*, **74**: 6382-6385, 2009.

- XIAO, Q.; LIU, Y, QIU, Y.; ZHOU, G.; MAO, C.; LI, Z.; YAO, Z. J.; JIANG, S. "Potent antitumor mimetics of annonaceous acetogenins embedded with an aromatic moiety in the left hydrocarbon chain part". *J. Med. Chem.*, **54**: 525-533, 2011a.
- XIAO, Q.; LIU, Y, QIU, Y.; YAO, Z.; ZHOU, G.; YAO, Z. J.; JIANG, S. "Desing, synthesis of symmetrical bivalents mimetics of annonaceous acetogenins and their cytotoxicities". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**: 3613-3615, 2011b.
- WALBA, D. M.; WAND, M. D.; WILKES, M. C. "Stereochemistry of the permanaganate oxidation of 1,5-dienes". *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (15): 4396-4397, 1979.
- WEI, X.; LORENZ, J. C.; KAPADIA, S.; SAHA, A.; HADDAD, N.; BUSACCA, C. A.; SENANAYAKE, C. H. "Tandem Pd(II)-catalyzed vinyl ether exchange-Claisen rearrangement as a facile approach to  $\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes". *J. Org. Chem.*, **72**: 4250-4253, 2006.
- YABUNAKA, H.; ABE, M.; KENMOCHI, A.; HAMADA, T.; NISHIOKA, T.; MIYOSHI, H. "Synthesis and inhibitory activity of ubiquinone-acetogenin hybrid inhibitor with bovine mitochondrial complex I". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**: 2385-2388, 2003.
- YAO, Z. J.; WU, H. P.; WU, Y. L. "Polyether mimics of naturally occurring cytotoxic annonaceous acetogenins". *J. Med. Chem.*, **43**: 2484-2487, 2000.
- ZENG, B. B.; WU, Y.; YU, Q.; WU, Y. L.; LI, Y.; CHEN, X. G. "Enantiopure simple analogues of annonaceous acetogenins with remarkable selective cytotoxicity towards tumor cell lines". *Angw. Chem. Int. Ed.*, 39 (11): 1934-1937, 2000.
- ZHAO, Q.; SUN, J.; LI, F.; HE, J.; LIU, B. "Mechanism and kinetics of Horner-Wadsworth-Emmons reaction in liquid-liquid phase-transfer catalytic system". *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **400**: 111-120, 2015.

## **CAPÍTULO III**

**Desenvolvimento de processos de nanoencapsulação para controle do fungo *Leucoagaricus gongylophorus***

## **1 – INTRODUÇÃO**

### **1.1 – Nanomateriais como sistemas de liberação controlada de princípio ativo**

Recentemente, aplicações de nanotecnologia têm atraído especial interesse dos pesquisadores. A nanotecnologia é hoje de extrema relevância na área de medicina terapêutica, mas também é aplicada nas indústrias química, cosmética, alimentícia, de eletrônicos, na agricultura e nas ciências forense e espacial (CHOI *et al.*, 2008; GOLDBERG *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2007; MADENE *et al.*, 2006; WISCHKE E SCHEWNDERMAN, 2008)

A interdisciplinaridade da nanobiotecnologia, que envolve química, biologia, engenharia e medicina, está revolucionando o desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada de drogas (GOLDBERG *et al.*, 2007; NISHIYAMA e KATAOKA, 2006).

Diversos sistemas poliméricos carreadores de princípios ativos como conjugados princípio-polímero e micelas poliméricas tem provado serem eficientes na liberação controlada de drogas e várias formulações têm sido estudadas no âmbito biológico (NISHIYAMA e KATAOKA, 2006).

### **1.2 – Nanopartículas poliméricas**

A nanoencapsulação é a tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos com finas camadas poliméricas formando pequenas partículas denominadas micro ou nanocápsulas com várias propriedades (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

O polímero age como um filme protetor, isolando o núcleo das esferas e prevenindo dos efeitos provenientes da inadequada exposição do princípio ativo. Essa membrana se desfaz sob estímulos específicos liberando o princípio ativo em condições e local ideais (SILVA *et al.*, 2014a). Essa propriedade de liberação controlada é a principal motivação para os estudos e desenvolvimento desses sistemas carreadores principalmente na administração de fármacos (BHUJBAL *et al.*, 2014).

No campo dos produtos naturais, a nanoencapsulação aumenta a solubilidade de metabólitos secundários ou extratos vegetais em água e permite que os princípios ativos alcancem o sitio de ação uma vez que os protege da degradação. Além disso, ao utilizar polímeros biodegradáveis não gera contaminação do meio ambiente (SILVA *et al.*, 2014b).

O emprego de nanotecnologia que traz benefícios para a agricultura inclui a encapsulação de pesticidas em nanomateriais, fertilizantes, biofertilizantes e micronutrientes, além disso, as nanopartículas podem ser usadas como biomarcadores para detecção de patógenos em plantas, como biosensores para a detecção de resíduos de pesticidas e da conservação do solo, e ainda na engenharia genética (GOGOS *et al.*, 2012; KHOT *et al.*, 2012).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ . O termo nanopartícula é utilizado para ambos, nanocápsulas e nanoesferas que diferem entre si pela composição e organização estrutural. A nanoesfera é uma matriz polimérica onde o princípio ativo pode estar adsorvido nessa matriz. A nanocápsula é um sistema vesicular composto por um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica em que o princípio ativo pode estar dissolvido nesse núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; PADILLA *et al.*, 2014; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003;). O desempenho das nanopartículas na liberação controlada do princípio ativo depende de suas propriedades físico-químicas como composição, tamanho, morfologia, carga e estado físico (ARRUDA *et al.*, 2015; GALINDO-RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

A caracterização das nanopartículas envolve determinação da eficiência de encapsulamento (teor de princípio ativo encapsulado), da recuperação absoluta (teor total de princípio ativo), pH das suspensões, potencial zeta, diâmetro e polidispersividade das nanopartículas, análise morfológica, rendimento de produto seco por aspersão em *Spray-Drier*, perfil de cinética de liberação do princípio ativo e estabilidade frente à radiação UV e temperatura.

Para o preparo das nanopartículas, vários métodos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas e são classificados de acordo com a forma como a formação da partícula ocorre, via reação de polimerização ou a partir de uma macromolécula ou polímero pré-formado. No primeiro caso, os métodos podem ainda ser classificados em emulsão-polimerização, polimerização interfacial e policondensação interfacial, enquanto os métodos que partem de polímeros pré-formados podem ser classificados



como emulsificação/evaporação do solvente, deslocamento de solvente e deposição interfacial, emulsificação/difusão do solvente e *salting out* com polímeros sintéticos (REIS *et al.*, 2006).

Diversos trabalhos de nanoencapsulação de produtos de origem natural já foram relatados na literatura. Uma grande quantidade de óleos essenciais (terpenos puros ou em mistura) de plantas já foram submetidos à trabalhos de nanoencapsulação (ALSHAMSAN, 2014; CHRISTOFOLI *et al.*, 2015; DONSI *et al.*, 2011; 2012). Há ainda relatos de pesquisas com substâncias de alta polaridade como polifênóis, flavonoides e derivados do ácido cinâmico, além de alcalóides, peptídeos e proteínas (AHMED *et al.*, 2012; FANG *et al.*, 2010; HERCULANO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2012; LOCH-NECKEL *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2006; YADAV *et al.*, 2011). Diante da dificuldade de obtenção, em quantidade significativa, de princípios ativos naturais para desenvolvimento de trabalhos de nanoencapsulação, pesquisas mais recentes envolvem o nanoencapsulamento de extratos brutos de partes vegetais (FORIM *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014b).

Nessa perspectiva, o grupo de pesquisa de Produtos Naturais – UFSCar vem desenvolvendo estudos que envolvem o nanoencapsulamento de produtos naturais para controle de pragas com resultados significativos (CARVALHO *et al.*, 2015; CAZAL *et al.*, 2014; CAZO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2014; FORIM *et al.*, 2013; PUHL *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2015). Seguindo essa linha, e resultados apresentados nos capítulos anteriores, foi proposto a utilização de substâncias biologicamente ativas isoladas e/ou identificadas da espécie *Annona mucosa*, alvo de estudo da presente tese, como princípio ativo para desenvolvimento de trabalho de nanoencapsulação.

O isolamento de lignanas furofurânicas de frações de *Annona mucosa*, ativas frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus*, confirmou estudos anteriores sobre o potencial fungicida dessa classe de compostos. Assim, foi proposto o desenvolvimento de nanoformulações destas lignanas (PAGNOCCA *et al.*, 1996).

Diante da pouca quantidade das substâncias isoladas, escolheu-se lignana furofurânica sesamina, a qual já foi comprovada seu potencial fungicida frente ao fungo simbiote em que esta substância inibiu o crescimento micelial do fungo em 74% a 282 µM e, sendo o componente principal do óleo das sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), era fácil sua obtenção em grande quantidade (BICALHO *et al.*, 2012; DAR *et al.*, 2015).

## **2 – OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo geral formular e aperfeiçoar processos e parâmetros para o nanoencapsulamento de sesamina baseado num planejamento fatorial  $2^3$  para posterior aplicação no controle do fungo *L. gongylophorus*, simbiote das formigas cortadeiras.

Os objetivos específicos são:

**a)** Isolamento em grande quantidade e caracterização da sesamina a partir do óleo de gergelim (*S. indicum*).

**b)** Desenvolvimento, otimização e validação de métodos de análises da sesamina formulada por CLAE.

**c)** Desenvolvimento de formulações para o preparo de suspensões coloidais de nanopartículas carregadas com a sesamina através do emprego de planejamento fatorial.

**d)** Caracterização físico-química das nanopartículas a fim de se obter as formulações com melhores propriedades

### **3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

#### **3.1 – Materiais**

##### Material cromatográfico

Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) usando folhas de alumínio com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, com 0,2 mm de espessura da Merck.

##### Solventes

Solventes comerciais grau P.A. destilados no Departamento de Química da UFSCar;  
Solventes grau CLAE da PANREAC e da J. T. BAKER;  
Solvente deuterado CDCl<sub>3</sub> com 99,8% de deutério ALDRICH CHEMICAL COMPANY.  
Água ultra pura proveniente de sistema de filtragem e osmose reversa (0,08 µS) obtida através de equipamento modelo Master System – Gehaka.

##### Reveladores

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

##### Outros materiais

Polímero PCL (poli- $\epsilon$ -caprolactona) e Span<sup>®</sup> 60 da marca Sigma-Aldrich;  
Polímero lignina fornecido pela empresa Suzano Papel e Celulose;  
Tween<sup>®</sup> 80 e Oleato de isodecila da marca Delaware;  
Filtros PVDF da marca CHROMAFIL<sup>®</sup> diâmetro de 25 mm e poro de 0.20 µm;  
Filtros estéreis Corning Incorporated, modelo Costar Spin-X, com volume de 2,0 mL e filtro de acetato de celulose com porosidade 0,22 µm;  
Membrana de diálise de celulose Sigma Aldrich, largura de 25 mm;  
Dióxido de silício coloidal da marca Delaware, Aerosil<sup>®</sup> 200.

## **3.2 – Equipamentos**

### Evaporadores rotatórios

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

### Balança analítica

Bel Engineering Mod. Mark 210A

### Chapa de aquecimento

Chapa de aquecimento com agitação magnética da marca Ika, modelo RT10 Power Ikamag®, com 10 pontos de agitação e aquecimento.

### Centrífuga

Centrífuga Eppendorf 5810R.

### Agitador de tubos

Vórtex PHOENIX AP56.

### Pipetas automáticas

Conjunto de micropipetas Eppendorf, modelo Research, faixa de volumes 1-1000 µL;

### Spray-Drier

Mini *Spray-Drier* marca Büchi, modelo B-290.

### Potenciômetro

Medidor de pH Metrohm, modelo 827, eletrodo Pt 1000;

### Speed-vac

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

Polarímetro

Polarímetro Schmidt – Haensch, modelo Polatronic H100, utilizando célula de quartzo de 1 dm de largura à 23 °C.

