

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

**“ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO EM *Picramnia bahiensis*
E *Thyrsodium schomburgkianum* – INSETICIDAS, FUNGICIDAS E
MICROENCAPSULAÇÃO”**

Rodrigo Ossamu Saga Kitamura*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

*** Bolsista FAPESP**

**São Carlos - SP
2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

K62ef

Kitamura, Rodrigo Ossamu Saga.

Estudo fitoquímico biomonitorado em *Picramnia bahiensis* e *Thyrsodium schomburgkianum* – inseticidas, fungicidas e microencapsulação / Rodrigo Ossamu Saga Kitamura. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

306 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Produtos naturais. 2. Formigas cortadeiras. 3. Nanopartículas. 4. Validação do método. I. Título.

CDD: 547.3 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

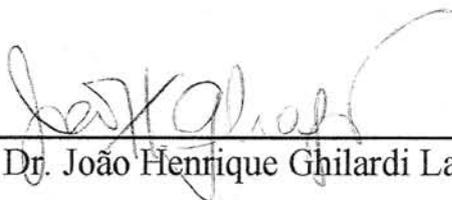
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de doutorado do candidato **Rodrigo Ossamu Saga Kitamura**, realizada em 22 de março de 2013:*



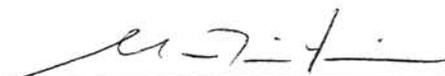
Prof. Dr. João Batista Fernandes



Prof. Dr. Odair Correa Bueno



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Dr. Gezimari Donizetti de Souza

Ao meu pai, Tuyossi Kitamura (*in memoriam*),
que fez o possível e o impossível pela minha família,
à minha mãe, Tsuneyo, pela luta e amor pelo bem dos filhos
e à minha irmã Patrícia, todos me ensinaram o verdadeiro sentido
das palavras amor e família e a relação entre elas.

Agradeço imensamente à Leila pelo amor,
carinho e compreensão que faz nosso amor
se fortalecer a cada dia.

"Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber."

Confúcio

AGRADECIMENTOS

Seguem meus sinceros agradecimentos e o reconhecimento de cada pessoa pela importante e decisiva participação nesta etapa da minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. João Batista Fernandes por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, pela orientação e realização deste projeto, agradeço eternamente pela paciência, serenidade, pelos preciosos ensinamentos e por estar sempre disposto a ajudar em todos os aspectos, com seus belíssimos conselhos e conversas, exercendo, além de orientador, em alguns momentos, o papel de grande amigo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado concedida, juntamente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa inicial de mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduíche.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e a Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva pela contribuição do trabalho realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pela grande ajuda na etapa do projeto relacionado ao processo de nanoencapsulamento, disponibilizando o seu laboratório e todos os equipamentos e materiais para a realização do trabalho, agradeço imensamente pela ajuda, conselhos, conversas e, principalmente, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Instituto Nacional de Ciência de Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Praga (INCT-CBIP) pelo uso dos equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear 400 e 600 MHz e do HPLC-MS/MS (API 2000) para as análises dos experimentos realizados.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio e Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira pela utilização dos equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear e do espaço físico de seu laboratório, juntamente com os técnicos responsáveis Paulo Lambertuci e, principalmente, Luciana Vizotto, agradeço imensamente em sempre estar disposta em ajudar, independente da situação e pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno pelos ensinamentos, disponibilidade, conselhos na realização dos ensaios inseticidas, juntamente com os alunos responsáveis pelos ensaios inseticidas frente às formigas-cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), em especial à Marcela Ceccato, por toda a ajuda nesta parte do trabalho.

À Dra. Ana Paula Terezan pela realização e ajuda nos ensaios fungicidas frente ao fungo simbiote, juntamente com todos os colaboradores e técnicos que também realizaram os ensaios.

Ao Dr. Leonardo Toffano pela realização dos ensaios de verificação de contaminação de microorganismos nas soluções de nanopartículas.

Ao Prof. Dr. João Henrique G. Lago por ter me ensinado os meus primeiros passos em minha vida profissional com grandes ensinamentos que me fizeram ter a paixão pela ciência e pesquisa e pela grande amizade, juntamente com a Profa. Dra. Paulete Romoff pelos grandes ensinamentos e o grande laço de amizade.

À Profa. Dra. Madalena Maria de Magalhães Pinto pelas contribuições e conselhos dados na realização da parte do trabalho realizado em Portugal, juntamente com grandes amigos que conquisei em especial Marta, Carlos, Gisela e Sara.

Ao Centro de Química Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pelo apoio e oportunidade de aprendizagem no exterior.

Ao técnico responsável do Laboratório de Polímeros do Instituto de Física da Universidade de São Paulo – São Carlos, Bruno Bassi, pela ajuda e ensinamentos no uso do equipamento Zetatrac.

A todos os técnicos responsáveis do Laboratório de Caracterização Estrutural do departamento de Engenharia de Materiais (LCE – DEMA) pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A todos os colegas do Laboratório de Produtos Naturais pelo companheirismo, apoio, conselhos e amizade. Em especial agradeço aos meus grandes amigos Karla (Foo), Fabiana (Fabi), Bruno, Israel (Isra), Marcela, André (Titi), Jaqueline (Jaque), Vanessa (Van), Douglas, James, Gabriel (Bié), Lucas, Olívia, Barbara (Babi), Francisco (Chicão) e Clayton (Goiano) tenho muito que agradecer a essas pessoas por contribuir direta ou indiretamente no meu trabalho e, o mais importante em todos os aspectos, o grande laço de amizade que guardo com muito carinho por todos.

À minha família, em especial meu pai Tuyossi Kitamura (*in memoriam*), minha mãe, Tsuneyo Saga Kitamura e minha irmã, Patrícia Sayuri Saga Kitamura, sempre me lembrarei de toda atenção, dedicação e esforço dado por vocês, sempre zelando pela formação dos filhos. Sou muito grato a todos vocês. Podem ter certeza que tenho conhecimento do grande esforço que todos fizeram nos momentos difíceis de minha vida, principalmente no falecimento de meu pai, e por isso sempre vou carregar um grande carinho e amor, amo muito vocês.

A uma das pessoas mais importantes e especiais nesta jornada, minha namorada Leila Gimenes, por sempre estar disposta a me ajudar, a me confortar e animar nos momentos difíceis, apoiando em minhas decisões e por ser minha grande amiga também. Agradeço muito por tudo e que o nosso amor se fortaleça mais e mais, amo muito você.

LISTA DOS PRINCIPAIS SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico em ppm
ϕ	Diâmetro
Π	Ligação pi
μL	Micro litro
μm	Micrometro
μM	Micro molar
μS	Micro siemens
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
C18	Fase octadecil silano
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD_3OD	Metanol deuterado
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	Centímetros
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dubleto
DAD	<i>Detector Diode Array</i>
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
eV	Elétron Volts
g	Grama
h	Altura

Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSCCC	<i>High-speed Counter-current Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IE	Ionização por impacto eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa-Massa
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa carga
MD	Sobrevivência mediana de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
MHz	Mega hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
nm	Nanometro
pH	Potencial hidrogeniônico
psi	<i>Pound force per square inch</i>
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete
THF	Tetraidrofurano
TIC	<i>Total Ion Current Chromatogram</i>
UV	Ultra Violeta
v/v	Volume/Volume

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 – Metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Picramnia</i>	12
TABELA 3.1 – Ingredientes contidos na dieta pura (controle) para ensaio inseticida frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> (BUENO et al., 1997)	31
TABELA 3.2 – Extratos preparados de <i>P. bahiensis</i> e <i>T. schomburgkianum</i>	38
TABELA 3.3 – Fracionamento cromatográfico do extrato H+D (1,5 g) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	41
TABELA 3.4 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01 (770,3 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	43
Tabela 3.5 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 (284,2 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	44
TABELA 3.6 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02 (53,2 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	47
TABELA 3.7 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02/11 (4,0 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	48
TABELA 3.8 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03 (109,5 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	50
TABELA 3.9 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03/03 (42,3 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	51
TABELA 3.10 - Fracionamento cromatográfico do grupo H+D/02 (97,6 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	52
TABELA 3.11 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03 (44,4 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	54
TABELA 3.12 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02 (24,1 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	55
TABELA 3.13 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01 (14,3 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	57
TABELA 3.14 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04 (8,8 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	58
TABELA 3.15 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04/02 (11,4 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	59
TABELA 3.16 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/03 (142,2 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	61
TABELA 3.17 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05 (61,9 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	62

TABELA 3.18 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05/04 (8,1 mg) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	63
TABELA 3.19 - Fracionamento cromatográfico da partição hexânica (9,2 g) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	66
TABELA 3.20 - Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02 (139,2 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	67
TABELA 3.21 - Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02/02+03 (47,8 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	68
TABELA 3.22 - Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04 (1,55 g) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	69
TABELA 3.23 - Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 (820,8 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	71
TABELA 3.24 - Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03 (574,5 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	72
TABELA 3.25 - Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03/02 (492,6 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	73
TABELA 3.26 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/05 (585,1 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	74
TABELA 3.27 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07 (709,3 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	75
TABELA 3.28 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07/04 (69,3 mg) do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	77
TABELA 3.29 – Variáveis avaliadas para otimização cromatográfica	79
TABELA 3.30 – Relação dos parâmetros utilizados no Espectrômetro de Massas..	82
TABELA 3.31 – Estimativa na liberação do ativo em relação ao método de preparação (MORA-HUERTAS et al., 2010).....	87
TABELA 3.32 – Composição da formulação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.....	89
TABELA 3.33 – Condições cromatográficas de crisofanol e menadiona.....	90
TABELA 3.34 – Condições utilizadas para secagem das nanopartículas	99
TABELA 4.1 – Metabólitos identificados.....	101
TABELA 4.2 – Dados de deslocamentos de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do crisofanol (8) e comparação com a literatura.....	120
TABELA 4.3 – Dados de deslocamentos de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 400 MHz) do 8-O-metilcrisofanol (9) e comparação com a literatura	124

TABELA 4.4 – Dados de deslocamentos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da biantrona do crisofanol (10) e comparação com a literatura	131
TABELA 4.5 – Parâmetros dependente da fonte, gás e do composto avaliados e otimizados.....	134
TABELA 4.6 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) das antronas inéditas 11 e 12	150
TABELA 4.7 – Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) das antronas 15 e 16 e comparação com a literatura	165
TABELA 4.8 – Dados de deslocamentos de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do 3 β -hidróxiglutin-5-eno (17) e comparação com a literatura.....	170
TABELA 4.9 – Dados de deslocamentos de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de 24	189
TABELA 4.10 – Composição das nanoesferas contendo Pluronic® F-68.....	192
TABELA 4.11 – Composição das nanoesferas contendo Span® 60 e Tween® 80	194
TABELA 4.12 – Composição das nanoesferas contendo Span® 80 e Tween® 80	196
TABELA 4.13 – Formulação inicial para nanoesferas	199
TABELA 4.14 – Formulação inicial para nanocápsulas.....	199
TABELA 4.15 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.) das nanoesferas e nanocápsulas contendo alizarina	203
TABELA 4.16 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.) das nanoesferas e nanocápsulas contendo crisofanol	205
TABELA 4.17 – Tamanho de partículas e potencial zeta para nanopartículas contendo alizarina.....	207
TABELA 4.18 – Tamanho de partículas e potencial zeta para nanopartículas contendo crisofanol.....	209
TABELA 4.19 – Formulação final para nanoesferas.....	211
TABELA 4.20 – Formulação final para nanocápsulas	212
TABELA 4.21 – Precisão (CV%) das soluções contendo crisofanol para a validação do método cromatográfico	222
TABELA 4.22 – Exatidão (%) das soluções contendo crisofanol para a validação do método cromatográfico	223
TABELA 4.23 – Precisão (CV%) das soluções contendo menadiona para a validação do método cromatográfico	224
TABELA 4.24 – Exatidão (%) das soluções contendo menadiona para a validação do método cromatográfico	224

TABELA 4.25 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.), diâmetro de partículas, Potencial zeta e pH para nanoesferas e nanocápsulas contendo crisofanol.....	226
TABELA 4.26 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.), diâmetro de partículas, Potencial zeta e pH para nanoesferas e nanocápsulas contendo menadiona.....	229
TABELA 4.27 – Cálculo do rendimento na secagem das nanopartículas vazias e contendo crisofanol e menadiona	233
TABELA 4.28 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de <i>P. bahiensis</i>	249
TABELA 4.29 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de <i>P. bahiensis</i>	250
TABELA 4.30 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das raízes de <i>P. bahiensis</i>	251
TABELA 4.31 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico das raízes de <i>P. bahiensis</i>	253
TABELA 4.32 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com a fração H+D/01/01/03.....	255
TABELA 4.33 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto 8	256
TABELA 4.34 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	258
TABELA 4.35 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de <i>T. schomburgkianum</i>	259
TABELA 4.36 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPH do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	262
TABELA 4.37 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPD do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	264

TABELA 4.38 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o extrato original diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i> e suas respectivas partições.....	266
TABELA 4.39 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com a substância 19 proveniente do extrato diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	267
TABELA 4.40 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias comerciais	269
TABELA 4.41 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente aerossil	272
TABELA 4.42 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente benzoato de benzila	273
TABELA 4.43 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com sucessivas diminuições na concentração de benzoato de benzila	274
TABELA 4.44 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas vazias e benzoato de benzila	275
TABELA 4.45 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo crisofanol	277
TABELA 4.46 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo crisofanol	278
TABELA 4.47 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo menadiona	281
TABELA 4.48 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo menadiona.....	282
TABELA 4.49 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as demais nanocápsulas contendo menadiona	284
TABELA 4.50 – Dados sobre o ensaio fungicida da substância 8 frente à inibição do crescimento micelial.....	286

TABELA 4.51 – Dados sobre o ensaio fungicida dos extratos brutos obtidos de <i>T. schomburgkianum</i> frente à inibição do crescimento micelial	287
TABELA 4.52 – Dados sobre o ensaio fungicida da substância 17 frente à inibição do crescimento micelial.....	288
TABELA 4.53 – Dados sobre o ensaio fungicida dos compostos naturais comerciais frente à inibição do crescimento micelial.....	290
TABELA 4.54 – Resultados do ensaio antifúngico do extrato de <i>T. schomburgkianum</i> e frações de <i>P. bahiensis</i>	291
TABELA 4.55 – Resultados do ensaio antifúngico de nanopartículas vazias.....	292
TABELA 4.56 – Resultados do ensaio antifúngico de crisofanol e alizarina e suas respectivas formulações	293

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Soldados, jardineiras e operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mantidas em formigueiros artificiais em laboratório (fotos superior); Ilustração do desfolhamento realizada pelas formigas cortadeiras (foto inferior).....	2
FIGURA 1.2 – Dimensão de um formigueiro adulto	4
FIGURA 1.3 – Representação das duas subdivisões de nanopartículas: nanoesferas e nanocápsulas.....	7
FIGURA 1.4 – Sistema de filtros localizados no sistema bucal (acima); Anatomia de uma formiga (abaixo)	9
FIGURA 3.1 – Pesagem dos ingredientes pertencentes à dieta (foto superior); transferência dos mesmos para os frascos sem e com adição de água destilada e autoclavagem de todo o material pertencente ao ensaio (fotos inferiores).....	32
FIGURA 3.2 – Ilustração das etapas realizadas no experimento de avaliação da atividade inseticida frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	33
FIGURA 3.3 – Ilustração da leitura das placas como resultado da inibição do crescimento micelial de <i>L. gongylophorus</i>	36
FIGURA 3.4 – Ilustração da metodologia utilizada para o ensaio antifúngico	37
FIGURA 3.5 – Ilustração do modelo de Margraff (à esquerda) e modelo de Conway (à direita) utilizados na escolha dos sistemas de solventes.....	40
FIGURA 3.6 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico do extrato das raízes de <i>P. bahiensis</i>	42
FIGURA 3.7 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	44
FIGURA 3.8 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	46
FIGURA 3.9 - Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações H+D/01/02 e H+D/01/02/11 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	49
FIGURA 3.10 - Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações H+D/01/03 e H+D/01/03/03 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	51
FIGURA 3.11 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	53
FIGURA 3.12 - Cromatograma referente à fração H+D/02/03.....	53
FIGURA 3.13 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	54
FIGURA 3.14 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	55

FIGURA 3.15 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	57
FIGURA 3.16 - Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações H+D/02/03/02/01/04 e H+D/02/03/02/01/04/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	60
FIGURA 3.17 - Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações H+D/05 e H+D/05/04 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	63
FIGURA 3.18 – Ilustração da partição realizada utilizando o extrato bruto diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	65
FIGURA 3.19 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da partição hexânica proveniente do extrato bruto diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	66
FIGURA 3.20 - Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações TSPH/02 e TSPH/02/02+03 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	68
FIGURA 3.21 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	70
FIGURA 3.22 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	71
FIGURA 3.23 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	72
FIGURA 3.24 - Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03/02 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	73
FIGURA 3.25 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/05 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	75
FIGURA 3.26 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	76
FIGURA 3.27 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07/04 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	77
FIGURA 3.28 – Esquema ilustrativo da análise por infusão direta	80
FIGURA 3.29 – Esquema ilustrativo da análise por injeção em fluxo.....	81
FIGURA 3.30 – Esquema ilustrativo dos parâmetros otimizados no equipamento API 2000	81
FIGURA 3.31 – Esquema ilustrativo dos parâmetros otimizados na fonte de ionização por Eletrospray.....	81
FIGURA 3.32 – Análises por injeção em fluxo realizadas na otimização da posição da agulha	83
FIGURA 3.33 – Tamanho das nanopartículas obtidas em diferentes métodos de preparação.....	85

FIGURA 3.34 – Eficiência de encapsulação do ativo em nanopartículas obtidas em diferentes métodos de preparação	86
FIGURA 3.35 – Tendência geral nos métodos de preparo de nanopartículas	86
FIGURA 3.36 – Esquema da metodologia de nanoprecipitação no preparo de nanopartículas	88
FIGURA 3.37 – Esquema da metodologia utilizada no parâmetro de precisão.....	93
FIGURA 3.38 – Sistema de ultrafiltração-centrifugação	94
FIGURA 3.39 – Sistema de secagem por nebulização	98
FIGURA 3.40 – Representação das esferas de nanopartículas adsorvidas ao núcleo contendo SiO ₂	98
FIGURA 4.1 – Espectro de massas do palmitato de metila (1)	105
FIGURA 4.2 – Espectro de massas do pentadecanoato de etila (2)	106
FIGURA 4.3 – Espectro de massas do estearato de metila (3).....	107
FIGURA 4.4 – Espectro de massas do estearato de etila (4).....	108
FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ¹ H da mistura dos ésteres de ácidos graxos 1 - 4	109
FIGURA 4.6 – Espectro de massas do ácido palmítico (5)	110
FIGURA 4.7 – Espectro de massas da sitostenona (6).....	111
FIGURA 4.8 – Espectro de RMN de ¹ H da mistura 5 e 6	112
FIGURA 4.9 – Espectro de massas de 5.....	113
FIGURA 4.10 – Espectro de massas do sitosterol (7)	114
FIGURA 4.11 – Espectro de RMN de ¹ H da mistura 5 e 7	115
FIGURA 4.12 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 8.....	116
FIGURA 4.13 – Proposta para os sinais em δ_H 11,96 e 12,07	116
FIGURA 4.14 – Ampliação dos sinais referentes aos hidrogênios das hidroxilas queladas	117
FIGURA 4.15 – Ampliação dos sinais na região de aromáticos de 8	118
FIGURA 4.16 – Ampliação do sinal referente à metila ligada a sistema aromático de 8.....	118
FIGURA 4.17 – Espectro de massas do crisofanol	119
FIGURA 4.18 – Proposta para o único sinal em δ_H 12,93 (pode ter posição trocada)	121

FIGURA 4.19 – Ampliação dos sinais de RMN de ^1H referentes à hidroxila quelada de 9	121
FIGURA 4.20 – Ampliação dos sinais de RMN de ^1H na região de aromáticos de 9	122
FIGURA 4.21 – Ampliação do espectro de RMN de ^1H relativo aos sinais referentes à metoxila e metila de 9	122
FIGURA 4.22 – Existência de duas possibilidades no posicionamento da metoxila ao anel	123
FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ^1H da substância 10	125
FIGURA 4.24 – Ampliação do espectro de RMN ^1H na região aromática da substância 10	126
FIGURA 4.25 – Etrutura representativa do núcleo crisofanol-9-antrona	126
FIGURA 4.26 – Ampliação da região desblindada do espectro de RMN de ^1H de 10	127
FIGURA 4.27 – Ampliação da região blindada do espectro de RMN de ^1H de 10 .	127
FIGURA 4.28 – Ampliação do sinal em δ_{H} 4,49 do espectro de RMN de ^1H de 10	128
FIGURA 4.29 – Possibilidades das classes químicas em relação à substituição em C-10	128
FIGURA 4.30 – Duas possibilidades diastereoisoméricas para 10	129
FIGURA 4.31 – Análise no modo <i>full scan</i> do composto 10	130
FIGURA 4.32 – Espectro de massas no modo <i>full scan</i> para o padrão usado com m/z 254	135
FIGURA 4.33 – Espectro de massas no modo <i>product ion</i> para o padrão usado com m/z 254	135
FIGURA 4.34 – Proposta de fragmentação para o composto crisofanol utilizado como padrão	137
FIGURA 4.35 – Análise em modo <i>full scan</i> a partir da fração rica em 11 e 12	138
FIGURA 4.36 – Espectro de U.V. referente à banda em t_{R} 22,98 min	139
FIGURA 4.37 – Espectro de massas gerado a partir da banda com t_{R} 22,98 min. .	140
FIGURA 4.38 – Análise no modo <i>precursor ion</i> para a transição m/z 491 \rightarrow m/z 281	141
FIGURA 4.39 – Espectro de RMN de ^1H das substâncias 11 e 12	142
FIGURA 4.40 – Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 11 e 12	143
FIGURA 4.41 – Mapa de contornos HSQC das substâncias 11 e 12	144

FIGURA 4.42 – Ampliação do mapa de contorno HSQC das substâncias 11 e 12	144
FIGURA 4.43 – Ampliação mapa de contornos HSQC das substâncias 11 e 12 ...	145
FIGURA 4.44 – Mapa de contornos HMBC das substâncias 11 e 12	145
FIGURA 4.45 – Ampliação do mapa de contornos HMBC das substâncias 11 e 12	146
FIGURA 4.46 – Ampliação do mapa de contornos HMBC das substâncias 11 e 12	146
FIGURA 4.47 – Comparação dos sinais atribuídos para uveosídeo e suas respectivas correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$	147
FIGURA 4.48 – Espectro de RMN Bidimensional COSY das substâncias 11 e 12	148
FIGURA 4.49 – Ampliação do espectro de RMN Bidimensional COSY das substâncias 11 e 12	148
FIGURA 4.50 – Proposta de fragmentação ocorrida nas substâncias 11 e 12	149
FIGURA 4.51 – Espectro de U.V. obtido para as substâncias 13 e 14	151
FIGURA 4.52 – Espectro de massas no modo <i>full scan</i> obtido para as substâncias 13 e 14	152
FIGURA 4.53 – Duas mais prováveis possibilidades no posicionamento do grupo hidroxila nas substâncias 13 e 14	152
FIGURA 4.54 – Proposta de fragmentação provável para definição parcial de 13 e 14	153
FIGURA 4.55 – Possíveis estruturas para 13 e 14	153
FIGURA 4.56 – Espectro de massas no modo <i>full scan</i> da fração HD/03/03.....	154
FIGURA 4.57 – Espectro de U.V. referente à banda em t_R 36,76 min	155
FIGURA 4.58 – Espectro de massas no modo <i>full scan</i> gerado a partir da banda com t_R 36,76 min	156
FIGURA 4.59 – Espectro de massas no modo <i>precursor ion</i> para a transição m/z 429 $\rightarrow m/z$ 239.....	156
FIGURA 4.60 – Espectro de massas no modo <i>precursor ion</i> para a transição m/z 429 $\rightarrow m/z$ 281.....	157
FIGURA 4.61 – Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD das substâncias 15 e 16	158
FIGURA 4.62 – Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 das substâncias 15 e 16	158
FIGURA 4.63 – Comparação da região aromática no espectro de RMN de ^1H em CD_3OD em relação à CDCl_3 das substâncias 15 e 16	159
FIGURA 4.64 – Comparação da região da glicose no espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 em relação à CD_3OD das substâncias 15 e 16	160

FIGURA 4.65 – Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 15 e 16	161
FIGURA 4.66 – Mapa de contorno HSQC das substâncias 15 e 16	162
FIGURA 4.67 – Mapa de contorno HMBC das substâncias 15 e 16	162
FIGURA 4.68 – Proposta de fragmentação ocorrida nas substâncias 15 e 16	163
FIGURA 4.69 – Espectro de RMN ^1H como confirmação do isolamento de 7	166
FIGURA 4.70 – Espectro de massas via CG/EM como confirmação do isolamento de 7	166
FIGURA 4.71 – Região relativa aos sinais desblindados do espectro de RMN ^1H de 17	167
FIGURA 4.72 – Região relativa aos sinais blindados do espectro de RMN ^1H de 17	168
FIGURA 4.73 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto 17	169
FIGURA 4.74 – Espectro de CG/EM, juntamente com a ampliação, da mistura de 18 - 20	171
FIGURA 4.75 – Espectros de Massa: (A) primeira banda cromatográfica; (B) segunda banda cromatográfica e (C) terceira banda cromatográfica	172
FIGURA 4.76 – Fragmentação do tipo Retro Diels-Alder gerando o fragmento m/z 218.....	173
FIGURA 4.77 – Possibilidades de fragmentações para os íons em m/z 218 e m/z 205 para as moléculas sem substituição em C-3 e com a presença do grupo carbonila em C-3.....	175
FIGURA 4.78 – Substâncias identificadas na fração TSPH/02/02+03/01	176
FIGURA 4.79 – Espectro de RMN de ^1H da fração TSPH/03+04/04/03/02/05.....	176
FIGURA 4.80 – Comparação dos espectros de RMN de ^1H entre o padrão lupeol e a fração TSPH/03+04/04/03/02/05.....	177
FIGURA 4.81 – Espectro de CG/EM da fração TSPH/03+04/04/03/02/05, junto com a comparação com o padrão lupeol (em vermelho).....	178
FIGURA 4.82 – Substância 21 identificada na fração TSPH/03+04/04/03/02/05 ...	178
FIGURA 4.83 – Cromatograma de CG/EM da fração TSPH/03+04/04/03/02/05 e a presença dos minoritários 22 e 23	179
FIGURA 4.84 – Espectro de massas no modo <i>full scan</i> da fração TSPH/03+04/04/03/02/05, juntamente com o espectro no modo <i>product ion</i> do íon m/z 427	180
FIGURA 4.85 – Espectro de massas via CG/EM da primeira banda minoritária proveniente da fração TSPH/03+04/04/03/02/05.....	181