Câmara de UV

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

Potencial Zeta/Diâmetro de Partícula

Nano ZetaSizer da Malvern Instruments, modelo ZEN3600.

Ultra-turrax

Ultra-turrax® IKA T 10 basic

Bomba Peristáltica

Bomba TPM 600 55 RPM, Watson-Marlow, Wilmington, UK.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Philips XL 30 FEG, 30 kV, resolução máxima de 2 nm.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

EI Tecnai G2 F20 HRTEM, Modo STEM BF-DF, abertura 3, SPOT 8, 200 kV

Cromatógrafo para cromatografia líquida de alta eficiência

Agilent Technologies modelo 1260 equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329B e detector Ultra Violeta G1314B e compartimento termostaticado de coluna G1316A. Os cromatogramas foram registrados no software OpenLab versão A.01.02.

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

BRUKER AVANCE™ III NanoBay 9,4 T (400 MHz para RMN <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN <sup>13</sup>C) – DQ-UFSCar.

### **3.3 – Nanoformulações de sesamina**

#### **3.3.1 – Isolamento da lignana sesamina**

A sesamina foi isolada a partir do óleo comercial das sementes de gergelim prensadas a frio, marca Sesamo Real, obtido no Mercado Municipal de Campinas. Foi utilizado um total de 1 L de óleo.

O óleo foi dividido em quatro partes de 250 mL, em que cada parte foi extraída com 3 x 500 mL de mistura H<sub>2</sub>O:EtOH (1:3). As fases aquosas resultantes foram reunidas e concentradas à vácuo. O material resultante foi lavado com hexano gelado para remoção do excesso de óleo restante na amostra, obtendo-se um sólido amarelado.

Este sólido foi recristalizado por solubilização em MeOH à quente, com a solução sendo então mantida em freezer à 5 °C por 24 h. O solvente sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta de Pasteur, e o sólido seco em capela de exaustão, resultando em 2,2 g de sesamina, contendo pouca impureza de sesamolina.

#### **3.3.2 – Análise cromatográfica, construção da curva analítica e validação do método para análise de sesamina por CLAE**

A amostra obtida no item 3.3.1 foi submetida à análise cromatográfica em gradiente exploratório para avaliação da pureza. Para as futuras análises do processo de nanoencapsulamento vários ajustes foram feitos no método utilizado no CLAE, para se obter a melhor seletividade, sensibilidade e tempo de análise. A Tabela 3.1 descreve os parâmetros avaliados.

**Tabela 3.1** – Métodos analíticos empregados para análise de sesamina.

<b>Método</b>	<b>Coluna</b>	<b>Condições analíticas</b>	<b>Tempo da corrida</b>
Gradiente exploratório	C18 Luna Phenomenex 10 µm (0,46 x 25 cm)	MeOH:H <sub>2</sub> O 10-90%, 1,0 mL/min, 254 nm	65 min
Isocrático	C18 Gemini Phenomenex 5 µm (0,46 x 15 cm)	MeOH:H <sub>2</sub> O 8:2; 1,0 mL/min, 285 nm	10 min

O método foi validado após a investigação da faixa linear de trabalho, seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão, limite de quantificação e de detecção, repetibilidade e estabilidade do injetor.

A faixa linear de trabalho foi estabelecida entre 1 e 100 µg/mL. Inicialmente foi preparada uma solução estoque (1000 µg/mL) pela diluição de 10,0 mg de sesamina em 10 mL de MeOH, que posteriormente foi diluída para a solução de trabalho (100 µg/mL, 10 mL). A partir dessa solução de trabalho foram preparadas soluções de análise em 11 concentrações diferentes: 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100 µg/mL. Todos os pontos da curva de calibração foram preparados em triplicata.

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, sendo:

O Limite de Detecção foi expresso como  $LD = 3,3*(s/a)$

O Limite de Quantificação foi expresso como  $LQ = 10*(s/a)$

Onde:

$s$  = Desvio padrão do intercepto,

$a$  = Coeficiente angular da curva de calibração

Para verificar a precisão e exatidão do método foram preparadas três soluções de sesamina 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 ( $n = 5$ ), e preparadas e analisadas em três dias não consecutivos para verificação da precisão inter-dias ( $n = 15$ ). 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%.

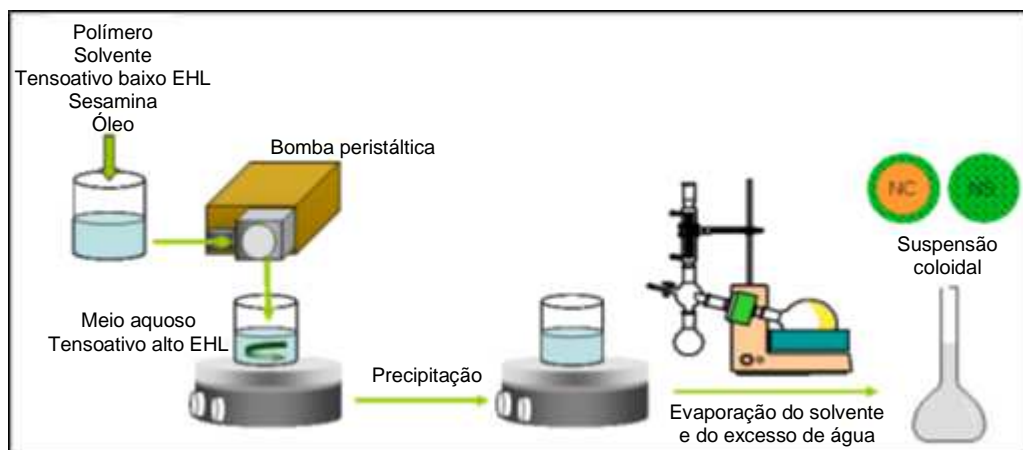
Para avaliação da repetibilidade do injetor, foi preparada uma amostra de 95 µg/mL e esta foi injetada 10 vezes seguidas, nas mesmas condições e então calculado o desvio padrão  $s(X)$  e o coeficiente de variação CV(%), a precisão e a exatidão.

Para avaliar a estabilidade do injetor, foi preparada uma amostra de 95 µg/mL e esta foi injetada 10 vezes em intervalos de 24 h 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.

### 3.3.3 – Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> e preparo das nanoformulações de sesamina

Para o preparo das nanoformulações foi empregado o método de nanoprecipitação: deposição interfacial de um polímero pré-formado baseado na técnica de deslocamento de solvente descrita por FESSI *et al.*, 1989 e adaptada para produtos naturais por FORIM *et al.*, 2013.

Inicialmente foi preparada uma fase orgânica contendo o biopolímero, a sesamina, o oleato de isodecila, o Span<sup>®</sup> 60 (tensoativo de baixo EHL) e acetona como solvente orgânico e uma fase aquosa contendo água e Tween<sup>®</sup> 80 (tensoativo de elevado EHL). Essas duas soluções foram agitadas à 45 °C por 20 min, quando a fase orgânica foi vertida na fase aquosa gota a gota, sob agitação magnética constante. A mistura resultante foi agitada à esta mesma temperatura por mais 15 min. Quando, foi então, deixada em repouso por 30 min. Na sequência, a acetona e parte da água foram eliminados via um evaporador rotativo a 45 °C ajustando o volume final da suspensão coloidal para 50 mL.



**Figura 3.1** – Representação esquemática do preparo das nanoformulações.



Para avaliar as melhores proporções de cada componente da nanoformulação, foi realizado um planejamento experimental com o objetivo de se conseguir o máximo de informações a partir da variação de componentes-chave da nanoformulação e o quanto cada um destes componentes influencia nas propriedades físico-químicas das nanoformulações.

Em um planejamento fatorial, cada componente alterado é uma variável e está modificada em quantidade de níveis. O número de experimentos a ser realizado é calculado pela expressão  $N^k$ , onde  $N$  é o número de níveis e  $k$  o número de variáveis. Para o presente trabalho foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  centrado na média e foram selecionadas as variáveis tipo, quantidade de biopolímero e quantidade de óleo conforme Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** – Variáveis e níveis para o planejamento fatorial e variáveis fixadas.

<b>Variáveis independentes</b>	<b>(-1)</b>	<b>0</b>	<b>(+1)</b>
<b><math>X_1</math>, Quantidade de polímero (mg)</b>	100	87,5 : 87,5	250
<b><math>X_2</math>, Tipo de polímero</b>	PCL	PCL : Lignina (1:1)	Lignina
<b><math>X_3</math>, Quantidade de óleo (mg)</b>	Ø	155	310
<b>Variáveis fixadas</b>			
<b>Volume de acetona</b>		26,5 mL	
<b>Span<sup>®</sup> 60</b>		76,5 mg	
<b>Volume de fase aquosa</b>		53 mL	
<b>Tween<sup>®</sup> 80</b>		76,5 mg	

O planejamento fatorial  $2^3$  centrado na média foi executado com um total de 11 experimentos, sendo três utilizados para investigação da reprodutibilidade da técnica de nanoencapsulamento, avaliada pelo desvio padrão dos experimentos, ou seja, pelos ensaios 9 a 11 descritos na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> centrado na média.

Ensaio	Variáveis		
	Qtidade de polímero	Tipo de polímero	Qtidade de óleo
NF1	-1	-1	-1
NF2	+1	-1	-1
NF3	-1	+1	-1
NF4	+1	+1	-1
NF5	-1	-1	+1
NF6	+1	-1	+1
NF7	-1	+1	+1
NF8	+1	+1	+1
NF9	0	0	0
NF10	0	0	0
NF11	0	0	0

### 3.3.4 – Preparo dos produtos secos por aspersão

As nanoformulações foram secas pelo método da secagem por aspersão (Mini *Spray-Dryer* Büchi B290) utilizando como suporte de secagem o dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200).

Inicialmente foi preparada uma solução da nanoformulação e aerosil à 2,0% (m/v), ou seja 1 g de aerosil para 50 mL de nanofromulação. A mistura foi então agitada em Ultra-turrax IKA T-10 Basic por 30 s. A solução foi então seca no mini *Spray-Drier*, conforme parâmetros apresentados na Tabela 3.4. A Figura 3.2 ilustra o processo.

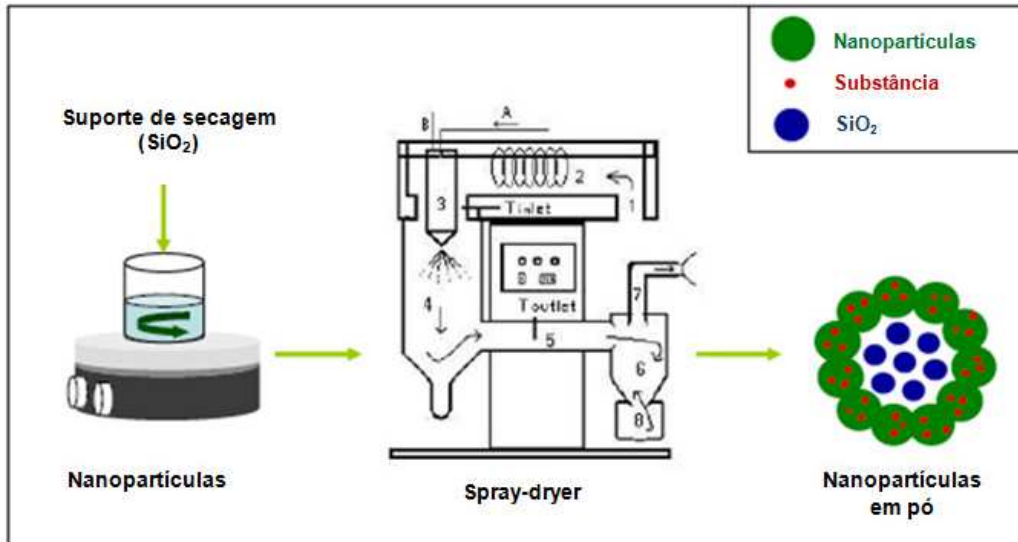


Figura 3.2 – Representação esquemática do preparo de micropartículas em pó.