FIGURA 4.86 – Espectro de massas via CG/EM da segunda banda minoritária proveniente da fração TSPH/03+04/04/03/02/05	181
FIGURA 4.87 – Proposta de fragmentação para a diferenciação dos isômeros 22 e 23	183
FIGURA 4.88 – Espectro de RMN de ¹ H da substância 24	184
FIGURA 4.89 – Ampliação do espectro de RMN de ¹ H da substância 24	185
FIGURA 4.90 – Espectro de RMN de ¹³ C da substância 24	186
FIGURA 4.91 – Mapa de contornos HSQC da substância 24	187
FIGURA 4.92 – Mapa de contornos HMBC da substância 24	187
FIGURA 4.93 – Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância 24	188
FIGURA 4.94 – Espectro de massas via CG/EM de 24	188
FIGURA 4.95 – Espectro de U.V. em MeOH do composto alizarina	191
FIGURA 4.96 – Espectro de U.V. em MeOH do composto crisofanol	191
FIGURA 4.97 – Exemplos de nanoesferas de PLGA contendo alizarina	193
FIGURA 4.98 – Diferentes mecanismos gerados no processo de instabilidade de uma dispersão	194
FIGURA 4.99 – Exemplos de nanoesferas e nanocápsulas de PCL contendo crisofanol.....	196
FIGURA 4.100 – Miristato de isopropila (esq.) e benzoato de benzila (dir.), cada um contendo 5 mg de alizarina	198
FIGURA 4.101 – Espectro de U.V. de alizarina, crisofanol e benzoato de benzila em iguais concentrações	201
FIGURA 4.102 – Curva de calibração da alizarina a 247 nm para análise das nanoesferas	202
FIGURA 4.103 – Curva de calibração da alizarina a 430 nm para análise das nanocápsulas.....	202
FIGURA 4.104 – Curva de calibração do crisofanol a 257 nm para análise das nanoesferas e nanocápsulas	204
FIGURA 4.105 – Curva de calibração referente ao crisofanol.....	214
FIGURA 4.106 – Curva de calibração referente à menadiona	214
FIGURA 4.107 – Análise da seletividade em nanoesferas vazias.....	216
FIGURA 4.108 – Cromatograma da seletividade em nanocápsulas vazias contendo 200 µL de óleo	217

FIGURA 4.109 – Cromatograma da seletividade em nanocápsulas vazias contendo 400 µL de óleo	217
FIGURA 4.110 – Cromatograma da comparação entre a análise de nanocápsulas vazias contendo 400 µL de óleo e crisofanol	218
FIGURA 4.111 – Cromatograma da especificidade de dois sistemas de solvente para o composto crisofanol	219
FIGURA 4.112 – Cromatograma obtido para o composto crisofanol em MeOH com a respectiva integração da banda correspondente	220
FIGURA 4.113 – Cromatograma obtido para o composto crisofanol em THF:MeOH 7:3 com a respectiva integração da banda correspondente.....	221
FIGURA 4.114 – Comparativo entre NCV e NCC 200 em 3 dimensões (acima); Curva referente à NCC 200 (A) e Curva referente à NSV (B).....	227
FIGURA 4.115 – Comparativo entre os tamanhos médios de partículas de seis formulações de nanocápsulas	230
FIGURA 4.116 – Adição da suspensão de nanopartículas em meio BDA para avaliação de possível contaminação. Sem esterilização por 40 minutos em luz U.V. em fluxo laminar (A); Com esterilização por 40 minutos em luz U.V. em fluxo laminar (B).....	231
FIGURA 4.117 – Imagem de NSC 1,0 na forma líquida a 100.000 x	235
FIGURA 4.118 – Imagens de NSC 1,0 na forma seca a 2.000; 2.500; 16.000 e 20.000 x	236
FIGURA 4.119 – Imagens de NCC 200 na forma líquida a 5.000 e 10.000 x	237
FIGURA 4.120 – Imagens de NCC 200 na forma seca a 1.000; 5.000; 10.000; 30.000; 50.000 e 200.000 x	239
FIGURA 4.121 – Imagens de NCC 200 na forma seca a 50.000; 100.000 e 200.000 x	240
FIGURA 4.122 – Imagens de NCC 400 na forma líquida a 10.000 x	241
FIGURA 4.123 – Imagens de NCC 400 na forma seca a 1.000; 5.000; 30.000 e 50.000 x	242
FIGURA 4.124 – Imagens de NCC 400 reduz. na forma seca a 10.000 e 20.000 x.....	243
FIGURA 4.125 – Imagens de NSM 1,0 na forma seca a 2.000 e 30.000 x	244
FIGURA 4.126 – Imagens de NCM 200 na forma líquida a 5.000 e 10.000 x	245
FIGURA 4.127 – Imagens de NCM 200 na forma seca a 1.000; 25.000; 50.000 e 100.000 x	245
FIGURA 4.128 – Imagens de NCM 400 na forma líquida a 60.000 e 120.000 x	246
FIGURA 4.129 – Imagens de NCM 400 na forma seca a 10.000 e 50.000 x	246

FIGURA 4.130 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de <i>P. bahiensis</i>	248
FIGURA 4.131 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de <i>P. bahiensis</i>	250
FIGURA 4.132 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das raízes de <i>P. bahiensis</i>	251
FIGURA 4.133 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial das frações obtidas do fracionamento cromatográfico das raízes de <i>P. bahiensis</i>	253
FIGURA 4.134 – Curva de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração H+D/01/01/03.....	255
FIGURA 4.135 – Curva de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da substância 8 .	256
FIGURA 4.136 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	258
FIGURA 4.137 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de <i>T. schomburgkianum</i>	259
FIGURA 4.138 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPH do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	261
FIGURA 4.139 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPD do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	263
FIGURA 4.140 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o extrato original diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i> e suas respectivas partições	265
FIGURA 4.141 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com a substância 19 proveniente do extrato diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	267
FIGURA 4.142 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias comerciais.....	268

FIGURA 4.143 – Estruturas dos compostos testados no ensaio inseticida frente às operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	270
FIGURA 4.144 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente aerossol	272
FIGURA 4.145 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente benzoato de benzila	273
FIGURA 4.146 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com sucessivas diminuições na concentração de benzoato de benzila.....	274
FIGURA 4.147 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas vazias e benzoato de benzila	275
FIGURA 4.148 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo crisofanol.....	277
FIGURA 4.149 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo crisofanol.....	278
FIGURA 4.150 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo menadiona.....	280
FIGURA 4.151 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo menadiona.....	282
FIGURA 4.152 – Curvas de sobrevivência de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as demais nanocápsulas contendo menadiona	283
FIGURA 4.153 – Ensaio fungicida da substância 8 frente à inibição do crescimento micelial.....	285
FIGURA 4.154 – Ensaio fungicida dos extratos brutos obtidos de <i>T. schomburgkianum</i>	287
FIGURA 4.155 – Ensaio fungicida da substância 17 frente à inibição do crescimento micelial.....	288
FIGURA 4.156 – Ensaio fungicida dos compostos naturais comerciais frente à inibição do crescimento micelial.....	289

RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO EM *Picramnia bahiensis* E *Thyrsodium schomburgkianum* – INSETICIDAS, FUNGICIDAS E MICROENCAPSULAÇÃO –

As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas as mais importantes pragas na agricultura, pastos e programas de reflorestamento devido ao desfolhamento causado pela descontrolada herbivoria que as plantas são submetidas. Os fatores como abundância dos recursos naturais como fonte de alimentos, escassez de inimigos naturais e competições entre outras espécies, promovem o ataque e, conseqüentemente, danos à plantação, gerando sérios prejuízos econômicos, já que a densidade dos ninhos de formigas-cortadeiras pode aumentar de 5 a 10 vezes em relação a um ambiente de equilíbrio ecológico. A ordem Sapindales é composta pelas famílias Staphyceaceae, Melianthaceae, Bretschneideraceae, Akaniceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Aceraceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Julianiceae, e Zygophyllaceae. Dentro destas famílias, diversos compostos com atividade inseticida e fungicida têm sido obtidos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos principais o estudo fitoquímico biomonitorado de *Picramnia bahiensis* e *Thyrsodium schomburgkianum* na obtenção de produtos naturais inseticidas (frente à *Atta sexdens rubropilosa*) e/ou fungicidas (frente ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*) e, principalmente, o estudo de metodologias de aplicação dos compostos bioativos para o seu controle. Assim, o estudo fitoquímico das plantas supracitadas permitiu o isolamento e identificação de 24 compostos, ácidos e ésteres de cadeia longa, antraquinonas, esteróides e terpenos, muito deles sendo identificados através da técnica de Espectrometria de Massas (HPLC/ESI-MS/MS), sendo que as substâncias **11** e **12** são inéditas na literatura. Dentre estes compostos, crisofanol, isolada das raízes de *P. bahiensis*, se destacou por apresentar atividade inseticida e fungicida em potencial frente às formigas-cortadeiras. Além disso, o estudo foi ampliado com compostos comerciais similares, levando ao composto menadiona, também com ambas as atividades em potencial. Este fato levou ao desenvolvimento de formulações através do processo de nanoencapsulamento no intuito de, além de obter compostos altamente ativos, desenvolver uma metodologia de aplicação dos mesmos, fornecendo assim um inseticida e fungicida que sejam viáveis no uso para o controle das formigas-cortadeiras. Assim, estes formicidas foram, pela primeira vez

na literatura, nanoformulados através da técnica de nanoencapsulamento, avaliando propriedades, como por exemplo, o prolongamento da atividade frente aos compostos livres, melhorando assim sua eficácia. Além disso, todo o método analítico foi validado via HPLC, seguindo as normas da ANVISA, visando, principalmente, a confiabilidade nos resultados de quantificação para a comparação com padrões de iscas tradicionais existentes no mercado.

Palavras chave: formigas-cortadeiras, *Picramnia bahiensis*, *Thyrsodium schomburgkianum*, nanoencapsulamento, validação do método

ABSTRACT

BIOMONITORED PHYTOCHEMISTRY STUDY OF *Picramnia bahiensis* AND *Thyrsodium schomburgkianum* – INSECTICIDES, FUNGICIDES AND MICRO-ENCAPSULATION – The leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* are considered between the most important plagues in agriculture, grassland and reforestation program, due the great amount of leaves cut which the plants are submitted. The factors such as natural resources abundance as food source, scantiness of natural enemies and competitions among others species, promote the attack and, consequently, damages to the plantation, generating serious economic damages, since the density of the nests of leaf-cutting ants can increase 5 to 10 times in relation to a nest in natural environment. The Sapindales order is composed by the families Staphyceaceae, Melianthaceae, Bretschneideraceae, Akaniceae, Sapindaceae, Hippocastanaceae, Aceraceae, Burseraceae, Anacardiaceae, Julianiceae, e Zygophyllaceae. Several compounds with insecticide and antifungal activities have been gotten from these families. In this context, the present work aimed as main objectives the bio-monitored phytochemistry study of *Picramnia bahiensis* and *Thyrsodium schomburgkianum* to obtain natural insecticides against *Atta sexdens rubropilosa* and/or fungicides against the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* and, specially, the study of methodologies to apply them to their control. The phytochemistry study of these plants allowed the isolation and identification of 24 compounds, acids and esters that have long chain, anthraquinones, steroids and terpenoids, many of them were identified using the Mass Spectrometry technique (HPLC/ESI-MS/MS), being that the substances **11** and **12** are previously unpublished in literature. Among these substances, chrysophanol, isolated from the roots of *P. bahiensis*, stand out to have potential insecticide and fungicide activities against the leaf-cutting ants. Furthermore, the study was extended with similar commercial compounds, leading to the compound menadione, also with both potential activities. This fact led to development of formulations through the nanoencapsulation process in order to, besides to obtain highly active compounds, develop an application methodology of them, thus providing an insecticide and fungicide that is viable to use in the leaf-cutting ants control. Therefore, these insecticides have been nanoformulated first time in the literature by the nanoencapsulation technique, evaluating properties such as, for example, the delay

activity compared to the free compounds, increasing their effectiveness. Additionally, the analytical method was validated via HPLC, following the ANVISA rules, aiming, mainly, reliability of the quantification results for comparison with traditional standards of baits in the market.

Keywords: leaf-cutting ants, *Picramnia bahiensis*, *Thyrsodium schomburgkianum*, nanoencapsulation, method validation

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – AS FORMIGAS-CORTADEIRAS	1
1.1.1 – <i>Métodos de controle</i>	4
1.2 – NANOENCAPSULAMENTO.....	6
1.3 – PROTÓTIPO DE INSETICIDA	10
1.4 – ORDEM SAPINDALES	11
1.4.1 – <i>Família Picramniaceae</i>	11
1.4.1.2 – Perfil fitoquímico do gênero <i>Picramnia</i>	11
1.4.2 – <i>Família Anacardiaceae</i>	18
1.4.2.1 – Perfil fitoquímico do gênero <i>Thyrsodium</i>	19
2 - OBJETIVOS	21
3 – EXPERIMENTAL	23
3.1 – MATERIAIS.....	23
3.1.1 – <i>Solventes e Reagentes</i>	23
3.1.2 – <i>Suportes para Cromatografia</i>	24
3.1.3 – <i>Reveladores Cromatográficos</i>	24
3.1.4 – <i>Outros aparatos</i>	25
3.2 – INSTRUMENTAÇÃO	25
3.2.1 – <i>Evaporadores rotativos</i>	25
3.2.2 – <i>Cromatógrafos e Espectrômetros</i>	26
3.2.3 – <i>Outros Equipamentos</i>	27
3.3 – METODOLOGIAS	29
3.3.1 – <i>Métodos cromatográficos - fracionamento biomonitorado – identificação das substâncias isoladas</i>	29
3.3.2 – <i>Ensaio inseticida frente às operárias de A. sexdens rubropilosa</i>	31
3.3.3 – <i>Ensaio de inibição do crescimento micelial do fungo simbionte L. gongylophorus</i>	34
3.3.4 – <i>Ensaio antifúngico</i>	36
3.4 – FITOQUÍMICA.....	37
3.4.1 – <i>Materiais vegetais</i>	37
3.4.2 – <i>Preparação dos extratos</i>	38

3.4.3 – Estudo do extrato bruto hexânico + diclorometânico das raízes de <i>P. bahiensis</i>	38
3.4.3.1 – Fracionamento do extrato bruto hexânico + diclorometânico (H+D) das raízes de <i>P. bahiensis</i>	39
3.4.3.2 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	42
3.4.3.3 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	44
3.4.3.3.1 – Mistura de ácidos e estéres de cadeia longa, esteróides e antraquinona provenientes do fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	45
3.4.3.4 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	46
3.4.3.5 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02/11 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	48
3.4.3.6 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	49
3.4.3.7 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03/03 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	50
3.4.3.8 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	52
3.4.3.9 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	53
3.4.3.10 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	55
3.4.3.11 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	56
3.4.3.12 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	58
3.4.3.13 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04/02 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	58
3.4.3.14 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/03 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	60

3.4.3.15 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	61
3.4.3.16 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05/04 das raízes de <i>P. bahiensis</i>	62
3.4.4 – Estudo do extrato diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	64
3.4.4.1 – Fracionamento do extrato bruto diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	64
3.4.4.2 – Fracionamento da partição hexânica do extrato bruto diclorometânico do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	65
3.4.4.3 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	67
3.4.4.4 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02/02+03 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	67
3.4.4.5 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	69
3.4.4.6 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	70
3.4.4.7 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	71
3.4.4.8 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03/02 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	72
3.4.4.9 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/05 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	74
3.4.4.10 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	75
3.4.4.11 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07/04 do caule de <i>T. schomburgkianum</i>	76
3.5 – ANÁLISE QUALITATIVA VIA HPLC/ESI-MS/MS.....	77
3.5.1 – Preparo das amostras.....	78
3.5.2 – Otimização das condições cromatográficas em HPLC/ESI-MS/MS.....	78
3.5.3 – Otimização das condições no Espectrômetro de Massas com ionização por Eletrospray (ESI-MS).....	80
3.5.4 – Otimização da posição da agulha na fonte de ionização por Eletrospray (ESI-MS)	82

3.6 – METODOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS	84
3.6.1 – Compostos nanoencapsulados	84
3.6.2 – Método de preparo das nanopartículas.....	84
3.6.3 – Método de nanoprecipitação ou nanodeposição interfacial do polímero pré-formado	87
3.6.4 – Caracterização físico-química das nanopartículas.....	89
3.6.4.1 – Validação do método analítico.....	90
3.6.4.1.1 – Linearidade.....	91
3.6.4.1.2 – Seletividade do método	91
3.6.4.1.3 – Especificidade do método.....	91
3.6.4.1.4 – Precisão (Repetibilidade e precisão intermediária)	92
3.6.4.1.5 – Exatidão.....	93
3.6.4.1.6 – Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD).....	93
3.6.4.2 – Eficiência de encapsulação	94
3.6.4.3 – Taxa de recuperação	95
3.6.4.4 – Diâmetro médio / Índice de polidispersão	95
3.6.4.5 – Potencial zeta	96
3.6.4.6 – Análise morfológica.....	96
3.6.4.7 – Determinação do pH.....	96
3.6.4.8 – Estudo da cinética de liberação “ <i>in vitro</i> ” das nanopartículas	97
3.6.4.9 – Secagem das nanopartículas	97
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4.1 – METABÓLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS	101
4.1.1 – Ácidos e ésteres de cadeia longa	105
4.1.2 – Antraquinonas.....	115
4.1.2.1 – Crisofanol (8)	115
4.1.2.2 – 8-O-metilcrisofanol (9)	120
4.1.2.3 – Biantrona do crisofanol (10).....	124
4.1.2.4 – Substâncias com esqueleto antraquinônico identificadas via HPLC/ESI-MS/MS	132
4.1.2.4.1 – Antronas glico-benzoiladas 11 e 12.....	138
4.1.2.4.2 – Oxantronas glico-benzoiladas 13 e 14	151
4.1.2.4.3 – Antronas glico-acetiladas 15 e 16.....	153
4.1.3 – Esteróides	166

4.1.3.1 – β -Sitosterol (7)	166
4.1.4 – <i>Triterperpenos</i>	167
4.1.4.1 – 3 β -hidróxiglutin-5-eno (17).....	167
4.1.4.2 – Mistura de olean-12-eno (18), β -amirenona (19) e friedelina (20) .	171
4.1.4.3 – Lupeol (21).....	176
4.1.4.4 – Mistura de β -amirina (22) e α -amirina (23)	179
4.1.5 – <i>Flavonóides</i>	184
4.1.5.1 – Flavona (24).....	184
4.2 – NANOPARTÍCULAS	190
4.2.1 – <i>Início do desenvolvimento das nanopartículas</i>	190
4.2.1.1 – Formulação das nanoesferas e nanocápsulas	199
4.2.1.2 – Determinação da taxa de recuperação e eficiência de encapsulação nas nanopartículas	200
4.2.1.2.1 – <i>Curva de calibração para nanopartículas contendo alizarina e as respectivas porcentagens de encapsulamento</i>	202
4.2.1.2.2 – <i>Curva de calibração para nanopartículas contendo crisofanol e as respectivas porcentagens de encapsulamento</i>	204
4.2.1.3 – Caracterização das nanopartículas.....	206
4.2.1.3.1 – <i>Tamanho de partículas / Índice de polidispersão e Potencial zeta para nanopartículas contendo alizarina</i>	206
4.2.1.3.2 – <i>Tamanho de partículas / Índice de polidispersão e Potencial zeta para nanopartículas contendo crisofanol</i>	208
4.2.2 – <i>Continuidade e finalização do desenvolvimento das formulações das nanopartículas</i>	210
4.2.3 – <i>Validação dos métodos cromatográficos via HPLC para crisofanol e menadiona</i>	213
4.2.3.1 – Linearidade do método	213
4.2.3.1.1 – <i>Crisofanol</i>	213
4.2.3.1.2 – <i>Menadiona</i>	214
4.2.3.2 – Seletividade do método	215
4.2.3.3 – Especificidade do método.....	218
4.2.3.4 – Precisão e exatidão do método	221
4.2.3.4.1 – <i>Crisofanol</i>	222
4.2.3.4.2 – <i>Menadiona</i>	223

4.2.3.5 – Limites de quantificação e detecção	224
4.2.4 – Caracterização físico-química	225
4.2.4.1 – Taxa de recuperação, Eficiência de encapsulação, diâmetro de partículas, potencial zeta e medição do pH	225
4.2.4.1.1 – <i>Crisofanol</i>	225
4.2.4.1.2 – <i>Menadiona</i>	228
4.2.4.2 – Secagem das nanopartículas	231
4.2.4.3 – Análise morfológica.....	234
4.2.4.3.1 – <i>Nanoesferas contendo crisofanol (NSC 1,0)</i>	234
4.2.4.3.2 – <i>Nanocápsulas contendo crisofanol (NCC 200, NCC 400 e NCC 400 reduz.)</i>	237
4.2.4.3.3 – <i>Nanoesferas contendo menadiona (NSM 1,0)</i>	243
4.2.4.3.4 – <i>Nanocápsulas contendo menadiona (NCM 200 e NCM 400)</i> ..	244
4.2.4.4 – Estudo da cinética de liberação “ <i>in vitro</i> ”	247
4.3 – ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	248
4.3.1 – <i>Atividade inseticida frente às operárias de A. sexdens rubropilosa</i>	248
4.3.1.1 – <i>Picramnia bahiensis</i>	248
4.3.1.1.1 – <i>Extratos brutos</i>	248
4.3.1.1.2 – <i>Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de P. bahiensis</i>	252
4.3.1.1.3 – <i>Substância 8 proveniente da fração H+D/01 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de P. bahiensis</i>	254
4.3.1.1.4 – <i>Frações H+D/02 e H+D/03 obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de P. bahiensis</i>	257
4.3.1.2 – <i>T. schomburgkianum</i>	257
4.3.1.2.1 – <i>Extratos brutos</i>	257
4.3.1.2.2 – <i>Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de T. schomburgkianum</i>	260
4.3.1.2.3 – <i>Substância 19 proveniente da fração TSPH/02/02+03/02 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de T. schomburgkianum</i>	267
4.3.1.3 – <i>Compostos naturais comerciais</i>	268

4.3.1.4 – Nanopartículas.....	270
4.3.1.4.1 – Componentes pertencentes às formulações	271
4.3.1.4.2 – Nanopartículas contendo crisofanol	276
4.3.1.4.3 – Nanopartículas contendo menadiona	279
4.3.2 – Atividade fungicida frente ao fungo simbiote <i>Leucoagaricus</i> <i>gongylophorus</i>	285
4.3.2.1 – <i>Picramnia bahiensis</i>	285
4.3.2.1.1 – Extratos brutos	285
4.3.2.1.2 – Substância 8 proveniente da fração H+D/01 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de <i>P. bahiensis</i>	285
4.3.2.2 – <i>Thyrsodium schomburgkianum</i>	286
4.3.2.2.1 – Extratos brutos	286
4.3.2.2.2 – Substância 17 proveniente da fração TSPH/02/02+03/02 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de <i>T.</i> <i>schomburgkianum</i>	288
4.3.2.3 – Compostos naturais comerciais.....	289
4.3.2.4 – Nanopartículas.....	290
4.3.3 – Atividade fungicida frente à <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Trichophyton rubrum</i>	290
4.3.3.1 – Extratos e frações de <i>P. bahiensis</i> e <i>T. schomburgkianum</i>	291
4.3.3.2 – Nanopartículas contendo crisofanol e alizarina	291
5 - CONCLUSÕES	295
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	297

1 – INTRODUÇÃO

A classe dos insetos se destaca como o mais diversificado em termos de número de espécies e populoso em relação ao ecossistema, tendo em sua maioria a presença de espécies herbívoras (OLIVEIRA et al., 2004). Direta ou indiretamente, cerca de 1% dos insetos são considerados prejudiciais ao homem, e o prejuízo causado por eles é na ordem de bilhões de dólares por ano em todo o mundo (PARRA et al., 2002). Com intuito de reduzir os danos causados pela herbivoria, as plantas, ao longo do processo evolucionário, desenvolveram um sistema de defesa eficiente (constitutivo e induzido) (KARBAN & BALDWIN, 1997). O sistema de defesa constitutivo está sempre presente na planta, de forma contínua, independente da presença ou a ação dos herbívoros, enquanto que o sistema de defesa induzido é expressado pela planta após a indução causada pelo herbívoro e essa resistência é expressada pela produção de compostos defensivos podendo atuar diretamente sobre os herbívoros ou inimigos naturais (FADINI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004).

Em relação às formigas, existem cerca de 14.000 espécies presentes no Planeta Terra (SARNAT et al., 2012), dado este disponível no site <http://www.antweb.org/introduced.jsp>, sendo que as formigas-cortadeiras possuem a capacidade de selecionar o material vegetal a ser cortado, pelo poder de distinguir à presença ou ausência de determinados metabólitos secundários tóxicos ou mesmo a quantidade de teor nutricional deste vegetal, para servir de substrato para o crescimento de seu fungo simbiote.

1.1 – AS FORMIGAS-CORTADEIRAS

As formigas-cortadeiras, mais conhecidas como quenquéns (*Acromyrmex*) e saúvas (*Atta*), são pertencentes à família Formicidae, dentro da ordem Hymenoptera (que inclui as vespas e abelhas), inserida na subfamília Myrmicinae, sendo que todas as formigas cultivadoras de fungo pertencem à tribo Attini (FERNÁNDEZ, 2003). Esta tribo abriga as formigas cultivadores de fungos, onde o seu cultivo é específico e se dá em determinados substratos de origem vegetal, existindo assim uma relação simbiótica obrigatória entre a formiga e o

fungo, *Leucoagaricus gongylophorus*. O cultivo deste fungo é a principal fonte de alimento para as larvas e rainha, que também pode suprir 9 % da energia requerida por uma formiga adulta (STRADLING & POWELL, 1992; BACCI JR. et al., 1998).

Esta tribo possui 13 gêneros, sendo estes *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Pseudoatta*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* (FERNÁNDEZ, 2003). O Brasil é o país que possui o maior número de espécies de saúvas em toda a América Latina, seguida pela Argentina e Paraguai, sendo a mais importante, *Atta sexdens rubropilosa* (STRADLING, 1991).



Fonte: Foto do autor



Fonte: Foto do autor



Fonte: http://www.flickr.com/photos/h_tinez/2500225679

FIGURA 1.1 – Soldados, jardineiras e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas em formigueiros artificiais em laboratório (fotos superior); Ilustração do desfolhamento realizada pelas formigas-cortadeiras (foto inferior).

As formigas-cortadeiras, quando presentes em ecossistemas naturais, mostram uma preferência por algumas espécies vegetais que sofrem a desfolhação (FIGURA 1.1), enquanto que outras não são atacadas, mesmo sendo abundantes e localizadas próximas ao formigueiro. As diferentes propriedades da planta, mais especificamente a repelência e atração, são as explicações para tal fenômeno, devido a uma relação inseto-planta de alta complexidade, proveniente de um processo evolucionário de mecanismos de defesa realizados pela planta juntamente com a adaptação das formigas-cortadeiras contra esses mecanismos de defesa (BUENO et al., 2005).

Apesar das formigas-cortadeiras apresentarem aspectos positivos e importantes ao meio ambiente, principalmente na transformação do solo, na poda da vegetação estimulando o seu crescimento, no aumento de uma grande quantidade de matéria orgânica para camadas profundas do subsolo promovendo a adubação pela decomposição deste material vegetal, no arejamento do solo devido ao sistema de túneis (HAINES, 1978; MIYASHIRA, 2007). As formigas-cortadeiras, principalmente os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (os gêneros mais derivados), são consideradas entre as mais importantes pragas na região Neotropical, já que sua distribuição geográfica é muito ampla e possuem o hábito de corte de uma grande diversidade de plantas nativas e também cultivadas na obtenção de sua principal fonte alimentar para o cultivo de seu fungo simbiote, gerando um grande prejuízo econômico, principalmente em plantações de *Eucalyptus* e *Pinus* (BOARETTO & FORTI, 1997).

Esta consideração se deve à alteração do ambiente gerado principalmente pela atividade humana, geralmente pelo desmatamento ou introdução de monoculturas, tornando-as pragas de difícil controle. Este desequilíbrio fornece uma abundância de recursos naturais como fonte de alimento, uma escassez de inimigos naturais e ausência de competições entre outras espécies, promovendo assim o ataque e, conseqüentemente, danos à plantação, gerando sérios prejuízos econômicos, já que a densidade dos ninhos de formigas-cortadeiras pode aumentar de 5 a 10 vezes em relação a um ambiente de equilíbrio ecológico (MOUNTINHO, 1995). A dimensão de um formigueiro é mostrada na FIGURA 1.2, sendo realizada uma escavação liderada pelo pesquisador Dr. Luiz Carlos Forti, indicando a dificuldade de se obter um controle efetivo sobre um ninho

de formigas-cortadeiras. Estima-se que o consumo nacional de iscas tóxicas é de aproximadamente 13.000 toneladas/ano, somente para as áreas de plantio de *Eucalyptus* e *Pinus*, tendo um valor de 6.515.844 hectares de área plantada em 2011 (ABRAF, 2012) e estima-se que são usadas entre 0,5 a 2,0 kg de iscas por hectare (FOELKEL, 2009). Isto demonstra a gravidade desta problemática na tentativa de minimizar os efeitos negativos causados por esta praga.



Fonte: <http://www.tecnoviado.com.ar/2011/03/o-interior-de-o-que-uma-formiga-gigante.html>

FIGURA 1.2 – Dimensão de um formigueiro adulto.

1.1.1 – Métodos de controle

Em relação ao controle de formigas-cortadeiras, diversas estratégias de controle são descritas na literatura, tais como o controle mecânico, cultural, químico e biológico (ARAÚJO et al., 2003), sendo o método químico o mais utilizado. Há diversos tipos de formulações para aplicação do inseticida, sendo uma delas na forma líquida, onde os concentrados de substâncias químicas são solúveis em

solventes orgânicos ou óleos ou emulsificados em água, ou a aplicação na forma de pó, onde os concentrados sólidos insolúveis em água estão em suspensão (BUENO et al., 1989).

No Brasil, o método de controle mais utilizado para o controle de formigas-cortadeiras consiste em iscas peletizadas contendo óleo de soja como veículo, polpa cítrica desidratada como atraente e um ingrediente ativo como princípio tóxico. O papel do óleo de soja é, basicamente, o solvente no qual o ativo será dissolvido, porém, segundo alguns autores, este também exerce função atrativa (BOARETTO & FORTI, 1997). A polpa cítrica, derivada da laranja, é obtida através do tratamento das cascas, sementes e bagaços desidratados, sendo este o atrativo efetivo mais apropriado, pois o mesmo serve como substrato para o desenvolvimento do fungo simbiote e apresenta alto teor de carboidrato, seu pH é levemente ácido, possuindo uma variedade de vitaminas e microelementos (BOARETTO & FORTI, 1997). Vale ressaltar que a polpa cítrica mostra um poder fundamental neste tipo de controle, já que a atratividade é de fundamental importância para a eficácia das iscas.

Atualmente, o uso de iscas granuladas, tendo como princípio ativo a sulfluramida, tem se destacado pela sua eficácia, tendo como principais motivos por oferecer maior segurança ao operador, baixo custo de mão de obra e maior rendimento no campo (ZANETTI et al., 2004), sendo que atualmente tem-se um grande avanço no desenvolvimento de compostos químicos mais potentes e especializado. Aparentemente a utilização destes para o controle das formigas-cortadeiras parece eficaz, porém há ainda o desafio de minimizar os danos causados pelos mesmos ao meio ambiente e que ainda há esforços nesse tipo de enfoque sem considerar uma possibilidade como o controle biológico (MIYASHIRA, 2007).

Uma possível explicação reside no fato de que na tentativa de controle destas pragas são necessários estudos de métodos que fornecessem resultados imediatos para uma solução rápida, pois estas sempre foram tratadas com métodos de emergência devido ao grande dano gerado e sua rapidez, sendo que os estudos no controle biológico não foram acompanhados por este. Atualmente, esta contradição tem sido muito discutida já que ao mesmo tempo em que os pesticidas são úteis a sociedade, é conhecido que estes são prejudiciais, persistentes e

contaminantes ao meio ambiente, sendo esta uma estratégia que pode gerar um desequilíbrio maior pela seleção de organismos mais resistentes (ALMEIDA et al., 2007).

Analisando os movimentos a nível mundial na preservação do ambiente, aliada a Química Verde, o controle biológico deve ser considerado sendo este também a base dos programas de manejo integrado de pragas (MIP). Ou seja, utilizar diferentes táticas de controle, principalmente por compostos isolados de fontes naturais, na tentativa de reduzir o impacto das formigas-cortadeiras (ou mesmo de outros insetos) considerados como pragas, minimizando o uso e os efeitos negativos de inseticidas químicos para seu controle (PARRA et al., 2002). Várias publicações, principalmente pelo Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFSCar, mostram a importância e a eficiência do emprego desse recurso natural no controle de pragas e a necessidade da utilização de táticas de MIP para sua preservação e aumento em sistemas agrícolas, florestais e pastoris.

Em razão do exposto acima, o controle biológico e por produtos naturais tem sido alvo de muitos pesquisadores na busca de compostos altamente específicos para formigas-cortadeiras e de baixa toxicidade ao meio ambiente, visando a sua proteção e ao ser humano. Também, a busca de novas metodologias de aplicação dos inseticidas e/ou fungicidas deve ser realizada. Para este último item, o nanoencapsulamento é a forma mais recente de formulação para aplicação, onde as partículas são dispersáveis em água (SEAMAN, 1990), tendo como vantagens a melhora na eficácia residual, estabilidade do princípio ativo, menor efeito sobre o meio ambiente, não reconhecimento do composto ativo frente aos insetos, liberação controlada e redução da toxicidade para mamíferos (OHTSUBO et al., 1991).

1.2 – NANOENCAPSULAMENTO

O termo nanoencapsulamento se refere à formação, a partir de metodologias específicas, de partículas em escala nanométricas (por definição inferior a 1 μm), onde estas partículas sólidas coloidais, definidas como nanopartículas, são sistemas carreadores de fármacos, geralmente constituídas por

materiais de natureza polimérica, de natureza biodegradável ou não biodegradável (MORA-HUERTAS et al., 2010; MOHANRAJ & CHEN, 2006). A partir do processo de preparação das nanopartículas e das matérias-primas utilizadas, pode-se gerar as nanoesferas (estruturas monolíticas esféricas constituídas por uma matriz tridimensional polimérica densa e porosa, formada pelo entrelaçamento das unidades poliméricas) e as nanocápsulas (sistemas do tipo reservatório que apresentam um núcleo oleoso ou aquoso rodeado por uma parede polimérica) (BRIGGER et al., 2002). A FIGURA 1.3 ilustra a estrutura das nanoesferas e nanocápsulas.

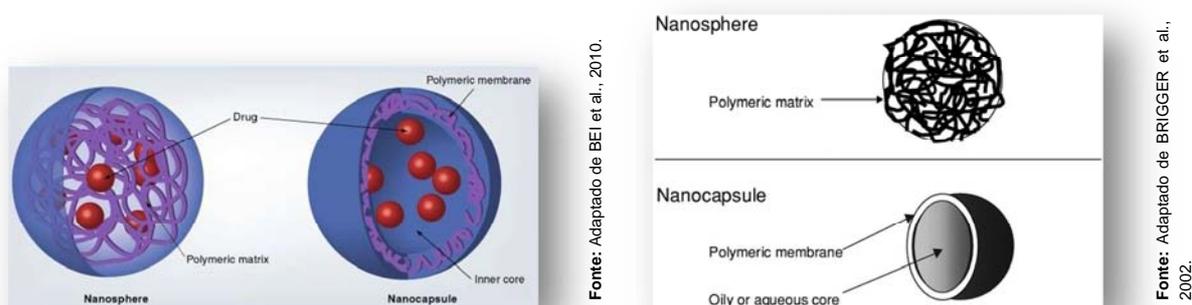
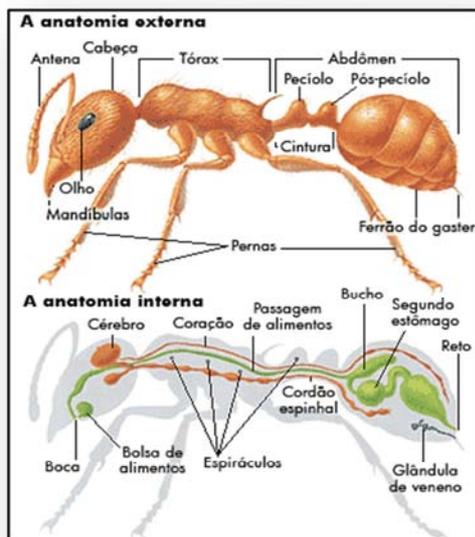


FIGURA 1.3 – Representação das duas subdivisões de nanopartículas: nanoesferas e nanocápsulas.

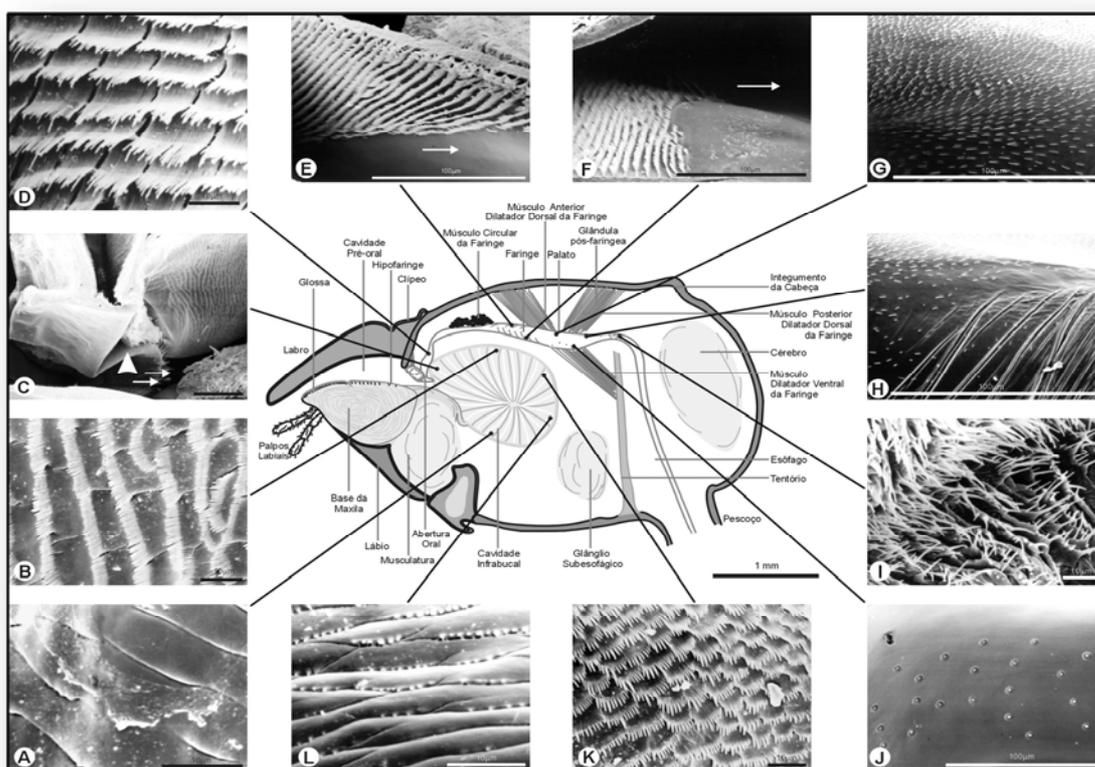
Diversos métodos são descritos para a obtenção das nanopartículas, tendo como métodos clássicos na preparação: nanoprecipitação, emulsão-difusão, dupla emulsificação, emulsão-coacervação, entre outros (MORA-HUERTAS et al., 2010). Dentre estes, o mais utilizado é a nanoprecipitação, sendo que nesse processo, o polímero (o mesmo deve ser solúvel em solvente orgânico e insolúvel em água), princípio ativo e estabilizante são solubilizados em um solvente semi-polar, como exemplo acetona ou etanol, e esta solução é adicionada, a uma vazão constante, em uma solução aquosa contendo ou não determinados estabilizantes, sob agitação magnética. No momento da adição das fases, na interface das duas fases, ocorre a precipitação do polímero, juntamente com o composto ativo, então há a formação instantânea das nanopartículas pela rápida difusão do solvente que é eliminado sob pressão reduzida (FESSI et al., 1988 e 1989; QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998). As variáveis chaves para esta metodologia, em relação

ao preparo, conseqüentemente à confecção das nanopartículas, são as associadas com as condições de adição da fase, ou seja, sua velocidade ou vazão controlada, agitação da fase aquosa, sendo que essas tornam importantes parâmetros para a boa estabilidade, tamanho e sua uniformidade.

A necessidade de um processo de nanoencapsulamento e a não de microencapsulamento, quando se relaciona às formigas-cortadeiras, se deve ao fato que para elas, o método mais eficaz para seu controle se dá pela ingestão do princípio ativo, já que a presença de um exoesqueleto duro e rígido não permite a penetração do mesmo para dentro de seu corpo, aliado ao *grooming* (ato de limpeza), que este fato indiretamente faz com que haja a locomoção de qualquer partícula aderida ao seu corpo para dentro de sua cavidade bucal, e somente as partículas com diâmetro menores que 1 μm conseguem efetivamente passar por diversos filtros presentes no sistema bucal da formiga e chegar ao sistema digestivo da mesma, como são mostrados na FIGURA 1.4.



Fonte: <http://formigueiros.mirmecolismo.com.br/search/label/Anatomia>



Fonte: Livro Insetos sociais da biologia à aplicação, Editora UFV - Viçosa, MG, 2008, 442p. Cap. 6 Utilização de alimentos pelas formigas-cortadeiras, pág. 99.

Autor da imagem: Odair Correa Bueno

FIGURA 1.4 – Sistema de filtros localizados no sistema bucal (acima); Anatomia de uma formiga (abaixo).

Assim, um sistema de nanopartículas contendo o máximo de composto bioativo encapsulado (alta eficiência de encapsulamento), irá reduzir a quantidade do veículo requerido para a administração suficiente do composto ativo em relação ao seu alvo, e com algumas características essenciais já supracitadas.

1.3 – PROTÓTIPO DE INSETICIDA

Em relação às colônias de formigas-cortadeiras, por se tratar de superorganismos, estas possuem características biológicas sociais, tais como cooperação e cuidados entre elas, divisão de tarefas por castas, sobreposição de gerações, entre outras mais, possuem também a capacidade de reconhecer e transmitir às companheiras algo estranho e tóxico frente a esses organismos, conferindo uma barreira em potencial no controle (MARINHO et al., 2006).

Tendo em vista essas características, diversos trabalhos especializados descrevem que um inseticida eficaz deve seguir alguns parâmetros, como não sofrer rejeição inicial (carregando-o para dentro do ninho), ser atrativo, agir por ingestão e, principalmente possuir ação retardada após o carregamento com mortalidade menor que 15% nas primeiras 24 horas e maior que 90% após 21 dias (BOARETTO & FORTI, 1997; DELLA-LUCIA, 1997; MARINHO et al., 2006; NAGAMOTO et al., 2004).

De fato, considerando o uso de princípios ativos sintéticos como sulfluramida e fipronil, estes sendo os mais utilizados no mercado atual, pela rápida ação mesmo em concentrações baixas faz com que haja a necessidade de uma camuflagem na metodologia de confecção e/ou aplicação dos mesmos. Ao mesmo tempo, o isolamento de determinado composto natural inseticida e/ou fungicida provavelmente não será tão potente e eficaz na ação. Porém dependendo do tempo de ação desta substância, aliada a metodologia correta de aplicação, torna este estudo de extrema importância na possibilidade do uso direto de compostos naturais, juntamente com o avanço no controle dos mesmos com o enfoque de reduzir o uso dos compostos sintéticos, causando um menor impacto negativo ao ambiente.

1.4 – ORDEM SAPINDALES

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

1.4.1 – Família Picramniaceae

A família Picramniaceae, em sua história taxonômica, mostrou possuir um período inicial de grande indefinição, cujo posicionamento era baseado na classificação morfológica, devido à ausência de dados químicos relativo à sua quimiosistemática. Uma nova classificação sugeriu a criação de uma nova família, Picramniaceae, contendo os gêneros *Picramnia* e *Alvaradoa*, excluindo-a da família Simaroubaceae (FERNANDO & QUINN, 1995).

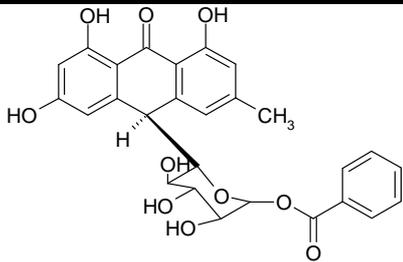
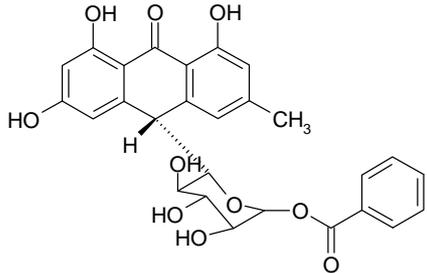
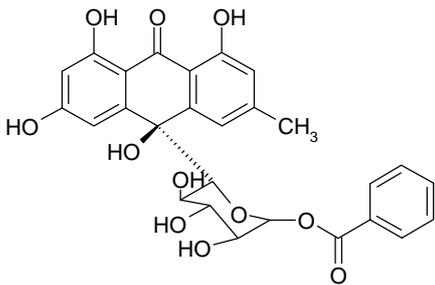
Trabalhos realizados com diversas espécies de *Picramnia* mostram a ausência de relatos de metabólitos secundários como quassinóides e outros (HERNANDEZ-MEDEL et al., 1996 e 1998; MONTEIRO, 1994; RODRIGUES FO., 1989; RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999, 2000 e 2001; SOLIS et al., 1995; VIEIRA, 1995) sugerindo o posicionamento na família Simaroubaceae inadequado, justificando assim seu novo posicionamento na família Picramniaceae, porém ainda na ordem Sapindales.

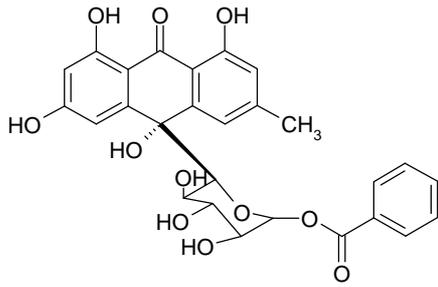
1.4.1.2 – Perfil fitoquímico do gênero *Picramnia*

A grande diversidade química de metabólitos secundários isolados de *Picramnia*, tais como, antraquinonas, cumarinas, esteróides, triterpenos do tipo

lupano, fenil-propanóides, antronas e oxantronas glicosiladas (DIAZ et al., 2004; HERNANDEZ-MEDEL et al., 1996, 1998 e 1999; MONTEIRO, 1994; RODRIGUES Fo., 1989; RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999, 2000 e 2001; SOLIS et al., 1995; VIEIRA, 1995), tem justificado os estudos deste gênero e, em alguns casos, à averiguação do potencial biológico destas espécies, como mostrado na TABELA 1.1.

TABELA 1.1 - Metabólitos secundários isolados de espécies de *Picramnia*

Substância	Planta	Atividade	Referência
 <p>Picramniosídeo D</p>	<i>P. teapensis</i>	-	RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999.
 <p>Picramniosídeo E</p>	<i>P. teapensis</i>	-	RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999.
 <p>Mayosídeo</p>	<i>P. teapensis</i>	-	RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999.
	<i>P. hirsuta</i>		HERNANDEZ-MEDEL et al., 1996.

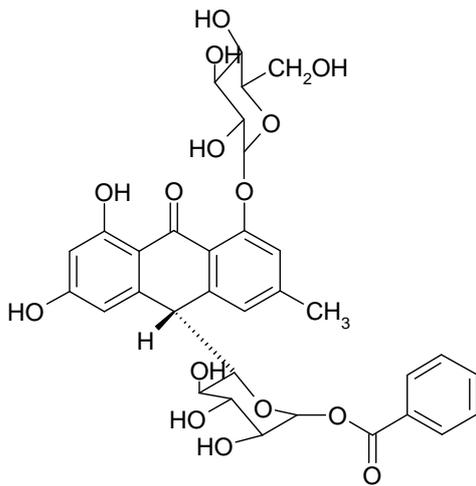


Mayosídeo B

P. teapensis

Fungicida

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999.

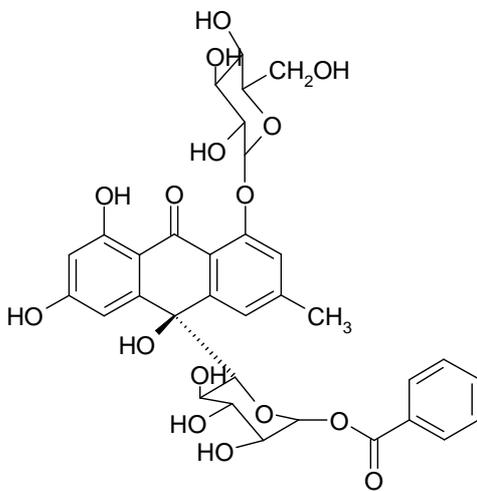


Picramniosídeo F

P. teapensis

-

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 2000.

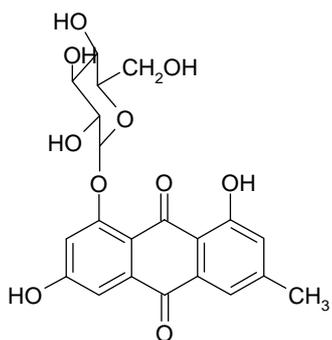


Mayosídeo C

P. teapensis

-

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 2000.



1-O-β-D-glucopiranosil emodina

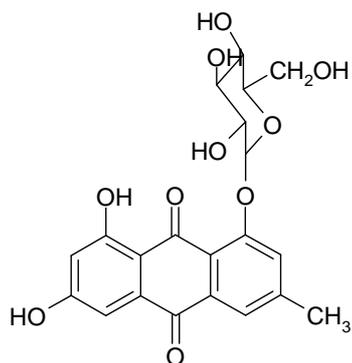
P. antidesma

Fungicida

HERNANDEZ-MEDEL et al., 1999.

P. teapensis

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 2000.



8-β-D-O-glucopiranosil emodina

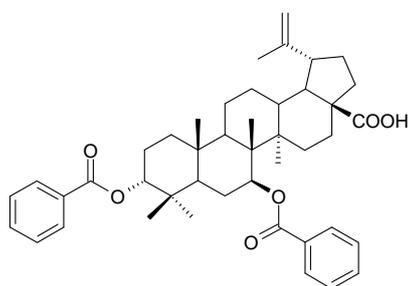
P. antidesma

Fungicida

HERNANDEZ-MEDEL et al., 1999.

P. teapensis

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 2000.

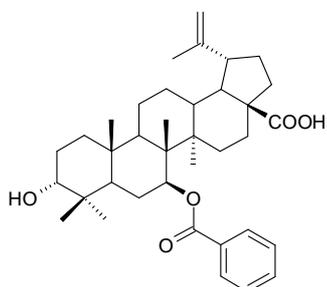


3α, 7β-dibenzoato do ácido lup-20(29)-en-28-óico

P. teapensis

-

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 2001.

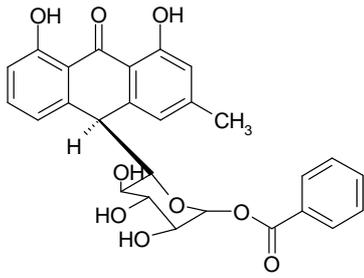


7β-benzoato do ácido 3α-hidróxi-lup-20(29)-en-28-óico

P. teapensis

-

RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 2001.

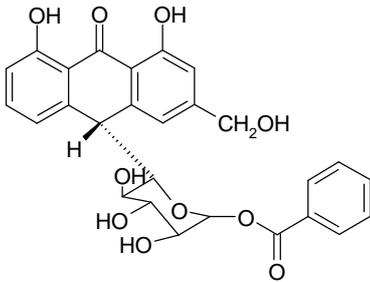


Uveosídeo

P. antidesma

-

HERNANDEZ-MEDEL et al., 1998.

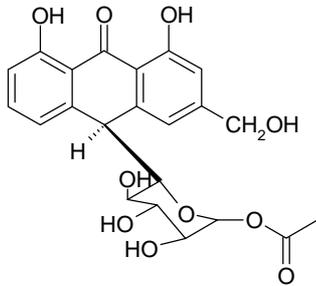


Picramniosídeo A

P. antidesma
ssp. fessonia

-

SOLIS et al., 1995.

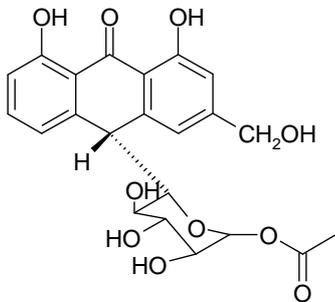


Picramniosídeo B

P. antidesma
ssp. fessonia

-

SOLIS et al., 1995.

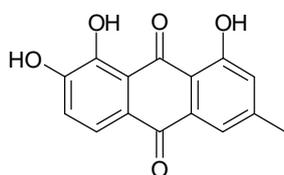


Picramniosídeo C

P. antidesma
ssp. fessonia

-

SOLIS et al., 1995.

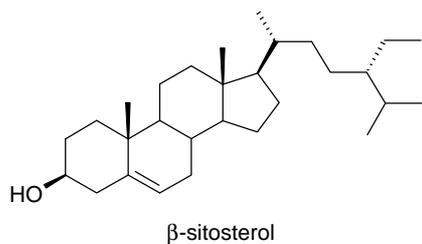


Nataloe-emodina

P. latifolia

Citotóxica

DIAZ et al., 2004.



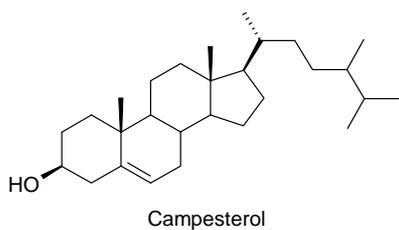
P. antidesma

HERNANDEZ-MEDEL et al.,
1998.

-

P. bahiensis

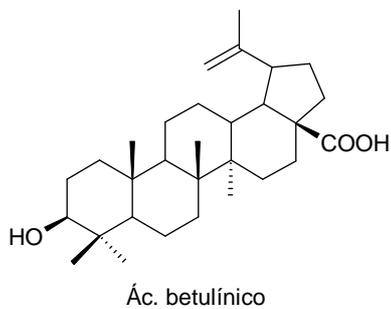
RODRIGUES
FILHO, 1989.
MONTEIRO,
1994.



P. bahiensis

-

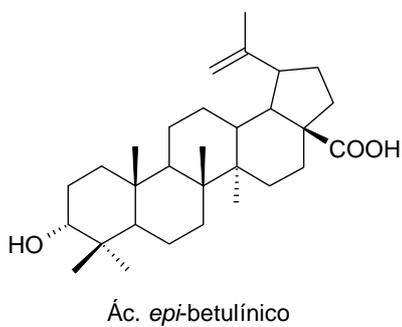
MONTEIRO,
1994.



P. bahiensis

-

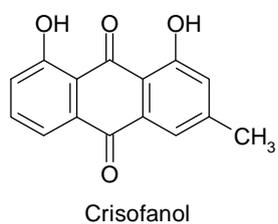
RODRIGUES
Fo, 1989.



P. bahiensis

-

VIEIRA, 1995.



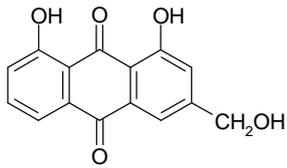
P. antidesma

HERNANDEZ-MEDEL et al.,
1998.