Tabela 3.4 – Parâmetros operacionais mini *Spray-Drier*.

Parâmetros	Valor
Fluxo de alimentação	4 mL/min
Fluxo de ar quente	530 L/h
Pressão do ar comprimido	0,55 bar
Temperatura de entrada do ar de secagem	110 °C ± 5 °C
Temperatura de saída do ar de secagem	50 °C ± 5 °C
Diâmetro do atomizador	0,7 mm
Sistema de aspiração	90% (36 m <sup>3</sup> /h)

### 3.3.5 – Quantificação e caracterização físico-química nas nanopartículas

#### 3.3.5.1 - Determinação da quantidade total de sesamina – Recuperação absoluta

A quantificação do teor total de sesamina nas suspensões coloidais foi feita mediante dissolução nas nanopartículas em acetonitrila com liberação do composto e análise por CLAE. Inicialmente, 100 µL de suspensão coloidal foi diluída para 1 mL com adição de 900 µL de acetonitrila em tubo eppendorf. A mistura foi agitada em

vortex por 30 s, deixada em repouso por 1 h, centrifugada à 25 °C e 20.800 g por mais 1 h. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf e seco em speed-vac à 45 °C, ressuspendido em 500 µL de MeOH, filtrado e analisado por CLAE. Cada suspensão coloidal foi analisada em triplicata (n = 3).

### **3.3.5.2 – Determinação da eficiência de encapsulamento de sesamina**

Para avaliar o teor de sesamina encapsulada foi necessário quantificar o teor de sesamina livre no meio de dispersão utilizando a técnica de filtração-centrifugação. Para tanto foi adicionado 500 µL da suspensão coloidal ao tubo *spin* contendo o filtro de membrana de acetato de celulose com poros de 0,22 µm e este foi centrifugado por 40 min à 25 °C e 20800 g. Neste procedimento as nanopartículas foram retidas pela membrana, enquanto o meio dispersante, a fase aquosa, contendo a sesamina não encapsulada, foi filtrado. Em seguida, 200 µL do filtrado foi transferido para um tubo eppendorf, seco em speed-vac à 45 °C, ressuspendido em 200 µL de MeOH, filtrado e analisado por CLAE. Cada suspensão coloidal foi analisada em triplicata (n = 3). Consequentemente, a eficiência de encapsulamento (EE%), em porcentagem, pode ser determinada pela diferença entre a quantidade de substância total na suspensão coloidal e a quantidade de substância livre no meio de dispersão através do uso da seguinte equação:

$$EE (\%) = \frac{(B - A)}{B} * 100$$

Onde A é a concentração de sesamina no ultrafiltrado (µg/mL) e B é a concentração total (µg/mL) obtida no item 3.3.5.1.

### **3.3.5.3 – Determinação do pH**

Os valores de pH das suspensões foram determinados diretamente nas suspensões através do potenciômetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0; 7,0 e 9,0. O pH foi medido imediatamente após o preparo e durante 4 meses num intervalo de 7 dias para avaliação da estabilidade das suspensões. Os resultados representam a média de três primeiras medidas.

#### **3.3.5.4 – Diâmetro médio/Potencial zeta das nanopartículas**

O diâmetro médio das nanopartículas e potencial zeta foram determinados em Nano ZetaSizer da Malvern Instruments, modelo ZEN3600. Para o diâmetro médio, 15 µL da suspensão coloidal foi diluída sobre 1,5 mL de água ultra pura e submetidas á análise. Para o potencial zeta, 800 µL da suspensão foi analisada diretamente. As medidas foram feitas em triplicata. Foi obtida também, a polidispersividade das nanopartículas.

#### **3.3.5.5 – Morfologia**

Para avaliar a homogeneidade e morfologia das nanopartículas foram realizadas análises de MEV com nanopartículas secas e análises de MET com nanopartículas em suspensão. Para as análises de MEV, as nanopartículas em suspensão foram evaporadas diretamente em suportes metálicos, previamente limpos e polidos com pasta de diamante enquanto as nanopartículas na forma de pó foram depositadas em fitas de carbono dupla face e esta afixada no mesmo suporte metálico. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com uma camada de ouro. Para as análises de MET, as nanopartículas em suspensão foram evaporadas diretamente sobre uma grade de cobre. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento De Engenharia de Materiais/UFSCAR.

#### **3.3.6 – Estudo de cinética de liberação**

O estudo do perfil de liberação *in vitro* da sesamina a partir das nanocápsulas foi realizado através da técnica de diálise. Para tanto, 1 mL de suspensão de nanopartícula contendo sesamina foi colocada dentro da membrana de celulose de 10 cm cada, previamente tratada para remoção do glicerol. Cada amostra foi mantida dentro da membrana, vedando-se as pontas da mesma com barbante para impedir a perda de material e as membranas foram então imersas em um sistema com entrada e saída de meio dispersante, solução tampão pH 5,3. Este meio dispersante foi bombeado para o sistema com auxílio de uma bomba peristáltica à um fluxo de 3 mL/min e foi composto por solução tampão fosfato de pH 5,3. O sistema foi mantido sob agitação magnética à 40 °C. Em intervalos de tempo de 0; 1,5; 6; 12; 24; 36 e 48

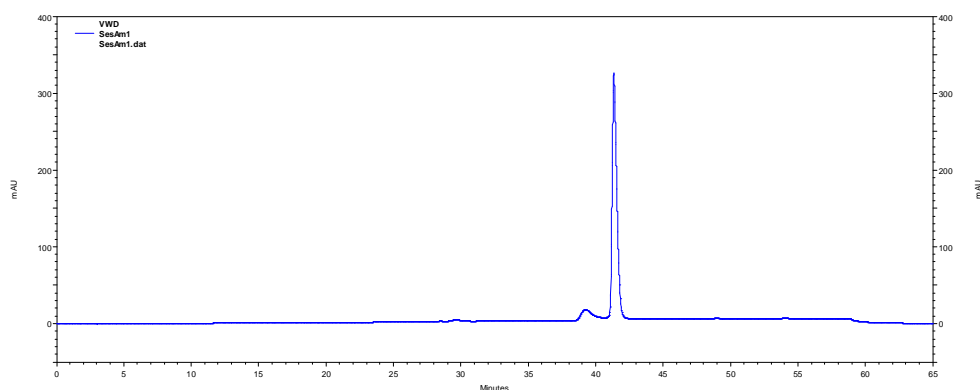
h foram retirados 3 membranas do sistema, e seus conteúdos analisados, quanto ao teor total de sesamina, por CLAE. O teor de sesamina no tempo 0 h foi considerado como 100%, ou seja 0% de liberação, e os demais pontos calculados em relação à este valor.

Para o tratamento prévio da membrana de diálise, foram separados tubos de 10 cm, deixados de molho em água destilada por 12 h, posteriormente lavados com água destilada à 60 °C por 2 min, seguido por uma lavagem à 100 °C em 500 mL de solução 5 mM de NaHCO<sub>3</sub> por 5 min, novamente fervidos em 500 mL de solução 5 mM de EDTA por 5 min, e por último fervidos em 500 mL de água ultra pura por 5 min. A membrana tratada foi mantida imersa em água em freezer para uso.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

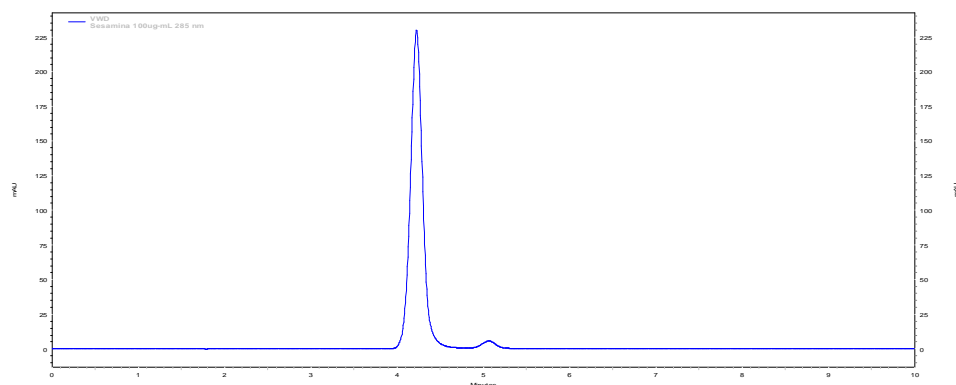
### 4.1 – Análise cromatográfica e identificação espectroscópica de sesamina

No cromatograma obtido por CLAE em gradiente exploratório da amostra de sesamina foi verificada a presença de uma segunda banda na proporção 9:1 (Figuras 4.1 e 4.2). Estudos fitoquímicos anteriores das sementes de gergelim reportam a presença de 16 diferentes lignanas presentes, sendo as majoritárias, a sesamina e a sesamolina (DAR e ARUMUGAM, 2013). No presente trabalho, decidiu-se proceder com essa amostra para desenvolvimento e validação do método para as futuras análises do processo de nanoencapsulamento.



**Figura 4.1** – Análise por CLAE método gradiente exploratório da amostra de sesamina a ser encapsulada.

*Condições:* Coluna C18 Phenomenex Luna 10  $\mu\text{m}$  ( $\phi = 0,46$  cm,  $h = 25$  cm), eluição gradiente MeOH:H<sub>2</sub>O 10-90%, fluxo 1,0 mL/min,  $\lambda=254$  nm.



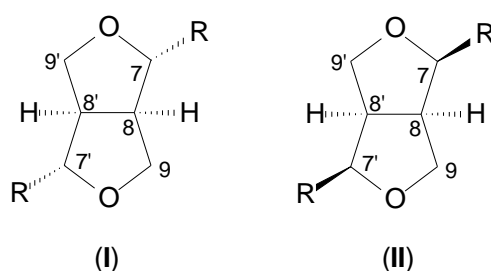
**Figura 4.2** – Análise por CLAE método isocrático da amostra de sesamina a ser encapsulada.

*Condições:* C18 Gemini Phenomenex 5  $\mu\text{m}$  (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH:H<sub>2</sub>O 8:2, fluxo 1,0 mL/min,  $\lambda = 285$  nm.

Embora os cromatogramas apresentados mostram a presença de impureza na amostra de sesamina, as análises por RMN de  $^1\text{H}$  indicaram um grau de pureza suficiente para desenvolvimento do processo de nanoencapsulação com essa amostra sem purificação extra.

Por ser a sesamina uma lignana furofurânica bem conhecida na literatura, esta foi identificada por dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com a literatura (WANG *et al.*, 2009).

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , foram observados os seguintes sinais:  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (*d*,  $J = 4,4$  Hz, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  4,24 (*dd*,  $J = 7,2; 9,3$  Hz, 2H);  $\delta_{\text{H}}$  3,88 (*dd*,  $J = 3,8; 9,3$  Hz, 2H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,07-3,04 (*m*, 2H) (Tabela 4.1). Esses sinais, com esses valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e integração caracterizam sistemas furofurânicos presentes em muitas lignanas (SEO, 2010). Onde os sinais descritos podem ser atribuídos da seguinte forma: O hidrogênio H-7 acopla com o hidrogênio H-8, gerando um duplete com constante de acoplamento  $J = 4,4$  Hz,  $\delta_{\text{H}}$  4,72 (H-7). Os hidrogênios H-9 são diastereotópicos (H-9 $\alpha$  e H-9 $\beta$ ) e acoplam entre si com constante de acoplamento de 9,3 Hz. Esses hidrogênios, H-9 $\alpha$  e H-9 $\beta$ , também acoplam com H-8 com constantes de 3,8 e 7,2 Hz, respectivamente. O mesmo comportamento é observado para os hidrogênios (H-7', H-8' e H-9'). Com base nos valores de integração, observa-se que os hidrogênios H-X' apresentam valores idênticos aos respectivos H-X, indicando assim, total equivalência química entre esses hidrogênios, o que permite afirmar que a molécula é simétrica o que permite a existência dos isômeros diequatorial (I) e diaxial (II) (Figura 4.3).