-

P. bahiensis

RODRIGUES
Fo, 1989.
MONTEIRO,
1994.



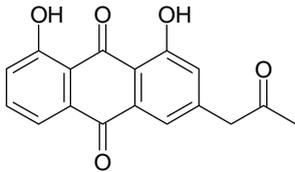
Aloe-emodina

P. antidesma
ssp. fessonia

SOLIS et al.,
1995.
RODRIGUES
Fo, 1989.

P. bahiensis

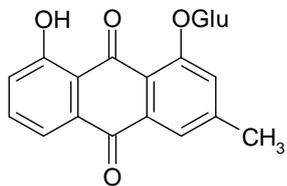
MONTEIRO,
1994.



Acetato de aloe-emodina

P. bahiensis

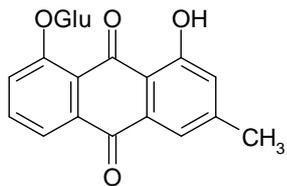
MONTEIRO,
1994.



1-O-β-glucopiranosil
crisofanol

P. bahiensis

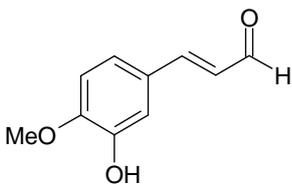
MONTEIRO,
1994.



8-O-β-glucopiranosil
crisofanol

P. bahiensis

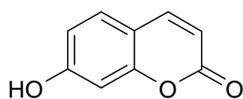
MONTEIRO,
1994.



3-hidróxi-4-metoxicinaldeído

P. bahiensis

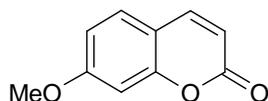
RODRIGUES
Fo, 1989.



7-hidróxicumarina

P. bahiensis

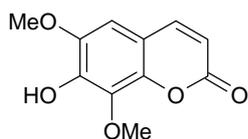
RODRIGUES
Fo, 1989.
MONTEIRO,
1994.



7-metóxicumarina
(Herniarina)

P. bahiensis

RODRIGUES
Fo, 1989.



Umbeliferona

P. bahiensis

-

MONTEIRO,
1994.

O estudo fitoquímico de *Picramnia bahiensis* levou ao isolamento de esteróides, triterpenos lupanos, fenil-propanóide, antraquinonas e cumarinas (MONTEIRO, 1994; RODRIGUES Fo., 1989; VIEIRA, 1995). Nestes trabalhos, tal espécie não foi investigada quanto à presença de substâncias fungicidas e inseticidas.

1.4.2 – Família Anacardiaceae

A família Anacardiaceae é constituída por cerca de 76 gêneros e 600 espécies, cujos gêneros são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae (PIO CORREA, 1984). *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lannea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea* são os gêneros mais estudados nesta família do ponto de vista químico e *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* são as mais investigadas com relação à suas composições químicas e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos, destacando-se neste sentido *M. indica* e *A. occidentale*. Nesta família foi verificada a ocorrência de flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e, principalmente, dos lipídios fenólicos e derivados e na classe dos flavonóides os biflavonóides são os mais freqüentes (CORRÊA et al., 2006).

Menos de 7% das espécies conhecidas da família tiveram estudos fitoquímico e de atividade já realizados. Nesta família são conhecidos gêneros (em torno de 25 %) com efeitos tóxicos e causadores de dermatite de contato severa e praticamente as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeae e Semecarpeae (VOGL et al., 1995; VOGL & MITCHELL, 1996).

A importância econômica, a diversidade de metabólitos e atividades biológicas tem justificado o enorme interesse no estudo de espécies desta família.

1.4.2.1 – Perfil fitoquímico do gênero *Thyrsodium*

Existe um número muito reduzido de estudos relatados na literatura de espécies de *Thyrsodium*, muitos trabalhos encontrados se referem às outras áreas de conhecimento (ANDRADE & RODAL, 2004; DA CUNHA & ALBURQUERQUE, 2006; MITCHELL & DALY, 1993), tendo um único trabalho publicado recentemente (COURTOIS et al., 2012), onde foi investigada a composição dos voláteis, principalmente os terpenos, em diferentes partes da planta. Vale ressaltar que as espécies estudadas não são a mesma descrita neste presente trabalho, sendo estudadas *Thyrsodium guianense* e *T. puberulum*. Portanto, se faz necessário um estudo com o intuito de investigar a espécie *T. schomburgkianum*, quanto à fitoquímica e a presença de substância(s) com atividade(s) biológica(s).

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais obter produtos naturais inseticidas e/ou fungicidas e desenvolver metodologias de aplicação dos mesmos para controlar *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae).

De um modo específico, pretendeu-se:

- Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado das plantas *Picramnia bahiensis* e *Thyrsodium schomburgkianum* visando o isolamento de novos compostos com atividade inseticida e/ou fungicida;
- Isolar e caracterizar os compostos das plantas estudadas que não apresentarem atividades supracitadas, contribuindo com informações sobre a quimiosistemática dos gêneros estudados, por estes serem pouco conhecidos sobre o ponto de vista químico;
- A partir do(s) composto(s) ativo(s), formular um inseticida através da técnica de nanoencapsulamento e comparando com padrões de iscas tradicionais existentes no mercado.

3 – EXPERIMENTAL

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 – Solventes e Reagentes

Água deionizada ultra pura proveniente de sistemas de filtragem e osmose reversa (0,08 μ S) foi obtida através de um equipamento (modelo Master System) da marca Gehaka e utilizada para o preparo das soluções como fase móvel para cromatografia líquida e no preparo das nanopartículas.

Metanol e Acetonitrila grau HPLC das marcas J.T.Baker e Panreac foram utilizados como fases móveis para cromatografias líquidas. Ácido acético glacial e acetato de amônio ambos da marca J.T.Baker (*'Baker Analyzed'® HPLC Reagent*) e ácido fórmico grau LC/MS da marca TCI America como aditivos às mesmas quando utilizadas na utilização do Espectrômetro de Massas.

Metanol grau MS da marca J.T.Baker e Tedia e acetonitrila grau MS da marca Tedia foram utilizados no preparo das soluções para a realização de infusão direta no Espectrômetro de Massas.

Solventes grau P.A. (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, etanol e metanol) destilados no próprio Departamento de Química foram utilizados no preparo das fases móveis para cromatografias em colunas.

Solventes deuterados (clorofórmio, acetona e metanol) das marcas Cambridge Isotope Laboratories Inc., Merck e Aldrich foram utilizados no preparo das amostras para a realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , nos experimentos uni e bidimensionais.

O polímero PLGA (50:50) M.M. 40000-75000, PCL, benzoato de benzila, Span® 60, lecitina de soja (40% de pureza), D(+)-glucose, solução tampão fosfato (ajustado a pH 5) e Pluronic® F-68 (copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno) da marca Sigma-Aldrich, Myritol® 318 (mistura de triglicerídeos dos ácidos caprílico/cáprico) e miristato de isopropila da marca Henkel, Span® 80 e

D(+)-trealose da marca Fluka, oleato de isodecila e Tween® 80 da marca Delaware e acetona grau HPLC da Panreac foram utilizados como composição na confecção das nanopartículas e análise das mesmas.

3.1.2 – Suportes para Cromatografia

Sílica gel 60 UV₂₅₄ sob suporte de alumínio da marca Aldrich e Macherey-Nagel GmbH & Co foram utilizadas na Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA). Gel de sílica 60 (63 - 230 µm) e gel de sílica tipo flash (40 – 63 µm), ambos da marca Acros Organics e sílica de fase reversa C₁₈ (60A, 40µm) da marca Sorbent Technologies foram usadas em Cromatografia em Coluna (CC), assim como Sephadex® LH-20 da marca Amersham Biosciences Inc.

Nas análises em HPLC foram utilizadas as colunas analítica Phenomenex® Luna - C₁₈ 10 µm (φ 4,6 x 250 mm) e semi-preparativa Phenomenex® Luna - C₁₈ 10 µm (φ 7,8 x 300 mm), sílica de fase reversa da marca Phenomenex empacotadas no próprio departamento; coluna preparativa Shodex GS-310 2G Asahipak empacotada com fase polimérica. Para as análises via HPLC (nanopartículas) e HPLC/MS foi utilizada coluna da marca Agilent, modelo Zorbax Eclipse XDB-18 (φ 4,6 x 150 mm, 5 µm) munida de uma coluna de segurança (pré-coluna) composta pela mesma fase estacionária da marca Phenomenex. Também foi utilizada a coluna da marca Macherey-Nagel GmbH & Co, modelo Nucleosil C₁₈ (φ 4,6 x 250 mm, 5 µm), pertencente ao CEQUIMED – Universidade do Porto.

3.1.3 – Reveladores Cromatográficos

Nas revelações dos cromatogramas em CCDA foram utilizadas irradiações no ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 356 nm através de uma câmara de luz UV. Posteriormente, solução de vanilina em ácido clorídrico, através da utilização de um borrifador e sob aquecimento, foi também usado como revelador.

3.1.4 – Outros aparatos

Para toda a parte do trabalho envolvendo a transferência de volumes, foram utilizadas um conjunto de micropipetas da marca Eppendorf, modelo Research, trabalhando em volumes de 1 µL a 1000 µL.

Para as filtrações das amostras, tanto das nanopartículas, quanto as amostras injetadas no HPLC, foram usados filtros das marcas Agela Technologies de 0,45 µm - φ 25 mm constituído de PVDF e da marca Macherey-Nagel GmbH & Co, modelo Chromafil O-20/15 MS constituído de PTFE de 0,20 µm – φ 15 mm, com a utilização de uma seringa descartável de 1ml.

Para o preparo das amostras de nanopartículas para quantificação foi utilizado tubos estéreis próprios para filtração da marca Corning Incorporated, modelo Costar Spin-X com volume de 2,0 mL e filtro de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm.

Para as secagens das nanopartículas foi utilizado como suporte o dióxido de silício coloidal da marca Delaware, Aerosil® 200.

3.2 – INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 – Evaporadores rotativos

Os rotaevaporadores utilizados foram da marca Büchi, modelo rotaevaporador R-200, R-114 e R-205, equipados com banhos Büchi B-490 e B-480, recirculador refrigerador da marca Thermo Scientific, modelos Neslab CFT-25 e Neslab Thermo Felx 900, todos mantidos a 5°C e acoplados às bombas de vácuo da marca Sibata Scientific Technologies.

O rotaevaporador utilizado, pertencente ao CEQUIMED – Universidade do Porto foi da marca Büchi acoplado a bomba de vácuo Büchi V-70.

3.2.2 – Cromatógrafos e Espectrômetros

As análises em CG/EM foram realizadas em espectrômetro Shimadzu GC-MS – QP 5000 (*Gas Chromatography Mass Spectrometer*), equipado com coluna da marca Macherey-Nagel GmbH & Co, modelo Optima-5 de 30 m de comprimento e ϕ 0,25 mm com 0,25 μ m, operando com ionização no modo positivo por ionização por elétrons (IE) a 70 eV. O software utilizado para tratamento dos dados foi o *GCMS Real Time Analysis*.

As análises em RMN foram realizadas nos aparelhos: marca Bruker, modelo ARX 200 operando a 200 MHz para núcleo de ^1H e 50 MHz para ^{13}C ; marca Bruker, modelos DRX 400 e Avance III operando a 400 MHz para núcleo de ^1H e 100 MHz para ^{13}C ; marca Bruker, modelo Avance III Ultrashield Plus operando a 600 MHz para núcleo de ^1H e 150 MHz para ^{13}C . Todos foram utilizados para a realização das técnicas necessárias para caracterização das substâncias.

Os espectros de infravermelho dos extratos brutos foram registrados em Espectrofotômetro da marca Bomem Hartmann & Braun, modelo MB-102.

O fracionamento do extrato bruto foi realizado em um Cromatógrafo em contracorrente de alta velocidade (HSCCC) da marca AECS QuickPrep, modelo Quattro CCC, munido de quatro bobinas (colunas) de ϕ 2,1 mm e 500 *psi*, operando com volumes de 54, 169, 80 e 140 mL e acoplado a uma bomba da marca LabAlliance, modelo Series II.

As análises via HPLC foram realizadas nos seguintes equipamentos:

° Marca Shimadzu modelo LC – 6A com modo reciclo, munido de detector com um comprimento de onda, modelo SPD – 6AV, bomba de marca Shimadzu, modelo LC – 6AD. A comunicação detector/computador foi realizada através de um módulo CBM – 6A e programa SHIMADZU Class – VP;

° Marca Shimadzu modelo LC – 10AD, modelo SPD – M 10A VP, munido de detector com dois comprimentos de onda. A comunicação detector/computador foi realizada através de um módulo CBM – 10A e programa SHIMADZU Class – VP;

° Marca Agilent Technologies, modelo Agilent 1200 series, configurado com um degaseificador G1322A, bomba quaternária G1311A, auto injetor G1367B, compartimento de coluna termostaticado G1316A e um detector trabalhando com um comprimento de onda G1316A com software *EZI Chrome*;

° Marca Agilent Technologies, modelo Agilent 1260 series configurado com os mesmos compartimentos supracitados no modelo anterior operando com software *OpenLab*;

° Marca Jasco acoplado a duas bombas modelo Jasco 880-PU, com detector de ultravioleta de comprimento variável Jasco 875-UV, este pertencente ao CEQUIMED – Universidade do Porto.

As análises feitas em Espectrômetro de Massas com ionização à pressão atmosférica (API) foram registradas, via acoplamento com cromatografia líquida ou por infusão direta, no equipamento da marca Applied Biosystems Life Technologies (AB/MDS Sciex), sob a plataforma API™ 2000, munido de analisador triplo quadrupolo e com duas fontes de ionização: ionização por *electrospray* (fonte TurbolonSpray®) (ESI-MS) e ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS). A parte cromatográfica foi realizada em um equipamento da marca Agilent, modelo 1200 series nas mesmas configurações já supracitadas para o mesmo modelo, porém com detector com arranjo de diodos (DAD). O software utilizado para tratamento dos dados foi o *Analyst* versão 1.5.1.

3.2.3 – Outros Equipamentos

° Agitador magnético com temperatura regulável da Marca Thermolyne Mirak, modelo SP73230-26, pertencente ao CEQUIMED – Universidade do Porto;

° Espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 3E, pertencente ao CEQUIMED – Universidade do Porto;

° Centrífuga da marca Heraeus Sepatech e Ultracentrífuga da marca Beckman, modelo UL-80, pertencente ao CEQUIMED – Universidade do Porto;

° Equipamento de medição do potencial zeta e tamanho das partículas da marca Malvern Instruments, modelo Zeta Sizer Nano Series (Nano-ZS), pertencente à Universidade do Porto;

° Placa de aquecimento com agitação magnética da marca Ika, modelo RT10 Power IkaMag®, com 10 pontos de agitação e aquecimento;

° Centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5810R, com opção de refrigeração e velocidade máxima de 14000 rpm ou 16400 g;

° Capela de fluxo laminar da marca Veco, modelo VLFS-12M;

° Estufa (B.O.D.) com fotoperíodo e termoperíodo da marca Eletrolab, modelo EL 202, com temperatura mantida à 25°C;

° Balança analítica da marca A&D Company, modelo GH-202;

° Medidor de pH da marca Qualxtron, modelo 8010, calibrado com soluções padrões de pH 4 e 7;

° Equipamento Spray Dryer da marca Büchi, modelo B-290;

° Equipamento Vortex da marca Boeco, modelo Combi-Spin FVL-2400 Plus;

° Equipamento Speed Vac da marca Labconco, modelo Centrivap 7810005, acoplado a um *trap* com resfriamento (modelo 7811001) e bomba de vácuo (modelo 7917101);

° Equipamento de medição do potencial zeta e tamanho das partículas da marca Microtrac, modelo Zetatrac, utilizando o programa Microtrac Flex Software, pertencente ao Laboratório de Polímeros do Instituto de Física – Universidade de São Paulo;

° Equipamentos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da marca Fei, modelos Magellan 400L e Inspect S50, pertencente ao Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de São Carlos.

Os equipamentos sem indicação de propriedade pertencem ao Laboratório de Bioensaios – Universidade Federal de São Carlos.

3.3 – METODOLOGIAS

3.3.1 – Métodos cromatográficos - fracionamento biomonitorado – identificação das substâncias isoladas

Todos os extratos das diferentes partes das plantas em estudo (folhas, caule e raízes), foram submetidos aos bioensaios de mortalidade frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* para verificação da atividade inseticida e de inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus* (atividade fungicida), visando assim detectar em quais extratos encontravam-se os metabólitos bioativos.

Os extratos bioativos tiveram seu perfil cromatográfico avaliado através de CCDA (Cromatografia em Camada Delgada Analítica), CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) no modo analítico, espectroscopia de infravermelho e por RMN de ^1H para provável verificação e definição das principais classes de metabólitos secundários presentes nos mesmos.

Os extratos e as frações bioativas foram submetidas a fracionamento cromatográfico em gel de sílica sob pressão ou em Sephadex® LH-20, utilizando-se misturas de solventes em polaridade gradiente ou em modo isocrático. A avaliação dos bioensaios das frações provenientes destes fracionamentos indicou quais deveriam ser submetidas a posteriores processos de separação.

A partir daí, foram utilizados métodos usuais de separação em sílica de fase normal, em fase reversa, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência, sempre utilizando os bioensaios para o monitoramento de cada etapa de purificação.

Técnicas cromatográficas tradicionais foram utilizadas: CRV (Cromatografia Rápida sob Vácuo), CLC (Cromatografia Líquida em Coluna), utilizando-se várias fases estacionárias (principalmente sílica gel do tipo “flash”, sílica gel 70-230 mesh e Sephadex® Lipofílico (HARBORNE, 1988; SCOTT, 1994; WOLF, 1965) e CLAE (BIDLINGMEYER, 1992). Para misturas mais polares e/ou mais complexas foram utilizadas as técnicas de contra-corrente como HSCCC (*High Speed Counter-Current Chromatography*) (ITO & CONWAY, 1995 e 2005; VIEIRA et al., 1996).

Após o isolamento da(s) substância(s) bioativa(s) e sua(s) caracterização(ões) por métodos espectrométricos (IV, UV, EM, RMN 1D e 2D) (ADAMS, 1995; BREITMAIER et al., 1979; BREITMAIER, 1993; CREWS, 1998; McLAFFERTY & TURECEK, 1993; NAKANISHI, 1990; SILVERSTEIN et al., 2005; VANDENDOOL & KRATZ, 1963; WEHRLI & WIRTHLIN, 1976 e químicos FIESER & FIESER, 2006), os testes de bioatividade foram então repetidos, com o objetivo de se confirmar o potencial biológico de cada substância.

3.3.2 – Ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*

Os extratos, as frações e substâncias puras obtidas dos fracionamentos cromatográficos foram enviados para o biomonitoramento frente ao ensaio de atividade tóxica (por ingestão), realizada no Centro de Estudos de Insetos Sociais na Universidade Estadual Paulista de Rio Claro (CEIS UNESP – Rio Claro), sob supervisão do Prof. Dr. Odair Correa Bueno e as alunas responsáveis pelos ensaios, coordenadas pela Marcela Ceccato.

Para o controle deste ensaio, foi utilizado uma dieta pura pré-estabelecida pelo grupo (BUENO et al., 1997), como mostram a TABELA 3.1 e FIGURA 3.1. Vale ressaltar que esta dieta é isenta de qualquer extrato ou composto e a mesma serve como a melhor alternativa de manutenção das mesmas quando desprovidas de sua dieta natural. O tempo de vida médio de uma formiga à base desta dieta é de aproximadamente 25 dias, período este de duração do experimento, já que acima deste tempo o tempo de vida das operárias de *A. sexdens rubropilosa* pode interferir nos resultados obtidos.

TABELA 3.1 – Ingredientes contidos na dieta pura (controle) para ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* (BUENO et al., 1997)

Componentes	Quantidade (% m/v)
Glicose	5,0
Peptona bacteriológica	1,0
Extrato de levedura	0,1
Ágar bacteriológico	1,0



Fonte: Foto do autor



Fonte: Foto do autor



Fonte: Foto do autor



Fonte: Foto do autor

FIGURA 3.1 – Pesagem dos ingredientes pertencentes à dieta (foto superior); transferência dos mesmos para os frascos sem e com adição de água destilada e autoclavagem de todo o material pertencente ao ensaio (fotos inferiores).

Resumidamente, este ensaio se baseia em quatro etapas (conforme metodologia desenvolvida por BUENO et al., 1989): isolamento aleatório de operárias de formigueiros mantidos em laboratório, incorporação do material vegetal a dieta preestabelecida, transferência das formigas em placas de Petri® (ϕ 10,0 cm) contendo a dieta em estufa de B.O.D. a 24 ± 1 °C com umidade relativa acima de 70% e avaliação diária da mortalidade das formigas com tempo total de experimento em 25 dias. A FIGURA 3.2 ilustra todas as etapas supracitadas.



Ninho de formigas-cortadeiras mantido em laboratório

Fonte: Foto do autor



Transferência aleatória das operárias

Fonte: Foto do autor



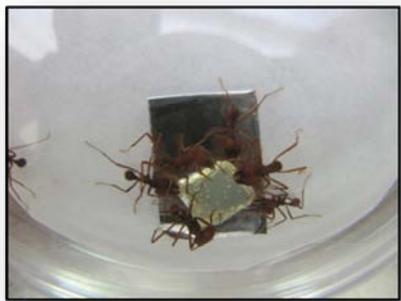
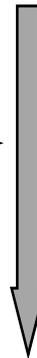
Dieta artificial (controle)

Fonte: Foto do autor

+



Fonte: Foto do autor



Fonte: Foto do autor



Ensaio inseticida contendo 10 operárias

Fonte: Foto do autor



Avaliação diária da mortalidade

Fonte: Foto do autor

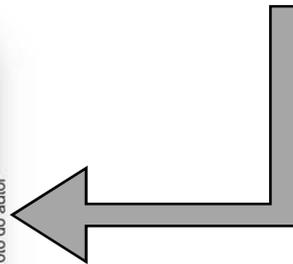


FIGURA 3.2 – Ilustração das etapas realizadas no experimento de avaliação da atividade inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Foram calculadas as taxas de sobrevivência diária para cada tratamento, a partir dos dados obtidos, construindo assim curvas de longevidade, as quais foram aplicadas a análise de variância, onde o número médio de dias de sobrevivência de cada placa foi calculado e utilizado como observação nas análises. Os tratamentos onde se verificou bons resultados foram submetidos a teste de Dunnet, uma comparação múltipla de médias com relação ao controle (MOTULSKY, 1995). Para a análise dos dados, foi utilizado o software *Graph-Pad Prism 3.0*.

3.3.3 – Ensaio de inibição do crescimento micelial do fungo simbiote *L. gongylophorus*

A realização do ensaio de inibição do fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*) foi inicialmente desenvolvida no Centro de Estudos de Insetos Sociais na Universidade Estadual Paulista de Rio Claro (CEIS UNESP – Rio Claro), sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e modificado e implementado, onde foi realizada no Laboratório de Bioensaios da UFSCar sob a supervisão da Dra. Ana Paula Terezan. O ensaio de atividade inibitória do crescimento micelial do fungo fundamenta-se na ação inibitória de extratos/substâncias fungicidas potenciais sobre o meio de cultura do mesmo.

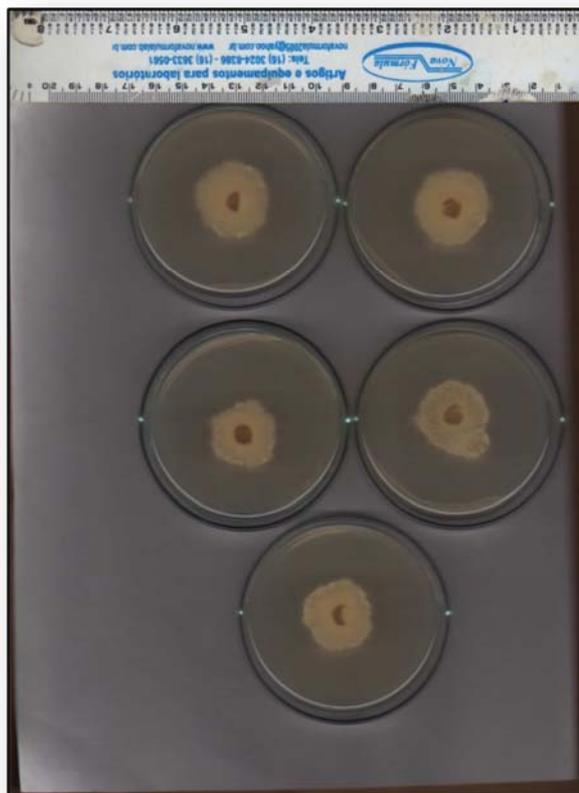
Inicialmente, o ensaio consistia, resumidamente, em quatro etapas principais: isolamento do microorganismo do ninho do formigueiro; adição do extrato/substância a ser testado a um meio de cultura apropriado; incubação do fungo e a avaliação do crescimento do fungo ao meio de cultura (RODRIGUEZ-GAMBOA, 2001). Decorrido o tempo de incubação (30 dias), foi observado o crescimento do fungo através da leitura dos resultados com base na quantidade e densidade do micélio, como mostrado a seguir: +5 = crescimento idêntico ao controle (100%); +4 = crescimento equivalente a 80% do controle; +3 = crescimento equivalente a 60% do controle; +2 = crescimento equivalente a 40% do controle; +1 = crescimento equivalente a 20% do controle ou inferior e 0 = ausência total de crescimento.

Com as alterações, o ensaio realizado no próprio Departamento de Química se baseia nas mesmas quatro principais etapas citadas anteriormente.

Sendo assim, o fungo, inicialmente, foi isolado de um ninho de formigas-cortadeiras *A. sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por repicagens 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 dissolvidos em água destilada, obtendo concentração final em torno de 100 e 1000 µg/mL. Em seguida, em cada tubo de ensaio, foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaios com o meio de cultura/extrato e placas de Petri® (80 X 15 mm) foram autoclavadas nas condições 120°C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de culturas foram vertidos nas placas de Petri® dentro da capela de fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri® foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Todas as amostras foram preparadas com réplicas. Após o período de incubação de 30 dias, a 25 ± 2°C foram realizadas as medidas do diâmetro médio final e calculado a área do crescimento micelial para cada placa, em cada amostra, sendo que esta metodologia é uma adaptação do artigo base (MIYASHIRA, 2007). As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbiote dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbiote. A FIGURA 3.3 ilustra a leitura dos resultados de inibição do crescimento micelial de *L. gongylophorus*.



Fonte: Foto do autor

FIGURA 3.3 – Ilustração da leitura das placas como resultado da inibição do crescimento micelial de *L. gongylophorus*.

3.3.4 – Ensaio antifúngico

O ensaio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob a supervisão da Profa. Dra. Eugénia Pinto e ao Dr. Luís Vale Silva. A atividade biológica dos compostos ensaiados foi avaliada frente à *Candida albicans* (ATCC 10231), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 46645) e *Trichophyton rubrum* (CECT 2794), tendo como controle de qualidade *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258), juntamente com Fluconazol como controle positivo.

A metodologia utilizada foi baseada na *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utilizando os protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008a

e b; VALE-SILVA et al., 2010). Abaixo é mostrada uma ilustração da metodologia utilizada para este ensaio (FIGURA 3.4).

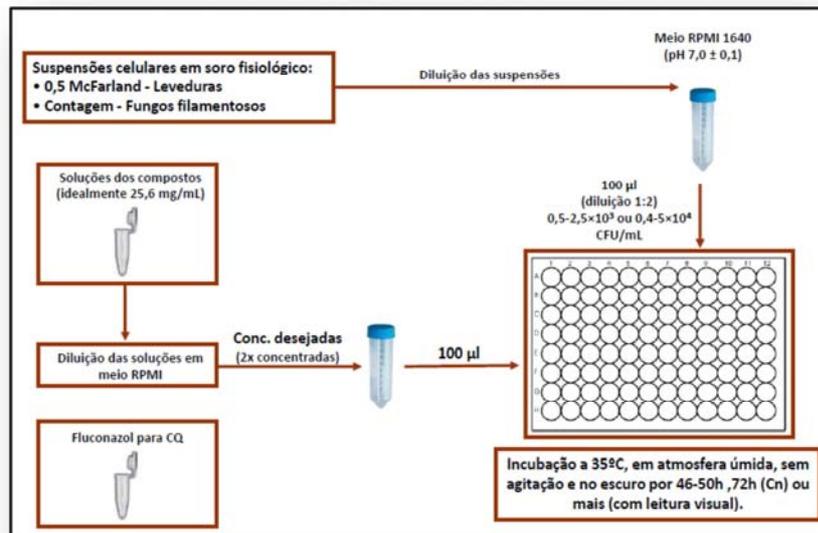


FIGURA 3.4 – Ilustração da metodologia utilizada para o ensaio antifúngico.

3.4 – FITOQUÍMICA

3.4.1 – Materiais vegetais

As plantas em estudo, *Picramnia bahiensis* e *Thyrsodium schomburgkianum* foram coletadas e identificadas pelo Dr. José Rubens Pirani do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo e as exsiccatas das mesmas foram depositadas nesta instituição. Em relação à localização da coleta, a planta *P. bahiensis* foi coletada na Estrada Piuma-Marataízes no Estado de Espírito Santo e, a outra planta, *T. schomburgkianum*, foi coletada no Município de Santa Luzia, Estrada para Estância no Estado de Sergipe.

3.4.2 – Preparação dos extratos

Para a preparação dos extratos, os mesmos foram feitos pela técnica responsável Dorai Periotto Zandonai, seguindo o protocolo já estabelecido de preparo dos mesmos, obtidos os extratos, eles foram mantidos em freezer, na extratoteca do Laboratório de Produtos Naturais. As diversas partes das plantas, folhas, galhos e raízes, foram secas em estufa e reduzidas a pó por moagem. Em seguida, os extratos brutos foram preparados, submetendo o material vegetal previamente obtido à extração exaustiva em hexano, CH₂Cl₂ e MeOH. A TABELA 3.2 apresenta as massas dos materiais secos e dos extratos obtidos.

TABELA 3.2 – Extratos preparados de *P. bahiensis* e *T. schomburgkianum*

Planta	Parte do vegetal	Massa seca (g)	Extrato hexânico (g)	Extrato diclorometânico (g)	Extrato metanólico (g)
<i>P. bahiensis</i>					
	Folhas	47,0	1,25	1,86	4,36
	Caule	342,0	0,69	2,45	18,91
	Raízes	219,0	0,75	2,32	12,56
<i>T. schomburgkianum</i>					
	Folhas	774,0	10,56	12,16	38,07
	Caule	4417,0	30,51	52,14	262,00

3.4.3 – Estudo do extrato bruto hexânico + diclorometânico das raízes de *P. bahiensis*

Todos os extratos brutos de *P. bahiensis* foram submetidos aos ensaios inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* e fungicida frente ao *L. gongylophorus*. A partir dos resultados, foi escolhido como alvo de estudo o extrato bruto hexânico e diclorometânico das raízes de *P. bahiensis* por apresentar

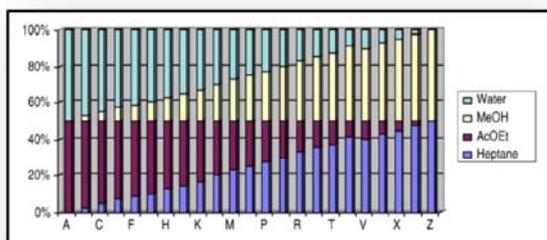
uma atividade inseticida em potencial, no intuito de isolar e caracterizar as substâncias bioativas. Vale ressaltar que ambos os extratos foram analisados através dos espectros de RMN de ^1H e por CCDA e verificou-se uma semelhança entre eles pelo perfil cromatográfico, direcionando assim a reunião em um único extrato denominado de H+D.

3.4.3.1 – Fracionamento do extrato bruto hexânico + diclorometânico (H+D) das raízes de *P. bahiensis*

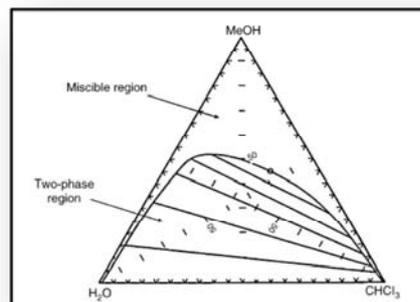
A partir das análises via CCDA e do espectro de RMN de ^1H , foi observado a presença de uma grande variedade de compostos de polaridades distintas, tendo em sua maioria a presença de compostos de polaridade intermediária. A partir deste dado, foi escolhida a utilização da Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (*High-Speed Counter-Current Chromatography – HSCCC*), que tem como principal vantagem em relação à cromatografia de coluna convencional, a eliminação de suporte sólido como fase estacionária (ITO, 2005) e, conseqüentemente, a diminuição das adsorções de modo irreversível vistas principalmente em cromatografia por adsorção.

A base da técnica se baseia na partição de uma determinada amostra entre duas fases (orgânica e aquosa) contidas em um sistema de solventes imiscíveis (MARSTON & HOSTETTMANN, 2006), onde ocorre a separação, ou seja, uma cromatografia líquida-líquida. O sucesso desta técnica é visto nas publicações em revistas especializadas, na purificação de alcalóides, antraquinonas, flavonóides, saponinas, entre outras classes de metabólitos (CAZAL et al., 2009; CAO et al., 1999; DERSKEN et al., 1998; KATAVIC et al., 1999; LEITE et al., 2005; LIU et al., 2004; MA et al., 2003; VIEIRA et al., 1996, YANG et al., 1998; YANG & ITO, 2001).

O sucesso neste tipo de cromatografia é a correta escolha do sistema de solvente. Diversos métodos de sistemas de solventes têm sido publicados em trabalhos por Camacho-Frias & Foucault (1996), ou mesmo através de modelos de diagramas de solventes, tais como modelo de Margraff e Conway (FIGURA 3.5, MARSTON & HOSTETTMANN, 2006).



Fonte: MARSTON & HOSTETTLMANN, 2006



Fonte: MARSTON & HOSTETTLMANN, 2006

FIGURA 3.5 – Ilustração do modelo de Margraff (à esquerda) e modelo de Conway (à direita) utilizados na escolha dos sistemas de solventes.

Outra possibilidade de escolha do sistema é através da busca em artigos especializados onde são encontrados inúmeros exemplos destes sistemas usados em HSCCC. Assim, para uma busca na eficiência na separação, foram inicialmente testados diversos sistemas de solventes obtidos na literatura, sendo os principais sistemas testados que apresentaram uma melhor separação e resolução estão listados abaixo:

1. Hex : AcOEt : ACN : H₂O (10:8:1:1 v/v/v/v)
2. MeOH : DCM : H₂O (5:4:3 v/v/v)
3. Hex : ACN : AcOEt (1:1:0,4 v/v/v)
4. Hex : AcOEt : MeOH : H₂O (1:1,5:2,5:1 v/v/v/v)
5. AcOEt : EtOH : H₂O (2:1:2 v/v/v)

Dois métodos podem ser realizados para guiar a escolha do sistema de solventes, sendo eles por CCDA e HPLC. Para este trabalho, a escolha destes sistemas foi guiado por CCDA, e através das análises das fases hidroalcolica e orgânica, verificou-se que o melhor sistema para o fracionamento foi MeOH : DCM : H₂O (5:4:3 v/v/v), onde este forneceu uma melhor distribuição igual entre as duas fases e valores de R_f entre 0,2 e 0,5. Vale ressaltar que os valores de R_f é apenas um indicativo da adequação de um sistema de solvente em particular em relação à distribuição dos compostos presentes em cada fase, pois este, diferentemente da técnica de HSCCC, envolve além da partição, o fenômeno de adsorção à fase estacionária. Sendo assim os parâmetros utilizados para a injeção e análise foram:

- Número de colunas = 4 colunas
- Massa da amostra injetada = 1,5 g (Loop de 5 mL)
- Sistema de eluição = MeOH : DCM : H₂O (5:4:3 v/v/v)
- Fase móvel = orgânica / Fase estacionária = hidroalcóolica
- Fase superior = fase hidroalcóolica / Fase inferior = fase orgânica
- Vazão = 4 mL/min

Foram coletadas 60 frações de aproximadamente 10 mL, juntamente com a inversão e o recolhimento de 500 mL da fase orgânica, como também a fase hidroalcóolica (fase estacionária) com a finalidade de retirar alguma parte do extrato que estivesse retida nestas fases, que após evaporação do solvente e análise por CCDA, foram reunidas em 08 frações a partir da semelhança em seus perfis cromatográficos, como apresentado na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 - Fracionamento cromatográfico do extrato H+D (1,5 g) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/01	1 a 3	830,3
H+D/02	4 a 8	228,2
H+D/03	9 a 18	169,5
H+D/04	19 a 23	17,2
H+D/05	24 a 29	61,9
H+D/06	30 a 42	41,5
H+D/07	43 a 54	11,2
H+D/08	55 a 60	7,3
F.O limp.	-	18,0
F.A limp.	-	6,0

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou a presença de substâncias com perfil aromático em todos os grupos. Na fração H+D/01 observou a predominância de material graxo, enquanto que nas seguintes pouca quantidade deste foi observada. Nas frações H+D/02, H+D/03, H+D/05 e H+D/06 foi observada uma possível presença de compostos glicosilados, podendo haver a possibilidade da existência de antronas, antraquinonas e/ou oxantronas glicosiladas e diglicosiladas (BALDERRAMA et al., 2001; DIAZ et al., 2004; HERNANDEZ-MEDEL et al., 1996, 1998 e 1999; RODRIGUEZ-GAMBOA et al., 1999 e 2000; SOLIS et al., 1995; VIEIRA, 1995) conforme levantamento bibliográfico já realizado no projeto de pesquisa. A FIGURA 3.6 ilustra o fracionamento referente ao extrato bruto H+D das raízes de *P. bahiensis*.

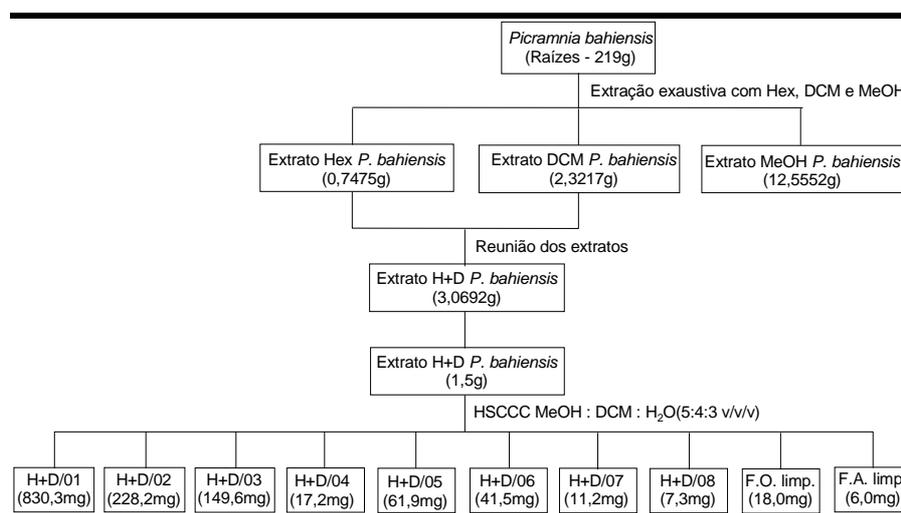


FIGURA 3.6 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico do extrato das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.2 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01 das raízes de *P. bahiensis*

Parte da fração H+D/01 (770,3 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato bruto H+D obtido das raízes de *P. bahiensis*, foi submetida a uma cromatografia em coluna “seca” em gel de sílica tipo flash como fase estacionária, utilizando H_2O a 10% para desativá-la e como fase móvel hex:AcOEt

1:1. Para extração foi utilizado AcOEt, e quando permanecia impregnado na sílica, foi utilizado MeOH.

Observaram-se 14 colorações aparentemente distintas na coluna e as mesmas foram cortadas em fatias e extraídas. Após análise por CCDA, elas foram reagrupadas em 07 frações, de acordo com a TABELA 3.4.

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou a presença de substâncias com perfil aromático e hidrogênios quelados na região próximo de $\delta_{\text{H}}12$ nas 06 frações e a predominância de material graxo em todas as frações. Nas frações H+D/01/03 a H+D/01/06 observou-se sinais entre $\delta_{\text{H}} 5,6$ a $\delta_{\text{H}} 2,0$.

TABELA 3.4 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01 (770,3 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/01/01	1 a 3	284,2
H+D/01/02	4 a 7	53,2
H+D/01/03	8 a 10	109,5
H+D/01/04	11 e 12	86,8
H+D/01/05	13	79,1
H+D/01/06	14	134,6

Uma possível explicação se dá pela existência de uma grande quantidade de um composto que poderia estar interagindo com os ácidos graxos, já que este fato foi detectado por apresentar uma coloração amarelada e pelo presente em toda a coluna. A FIGURA 3.7 ilustra o fracionamento realizado com a fração H+D/01 das raízes de *P. bahiensis*.

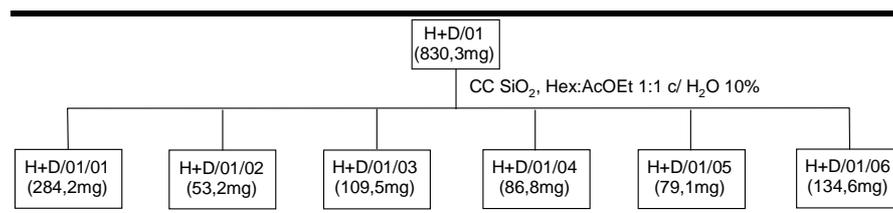


FIGURA 3.7 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/01 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.3 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/01/01 (284,2 mg), proveniente do fracionamento descrito anteriormente, foi submetido a uma coluna cromatográfica em gel de sílica tipo flash como fase estacionária, tendo como fase móvel inicial para a eluição hexano, seguido de hex:AcOEt 9:1, aumentando o gradiente de eluição em 10% e, por último, MeOH.

Foram coletadas 44 frações de aproximadamente 20 mL cada, reunidos em 07 frações após análises em CCDA (TABELA 3.5).

TABELA 3.5 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 (284,2 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/01/01/01	1 a 6	18,1
H+D/01/01/02	7 a 9	6,2
H+D/01/01/03	10 a 16	37,2
H+D/01/01/04	17 a 20	6,0
H+D/01/01/05	21 a 26	31,8
H+D/01/01/06	27 a 37	69,3
H+D/01/01/07	38 a 44	89,0

As 06 primeiras frações foram analisadas por CG/EM para uma possível identificação em mistura, utilizando como comparação e confirmação o banco de dados do próprio aparelho, bem como o banco de dados do “*National Institute of Standards and Technology*” (NIST). A última fração não foi analisada já que sua solubilidade se deu em solvente polar, incompatível com a técnica, e por esse motivo não foi injetada para análise. Juntamente, todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou a presença majoritária de um composto no grupo H+D/01/01/03. As frações H+D/01/01/02 e H+D/01/01/04 apresentaram sinais semelhantes, porém ainda em mistura com outro composto. Este grupo foi submetido a análises espectrométricas, visando sua caracterização estrutural.

3.4.3.3.1 – Mistura de ácidos e estéres de cadeia longa, esteróides e antraquinona provenientes do fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 das raízes de *P. bahiensis*

As frações H+D/01/01/01, H+D/01/01/02, H+D/01/01/03, H+D/01/01/04, H+D/01/01/05 e H+D/01/01/06 foram analisadas via CCDA, utilizando como revelador o reagente de vanilina, indicando uma possibilidade da presença de compostos relativamente apolares, tais como compostos lipofílicos, esteróides ou terpenos. Assim, por se tratar de compostos apolares em misturas, estas frações foram submetidas às análises via CG/EM com a fonte por ionização por elétrons (EI) a 70 eV em concentração de 1 mg/mL.

Os parâmetros utilizados foram: temperatura inicial do forno de 100°C durante 3 minutos, aumentando a temperatura em 5°C/min até a temperatura final de 280°C, mantendo esta durante 15 minutos, totalizando 54 minutos de corrida, tendo temperatura do injetor em 250°C, temperatura da interface em 280°C e fluxo final de 0,8 mL/min. Todas as frações foram analisadas nas mesmas condições utilizando o modo *split* e volume de injeção de 1 µL.

Na fração H+D/01/01/01 foram identificados por CG/EM e RMN de ^1H , uma mistura de estéres de cadeia longa (substâncias **1**, **2**, **3** e **4**). A substância **5** foi identificada, também via CG/EM e RMN de ^1H , como sendo ácido carboxílico de cadeia longa, obtida nas frações H+D/01/01/05 e H+D/01/01/06. O esteróide **6** foi

identificado em mistura, juntamente com o composto **5**, na fração H+D/01/01/05, sendo que o esteróide **7** foi identificado em mistura também na fração H+D/01/01/06. Nas frações H+D/01/01/02, H+D/01/01/03 e H+D/01/01/04 foi identificado a substância **8**, porém estes com quantidades variáveis do contaminante ftalato, sendo estes submetidos à cromatografia para sua purificação utilizando a mesma metodologia descrita no item **3.4.3.4**.

A FIGURA 3.8 mostra o fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 e os compostos obtidos a partir de suas frações.

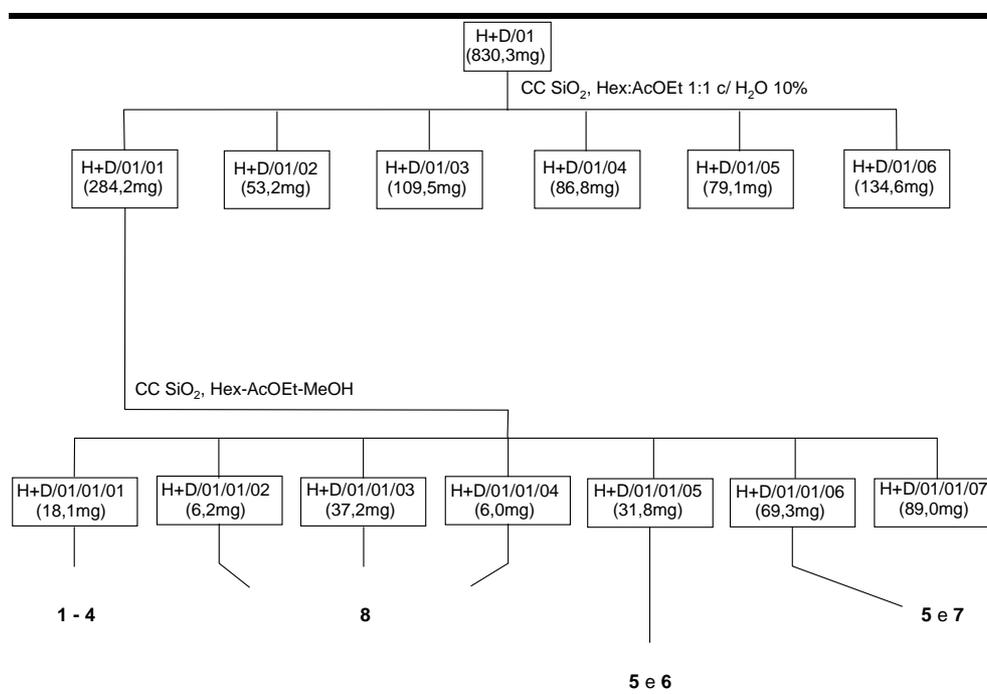


FIGURA 3.8 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/01 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.4 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/01/02 (53,2 mg) foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica tipo flash como fase estacionária, tendo como fase

móvel inicial hexano, seguido de diferentes proporções de hex:DCM, acetona e, por último, MeOH. Foram coletadas 101 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 14 frações após análises em CCDA (TABELA 3.6).

TABELA 3.6 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02 (53,2 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/01/02/01	1 a 15	2,8
H+D/01/02/02	16 a 31	0,7
H+D/01/02/03	32 a 35	0,6
H+D/01/02/04	36 a 50	2,4
H+D/01/02/05	51 a 55	1,9
H+D/01/02/06	56 e 57	2,1
H+D/01/02/07	58 a 75	7,8
H+D/01/02/08	76 a 79	1,0
H+D/01/02/09	80 e 81	0,7
H+D/01/02/10	82 a 85	0,3
H+D/01/02/11	86 a 94	4,0
H+D/01/02/12	95 a 97	1,1
H+D/01/02/13	98	19,1
H+D/01/02/14	99 a 101	4,8

Todas as frações foram analisadas por CCDA e por RMN de ^1H as obtidas com massa superior a 1,0 mg. Foi verificado a presença do composto **8** já descrito anteriormente nas frações H+D/01/02/06 (na presença de mistura) e H+D/01/02/07. A fração H+D/01/02/11 se mostrou relevante a ser estudada pela boa separação via CCDA com a pela presença de uma mancha amarelada, porém, de R_f menor em relação ao crisofanol e juntamente com a presença de outra substância.

3.4.3.5 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02/11 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/01/02/11 (4,0 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02, mostrou ser uma mistura binária. Assim, esta foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando DCM 100% como fase móvel e para a extração do composto adsorvido na sílica utilizou-se AcOEt. Assim foram coletadas duas manchas de polaridades distintas (TABELA 3.7).

TABELA 3.7 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/02/11 (4,0 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações obtidas	R _f na CCDA	Massa (mg)
H+D/01/02/11/01	Superior	1,5
H+D/01/02/11/02	Inferior	1,9

Através da análise de RMN de ¹H verificou-se que na fração H+D/01/02/11/01 foi isolado e identificado o composto **9** e na fração H+D/01/02/11/02 o esteróide **7**, sendo este já identificado anteriormente.

Abaixo, através da FIGURA 3.9, segue o fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos descritos nos itens **3.4.3.4** e **3.4.3.5**.

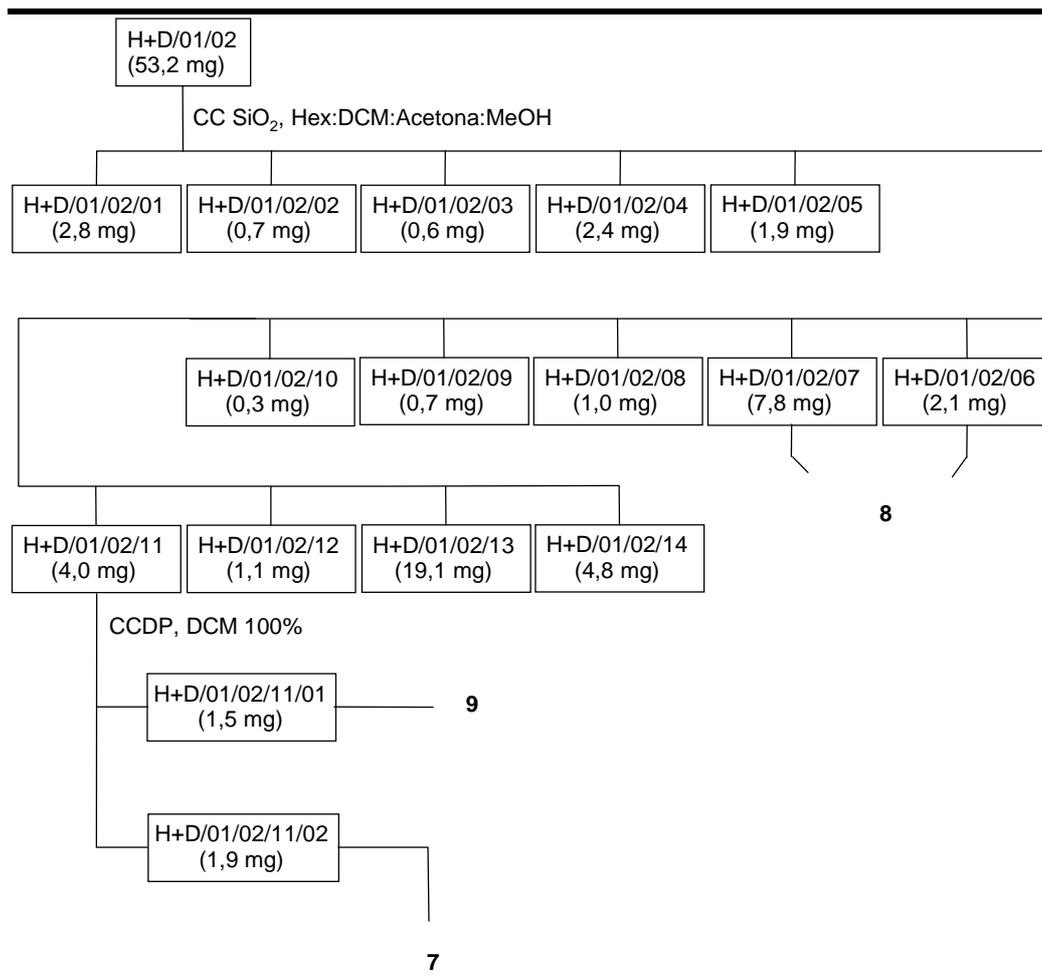


FIGURA 3.9 – Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações H+D/01/02 e H+D/01/02/11 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.6 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/01/03 (109,5 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico do grupo H+D/01, foi submetida a uma coluna cromatográfica em Sephadex® LH-20 como fase estacionária, com eluição isocrática utilizando o sistema DCM:MeOH 4:6. Foram coletadas 27 frações contendo em cada 10 mL e através das análises em CCDA foram agrupadas em 04 frações (TABELA 3.8).

TABELA 3.8 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03 (109,5 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/01/03/01	1 a 4	23,4
H+D/01/03/02	5 e 6	16,5
H+D/01/03/03	7 a 13	42,3
H+D/01/03/04	14 a 27	20,0

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou, novamente, uma maior presença de material graxo na primeira fração, decaindo sua quantidade em relação às frações seguintes (presença de sinais relativos a hidrogênios aromáticos e sinais entre δ_{H} 5,8 a 0,6 e no grupo H+D/01/03/03 a presença de sinais referentes a hidrogênios quelados próximos a δ_{H} 12).

3.4.3.7 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03/03 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/01/03/03 (42,3 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03, foi submetida novamente a cromatografia em Sephadex® LH-20 utilizando como fase móvel o sistema isocrático DCM:MeOH 2:8. Foram coletadas 24 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 04 novas frações após análises em CCDA dada suas semelhanças nos perfis cromatográficos (TABELA 3.9).

TABELA 3.9 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03/03 (42,3 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/01/03/03/01	1 a 5	6,9
H+D/01/03/03/02	6 e 9	11,5
H+D/01/03/03/03	7 a 13	10,8
H+D/01/03/03/04	14 a 24	11,2

A partir das análises por RMN de ^1H , verificou-se a presença novamente do composto **8** na fração H+D/01/03/03/03. Vale ressaltar aqui que todas as frações contendo este composto foram submetidas a fracionamento cromatográfico com objetivo de isolar uma maior quantidade do mesmo, pois este composto, por apresentar atividade inseticida e fungicida, foi submetido ao processo de nanoencapsulamento.

O Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/01/03 e H+D/01/03/03 (descritos nos itens **3.4.3.6** e **3.4.3.7**) é mostrado na FIGURA 3.10.