**Figura 4.3** – Isômeros diequatorial (I) e diaxial (II) possíveis para as lignanas furofurânicas.

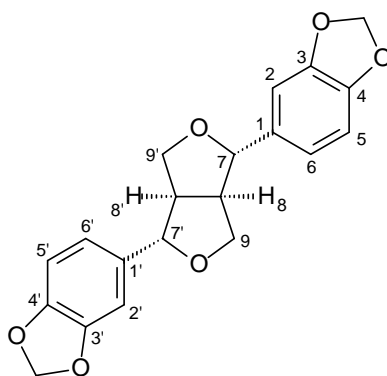
No isômero diaxial (II), o anel aromático em axial fica muito próximo do hidrogênio axial do grupo metilênico (H-9/H9') do anel furânico oposto a ele, assim os dois hidrogênios axiais da molécula aparecem na faixa de deslocamento entre  $\delta_{\text{H}}$  3,3-



3,7, devido ao efeito anisotrópico do anel. No isômero diequatorial (I), os prótons metilênicos equatoriais são desblindados devido à presença dos anéis aromáticos também em equatorial, e aparecem na faixa de deslocamento entre  $\delta_H$  4,2-4,4 (RUSSEL & FENEMORE, 1973). Como esses sinais foram observados em  $\delta_H$  4,24, concluiu-se que a sesamina isolada apresentava configuração diequatorial.

A observação, no espectro de RMN de  $^1H$ , de um simpleto em  $\delta_H$  5,96 integrado para 4 hidrogênios, e do multiplete em  $\delta_H$  6,86-6,77, integrado para 6 hidrogênios, reafirma a simetria da molécula, onde se tem como grupos -R, anéis aromáticos 3,4-substituídos por grupos metilenodióxi. A posição 3,4 de substituição destes grupos metilenodióxi, é determinada pelo caminho biossintético das lignanas (BAYINDIR *et al.*, 2008; DEWICK, 2002). Os deslocamentos químicos da molécula puderam ser atribuídos a partir dos experimentos de RMN de  $^{13}C$ , HSQC e HMBC e comparação com a literatura (WANG *et al.*, 2009).

Para determinar a configuração absoluta da sesamina, foi realizado experimento de  $\alpha_D$  onde se obteve o valor de  $\alpha_D = +78,89$  (*c* 0,45  $CHCl_3$ ), que comparando com a literatura,  $\alpha_D = +69,0$  ( $CHCl_3$ ) (WANG *et al.*, 2009) trata-se da (+)-sesamina.



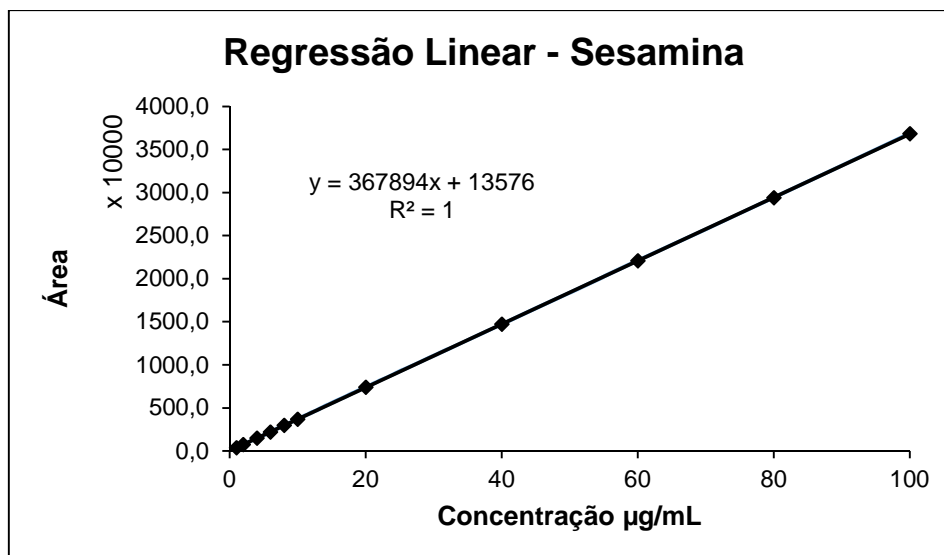
(+)-sesamina

**Tabela 4.1** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) da sesamina e comparação com a literatura (WANG *et al.*, 2009:  $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz para RMN de  $^1\text{H}$ / 150 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ).

H/C	$\delta_{\text{H}}$ (ppm), J (Hz)		$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	
	Sesamina	WANG <i>et al.</i> , 2009	Sesamina	WANG <i>et al.</i> , 2009
1/1'	-	-	135,0	135,2
2/2'	6,86-6,77 ( <i>m</i> )	6,77-6,84 ( <i>m</i> )	106,5	106,7
3/3'	-	-	147,9	148,1
4/4'	-	-	147,1	147,3
5/5'	6,86-6,77 ( <i>m</i> )	6,77-6,84 ( <i>m</i> )	108,2	108,4
6/6'	6,86-6,77 ( <i>m</i> )	6,77-6,84 ( <i>m</i> )	119,3	119,5
7/7'	4,72 ( <i>d</i> , 4,4)	4,71 ( <i>d</i> , 3,6)	85,8	85,9
8/8'	3,07-3,04 ( <i>m</i> )	3,04 ( <i>m</i> )	54,3	54,5
9ax/9'ax	3,88 ( <i>dd</i> , 3,8 e 9,3)	3,86 ( <i>dd</i> , 4,6 e 9,0)	71,7	71,9
9eq/9'eq	4,24 ( <i>dd</i> , 7,2 e 9,3)	4,22 ( <i>dd</i> , 6,6 e 9,0)	71,7	71,9
OCH <sub>2</sub> O	5,96 ( <i>s</i> )	5,94 ( <i>s</i> )	101,0	101,3

## 4.2 – Validação do método analítico para quantificação de sesamina por CLAE

A curva analítica para sesamina obtida através da regressão linear foi preparada utilizando 11 concentrações diferentes, sendo: 1,00; 2,00; 4,00; 6,00; 8,00; 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . A regressão linear obtida pela área em função da concentração está representada na Figura 4.6. A precisão e exatidão obtidas para cada concentração usada na construção da curva e calibração se encontram listadas na Tabela 4.2.



**Figura 4.4** – Curva de calibração para análise de sesamina. As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento Agilent 1260.

Condições: C18 Gemini Phenomenex 5 µm (0,46 x 15 cm), eluição isocrática MeOH:H<sub>2</sub>O 8:2, fluxo 1,0 mL/min, λ = 285 nm.

A curva de calibração ilustrada da Figura 4.4 mostra que o sinal analítico foi diretamente proporcional à concentração dentro da faixa de trabalho estabelecida, tornando possível a correlação entre a concentração de sesamina nas amostras padrão com a área dos picos nos cromatogramas. A faixa de trabalho foi descrita pela equação da reta  $y = 367894x + 13576$ , onde  $y$  é a área da banda cromatográfica e  $x$  é a concentração da sesamina na solução em µg/mL com coeficiente de correlação linear  $r^2 = 1$ .

**Tabela 4.2** – Precisão e exatidão da curva de calibração.

Concentração nominal (µg/mL)	Média das áreas (x10 <sup>4</sup> )	Desvio Padrão (n = 3) (x10 <sup>4</sup> )	DPR (%) (Precisão)	Exatidão (%)
1	3,78	0,188	0,5	99,04
2	75,32	0,918	1,2	100,52
4	148,73	0,558	0,4	100,15
6	220,26	2,721	1,2	99,17
8	296,33	1,198	0,0	100,22
10	369,62	6,767	0,2	100,10
20	740,67	69,365	0,9	100,48
40	1.470,11	1,264	0,1	99,81
60	2.208,95	11,518	0,5	100,01
80	2.941,23	42,240	0,1	99,89
100	3.683,23	85,307	0,2	100,08

A Tabela 4.3 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%. 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 4.3** – 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	4,96x10 <sup>15</sup>	4,96x10 <sup>15</sup>	1589418	1,98x10 <sup>-72</sup>	
Resíduo	30	9,37x10 <sup>10</sup>	3,12x10 <sup>9</sup>			
Total	31	4,96x10 <sup>15</sup>				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>
Interseção (a)	24527,67	13157,48	1,864162	0,072111	-2343,479	51398,83
Inclinação (b)	367874,5	291,7968	1260,721	1,98x10 <sup>-72</sup>	367278,6	368470,4

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) a assim calculados a exatidão e a precisão inter e intra-dia para cada ponto. Os resultados encontram-se na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** – Exatidão e precisão inter e intra dia para validação do método.

<b>Sesamina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Dia</b>	<b>Repetições</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Precisão [DPR (%)]</b>
<b>Varição Intra Dia (n = 5)</b>				
1,2	1	5	98,5	1,28
50	1	5	100,4	0,31
95	1	5	100,3	0,32
1,2	2	5	101,2	0,41
50	2	5	100,4	0,26
95	2	5	100,3	0,47
1,2	3	5	100,8	0,56
50	3	5	100,5	0,18
95	3	5	100,2	0,15
<b>Varição Inter Dia (n = 15)</b>				
1,2	-	15	100,1	1,43
50	-	15	100,4	0,24
95	-	15	100,2	0,32

Neste trabalho, o limite de detecção foi calculado de acordo com a relação sinal/ruído, sendo 10 e 3 vezes para o LQ e o LD foram estabelecidos em 0,08 e 0,4, respectivamente. O LQ encontrado foi menor que o primeiro ponto da curva de calibração (<1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) provando ser a curva linear, exata e precisa na faixa de trabalho.

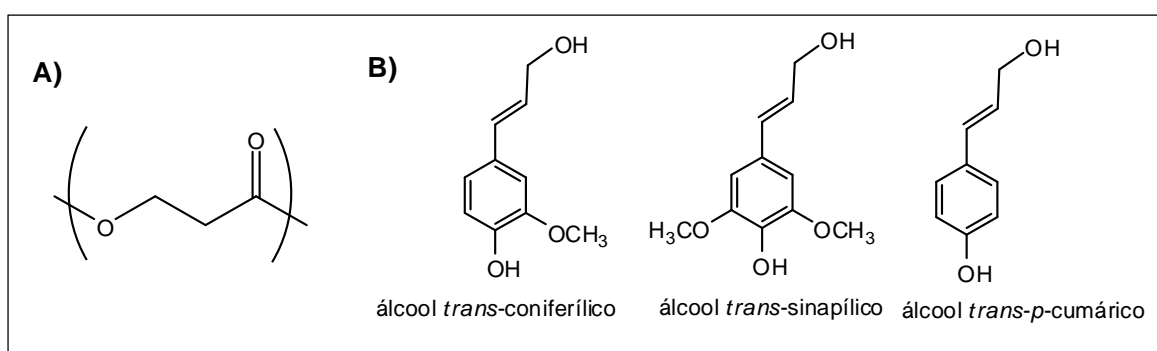
Para o estudo de reprodutibilidade do injetor, foram obtidos 101,6% de exatidão e um DPR de 0,0007% para precisão enquanto esses mesmos parâmetros para estudo de estabilidade do injetor foram de 101,7% e 0,001%, respectivamente.