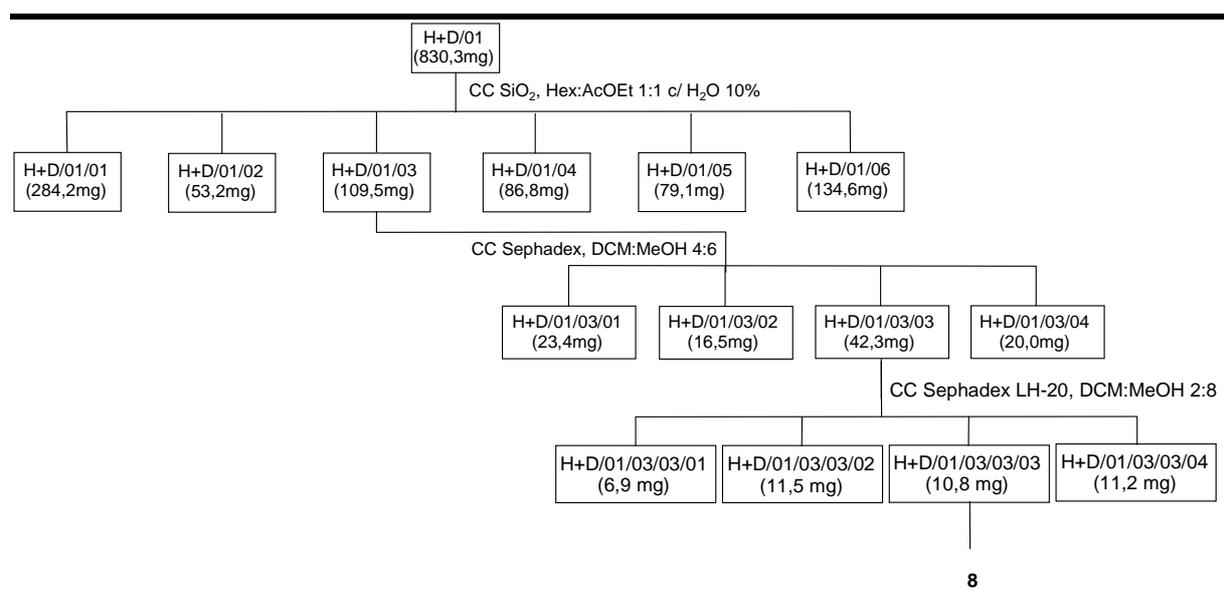


FIGURA 3.10 – Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações H+D/01/03 e H+D/01/03/03 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.8 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/02 (97,6 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato H+D bruto obtido das raízes de *P. bahiensis*, foi submetido a uma coluna cromatográfica em Sephadex® LH-20 como fase estacionária, com eluição isocrática utilizando MeOH 100%. Foram coletadas 24 frações contendo em cada 10 mL e através das análises em CCDA foram agrupadas em 05 frações (TABELA 3.10).

Vale ressaltar que a massa utilizada neste fracionamento não corresponde à obtida inicialmente já que este foi ensaiado frente à atividade inseticida e tendo uma parte da massa restante reservada para posteriores ensaios.

TABELA 3.10 - Fracionamento cromatográfico do grupo H+D/02 (97,6 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/02/01	1 a 4	20,5
H+D/02/02	5 e 6	18,1
H+D/02/03	7 e 8	44,4
H+D/02/04	9 a 12	3,0
H+D/02/05	13 a 24	3,1

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou a presença predominante de material graxo na primeira fração, tendo sinal característico de aromático nos grupos H+D/02/02, H+D/02/03 e H+D/02/04, sinais característicos de hidrogênios quelados em torno de $\delta_{\text{H}}12$ no grupo H+D/02/03 com alta complexidade pela grande presença de compostos desta classe química. A FIGURA 3.11 refere-se ao fluxograma da fração H+D/02.

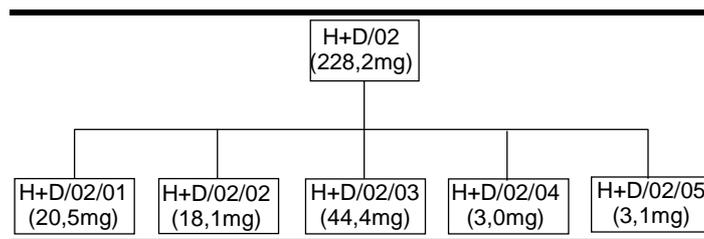


FIGURA 3.11 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.9 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/02/03 (44,4 mg) foi fracionada em HPLC (FIGURA 3.12) utilizando coluna polimérica Shodex, com *loop* de 200 μ L, como fase móvel MeOH 100% e utilizando o comprimento de onda a 254 nm para detecção. Foram obtidas 04 bandas cromatográficas e coletadas. Nesse fracionamento houve um problema no momento da injeção e houve perdas significativas da massa da fração fracionada.

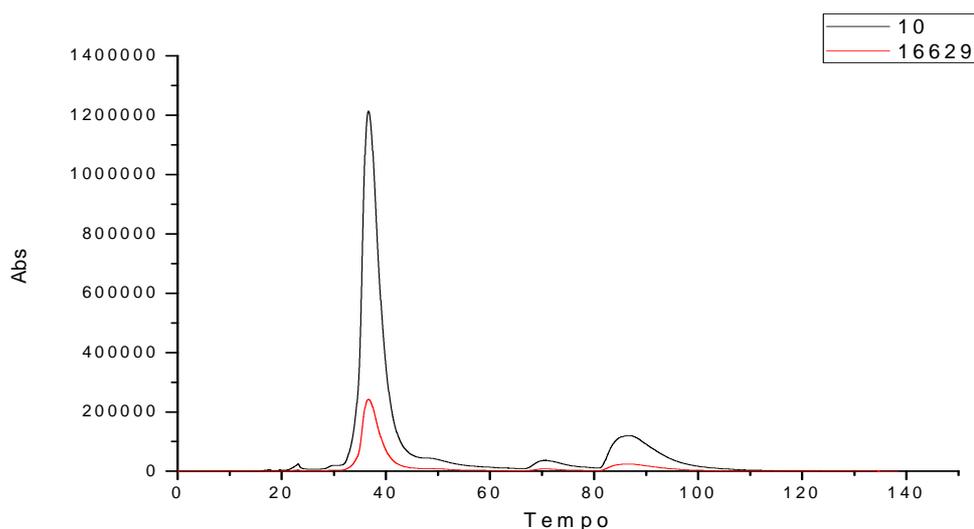


FIGURA 3.12 – Cromatograma referente à fração H+D/02/03.

A numeração das frações se deu pela ordem sucessiva das bandas coletadas. As massas referentes a cada banda são apresentadas na TABELA 3.11.

TABELA 3.11 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03 (44,4 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Intervalo recolhido	Massa (mg)
H+D/02/03/01	Até 30 min.	1,4
H+D/02/03/02	30 a 60 min.	24,1
H+D/02/03/03	68 a 80 min.	2,6
H+D/02/03/04	80 a 110 min.	2,7

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H , onde se verificou que a mistura majoritária estava presente na fração H+D/02/03/02. O restante das frações foi analisado, porém não se verificou interesse em seus estudos e aliada a pouca quantidade haveria certa dificuldade na análise das misturas dos componentes presentes. O fluxograma do fracionamento cromatográfico da fração estudada está apresentado na FIGURA 3.13.

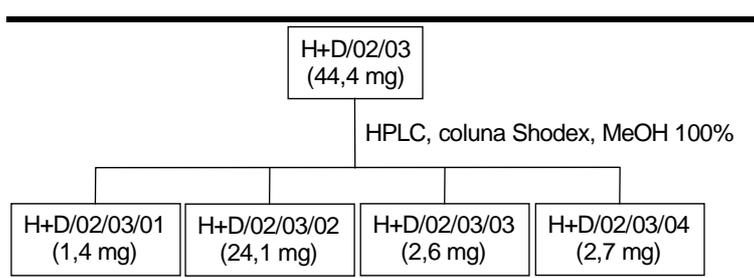


FIGURA 3.13 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.10 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/02/03/02 (24,1 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03, foi submetida a cromatografia em gel de sílica de fase reversa C₁₈ utilizando como fase móvel o sistema isocrático MeOH:H₂O 8:2. Foram coletadas 35 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 04 novas frações após análises em CCDA em razão de suas semelhanças (TABELA 3.12).

TABELA 3.12 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02 (24,1 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/02/03/02/01	1 a 15	14,3
H+D/02/03/02/02	16 a 25	4,0
H+D/02/03/02/03	26 a 32	2,6
H+D/02/03/02/04	33 a 35	1,2

Todas as frações foram analisadas por RMN de ¹H, onde se verificou como no item descrito anteriormente, que a mistura majoritária de interesse estava presente na fração H+D/02/03/02/01. A FIGURA 3.14 é o fluxograma do fracionamento cromatográfico desta fração em estudo.

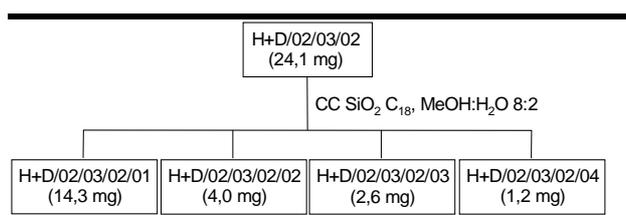
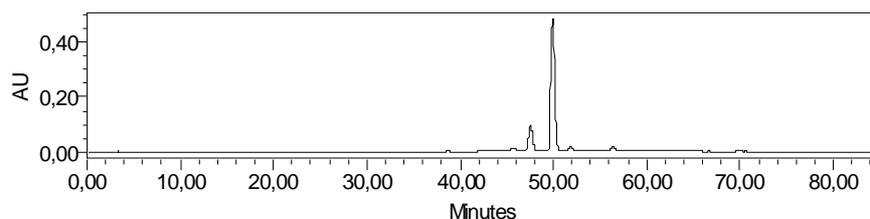


FIGURA 3.14 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02 das raízes de *P. bahiensis*.

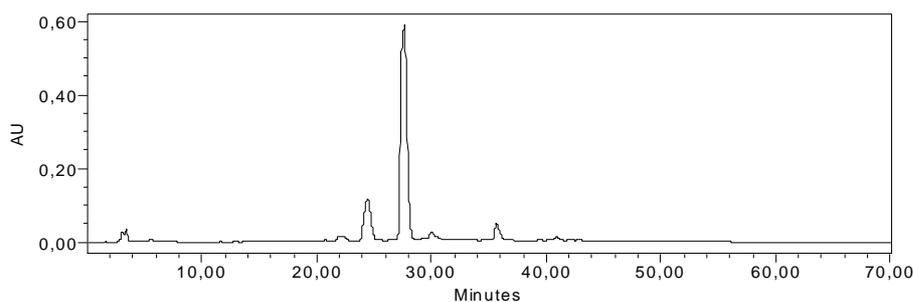
3.4.3.11 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/02/03/02/01 (14,3 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02, foi submetido à HPLC utilizando como fase estacionária sílica de fase reversa C₁₈, tendo como fase móvel dois sistemas gradiente exploratórios (MeOH:H₂O com aumento da concentração de MeOH em função do tempo) para verificar a melhor separação dos compostos. Foram testados diversos sistemas, sendo que abaixo são apresentados os dois melhores cromatogramas obtidos com melhores resoluções:

- Sistema MeOH:H₂O 10% a 100% em 60 minutos de corrida cromatográfica:



- Sistema MeOH:H₂O 50% a 100% em 60 minutos de corrida cromatográfica:



Após ter escolhido o segundo sistema pela melhor separação, partiu-se para o estudo em escala semi-preparativa, utilizando-se da fórmula dada pela EQUAÇÃO 1, onde S é o fator de escalonamento em que R_p e L_p são, respectivamente, diâmetro e comprimento da coluna preparativa e R_a e L_a , o diâmetro e comprimento da coluna analítica.

$$S = \frac{Rp^2 \times Lp}{Ra^2 \times La} \quad (1)$$

Assim, em relação ao fluxo utilizado, passou de 1 para 6 mL/min. Foram recolhidas 06 frações a partir do cromatograma obtido em escala semi-preparativa, como mostrado no cromatograma supracitado e na TABELA 3.13.

TABELA 3.13 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01 (14,3 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Intervalo recolhido	Massa (mg)
H+D/02/03/02/01/01	Até 20 min.	0,5
H+D/02/03/02/01/02	20 a 23 min.	2,2
H+D/02/03/02/01/03	23 a 26 min.	0,7
H+D/02/03/02/01/04	26 a 29 min.	8,8
H+D/02/03/02/01/05	29 a 31 min.	0,8
H+D/02/03/02/01/06	31 a 38 min.	0,6

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H , onde se verificou que a mistura majoritária de interesse estava presente na fração H+D/02/03/01/04. O fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico desta fração em estudo é mostrado pela FIGURA 3.15.

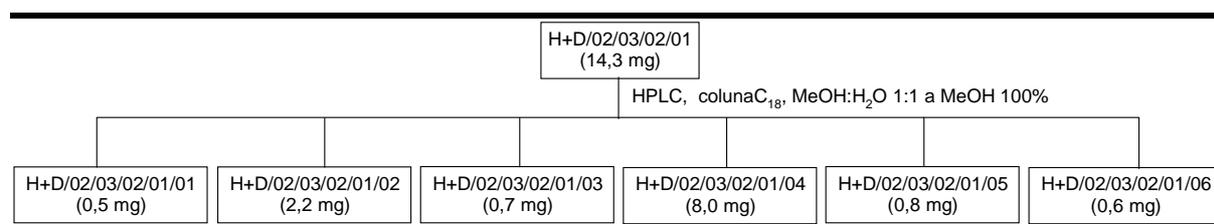


FIGURA 3.15 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.12 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/02/03/02/01/04 (8,8 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01, foi submetida à cromatografia em Sephadex® LH-20 tendo como fase móvel MeOH. Foram coletadas 10 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 02 frações após análises em CCDA em razão de suas semelhanças, como apresentado na TABELA 3.14.

TABELA 3.14 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04 (8,8 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/02/03/02/01/04/01	1 a 3	0,6
H+D/02/03/02/01/04/02	4 a 10	7,4

A partir das análises em CCDA, a mistura de interesse encontrava-se na segunda fração obtida, assim partiu-se para o seu fracionamento.

3.4.3.13 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04/02 das raízes de *P. bahiensis*

Para obter uma maior quantidade total dessa fração, já que há uma alta complexidade de constituintes, mesmo após os fracionamentos, foi buscado, através do fracionamento em paralelo do extrato restante e, assim foi obtido 3,3 mg da fração ao qual se assemelhava com o discutido aqui, através da semelhança no perfil cromatográfico em CCDA, juntamente com a junção da fração H+D/02/03/02/01/03.

Assim, a fração H+D/02/03/02/01/04/02 (11,4 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04, foi submetida à

cromatografia em gel de sílica, utilizando como fase móvel o sistema isocrático Hex:AcOEt 10:1 para a separação dos componentes mais apolares da mistura e, AcOEt 100% para os componentes mais polares. Foram coletadas 09 frações de aproximadamente 5 mL cada, reunidas em 04 novas frações após análises em CCDA (TABELA 3.15).

TABELA 3.15 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/02/03/02/01/04/02 (11,4 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/02/03/02/01/04/02/01	1 a 3	1,8
H+D/02/03/02/01/04/02/02	4 e 5	0,5
H+D/02/03/02/01/04/02/03	6 e 7	1,4
H+D/02/03/02/01/04/02/04	8 e 9	4,6

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H , onde se verificou que na fração H+D/02/03/02/01/04/02/01 há a presença novamente do composto **8**. Na fração H+D/02/03/02/01/04/02/03, notou-se os sinais característicos de um esqueleto antraquinônico, tendo os sinais duplicados no espectro de RMN de ^1H , levando, a princípio, a ter uma mistura de dois isômeros da classe das oxantrons ou das antrons. Após análises detalhadas, mostrou-se ter o isolamento de um dímero de antraquinona, sendo esta a substância **10**. A fração H+D/02/03/02/01/04/02/04, através da análise por RMN de ^1H , mostrou a presença complexa de compostos do tipo antraquinônico, sendo que esta fração foi submetida à análise via LC/ESI-MS sob plataforma API 2000 com objetivo de identificar os compostos em mistura. A partir das diversas análises, foram identificados os compostos **11 - 14**.

Uma possível explicação do fato que o composto **8** esteja aparecendo na maioria das frações pode ser pela sua interação na fase estacionária, já que ele na maioria dos casos é sempre o composto majoritário na mistura, e no momento que é usado um solvente de maior polaridade (AcOEt), este retira por completo o mesmo.

A FIGURA 3.16 mostra o fluxograma do fracionamento cromatográfico das frações H+D/02/03/02/01/04 e H+D/02/03/02/01/04/02 descritos nos itens 3.4.3.12 e 3.4.3.13.

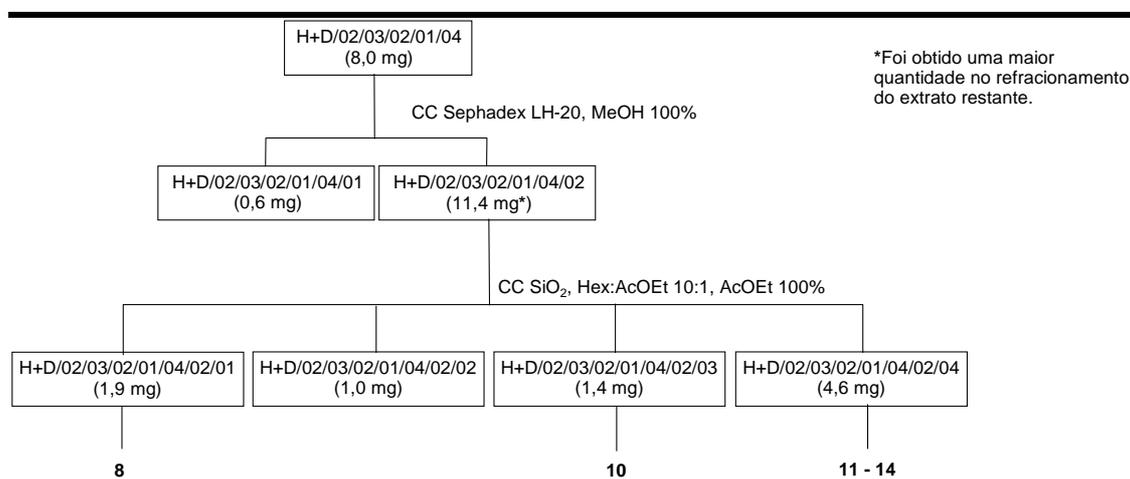


FIGURA 3.16 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico das frações H+D/02/03/02/01/04 e H+D/02/03/02/01/04/02 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.3.14 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/03 das raízes de *P. bahiensis*

O grupo H+D/03 (142,2 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato H+D bruto obtido das raízes de *P. bahiensis*, foi submetido a uma coluna cromatográfica em Sephadex® LH-20 como fase estacionária, com eluição isocrática utilizando MeOH 100%. Foram coletadas 38 frações contendo em cada 10 mL, e através das análises em CCDA foram agrupadas em 05 frações (TABELA 3.16).

TABELA 3.16 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/03 (142,2 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/03/01	1 a 6	18,8
H+D/03/02	7 e 8	8,7
H+D/03/03	9 a 12	89,4
H+D/03/04	13 a 16	11,2
H+D/03/05	17 a 38	4,3

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou a presença predominante de material graxo nos dois primeiros grupos, tendo sinais característicos de aromáticos nos grupos H+D/03/02, H+D/03/03 e H+D/03/04, onde que na terceira fração mostrou a presença de uma mistura de compostos de alta complexidade, sendo que esta fração, juntamente com a fração H+D/02/03/02/01/04/02/04, foram escolhidas, inicialmente, para realizar um trabalho em LC/ESI-MS sob plataforma API 2000 com objetivo de identificar os compostos em mistura. A descrição detalhada deste estudo está mostrada no item **3.5**. A partir das análises desta fração H+D/03/03 via LC/ESI-MS, foram identificadas as substâncias **15** e **16**, sendo estes os compostos majoritários presentes nesta fração.

3.4.3.15 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05 das raízes de *P. bahiensis*

O grupo H+D/05 (61,9 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato H+D bruto obtido das raízes de *P. bahiensis*, foi submetido a uma coluna cromatográfica em Sephadex® LH-20 como fase estacionária, com eluição isocrática utilizando MeOH 100%. Foram coletadas 35 frações contendo em cada 10 mL, e através das análises em CCDA foram agrupadas em 04 novas frações (TABELA 3.17).

TABELA 3.17 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05 (61,9 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/05/01	1 e 2	7,6
H+D/05/02	3 a 8	7,7
H+D/05/03	9 a 16	28,4
H+D/05/04	17 a 35	8,1

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H onde se verificou a presença de sinais característicos de aromáticos na fração H+D/05/04, mostrando também alta complexidade de compostos, porém com sinais muito semelhantes à substância **10**, sendo assim alvo de estudo para verificar a possibilidade do mesmo ser um estereoisômero, por exemplo, em relação ao composto previamente isolado.

3.4.3.16 – Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05/04 das raízes de *P. bahiensis*

A fração H+D/05/04 (8,1 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração H+D/05 das raízes de *P. bahiensis*, foi submetida a uma coluna cromatográfica em gel de sílica como fase estacionária, tendo como fase móvel isocrática hex:AcOEt 8:2. Foram coletadas 57 frações contendo em cada 05 mL, e através das análises em CCDA foram agrupadas em 05 frações (TABELA 3.18).

TABELA 3.18 - Fracionamento cromatográfico da fração H+D/05/04 (8,1 mg) das raízes de *P. bahiensis*

Grupos	Frações Reunidas	Massa (mg)
H+D/05/04/01	1 a 5	0,6
H+D/05/04/02	6 a 35	3,3
H+D/05/04/03	36 a 43	1,4
H+D/05/04/04	44 a 53	1,1
H+D/05/04/05	54 a 57	0,8

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H , onde se verificou que na fração H+D/05/04/03 há a presença novamente do composto **10** em muita baixa quantidade pelo fato de estar presente em mistura de mais outros compostos. A possibilidade de ser uma possível estrutura isomérica foi descartada a partir da definição, através da purificação, das multiplicidades aliadas às constantes de acoplamento dos sinais referentes a essa substância no espectro de RMN de ^1H .

A FIGURA 3.17 mostra o fluxograma do fracionamento cromatográfico das frações H+D/05 e H+D/05/04 descritos nos itens **3.4.3.15** e **3.4.3.16**.

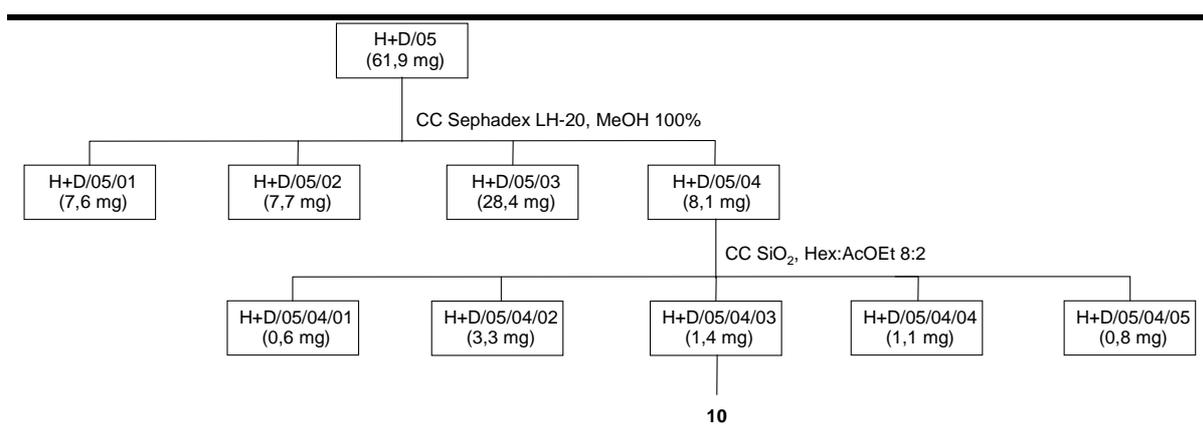


FIGURA 3.17 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico das frações H+D/05 e H+D/05/04 das raízes de *P. bahiensis*.

3.4.4 – Estudo do extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

Todos os extratos obtidos de *T. schomburgkianum* foram submetidos ao ensaio inseticida e fungicida. A partir do resultado do ensaio inseticida e fungicida, o extrato diclorometânico do caule mostrou possuir atividade em potencial frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *L. gongylophorus*.

3.4.4.1 – Fracionamento do extrato bruto diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

O extrato bruto bioativo em DCM do caule (52,1 g) mostrou, através da análise do espectro de RMN de ^1H e CCDA, uma complexidade de compostos presentes e também a presença de compostos tanto apolares quanto polares. Assim, este foi inicialmente particionado, dissolvendo-o uma parte do extrato em uma solução MeOH:H₂O 9:1 e particionando, agora em hexano para a uma divisão um pouco mais fina das diferentes polaridades, obtendo assim compostos apolares e, portanto tendo uma prévia separação em relação as polaridades dos compostos presentes no extrato. O restante do extrato (hidroalcoólica) não solúvel em hexano foi nomeado de partição em diclorometano. A FIGURA 3.18 mostra o procedimento da partição descrita para o extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*.

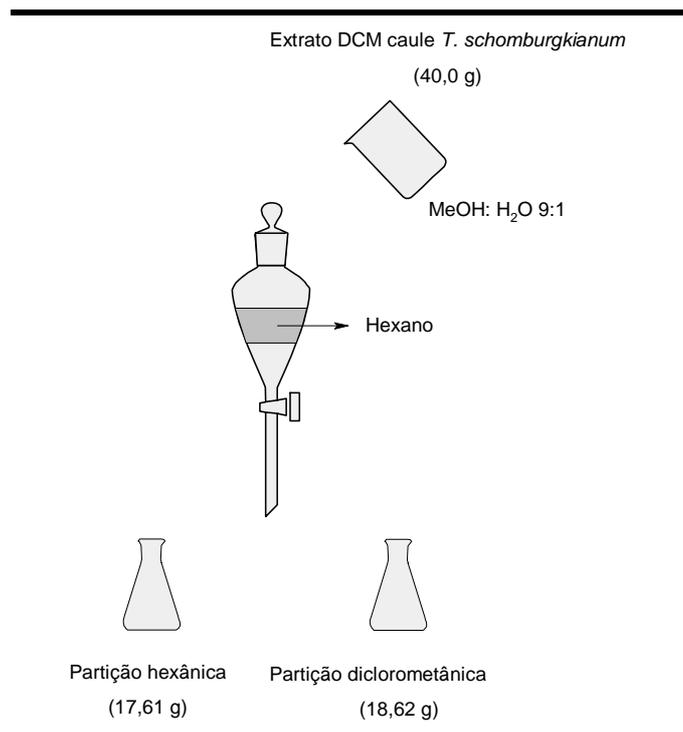


FIGURA 3.18 – Ilustração da partição realizada utilizando o extrato bruto diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.2 – Fracionamento da partição hexânica do extrato bruto diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

Uma parte do material referente à partição hexânica (9,2 g), proveniente do extrato bruto diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*, foi submetida à coluna cromatográfica em gel de sílica como fase estacionária, tendo como fase móvel inicial Hex:DCM 1:1, seguido de Hex:DCM 2:8, Hex:DCM 1:9, DCM e, por último, DCM:AcOEt 9:1, com todas as misturas de eluentes com volume de 500 mL. Foram coletadas 92 frações com diferentes volumes de coleta (coletadas conforme a saída das bandas cromatográficas), reunidas em 10 frações a partir das semelhanças nos perfis cromatográficos via CCDA (TABELA 3.19).

TABELA 3.19 – Fracionamento cromatográfico da partição hexânica (9,2 g) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/01	1 a 5	443,8
TSPH/02	6 e 7	139,2
TSPH/03	8 a 10	1212,9
TSPH/04	11 a 40	336,4
TSPH/05	41 a 82	585,1
TSPH/06	83	635,2
TSPH/07	84 e 85	709,3
TSPH/08	86 a 88	1216,4
TSPH/09	89 e 90	613,1
TSPH/10	91 e 92	2939,0

As análises de RMN de ^1H mostraram que, em algumas frações foram observados sinais com maior clareza em δ_{H} 0,80 a 5,4, mostrando a presença de determinados compostos majoritários nestas frações. As frações TSPH/03 e TSPH/04, a partir de seus espectros de RMN de ^1H e CG/EM, mostraram uma semelhança em seus perfis, principalmente nos picos majoritários, sendo reunidas em uma única fração denominada TSPH/03+04. O fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico desta partição em estudo é mostrado pela FIGURA 3.19.

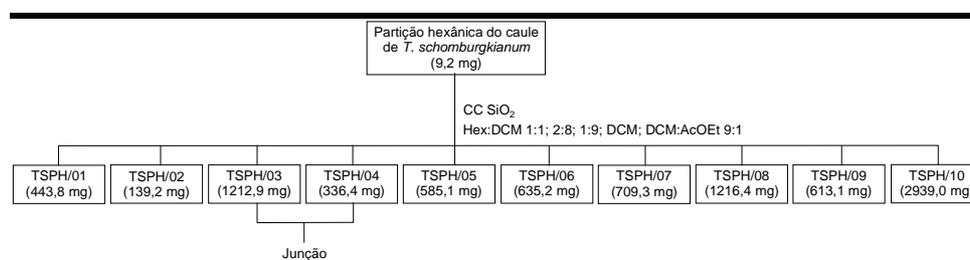


FIGURA 3.19 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da partição hexânica proveniente do extrato bruto diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.3 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/02 (139,2 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da partição hexânica, foi submetida a cromatografia em gel de sílica utilizando como fase móvel inicial hexano, Hex:DCM 9:1, seguida por Hex:DCM 8:2, Hex:DCM 7:3, Hex:DCM1:1 e por último DCM. Foram coletadas 64 frações de aproximadamente 125 mL cada, reunidas em 05 novas frações após análises em CCDA (TABELA 3.20).

TABELA 3.20 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02 (139,2 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/02/01	1 a 15	2,2
TSPH/02/02	16 a 35	7,4
TSPH/02/03	36 a 60	40,4
TSPH/02/04	61 e 62	8,2
TSPH/02/05	63 e 64	77,6

As análises de RMN de ^1H mostraram que nas frações TSPH/02/02 e TSPH/02/03 havia uma semelhança espectroscópica entre elas e possuíam sinais majoritários e característicos de composto hidrocarboneto, possivelmente da classe dos terpenos.

3.4.4.4 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02/02+03 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/02/02+03 (47,8 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da partição hexânica, foi submetida a cromatografia em gel de sílica

utilizando como fase móvel o sistema isocrático Hex:AcOEt 9:1. Foram coletadas 32 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 03 novas frações (TABELA 3.21).

TABELA 3.21 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/02/02+03 (47,8 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/02/02+03/01	1 a 6	3,4
TSPH/02/02+03/02	7 a 15	40,2
TSPH/02/02+03/03	16 a 32	3,8

Todas as frações foram analisadas por RMN de ^1H , onde se verificou na fração TSPH/02/02+03/02 um triterpeno do tipo oleanano **17**. A fração TSPH/02/02+03/01 foi analisada juntamente com outras técnicas espectrométricas, tais como CG/EM mostrando assim a presença de três triterpenos: **18 - 20**. O Fluxograma (FIGURA 3.20) representa os sucessivos fracionamentos cromatográficos realizados com a fração TSPH/02 e TSPH/02/02+03 proveniente do caule de *T. schomburgkianum*.

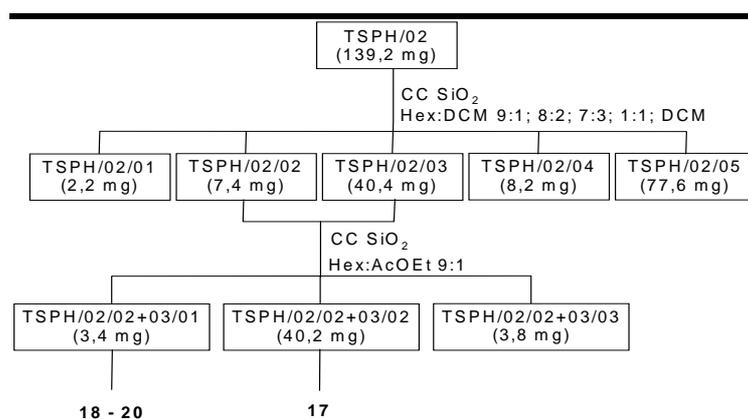


FIGURA 3.20 – Fluxograma referente aos fracionamentos cromatográficos das frações TSPH/02 e TSPH/02/02+03 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.5 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/03+04 (1,55 g), proveniente do fracionamento cromatográfico da partição hexânica, foi submetida a cromatografia em gel de sílica utilizando como fase móvel o sistema isocrático Hex:AcOEt 9:1. Foram coletadas 51 frações de aproximadamente 20 mL cada, reunidas em 06 frações a partir da semelhança no perfil cromatográfico (TABELA 3.22).

TABELA 3.22 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04 (1,55 g) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/03+04/01	1 a 5	58,6
T-SPH/03+04/02	6 a 9	53,9
TSPH/03+04/03	10 a 20	172
TSPH/03+04/04	21 a 40	820,8
TSPH/03+04/05	41 a 50	48,4
TSPH/03+04/06	51	230,1

Na análise via CCDA, a fração TSPH/03+04/04 mostrou a presença de uma mancha majoritária com R_f 0,4 no sistema Hex:AcOEt 9:1, além de outras manchas minoritárias. As análises de RMN de 1H mostraram que, apesar da possibilidade de ter um composto majoritário nesta fração via CCDA, havia uma complexidade de sinais referentes à região de sinais de hidrogênios ligados a carbonos alifáticos, muito provavelmente de se tratar de misturas de esteróides ou triterpenos. A FIGURA 3.21 apresenta o fluxograma para o fracionamento cromatográfico de TSPH/03+04 proveniente do caule de *T. schomburgkianum*.

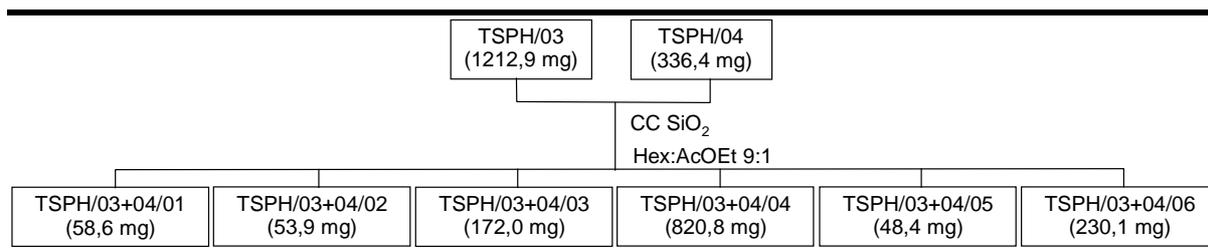


FIGURA 3.21 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.6 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/03+04/04 (820,8 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04, foi submetida a cromatografia em gel de sílica utilizando como fase móvel novamente o sistema isocrático Hex:AcOEt 9:1. Foram coletadas 49 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 05 frações (TABELA 3.23).

TABELA 3.23 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 (820,8 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/03+04/04/01	1 a 4	13,6
TSPH/03+04/04/02	5 a 15	81,6
TSPH/03+04/04/03	16 a 32	574,5
TSPH/03+04/04/04	33 a 45	51,3
TSPH/03+04/04/05	46 a 49	27,5

A FIGURA 3.22 representa o fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 do caule de *T. schomburgkianum*.

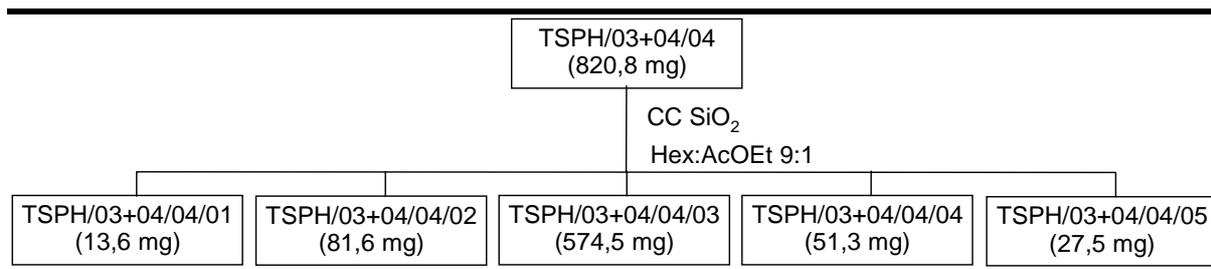


FIGURA 3.22 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.7 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/03+04/04/03, proveniente do fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04, semelhante à anterior, mostrava uma possível coeluição entre os compostos majoritários presentes com mesmo R_f . Assim, foi realizada uma busca em diferentes sistemas de solventes (MARTELANC et al., 2009), tais como CHCl_3 :éter 19:1, DCM:AcOEt 24:1, CHCl_3 :éter 97:3, dentre outros, porém nenhum apresentou uma boa resolução de separação.

Após outros testes de sistemas de fase móvel, a fração TSPH/03+04/04/03 (574,5 mg) foi submetida a cromatografia em gel de sílica utilizando como fase móvel o sistema isocrático Hex:AcOEt 9:1 com 1% de ácido fórmico. Assim, foram coletadas 33 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 05 frações (TABELA 3.24).

TABELA 3.24 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03 (574,5 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/03+04/04/03/01	1 a 3	6,8
TSPH/03+04/04/03/02	4 a 18	492,6
TSPH/03+04/04/03/03	19 a 25	32,5
TSPH/03+04/04/03/04	26 a 31	12,6
TSPH/03+04/04/03/05	32 e 33	11,8

As análises de RMN de ^1H mostraram que a mistura de interesse se encontrava na fração TSPH/03+04/04/03/02, e, vale ressaltar que todas as outras frações foram analisadas também através da técnica de CG/EM para a possível identificação dos compostos minoritários. O fluxograma deste fracionamento cromatográfico é mostrado através da FIGURA 3.23.

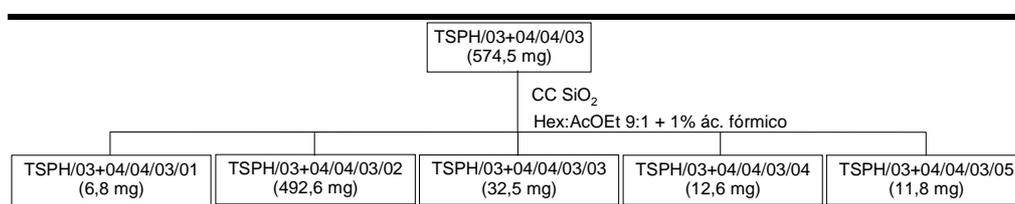


FIGURA 3.23 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.8 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03/02 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/03+04/04/03/02, proveniente do fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03, após sucessivos fracionamentos, encontrava-se, via CCDA, teoricamente mais pura pela quantidade menor de manchas na revelação com vanilina. Assim, a fração TSPH/03+04/04/03/02 (492,6

mg) foi submetida a cromatografia em gel de sílica utilizando como fase móvel o sistema Hex:AcOEt 95:5. Foram coletadas 70 frações de aproximadamente 5 mL cada, reunidas em 07 frações pela semelhança no perfil cromatográfico (TABELA 3.25).

TABELA 3.25 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03/02 (492,6 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/03+04/04/03/02/01	1 a 15	4,6
TSPH/03+04/04/03/02/02	16 a 18	0,8
TSPH/03+04/04/03/02/03	19 a 25	1,5
TSPH/03+04/04/03/02/04	26 a 28	1,1
TSPH/03+04/04/03/02/05	29 a 50	467,6
TSPH/03+04/04/03/02/06	51 a 60	1,8
TSPH/03+04/04/03/02/07	61 a 70	2,9

A análise de RMN de ^1H da fração TSPH/03+04/04/03/02/05, juntamente com a análise de CG/EM, mostrou a presença de três compostos, sendo que um deles apresentava-se majoritariamente. O composto majoritário foi identificado como **21** e os dois compostos minoritários da mistura foram identificados como **22** e **23**. A FIGURA 3.24 mostra o fracionamento cromatográfico feito com a fração TSPH/03+04/04/03/02 proveniente do caule de *T. schomburgkianum*.

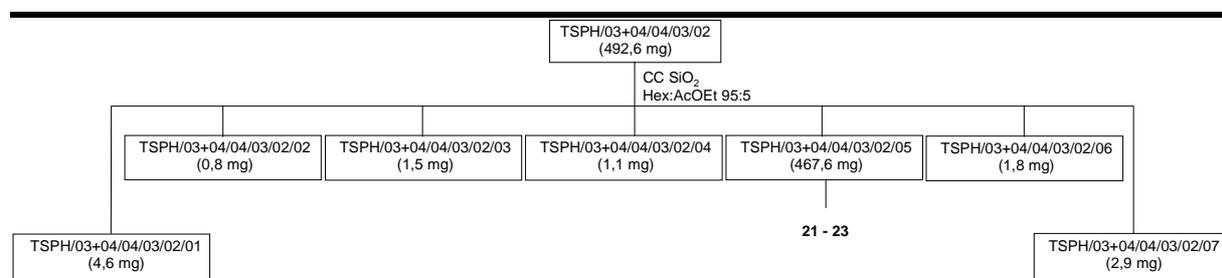


FIGURA 3.24 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/03+04/04/03/02 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.9 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/05 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/05 (585,1 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da partição hexânica, foi submetida a cromatografia em gel de sílica utilizando como fase móvel o sistema Hex:AcOEt 9:1. Assim, foram coletadas 48 frações de aproximadamente 20 mL cada, reunidas em 09 frações (TABELA 3.26).

A análise de RMN de ^1H da fração TSPH/05/06, juntamente com a análise de CG/EM, mostrou o isolamento do esteróide **7**. Vale ressaltar que houve uma perda significativa na massa da fração, resultando em um baixo rendimento da coluna realizada. A FIGURA 3.25 apresenta o fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico realizado com a fração TSPH/05 proveniente do caule de *T. schomburgkianum*.

TABELA 3.26 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/05 (585,1 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/05/01	1 a 4	5,0
TSPH/05/02	5 e 6	5,6
TSPH/05/03	7 a 10	50,4
TSPH/05/04	11 a 17	67,4
TSPH/05/05	18 a 20	20,4
TSPH/05/06	21 a 30	99,6
TSPH/05/07	31 a 35	2,9
TSPH/05/08	36 a 44	2,6
TSPH/05/09	45	17,8

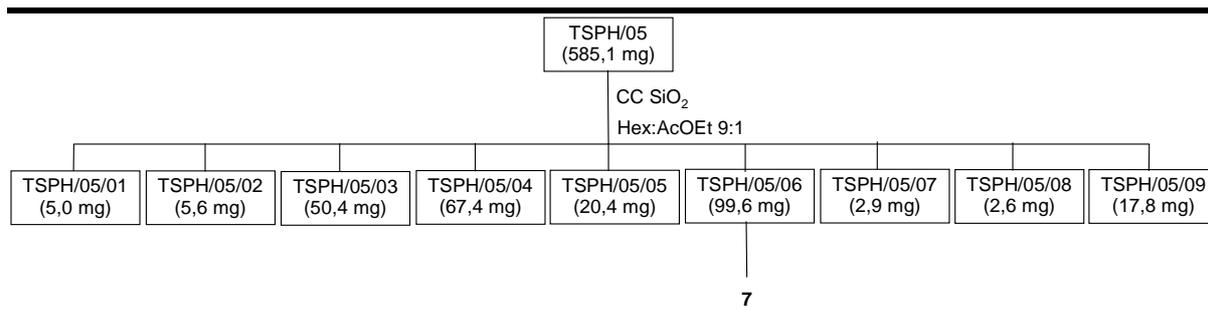


FIGURA 3.25 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/05 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.10 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/07 (709,3 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da partição hexânica, foi submetida a uma cromatografia em gel de sílica tipo flash como fase estacionária, utilizando como fase móvel Hex:Acetona 8:2. Foram coletadas 50 frações de aproximadamente 50 mL cada, reunidas em 06 frações pela semelhança no perfil cromatográfico (TABELA 3.27).

TABELA 3.27 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07 (709,3 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/07/01	1 e 2	121,0
TSPH/07/02	3 a 5	61,3
TSPH/07/03	6 a 12	179,4
TSPH/07/04	13 a 20	69,3
TSPH/07/05	21 a 35	39,4
TSPH/07/06	36 a 50	80,0

As análises de RMN de ^1H mostraram que na fração TSPH/07/04 mostrava sinais muito distintos em relação aos vistos anteriormente, sendo este escolhido para posterior fracionamento. O fluxograma deste fracionamento cromatográfico é mostrado através da FIGURA 3.26.

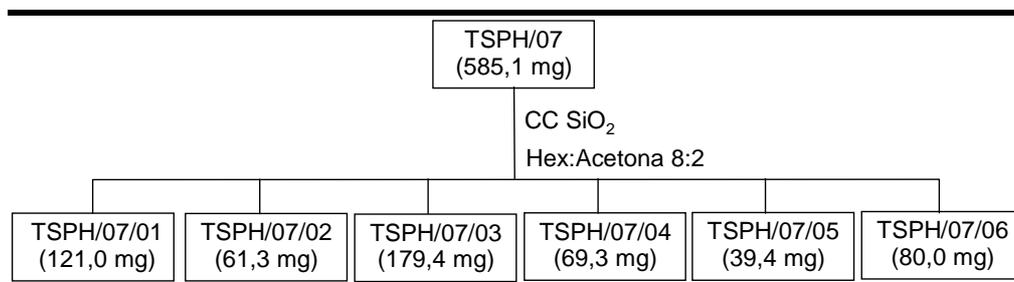


FIGURA 3.26 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.4.4.11 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07/04 do caule de *T. schomburgkianum*

A fração TSPH/07/04 (69,3 mg), proveniente do fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07, foi submetida a cromatografia em Sephadex® LH-20 utilizando como fase móvel o sistema isocrático DCM:MeOH 4:6. Foram coletadas 26 frações de aproximadamente 10 mL cada, reunidas em 05 novas frações pela semelhança no perfil cromatográfico (TABELA 3.28).

TABELA 3.28 – Fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07/04 (69,3 mg) do caule de *T. schomburgkianum*

Frações	Frações Reunidas	Massa (mg)
TSPH/07/04/01	1 a 4	3,9
TSPH/07/04/02	5 a 13	25,6
TSPH/07/04/03	14 a 16	13,9
TSPH/07/04/04	17	19,0
TSPH/07/04/05	18 a 26	3,7

A análise de RMN de ^1H da fração TSPH/07/04/05 mostrou a presença dos sinais vistos anteriormente, sendo que este foi identificado como **26**. A FIGURA 3.27 mostra o fracionamento cromatográfico feito com a fração TSPH/07/04 proveniente do caule de *T. schomburgkianum*.

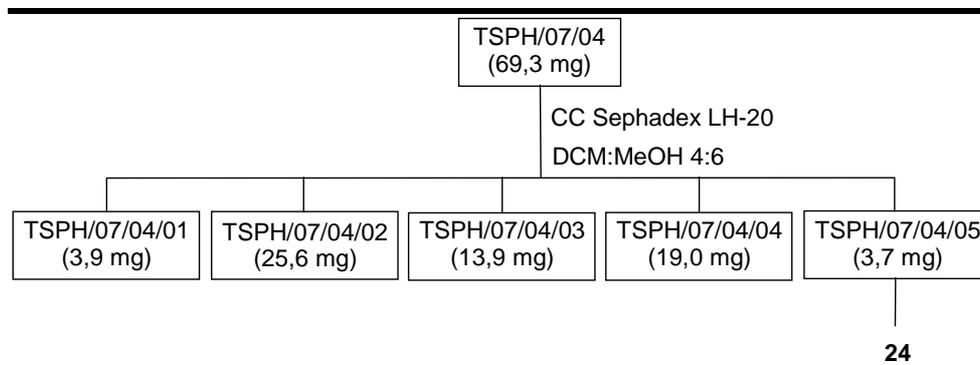


FIGURA 3.27 – Fluxograma referente ao fracionamento cromatográfico da fração TSPH/07/04 do caule de *T. schomburgkianum*.

3.5 – ANÁLISE QUALITATIVA VIA HPLC/ESI-MS/MS

Esta parte do trabalho teve como principal objetivo o envolvimento e aprendizado em Espectrometria de Massas na identificação dos compostos presentes em misturas complexas, possibilitando a execução das análises

necessárias, e, principalmente o aprendizado como operador e conhecedor desta técnica analítica e não somente como usuário da mesma. Vale salientar que os termos técnicos aqui utilizados foram baseados no artigo VESSECCHI et al. (2011), onde o mesmo descreve um grande número de termos e definições traduzidos para a língua portuguesa que são utilizados de forma corrente.

Assim, com este enfoque de trabalho, foi observado que algumas frações e subfrações de *P. bahiensis* possuíam alguns sinais de interesse no espectro de RMN de ^1H indicando as classes das substâncias e que estavam em mistura. A partir dessas informações, houve uma busca na literatura com o enfoque de se identificar simultaneamente os compostos presentes, tendo alguns artigos selecionados e tomados como ponto de partida para este presente estudo (ACKACHA et al., 2003; SONG et al., 2009). Após algumas tentativas e mudanças, foi utilizado como referência, inicialmente, o artigo descrito por JIN et al. (2007) para este trabalho.

3.5.1 – Preparo das amostras

As frações, subfrações e compostos puros (utilizados como padrões) foram pesadas e solubilizadas em concentração de 1 mg/mL em metanol grau MS. As amostras foram deixadas em repouso durante 24 horas mantidas em geladeira e depois filtradas em filtros 0,2 μm e foram diluídas até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ para a injeção no sistema de HPLC (frações e subfrações) e para composto puro, na faixa de trabalho entre 10 $\mu\text{g/mL}$ a 1 $\mu\text{g/mL}$ para otimização por infusão direta.

3.5.2 – Otimização das condições cromatográficas em HPLC/ESI-MS/MS

Em relação à avaliação dos parâmetros cromatográficos, foram testadas diferentes combinações de sistemas de fase móvel, aditivos orgânicos presentes na fase aquosa da fase móvel para o auxílio na ionização. Outros parâmetros, tais como fluxo da fase móvel e temperatura do forno da coluna foram otimizados.

Assim, para realizar uma boa separação dos compostos presentes nas misturas, diferentes sistemas de fase móvel foram testadas (metanol/água, acetonitrila/água) com ou sem a adição de ácido fórmico, ácido acético e acetato de amônio na fase aquosa. O sistema de fase móvel, em todos os testes, constituiu de uma quantidade definida de aditivo em água (fase aquosa) e metanol ou acetonitrila como sendo a fase orgânica, usando a seguinte rampa iniciando em 50% de fase orgânica (0 min.) diminuindo para 20% (30 min.) até 0% (40 min.), permanecendo constante até 60 min. de corrida cromatográfica. O fluxo utilizado foi de 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ munido de divisor de fluxo com razão de 3:1, com a temperatura do forno da coluna em 30°C, volume de injeção de 20 μL e utilização do detector em 250 nm. A TABELA 3.29 mostra as diferentes condições avaliadas.

Vale salientar que todas as análises foram realizadas utilizando uma coluna Eclipse XDB C₁₈ munida de pré-coluna de segurança, prevenindo a entrada de possíveis interferentes que poderiam atrapalhar ou mesmo diminuir o desempenho da coluna nas análises, e todas as análises foram comparadas com base no cromatograma de íons totais (TIC, *Total Ions Chromatogram*) em modo de aquisição *full scan* gerado em cada análise mostrada abaixo.

TABELA 3.29 - Variáveis avaliadas para otimização cromatográfica

Fase Móvel	Aditivo	Modo de ionização
H ₂ O:MeOH	HCOOH 0,05% (v/v)	Positivo / Negativo
H ₂ O:ACN	HCOOH 0,05% (v/v)	Positivo / Negativo
H ₂ O:MeOH	CH ₃ COOH 0,05 (v/v)	Positivo / Negativo
H ₂ O:ACN	CH ₃ COOH 0,05 (v/v)	Positivo / Negativo
H ₂ O:MeOH	CH ₃ COONH ₄ 10 mM	Positivo / Negativo
H ₂ O:ACN	CH ₃ COONH ₄ 10 mM	Positivo / Negativo
H ₂ O:MeOH	CH ₃ COONH ₄ 20 mM	Positivo / Negativo
H ₂ O:ACN	CH ₃ COONH ₄ 20 mM	Positivo / Negativo

Após avaliação de todos os testes realizados, foi definido, ao contrário do artigo previamente utilizado como referência, a utilização da fase móvel composta por H₂O:MeOH utilizando como aditivo CH₃COONH₄ à 20 mM em modo negativo.

3.5.3 – Otimização das condições no Espectrômetro de Massas com ionização por Eletrospray (ESI-MS)

Para obter uma maior resposta dos íons desejados, foram feitas as análises por infusão direta no espectrômetro de massas (FIGURA 3.28) e análise em Espectrometria de Massas por injeção em fluxo (FIGURA 3.29) para ajuste de alguns parâmetros importantes no fornecimento do máximo de resposta do íon [M-H]⁻. Assim, foram utilizados dois padrões de antraquinonas, crisofanol (obtido naturalmente) com *m/z* 254 e alizarina (obtido comercialmente) com *m/z* 240, nas concentrações de 1 µg/mL em MeOH grau MS para injeção direta e 100 µg/mL em MeOH grau MS para análise por injeção em fluxo.

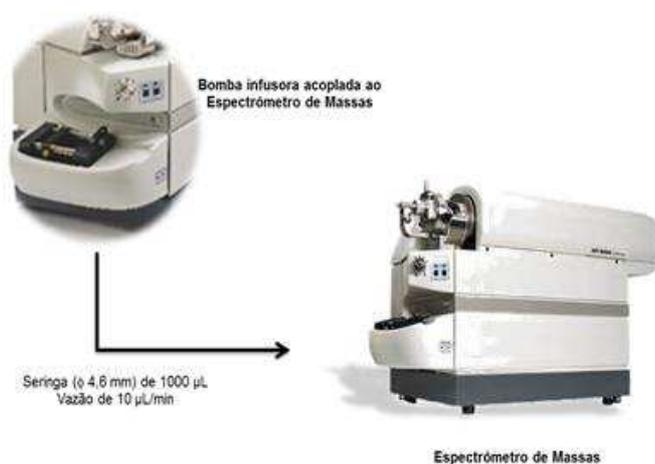


FIGURA 3.28 – Esquema ilustrativo da análise por infusão direta.