### **4.3 – Quantificação e caracterização físico-química das nanopartículas**

Um sistema de nanopartículas poliméricas de sucesso deve ser aquele que possui alta carga de princípio ativo, o que reduz a quantidade de material a ser administrado para os fins biológicos. Tal feito pode ser alcançado de duas formas: incorporação do princípio ativo ao mesmo tempo da formação das nanopartículas, ou

absorção do princípio ativo após a formação das nanopartículas (KUMARI *et al.*, 2010). Para o presente trabalho, empregou-se o método de nanoprecipitação, que se encaixa no primeiro caso, incorporação do princípio ativo ao mesmo tempo da formação das nanopartículas. A formação das nanopartículas foi imediatamente verificada após a adição da fase orgânica sobre a aquosa, uma vez que todas as formulações apresentaram aspecto macroscópico homogêneo leitoso e opaco, que é resultado do efeito Tyndall, resultante da reflexão de luz pela formação das nanopartículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A escolha de PCL e lignina como polímeros para esta variável independente foi devido às propriedades destes. O PCL (Figura 4.5A) é um poliéster amplamente empregado no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos sendo biocompatível e biodisponível, de alta permeabilidade e baixa toxicidade (CHAWLA e AMIJI, 2002). A lignina por sua vez é uma macromolécula de composição química complexa, formada por unidades fenilpropanóides substituídas que são unidas por ligações carbono-carbono e ligações carbono oxigênio (Figura 4.5B) (FUKUSHIMA e HATFIELD, 2003). Ela é um resíduo produzido em larga escala pelas indústrias de papel e celulose, de origem natural, ou seja, não tóxico ao meio ambiente, biodegradável e termicamente estável. Outra variável independente foi a quantidade do óleo oleato de isodecila, uma vez que foram feitas nanocápsulas, que possuem um núcleo oleoso envolto por uma parede polimérica, e nanoesferas, que são compostas apenas da matriz polimérica.



**Figura 4.5** – Unidades monoméricas constituintes de PCL (A) e lignina (B).

Os parâmetros a serem avaliados na quantificação das nanopartículas são a eficiência e encapsulamento e teor total de sesamina nas suspensões e o rendimento do produto seco por aspersão, enquanto os parâmetros físico-químicos são o pH, potencial zeta, diâmetro de partícula e a polidisperssividade. A resposta de cada um

desses parâmetros é importante para avaliação da qualidade e estabilidade das nanopartículas, e são variáveis dependentes do planejamento fatorial, ou seja, sua resposta muda conforme altera-se alguma das variáveis independentes. A Tabela 4.5 descreve os resultados das variáveis dependentes resultantes das suspensões coloidais obtidas.

**Tabela 4.5** – Descrição das variáveis independentes e respostas das variáveis dependentes observadas para o planejamento fatorial.

Exp.	Variáveis independentes			Variáveis dependentes <sup>b</sup>						
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	EE (%)	RA (%)	pH	PZ (mV)	DP (nm)	Polid	PS (%)
NF1	-1	-1	-1	91,5	87,7	5,81	-41,07	185,60	0,140	36,1
NF2	+1	-1	-1	100,1	89,8	5,64	-45,87	210,30	0,118	30,4
NF3	-1	+1	-1	100,3	110,4	4,59	-47,13	167,60	0,127	42,2
NF4	+1	+1	-1	100,3	107,8	3,98	-47,07	315,00	0,382	37,8
NF5	-1	-1	+1	90,9	98,4	5,66	-41,37	250,80	0,194	38,9
NF6	+1	-1	+1	100,2	110,3	5,44	-44,67	335,80	0,258	31,8
NF7	-1	+1	+1	99,5	115,0	4,15	-48,80	379,60	0,513	47,6
NF8	+1	+1	+1	97,7	115,0	3,75	-50,03	341,00	0,584	38,4
NF9 <sup>a</sup>	0	0	0	100,3	95,80	4,22	-49,67	314,60	0,500	43
NF10 <sup>a</sup>	0	0	0	100,3	101,00	4,18	-49,67	253,20	0,401	39,2
NF11 <sup>a</sup>	0	0	0	100,2	98,20	4,19	-46,73	189,80	0,416	37,1

<sup>a</sup> indica o ponto central do planejamento fatorial; <sup>b</sup> réplica das análises representadas como média; EE (%): eficiência de encapsulamento; RA (%): recuperação absoluta; PZ: potencial zeta; DP: Diâmetro de partícula; Polid.: Polidispersividade; PS: rendimento do produto seco por aspersão

De forma geral, foram obtidos altos rendimentos de eficiência de encapsulamento e recuperação absoluta para todas as nanoformulações, com resultados variando entre 90,9-100,3% e 87,7-115,0%, respectivamente.

O pH das suspensões é um parâmetro que permite avaliar a estabilidade das nanopartículas uma vez que alterações do pH podem estar relacionadas com a degradação do polímero utilizado, ou de algum componente da formulação (GUTERRES *et al.*, 1995). Os resultados da Tabela 4.5 mostram que o pH das 11 nanoformulações feitas ficou na faixa entre 3,7 e 5,8, com valores de pH mais ácidos para as nanoformulações de lignina: NF3, NF4, NF7 e NF8, todas abaixo de 5,0. Isso se deve ao fato das ligninas serem resultado da polimerização de fenilpropanoides hidroxilados e/ou metoxilados o que lhe confere maior acidez em relação ao PCL que é um poliéster.

O diâmetro médio e a polidispersão das nanopartículas estão relacionados com o método de preparação e composição quali e quantitativa das mesmas. O principal fator de alteração do diâmetro médio das nanopartículas é o emprego ou não de óleo, ou seja, a diferença entre nanocápsulas e nanoesferas. No presente trabalho, foi possível observar, de forma geral, que as nanocápsulas (NF5, NF6, NF7 e NF8) apresentaram diâmetro médio na faixa de 250-379 nm, enquanto as nanoesferas apresentaram diâmetro médio na faixa 167-315 nm. Fica evidenciado assim, que o emprego de óleo nas nanoformulações aumenta o tamanho das partículas.

O potencial zeta reflete o potencial eletrostático na superfície das partículas que pode ser consequência da adsorção de estruturas iônicas da suspensão ou, da dissociação de grupos funcionais do polímero (MAGNHEIN e BENITA, 1991; MOSQUEIRA *et al.*, 2000). O potencial zeta é um indicativo da estabilidade das nanopartículas em suspensão coloidal e é considerado bom quando os valores são superiores a  $\pm 30$  mV (SILVA *et al.*, 2011). Pela análise dos dados da Tabela 4.5 podemos observar que todas as nanoformulações apresentaram bons resultados de potencial zeta, variando entre -41,70 e -50,03 mV.

Nanopartículas em suspensão não é o material mais adequado para transporte e armazenagem, isso por que, as suspensões são susceptíveis à liberação prematura do princípio ativo e contaminação por microorganismos. Além do fato de que, suspensões armazenadas por longo período de tempo podem sofrer decantação, agregação e perda da estabilidade físico-química das nanopartículas. Esses problemas podem ser contornados pela secagem das suspensões coloidais via



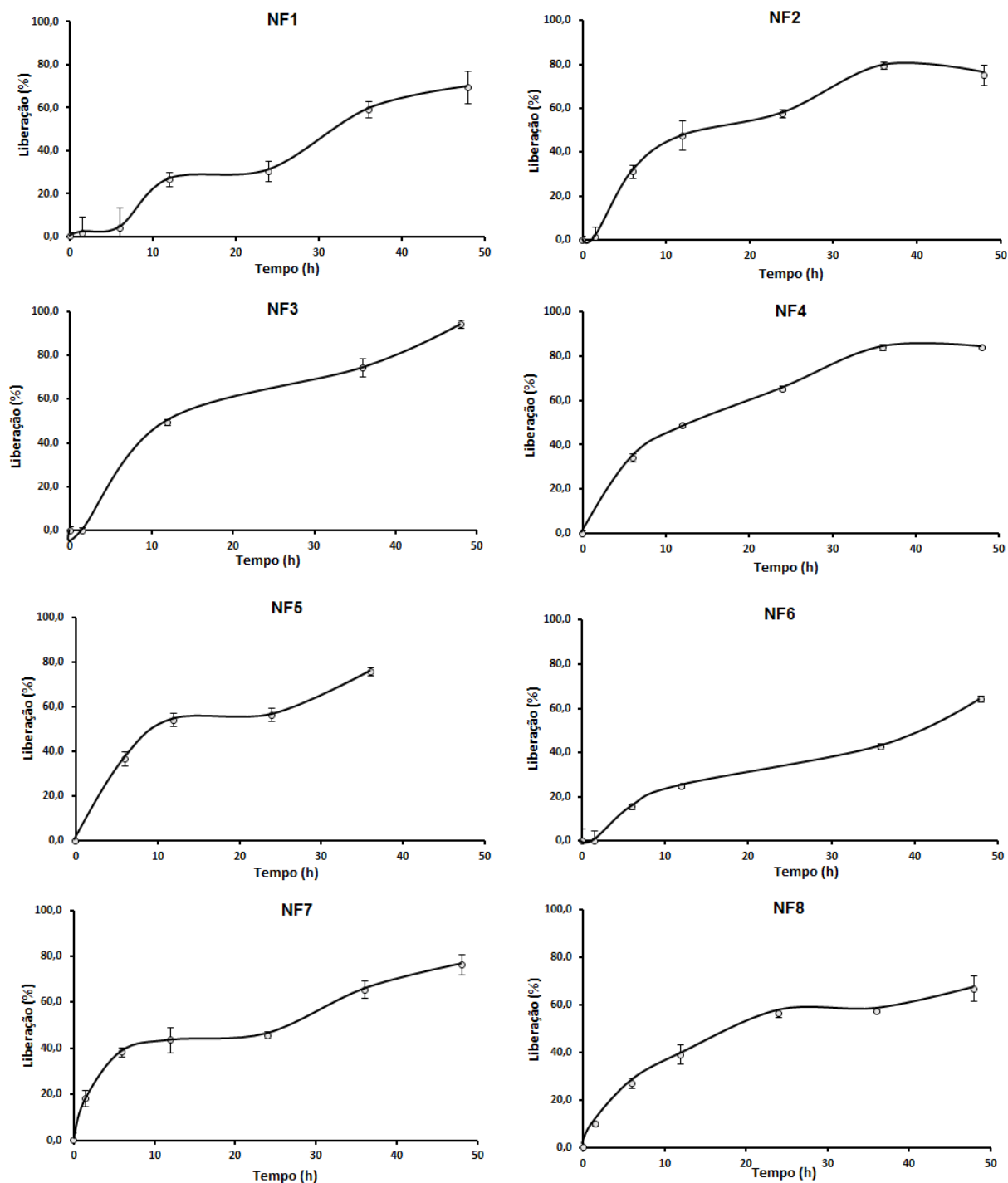
técnica de secagem por aspersão como, por exemplo, *Spray-Drier*, que resulta em um material seco de micropartículas (VEHRING *et al.*, 2007).

Os rendimentos para o produto seco por aspersão foram baixos para todas as nanoformulações, variando entre 30,4 e 47,6%, devido a perdas decorrentes da aglomeração de material na parede da câmara de secagem do *Spray-Drier*, quando operado sob as condições estabelecidas.

### **4.4 – Cinética de liberação das nanopartículas**

Os mecanismos e a taxa de liberação do princípio ativo são tanto importantes quanto as metodologias de formação de nanopartículas. Existem 5 possíveis mecanismos de liberação do princípio ativo: a) desorção do princípio ativo ligado à superfície das nanopartículas, b) difusão através da matriz da nanopartícula, c) difusão através da parede polimérica, d) erosão da matriz da nanopartícula, e) processos combinados de erosão-difusão (KUMARI *et al.*, 2010).

Em geral a taxa de liberação do princípio ativo depende da solubilidade, difusão e biodegradação dos componentes da nanoformulação. Mas também pode ser influenciado pela eficiência de encapsulamento, tamanho das nanopartículas, peso molecular do polímero, composição do núcleo da nanopartícula e a natureza do surfactante (KUMARI *et al.*, 2010; MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). Os perfis de liberação das diferentes nanoformulações, são apresentados na Figura 4.6.



**Figura 4.6** – Perfil de liberação das nanoformulações NF1-NF8.

Os perfis de liberação foram similares para todas as nanoformulações, onde observou-se uma liberação acentuada nas 10 horas iniciais, seguida da liberação lenta após esse período. Para que fosse possível avaliar esse parâmetro como fator resposta, ou seja, como uma variável dependente, essas curvas foram linearizadas por função logarítmica. Dessa forma, se obteve uma equação de primeiro grau ( $y = ax + b$ ) para descrever cada perfil e o valor do coeficiente angular  $a$ , é diretamente

relacionado à taxa de liberação da sesamina. Quanto maior o valor do coeficiente angular, maior a taxa de liberação da sesamina (Tabela 4.6). Observa-se que, de forma geral, as nanoformulações onde empregou-se a lignina como polímero apresentaram liberação mais acelerada.

**Tabela 4.6** – Valores de coeficiente angular (*a*) para a reta que descreve os perfis de liberação.

Exp.	Coeficiente angular ( <i>a</i> )	Exp.	Coeficiente angular ( <i>a</i> )
NF1	0,8265	NF5	2,5249
NF2	0,7502	NF6	0,5216
NF3	2,1907	NF7	2,5175
NF4	2,1754	NF8	1,7859

#### **4.5 – Avaliação do planejamento fatorial**

O planejamento fatorial 2<sup>3</sup> realizado permitiu avaliar os efeitos das variáveis independentes (quantidade e tipo de polímero e quantidade de óleo) sobre os resultados das variáveis dependentes.

O efeito de cada variável e suas interações foram calculados de acordo com a seguinte equação: Efeito das variáveis =  $\bar{y}_+$  -  $\bar{y}_-$ , onde  $\bar{y}_+$  e  $\bar{y}_-$  são a média da EE, RA, pH, PZ, DP, Polid., PS e do coeficiente angular da cinética de liberação nos níveis superior (+1) e inferior (-1), respectivamente. A Figura 4.7 ilustra os efeitos calculados para os dados normalizados em porcentagem para o planejamento fatorial investigado. Na normalização os maiores valores foram considerados como 100 e os demais foram calculados proporcionalmente. A Tabela 4.7 mostra a porcentagem de cada efeito nas variáveis dependentes.

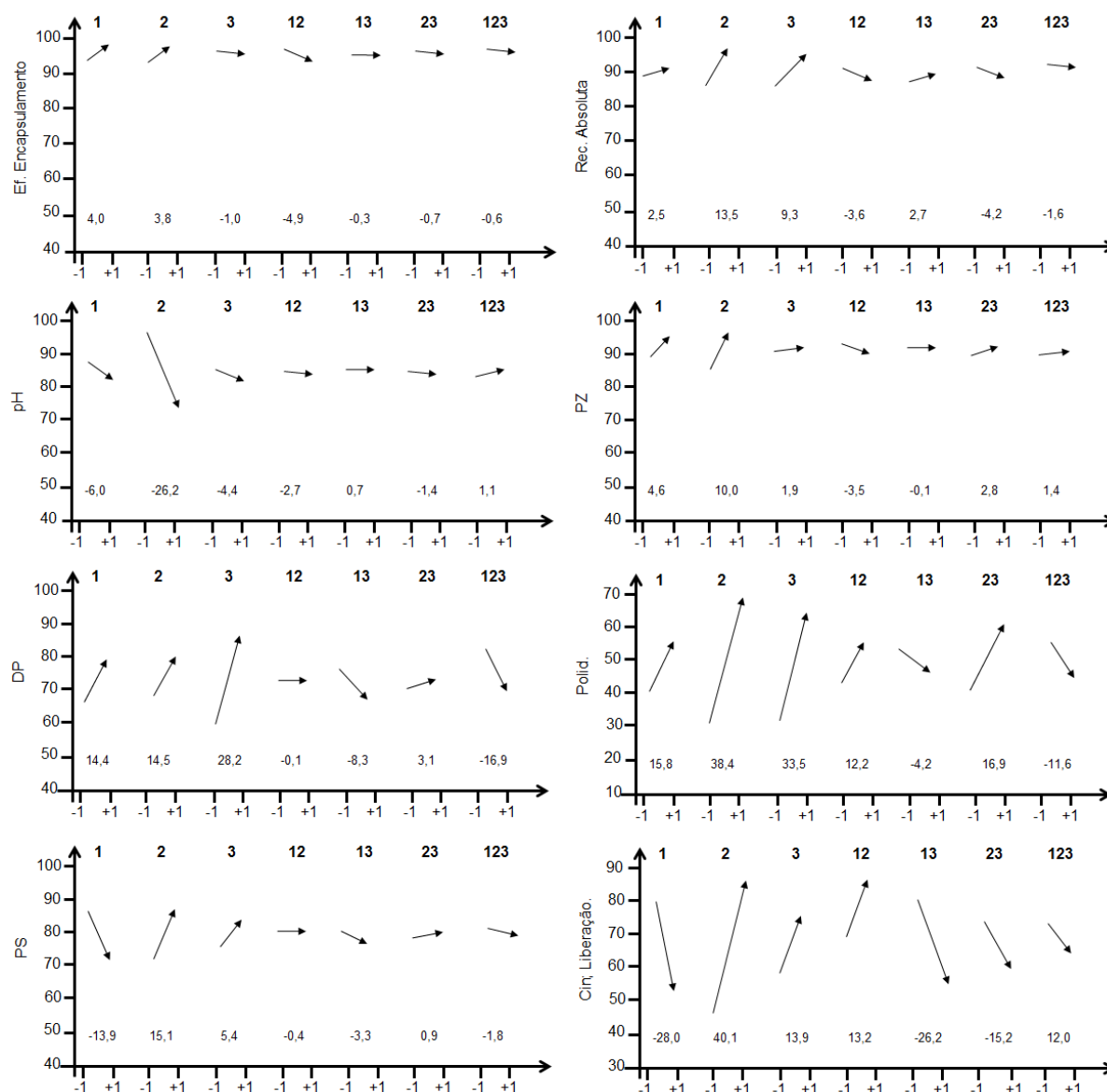


Figura 4.7 – Efeitos calculados em porcentagem, após normalização dos dados, dos experimentos realizados pelo planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. A inclinação dos vetores indica a amplitude dos efeitos.

Tabela 4.7 - Porcentagem de cada efeito nas variáveis dependentes.

Variáveis dependentes	Efeitos						
	1	2	3	12	13	23	123
EE (%)	28,6	25,2	1,68	42,8	0,13	0,93	0,69
RA (%)	1,95	57,5	27,7	4,12	2,30	5,63	0,78
pH	4,78	91,2	2,57	0,97	0,07	0,26	0,16
PZ	14,6	68,3	2,37	8,16	0,01	5,20	1,32
DP	13,3	13,6	51,2	0,00	4,40	0,62	16,9
Polid	7,25	43,0	32,7	4,32	0,51	8,31	3,90
PS	41,4	49,2	6,18	0,04	2,28	0,19	0,69
CL	20,5	42,1	5,06	4,56	18,0	6,05	3,77

Todas as formulações apresentaram altos valores de eficiência de encapsulamento (EE), acima de 90%, sendo a média 97,6%. Este resultado se deve principalmente à baixa solubilidade da sesamina, que tem maior afinidade pelo núcleo oleoso e/ou afinidade polimérica, com a matriz ou parede polimérica, do que com o meio aquoso de dispersão. Quando avaliados os efeitos de primeira ordem para este fator resposta, observou-se que as variáveis quantidade ( $x_1$ ) e tipo de polímero ( $x_2$ ) promovem aumento da eficiência de encapsulamento em 28,6 e 25,2%, respectivamente.

A recuperação absoluta (RA) média de sesamina foi de 104,3%, variando na faixa 87,7-115%. As variáveis independentes que tiveram maior efeito na recuperação absoluta foram tipo de polímero ( $x_2$ ) e quantidade de óleo ( $x_3$ ), que aumentaram esta resposta em 57,5 e 27,7%, respectivamente. A combinação das variáveis não resultou em efeitos significativos na recuperação absoluta. Quando as variáveis tipo de polímero e quantidade de óleo estavam no nível alto (+1), ou seja, nanoformulações com lignina e óleo, a interação ou afinidade da sesamina provavelmente aumentou, o que levou à maior recuperação absoluta.

O valor de pH da nanoformulação é diretamente relacionado à composição da amostra. Neste experimento, a variável tipo de polímero ( $x_2$ ) no nível alto (+1), emprego de lignina, diminuiu o pH da nanoformulação em 91,2%.

Uma vez que o potencial zeta é um indicativo da estabilidade das nanopartículas, a variável com maior efeito sobre esta resposta é de extrema importância para a composição otimizada das nanoformulações em suspensão coloidal. Neste experimento, a variável  $x_2$ , tipo de polímero, no nível alto, emprego de lignina, tem um efeito de 68,3% de aumento do potencial zeta (valor em módulo), indicando assim, ser a lignina melhor biopolímero que o PCL.

O diâmetro de partícula tem consequências importantes na aplicação biológica das nanopartículas, uma vez que seu potencial biológico depende das membranas que devem atravessar. O tamanho de partícula em nanocápsulas é limitado pelo tamanho do núcleo oleoso que é imediatamente criado quando a fase orgânica é adicionada à fase aquosa que, por sua vez, depende da velocidade de adição desta fase orgânica e da agitação magnética e viscosidade da fase aquosa. Nas mesmas condições, nanocápsulas sempre terão maior diâmetro de partícula que nanoesferas (BOUCHEMAL *et al.*, 2004). Nanoesferas e nanocápsulas de tamanho médio de 219,6 nm e 326,8 nm, respectivamente, foram obtidas, com tamanhos de partícula nas

faixas, 167-315 e 250-379 nm, respectivamente. De fato, os resultados comprovam a influência da presença de óleo no tamanho das nanopartículas, uma vez que a variável quantidade de óleo ( $x_3$ ), quando no nível alto (+1), ou seja, emprego de óleo na nanoformulação é responsável por 51,2% de aumento no tamanho das nanopartículas. As três variáveis em interações de 1º ordem ( $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ ) são responsáveis por 78,1% do efeito neste fator resposta, e todas elas promovem aumento do tamanho de partícula quando estão no nível alto (+1), ou seja, nanocápsulas com 250 mg de lignina e óleo tenderão a ser as maiores nanopartículas, enquanto que nanoesferas com 100 mg de PCL tenderão a ser as menores partículas. Quando analisamos o cálculo do efeito para as interações de 2º e 3º ordem ( $x_1.x_3$  e  $x_1.x_2.x_3$ ) estes promovem diminuição de 8,3 e 16,9% no tamanho de partícula, respectivamente. Isto comprova que as variáveis  $x_1$  e  $x_3$ , no nível baixo, ou seja, 100 mg de polímero e isento de óleo, diminuem o tamanho das partículas.

Ainda em relação ao tamanho das nanopartículas tão importante quanto o valor do DP é o valor de sua dispersão, que foi avaliada pelo índice de polidispersividade das amostras, que indica a distribuição média do tamanho das nanopartículas. Valores de polidispersividade inferiores à 0,200 representam uma boa homogeneidade da amostra (SANTOS *et al.*, 2011). Esse valor é desejado para manter a estabilidade da dispersão coloidal sem a formação de micropartículas ou precipitados. As nanoformulações preparadas neste trabalho não apresentaram precipitados mesmo após quatro meses de armazenamento. De forma geral, melhores valores de polidispersividade foram obtidos para as nanoesferas NF1, NF2 e NF3, indicando serem estas as mais homogêneas.

Embora as variáveis  $x_1$  e  $x_2$  tenham sido aquelas de maior influência, quando foi avaliado o rendimento do produto seco, a variação total dos rendimentos entre as nanoformulações variou entre 30,4 e 47,6% sendo, por este motivo, o efeito destas variáveis não apresentou variação significativa neste fator-resposta.

Os coeficientes angulares para os perfis de cinética de liberação representam numericamente, a velocidade de liberação da sesamina. Quanto maior o valor deste coeficiente, maior a velocidade de liberação da sesamina. Desta forma, as variáveis independentes de maior efeito sobre a velocidade de liberação da sesamina foram a quantidade de polímero que, no nível alto (250 mg) diminui em 20,5% a velocidade de liberação e o tipo de polímero que, no nível alto (lignina) aumenta em 42,1% a velocidade de liberação. O uso de maior quantidade de polímero permite a formação

de mais camadas poliméricas em torno das nanopartículas, e como consequência, diminui a velocidade de liberação. A diferença observada no emprego dos polímeros PCL e lignina pode estar relacionada com as diferenças estruturais destes.

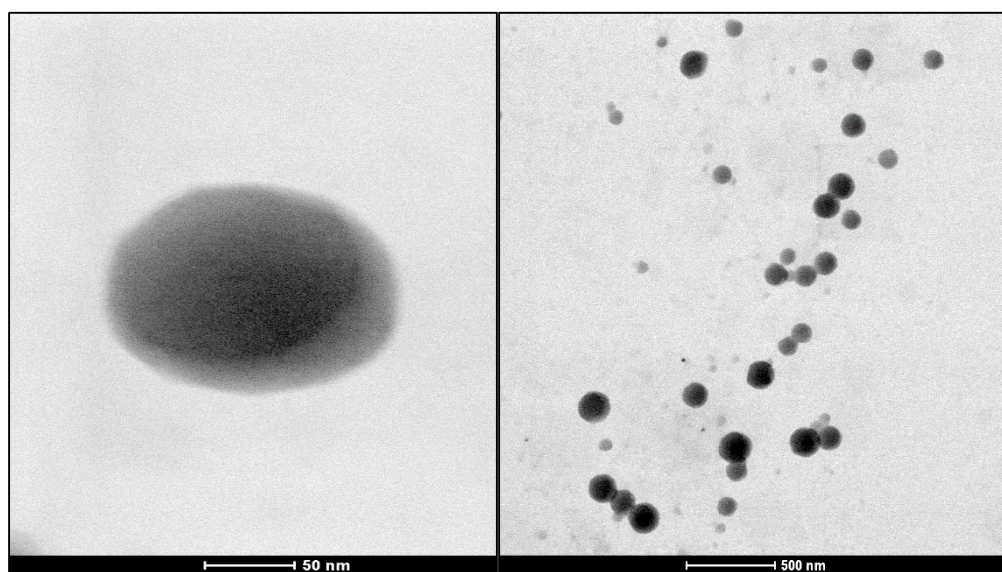
A análise conjunta dos resultados acima descritos, priorizando os dados de estabilidade como PZ, polidispersividade, e estruturais como DP e de recuperação absoluta, propõe a melhor formulação como sendo a NF3, nanoesferas preparadas no nível inferior da quantidade de polímero ( $x_1$ , 100 mg) e nível superior do tipo de polímero ( $x_2$ , lignina).

De posse deste resultado, foram selecionadas 3 nanoformulações para estudos de morfologia e ensaios biológicos com o fungo simbiote *L. gongylophorus*. Além da nanoesfera de lignina (NF3), foi escolhida a nanoesfera correspondente de PCL (NF1), e a nanocápsula correspondente de lignina (NF7).

#### **4.6 – Avaliação da morfologia**

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) foram empregadas nesta etapa do trabalho para se obter maior informação tanto morfológica quanto de forma e tamanho das nanopartículas.

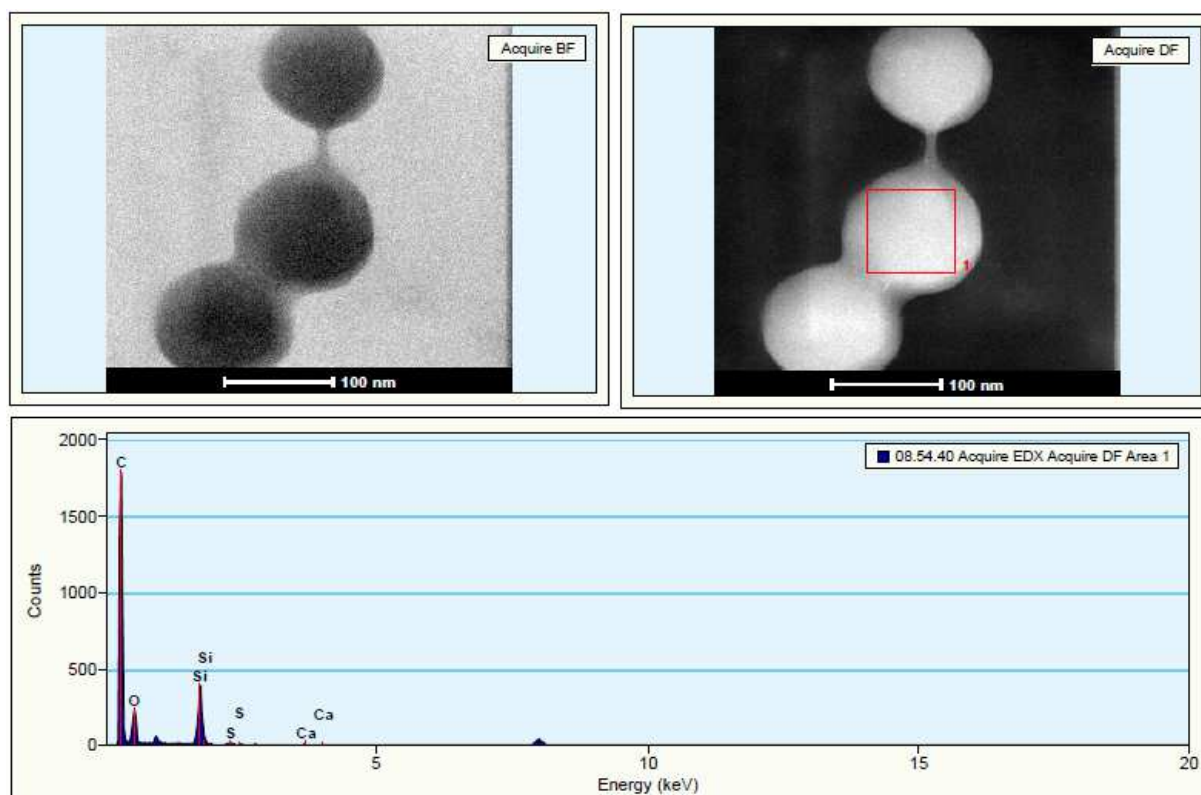
A Figura 4.8 mostra as fotomicroscopias (MET) obtidas para a melhor nanoformulação escolhida NF3.



**Figura 4.8** – Fotomicroscopias obtidas por MET, a partir da suspensão de nanoesferas NF3.

As imagens obtidas por MET para a suspensão NF3, mostram a diâmetro de partícula na faixa de 100-200 nm (A) e também a homogeneidade das nanopartículas (B), o que está de acordo com o obtido nas análises de diâmetro de partícula (167,60 nm) e de polidispersividade (0,127). Além disso, as fotomicroscopias possibilitaram a observação da forma esférica das nanopartículas.

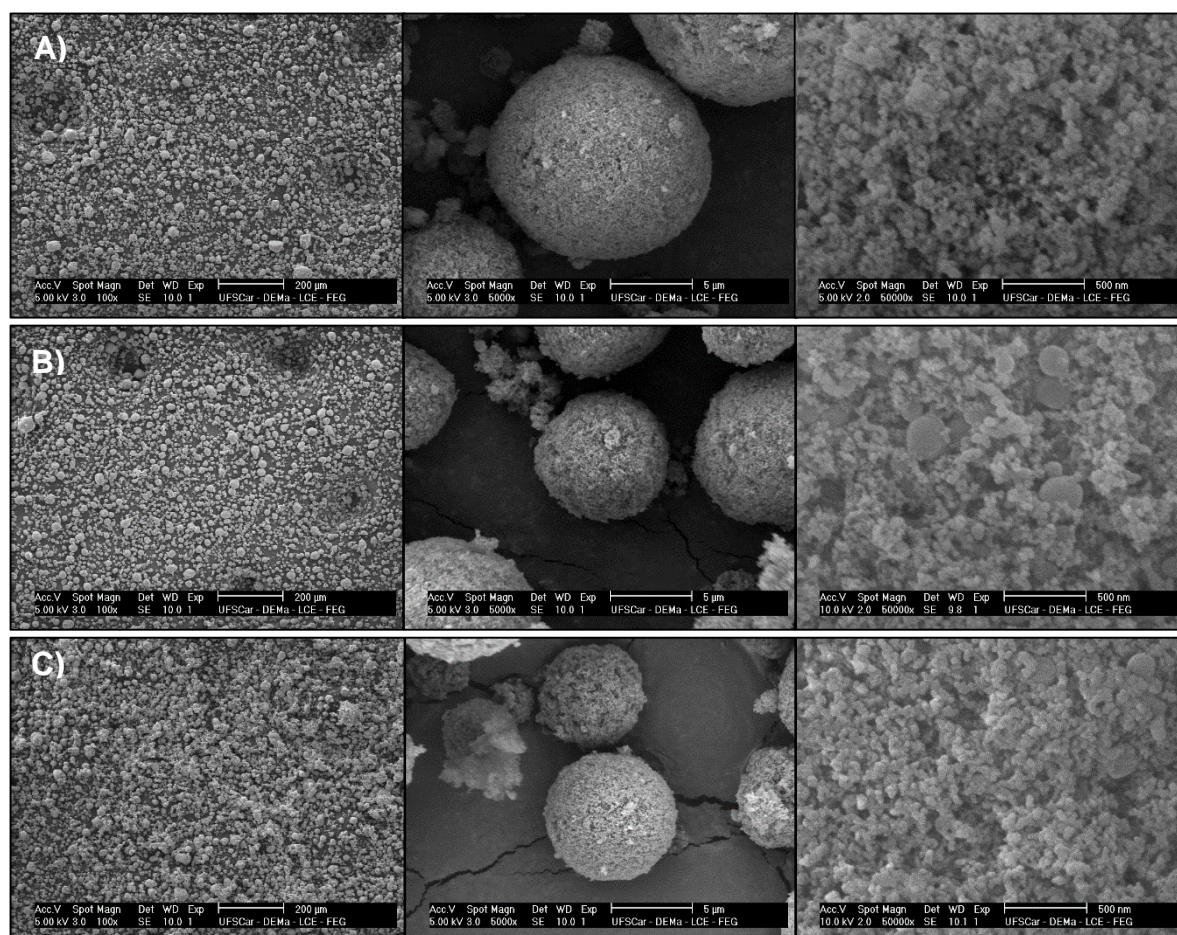
A Figura 4.9 mostra o resultado da caracterização química da região central das nanopartículas de NF3 por Espectroscopia de raios-x por dispersão em energia (EDS). O resultado confirma a composição orgânica das nanopartículas, pela alta concentração de carbono e oxigênio oriundos da lignina, empregada como biopolímero e do princípio ativo sesamina. É possível observar ainda, contaminação por silício comum em ligninas.



**Figura 4.9** – Análise elementar para as nanopartículas NF3 obtidas por EDS.



A Figura 4.10 mostra as fotomicroscopias obtidas por MEV para o produto seco das 3 nanoformulações. Neste caso não há possibilidade de formação do filme polimérico uma vez que a secagem foi realizada previamente em condições controladas. Como no processo de secagem por *Spray-Drier* é empregado um suporte de secagem o dióxido de silício o material obtido é composto de micropartículas, resultante da aglomeração das nanopartículas sobre esse suporte. Foi possível verificar o tamanho das micropartículas secas, entre 10 e 20  $\mu\text{m}$  e essas fotomicroscopias permitiram avaliar melhor a morfologia das partículas, em que se observa, nas fotomicroscopias de expansão 50.000x, a presença de nanopartículas incrustadas no suporte de dióxido de silício.



**Figura 4.10** – Fotomicroscopias obtidas por MEV para as nanoformulações NF1 (A), NF3 (B) e NF7 (C) em pó às expansões de 100x, 5.000x e 50.000x.

## **5 – CONCLUSÕES**

Os resultados deste trabalho demonstraram que nanocápsulas e nanoesferas poliméricas carregadas com a lignina sesamina podem ser preparadas utilizando os polímeros PCL e lignina. O método cromatográfico desenvolvido e validado foi eficiente para as análises quantitativas deste trabalho.

O planejamento fatorial desenvolvido permitiu avaliar o efeito de diferentes variáveis sobre a qualidade e estabilidade das nanopartículas formadas, onde verificou-se que alterações na composição da nanoformulação provocam alterações nas características físico-químicas das nanopartículas. A partir das respostas obtidas para os mais importantes fatores resposta como estabilidade, medido por potencial zeta e podisperssividade, estrutura, medidos pelo diâmetro de partícula, e de recuperação absoluta, foi possível afirmar que a melhor nanoformulação foi a suspensão coloidal de nanoesferas preparadas com 100 mg de lignina (NF3).

Este resultado é de grande importância econômica, ambiental e tecnológica uma vez que a lignina, resíduo gerado de processo industrial, tem grande aplicabilidade como biopolímero para o processo de nanoencapsulamento de princípios ativos. Além disso, a lignina na presença de microorganismos do solo, gera ácidos úmicos que atuam como biofertilizantes naturais. Assim, a grande disponibilidade de lignina aliada à sua não-toxicidade ao meio ambiente e excelentes resultados no trabalho aqui descrito, pode torná-la o próximo biopolímero para aplicações de agroquímicos no campo.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, K.; LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. "Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties". *Food Chem.*, **132**: 799-807, 2012.
- ALSHAMSAN, A. "Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles". *Saudi Pharm. J.*, **22**: 219-222, 2014.
- ARRUDA, A. C. C.; SILVA, A. L. D.; GALAZZI, R. M.; AZEVEDO, R. A.; ARRUDA, M. A. Z. "Nanoparticles applied to plant science: A review". *Talanta*, **131**: 693-705, 2015.
- BAYINDIR, U.; ALFERMANN, A. W.; FUSS, E. "Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb". *Plant J.*, **55**: 810-820, 2008.
- BHUJBAL, S. V.; VOS, P.; NICLOU, S. P. "Drug and cell encapsulation: Alternative delivery options for the treatment of malignant brain tumors". *Adv. Drug Delivery Rev.*, **67-68**: 142-153, 2014.
- BICALHO, K. U.; TEREZAN, A. P.; MARTINS, D. C.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. "Evaluation of the toxicity of *Virola sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants". *Psyche: J. Entomol.*, 1-7, 2012.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANÇOM, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. "Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation". *Int. J. Pharm.*, **280**: 241-251, 2004.
- CARVALHO, S. S.; VENDRAMIM, J. D.; SÁ, I. C. G.; SILVA, M. F. G. F., RIBEIRO, L. P.; FORIM, M. R. "Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro". *Bragantia*, **74**: 298-306, 2015.
- CAZAL, C. M.; FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. "Development and validations of a RP-HPLC method to determine the xanthyletin content in biodegradable polymeric nanoparticles". *Quim. Nova*, **37**: 1145-1150, 2014.
- CAZO, N.; PEREIRA-FILHO, E., SILVA, M. F. G. F., FERNANDES, J. B.; VIEIRA, J. B.; PUHL, 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.
- CHAWLA, J. S.; AMIJI, M. M.; "Biodegradable poly(ε-caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen". *Int. J. Pharm.*, **249**: 127-138, 2002.
- CHOI, M. J.; MCDONAGH, A. M.; MAYNARD, P.; ROUX, C. "Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingerprint detection". *Forensic Sci. Int.*, **179**: 87-97, 2008.
- CHRISTOFOLI, M.; COSTA, E. C. C.; BICALHO, K. U.; DOMINGUES, V. C.; PEIXOTO, M. F.; ALVES, C. C. F.; ARAÚJO, W. L.; CAZAL, C. M. "Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations". *Ind. Crops Prod.*, **70**: 301-308, 2015.
- COSTA, J. T.; FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; SOUZA, J. R.; MONDEGO, J. M.; JUNIOR, A. L. B. "Effects of different formulations of neem-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans". *J. Stored Prod. Res.*, **56**: 49-53, 2014.
- DAR, A. A.; ARUMUGAM, N. "Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis – A review". *Bioorg. Chem.*, **50**: 1-10, 2013.

- DAR, A. A.; VERMA, N. K.; ARUMUGAM, N. "New updated method for isolation, purification and characterization of clinically important antioxidant lignans – Sesamin and sesamol, from sesame oil". *Ind. Crops Prod.*, **64**: 201-208, 2015.
- DEWICK, P.M.; *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach*; England, John Wiley & Sons, 2002.
- DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods". *Food Sci. Technol.*, **44**: 1908-1914, 2011.
- DONSI, F.; ANNUNZIATA, M.; VINCENSI, M.; FERRARI, G. "Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier". *J. Biotechnol.*, **159**: 342-350, 2012.
- FANG, Z.; BHANDARI, B. "Encapsulation of polyphenols: A review". *Trend Food Sci. Technol.*, **21**: 510-523, 2010.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, **55**: R1-R4, 1989.
- FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; MONGEDO, J. M.; JUNIOR, A. L. B. "Development of a new method to prepare nano-/microparticles loaded with extracts of *Azadirachta indica*, their characterization and use in controlling *Plutella xylostella*". *J. Agric. Food Chem.*, **61**: 9131-9139, 2013.
- FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. "Espectros de duas formas de lignina obtidas por ressonância magnética nuclear", *Pesq. Agropec. Bras.*, **38**: 505-511, 2003.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. "Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion and nanoprecipitations methods". *Pharm. Res.*, **21**: 1428-1439, 2004.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview". *Food Res. Int.*, **40**: 1107-1121, 2007.
- GOGOS, A.; KNAUER, K.; BUCHELI, T. D. "Nanomaterials in plant protection and fertilization: Current state, foreseen applications and research properties". *J. Agric. Food Chem.*, **60**: 9781-9792, 2012.
- GOLDBERG, M.; LANGER, R.; JIA, X. "Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering". *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, **18**: 241-268, 2007.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. "Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study". *Int. J. Pharm.*, **113**: 57-63, 1995.
- HERCULANO, E. D.; PAULA, H. C. B.; FIGUEIREDO, E. A. T.; DIAS, F. G. B.; PEREIRA, V. A. "Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil". *Food Sci. Technol.*, **61**: 484-491, 2015.
- HUANG, D.; LIAO, F.; MOLESA, S.; REDINGER, D.; SUBRAMANIAN, V. "Plastic-compatible low resistance printable gold nanoparticle for flexible electronics". *J. Electrochem. Soc.*, **150**: G412-G417, 2003.
- KHOT, L. R.; SANKARAN, S.; MAJA, J. M.; EHSANI, R.; SCHUSTER, E. W. "Applications of nanomaterial in agricultural production and crop protection: A review". *Crop. Prot.*, **35**: 64-70, 2012.
- KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems". *Colloids Surf. B*, **75**: 1-18, 2010.

- LI, Y.; ZHENG, J.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. "Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization". *Food Hydrocoll.*, **27**: 517-528, 2012.
- LIU, T. T.; MUSINSKI, L. D.; PATEL, P. R.; GALLIMORE, A. D.; GILCHRIST, B. E.; KEIDAR, M. "Nanoparticle electric propulsion for space exploration". *Space Technology and Applications International Forum, STAIF*, 2007.
- LOCH-NECKEL, G.; NEMEN, D.; PUHL, A. C.; FERNANDES, D.; STIMAMIGLIO, M. A.; SILVA, M. A.; HANGAI, M.; SILVA, M. C. S.; LEMOS-SENNA, E. "Stealth and non-stealth nanocapsules containing camptothecin: *in-vitro* and *in-vivo* activity on B16-F10 melanoma". *J. Pharm. Pharmacol.*, **59**: 1359-1364, 2007.
- MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHER, J.; DESOBRY, S. "Flavour encapsulation and controlled release – a review". *Int. J. Food Sci. Technol.*, **41**: 1-21, 2006.
- MAGENHEIN, B.; BENITA, S. "Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach". *S. T. P. Pharma Sci.*, **1**: 221-241, 1991.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. "Polymer-based nanocapsules for drug delivery". *Int. J. Pharm.*, **385**: 113-142, 2010.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. "Poly-(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties". *J. Pharm. Sci.*, **89**: 614-626, 2000.
- NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. "Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug delivery". *Pharmacol. Ther.*, **112**: 630-648, 2006.
- PADILLA, A. B.; SOTO, K. M.; ITURRIAGA, M. H.; MENDOZA, S. "Food antimicrobials nanocarriers". *Scient. World J.*, 1-11, 2014.
- PAGNOCCA, F. C.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. "Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants", *J. Chem. Ecol.*, **22**: 1325-1330, 1996.
- PUHL, A. C.; FAGUNDES, M.; SANTOS, K. C.; POLIKARPOV, I.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; FORIM, M. R. "Preparation and characterization of polymeric nanoparticles loaded with flavonoid luteolin, by using factorial design". *Int. J. Drug Deliv.*, **3**: 683-698, 2011.
- REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. "Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles". *Nanomedicine J.: Nanotec., Biol. Med.*, **2**: 8-21, 2006.
- RUSSEL, G. C.; FENEMORE, P. G. "New lignans from leaves of *Macropiper excelsum*". *Phytochemistry*, **12**: 1799-1803, 1973.
- SANTOS, K. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; POLIKARPOV, I.; ZUCOLOTTI, V.; FORIM, M. R. "Development and validation of a fast RP-HPLC method to determine the analogue of the thyroid hormone, 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (TRIAC), in polymeric nanoparticles". *Anal. Methods*, **3**: 1936-1942, 2011.
- SANTOS, K. C.; SILVA, M. F. G. F.; PEREIRA-FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; POLIKARPOV, I.; FORIM, M. R. "Polymeric nanoparticles loaded with the 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (Triac), a thyroid hormone: factorial design, characterization and reselase kinetics". *Nanotechnol. Sci. Appl.*, **5**: 37-48, 2012.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. "Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos

- nanoparticulados para administração de fármacos”. *Quím. Nova*, **26**: 726-737, 2003.
- SEO, YOUNGWAN. “Antioxidant activity of the chemical constituents from the flower buds of *Magnolia denudata*”. *Biotechn. Biopr. Eng.*, **15**: 400-406, 2010.
- SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. “Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology”. *Ciência Rural*, **44**: 1304-1311, 2014a.
- SILVA, L. M.; HILL, L. E.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, C. L. “Delivery of phytochemicals of tropical fruit by-products using poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles: Synthesis, characterization and antimicrobial activity”. *Food Chem.*, **165**: 362-370, 2014b.
- SILVA, M. D. S.; COCENZA, D. S.; GRILLO, R.; MELO, N. F. S.; TONELLO, P. S.; OLIVEIRA, L. C.; CASSIMIRO, D. L.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. “Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies”. *J. Hazard. Mater.*, **190**: 366-374, 2011.
- SOUZA, B. H. S.; COSTA, E. N.; FORIM, M. R.; COSTA, E. S.; JUNIOR, A. L. B. “Formulations of *Melia azedarach* to control *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae in corn and plant enhancement”. *Neotrop. Entomol.*, **44**: 173-179, 2015.
- VEHRING, R.; FOSS, W. R.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. “Particle formation in spray drying”. *Aerosol Sci.*, **38**: 728-746, 2007.
- WANG, X.; LIN, Y.; GENG, Y.; LI, F.; WANG, D. “Preparative separation and purification of sesamin and sesamol from sesame seeds by high-speed counter-current chromatography”. *Cereal Chem.*, **86**: 1: 23-25, 2009.
- WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. “Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGC microparticles”. *Int. J. Pharm.*, **364**: 298-327, 2008.
- YADAV, S. C.; KUMARI, A.; YADAV, R. “Development of peptide and protein nanotherapeutics by nanoencapsulation and nanobioconjugation”. *Peptides*, **32**: 173-178, 2011.