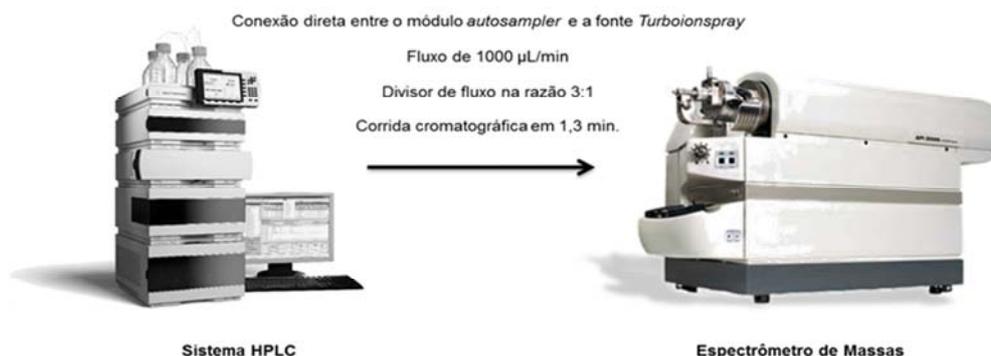


FIGURA 3.29 – Esquema ilustrativo da análise por injeção em fluxo.

Foram, ainda, avaliados parâmetros dependentes do composto para MS e MS/MS, tais como o potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), potencial de focalização (FP), energia de colisão (CE), potenciais de entrada e saída da célula (CEP e CXP respectivamente) e parâmetros da fonte/gás, tais como gás de cortina (CUR), voltagem do TurbolonSpray[®] (IS), temperatura da fonte (TEM), gás nebulizador (GS1), gás de aquecimento (GS2), gás de colisão (CAD). As FIGURAS 3.30 e 3.31 ilustram os parâmetros citados anteriormente.

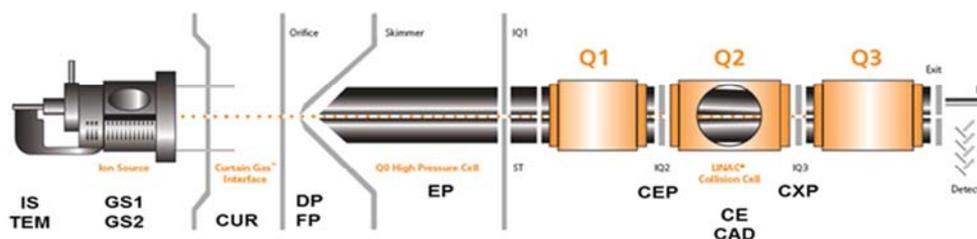


FIGURA 3.30 – Esquema ilustrativo dos parâmetros otimizados no equipamento API 2000.

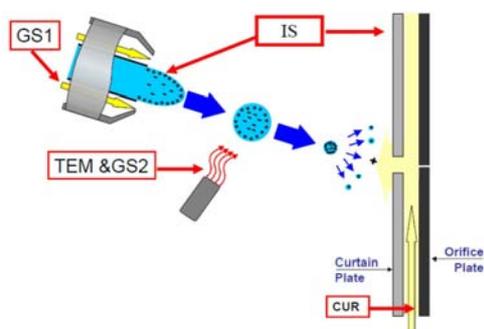


FIGURA 3.31 – Esquema ilustrativo dos parâmetros otimizados na fonte de ionização por Eletrospray.

Assim, todos os parâmetros otimizados no modo negativo estão ilustrados na TABELA 3.30.

TABELA 3.30 – Relação dos parâmetros utilizados no Espectrômetro de Massas

Parâmetros utilizados	
CUR (<i>Curtain gas</i>)	40 psi
IS (<i>Ionspray Voltage</i>)	-4500 V
GS1 (<i>Gas 1</i>)	50 psi
GS2 (<i>Gas 2</i>)	45 psi
TEM (<i>Temperature</i>)	0; 400 °C
DP (<i>Declustering Potential</i>)	-58 V
FP (<i>Focusing Potential</i>)	-380 V
EP (<i>Entrance Potential</i>)	-10 V
CEP (<i>Collision Cell Entrance Potential</i>)	-16 V
CAD (<i>Collisionally Activated Dissociation</i>)	4 V
CE (<i>Collision Energy</i>)	-52 V
CXP (<i>Collision Cell Exit Potential</i>)	-4 V

3.5.4 – Otimização da posição da agulha na fonte de ionização por Eletrospray (ESI-MS)

Este ajuste foi fundamental no processo de nebulização e secagem da amostra a ser ionizada dentro da fonte de ionização, na interface entre o acoplamento da técnica de Cromatografia Líquida com o Espectrômetro de Massa. Para isso foram feitas 36 injeções para a análise por injeção em fluxo, ou seja, a injeção do padrão crisofanol varrendo um único íon $[M-H]^-$ com m/z 253 (modo de aquisição Q_1 *Multiple Ion*) sem a colocação da coluna cromatográfica com tempo de corrida ajustado em 1,3 min. e temperatura da fonte otimizada em 400°C foi realizada juntamente com a variação das posições vertical e horizontal da agulha da

fonte de ionização (orifício por onde a amostra sai do cromatógrafo líquido e é nebulizada para dentro do Espectrômetro de Massas). Em resumo, foi a verificação do melhor posicionamento da mesma para gerar uma máxima resposta e melhor resolução no sinal do íon detectado (máxima leitura do *TIC*). Para uma melhor exemplificação do processo de ajuste, segue abaixo, através da FIGURA 3.32, três análises realizadas.

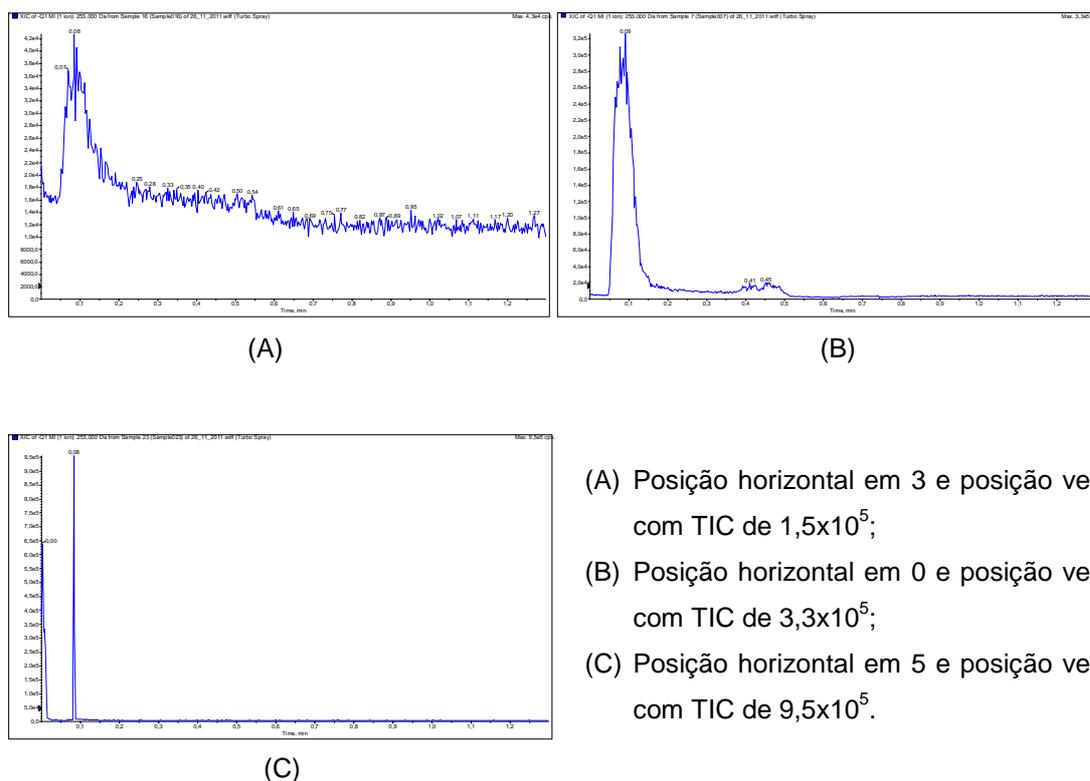


FIGURA 3.32 – Análises por injeção em fluxo realizadas na otimização da posição da agulha.

O resultado obtido na análise indicada em (C) mostrou ter a máxima resposta dos íons totais detectados, aliado a melhor resolução do sinal gerado, sendo o ajuste escolhido como 5 (posição horizontal) e 5 (posição vertical).

3.6 – METODOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS

3.6.1 – Compostos nanoencapsulados

Como objetivo principal desta parte do presente trabalho, o processo de nanoencapsulamento de compostos bioativos, apesar de terem sido isolados 26 compostos das plantas estudadas, somente crisofanol mostrou boa atividade no ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* e fungicida frente ao *L. gongylophorus*. Além disso, pode ser isolado em quantidades satisfatórias para realizar o processo de nanoencapsulamento. Assim, para um estudo mais amplo com outros compostos bioativos, foram obtidos compostos comerciais da marca Sigma-Aldrich, cedidos gentilmente pelo Dr. Warley de Souza Borges, tanto das classes das antraquinonas (alizarina, 2-metil-antraquinona e antraquinona), quanto das naftoquinonas (menadiona e 1,4-naftoquinona) e realizados os trabalhos prévios com os mesmos.

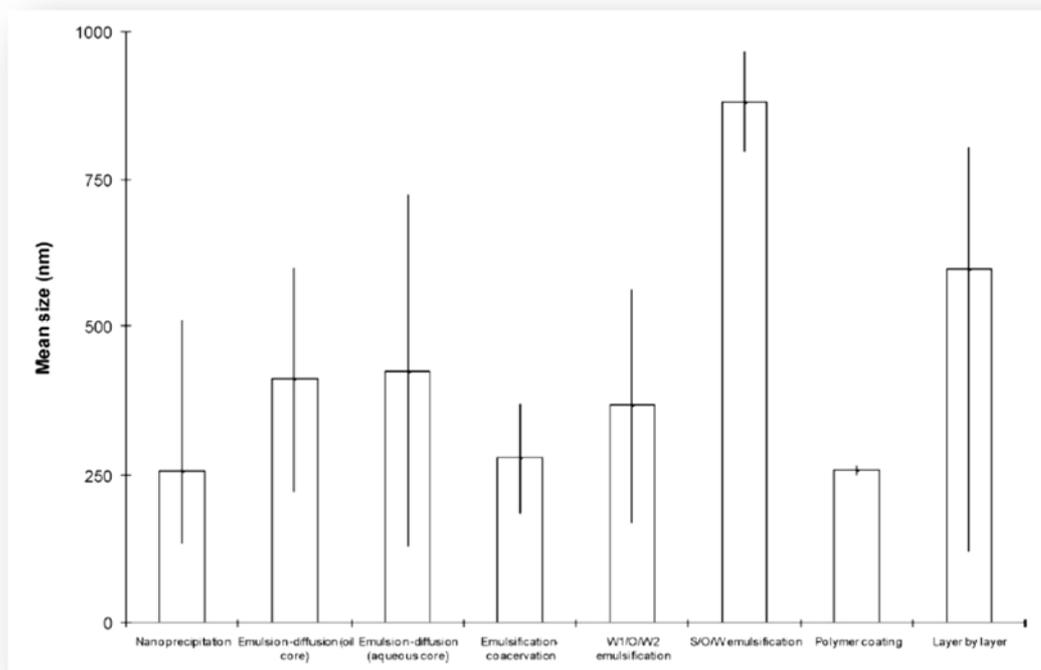
A partir dos resultados dos ensaios biológicos com os compostos comerciais, foram escolhidos, além do crisofanol, alizarina e menadiona para serem submetidos ao processo de nanoencapsulamento.

Em paralelo, foi desenvolvido um estudo com o princípio ativo sintético fipronil, sendo um dos compostos mais utilizados nas iscas comerciais no controle das formigas-cortadeiras. Vale ressaltar, que este estudo foi de extrema importância para a compreensão das características desta técnica, como o efeito da cinética de liberação, ou seja, a liberação controlada do princípio ativo devido ao processo de encapsulamento, a possibilidade da diminuição da dosagem da carga de ativo para a ação desejada (o que contribuirá para diminuir sua ação poluidora ao ambiente) e forneceu um padrão para os estudos realizados com produtos naturais.

3.6.2 – Método de preparo das nanopartículas

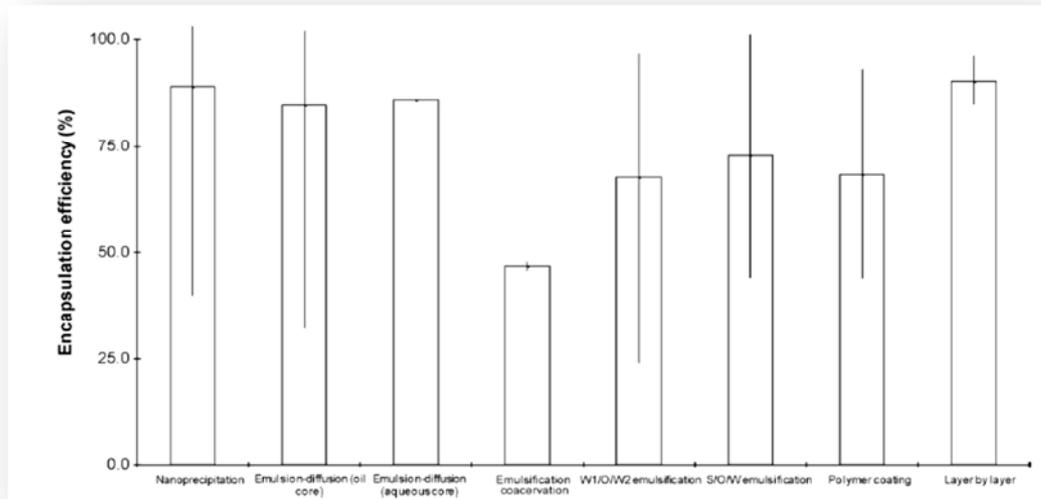
Em relação às diversas técnicas de preparação das nanopartículas, como já discutido no item 1.2, nanoprecipitação se destaca pela sua simplicidade,

reprodutibilidade, baixo custo, entre outras mais (COUVREUR et al., 2002). Alguns dados estatísticos são mostrados abaixo pelas FIGURAS 3.33-3.35, mostrando, em relação à consideração de sistemas de liberação nanoparticulados, que a utilização da técnica de nanoprecipitação ou nanodeposição interfacial produz resultados satisfatórios em relação ao tamanho da partícula, eficiência de encapsulação (MORA-HUERTAS et al., 2010).



Fonte: Adaptado de Mora-Huertas et al., 2010.

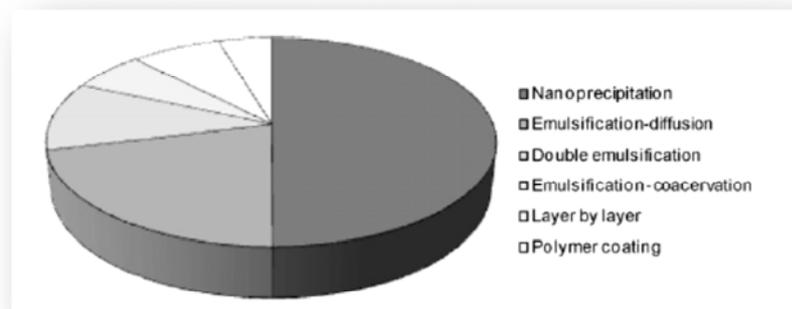
FIGURA 3.33 – Tamanho das nanopartículas obtidas em diferentes métodos de preparação.



Fonte: Adaptado de Mora-Huertas et al., 2010.

FIGURA 3.34 – Eficiência de encapsulação do ativo em nanopartículas obtidas em diferentes métodos de preparação.

Apesar das vantagens dos métodos e, principalmente, das limitações dos mesmos, é possível verificar a tendência no uso das técnicas de preparo em nanopartículas, onde os dados anteriormente citados se confirmam através da FIGURA 3.35, onde é visto que cerca de 50% dos trabalhos em pesquisas utilizando nanoencapsulamento tem o processo de nanoprecipitação como o método mais utilizado.



Fonte: Adaptado de Mora-Huertas et al., 2010.

FIGURA 3.35 – Tendência geral nos métodos de preparo de nanopartículas.

Este método é utilizado principalmente para moléculas lipofílicas, porém quando o objetivo da investigação é a nanoencapsulação de compostos hidrosolúveis, esta estatística não é mais válida, tornando o método de dupla-emulsificação o mais utilizado.

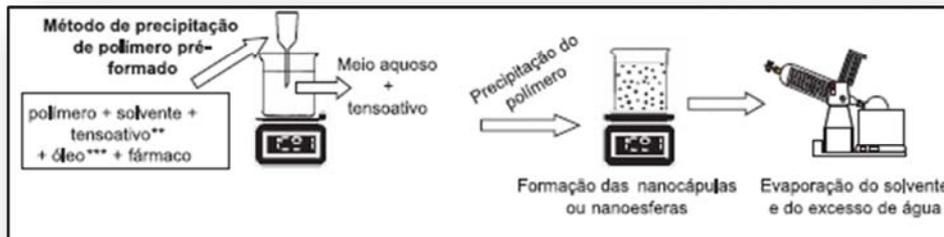
Outro fator de extrema importância é a tendência do tempo em relação à porcentagem de liberação, como discutido no item **1.3**, visando especificamente o controle de formigas-cortadeiras. A TABELA 3.31 apresenta uma tendência geral na liberação das substâncias ativas a partir das nanocápsulas em função do método de preparação.

TABELA 3.31 – Estimativa na liberação do ativo em relação ao método de preparação (MORA-HUERTAS et al., 2010)

Método	Tempo de liberação da substância ativa (min)			
	25%	50%	75%	90%
Nanoprecipitação	10	45	75	750
Emulsão-difusão	<2	<2	10	60
Emulsão-coacervação	<4	<4	15	45
Dupla-emulsificação	145	1000	>2000	>2000
Revestimento-polímero	20	40	60	150
Camada-por-camada	40	85	320	510

3.6.3 – Método de nanoprecipitação ou nanodeposição interfacial do polímero pré-formado

As nanoesferas e nanocápsulas foram todas preparadas utilizando a técnica descrita inicialmente por Fessi et al. (1988 e 1989). Uma representação esquemática desta técnica é apresentada na FIGURA 3.36, já que a descrição da mesma foi realizada no item **1.2**.



de
Fonte: Adaptado de Schaffazick et al., 2003.

FIGURA 3.36 – Esquema da metodologia de nanoprecipitação no preparo de nanopartículas.

Para esta parte do trabalho, inicialmente desenvolvida no Centro de Química Medicinal (CEQUIMED-UP) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, foram preparadas diversas formulações, com base em trabalhos já publicados pelo grupo de pesquisa CEQUIMED-UP, utilizando inicialmente o polímero PLGA. Após avaliar alguns parâmetros, como taxa de recuperação, eficiência de encapsulação, tamanho de partículas, potencial zeta, estabilidade da formulação, foi visto que estes não apresentavam resultados satisfatórios. Assim, iniciou-se a substituição de alguns componentes da formulação e, principalmente, a substituição do polímero para o PCL, mostrando agora resultados melhores, porém ainda não satisfatórios.

A continuidade desta etapa se deu sob a co-orientação do Prof. Dr. Moacir Rossi Forim, desenvolvidas no Laboratório de Produtos Naturais (DQ/UFSCar) onde que após pequenas modificações na metodologia resultaram em uma formulação estável, sendo descrito a seguir.

Inicialmente foi obtida a fase orgânica constituída de acetona contendo o polímero PCL, o composto ativo, tensoativo e, no caso das nanocápsulas, o óleo (núcleo). A fase aquosa foi constituída de água e tensoativo, de constituição diferente ao contido na fase orgânica (TABELA 3.32). Em seguida, a fase orgânica foi vertida, sob vazão constante e contínua, sobre a fase aquosa com agitação constante e em temperatura ambiente, mantendo-a sob agitação durante 10 minutos. Logo em seguida, a suspensão coloidal foi evaporada em rotaevaporador sob vácuo à 42°C, ajustando o volume final para 15 mL.

TABELA 3.32 – Composição da formulação de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação

Composição	Nanoesferas	Nanocápsulas
Fase orgânica		
Acetona	15 ml	15 ml
PCL	69 mg	69 mg
Span 60	50 mg	50 mg
Benzoato de benzila	-	200 e 400 µl
Fase aquosa		
Água	25 ml	25 ml
Tween 80	50 mg	50 mg

A partir da determinação de cada componente da formulação e suas respectivas quantidades, partiu-se para a caracterização físico-química visando o entendimento do comportamento físico-químico destes sistemas de nanopartículas, sendo que estas metodologias estão apresentadas adiante. Além das principais metodologias de caracterização, foi também realizado e abordado o estudo referente à secagem das nanopartículas que, a princípio, é uma estratégia de aumentar a estabilidade físico-química dos sistemas em relação ao mesmo na sua forma líquida dispersa.

3.6.4 – Caracterização físico-química das nanopartículas

Antes de iniciar o detalhamento de determinados parâmetros deste item, ou seja, a quantificação que envolve a otimização das condições cromatográficas, preparo de soluções padrões juntamente com a confecção de curva de calibração e, conseqüentemente, cálculo da taxa de recuperação e eficiência de encapsulação de todas as nanopartículas confeccionadas, será

primeiro apresentado a metodologia que envolve toda a validação do método cromatográfico para garantir que todo o método analítico forneça informações confiáveis, interpretáveis e reproduzíveis sobre as amostras.

3.6.4.1 – Validação do método analítico

Para a realização da validação do método analítico foram utilizadas as normas da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), seguindo as recomendações a partir da Resolução ANVISA RE nº899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003), onde foram avaliados os parâmetros linearidade, seletividade do método, especificidade do método, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), requeridos para a execução da validação do método analítico.

Os compostos crisofanol e menadiona foram alvos de investigação para a validação de seus respectivos métodos analíticos. A escolha destes compostos se deu pela maior atividade apresentada. Assim, para a investigação, inicialmente foi realizado diversos testes para o desenvolvimento de um método cromatográfico. A TABELA 3.33 mostra as condições cromatográficas dos compostos crisofanol e menadiona.

TABELA 3.33 – Condições cromatográficas de crisofanol e menadiona

Analito	Sistema	Volume de injeção (µL)	Vazão (mL/min)	Comprimento de onda (nm)
Crisofanol	MeOH:H ₂ O (8:2 v/v)	20	1	257
Menadiona	MeOH:H ₂ O (1:1 v/v)	20	1	251

3.6.4.1.1 – Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método analítico produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003). Para a determinação deste parâmetro, foi inicialmente construída uma curva de calibração para ambos os compostos, com as respectivas concentrações de trabalho mostradas abaixo:

- Crisofanol: 5; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 µg/mL.
- Menadiona: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 400 µg/mL.

A avaliação deste parâmetro se deu a partir do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (coeficiente de correlação do gráfico, r^2).

3.6.4.1.2 – Seletividade do método

A avaliação da seletividade do método com relação a algum possível interferente em coeluição foi realizada através da comparação entre amostras com e sem o analito nas mesmas condições cromatográficas. Assim foram preparadas soluções de nanoesferas e nanocápsulas vazias, ou seja, sem a presença do composto ativo, e preparado conforme a metodologia de abertura de amostra e analisando se há a presença ou ausência de compostos com o mesmo tempo de retenção do analito na amostra. Assim, a partir desta análise há uma confirmação de que o método é capaz de medir exatamente o analito mesmo na presença de outros interferentes, componentes em sua matriz (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003).

3.6.4.1.3 – Especificidade do método

Apesar de este parâmetro ser muito utilizado como sinônimo ao descrito anteriormente, este pode ser definido como a capacidade do método analítico em detectar o analito (BRITO et al., 2003). Como as aberturas das

amostras foram realizadas em um sistema de solvente diferente ao utilizado na ressuspensão dos analitos para serem injetados e analisados via HPLC, houve então a necessidade de investigar a resposta destes sistemas de solventes em solubilizar a mesma quantidade do composto, comparando assim se existe um valor semelhante na área do pico referente aos compostos entre os dois diferentes sistemas de solventes.

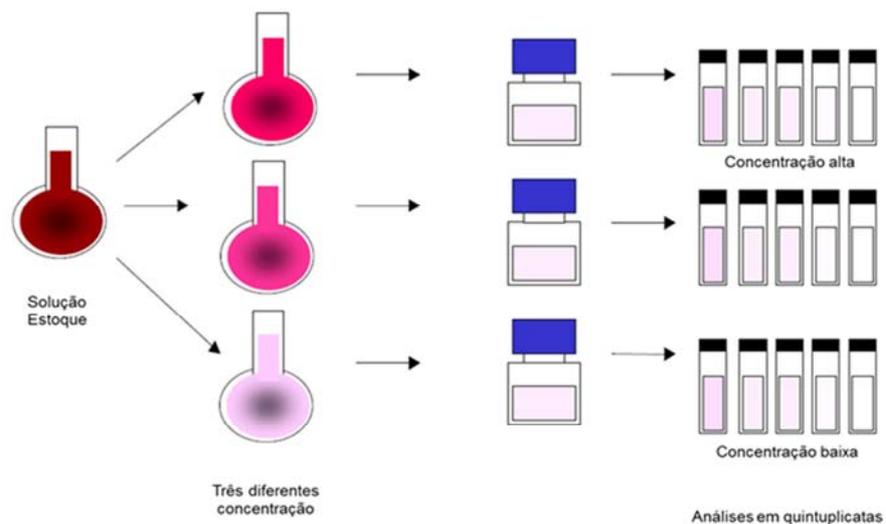
3.6.4.1.4 – Precisão (*Repetibilidade e precisão intermediária*)

Este é o parâmetro que avalia a proximidade dos resultados de várias medidas de uma amostragem múltipla na mesma amostra (ANVISA, 2003; BRITO et al., 2003). Assim, este parâmetro foi analisado em dois níveis:

- Precisão intra-corrida (*Repetibilidade*): expressa a precisão entre os resultados em um pequeno espaço de tempo com o mesmo analista e instrumentação;
- Precisão inter-corridas (*Precisão intermediária*): expressa as variações no mesmo laboratório envolvendo diferentes dias.

Assim, foram avaliadas três soluções contendo os compostos ativos em diferentes concentrações, sendo que a primeira concentração foi 120% do valor utilizado no primeiro ponto da curva de calibração, a segunda entre 40-60% do maior concentração usada na curva (foi utilizada 43%) e a terceira também entre 90-100% do maior ponto da curva (foi utilizada 93,8%). Todas as amostras foram preparadas em quintuplicata, totalizando 15 amostras, e analisadas em um único dia para precisão intra-corrida e analisadas em três dias não consecutivos para avaliação da precisão inter-corridas, totalizando 45 amostras (conforme a FIGURA 3.37). A precisão é expressa como desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação (CV%) das diversas medidas, pela equação mostrada abaixo, onde s significa o valor de desvio-padrão e M a média de cada concentração analisada (EQUAÇÃO 2).

$$CV(\%) = \frac{s}{M} \times 100 \quad (2)$$



Fonte: Adaptado de BRITO et al., 2003.

FIGURA 3.37 – Esquema da metodologia utilizada no parâmetro de precisão.

3.6.4.1.5 – Exatidão

A exatidão mostra a concordância ou proximidade entre o valor real do analito na amostra em relação ao valor nominal. A EQUAÇÃO 3 mostra o cálculo para este parâmetro, onde M corresponde ao valor da média experimental.

$$Exatidão (\%) = \frac{M}{M_{teorica}} \times 100 \quad (3)$$

3.6.4.1.6 – Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)

O limite de quantificação descreve a menor quantidade do analito que pode ser analisada com precisão e exatidão e o limite de detecção demonstra a quantidade mínima detectada do analito na amostra, mesmo não sendo quantificado (ANVISA, 2003). Estes parâmetros foram obtidos experimentalmente, por sucessivas diluições de uma solução padrão de concentração conhecida e decrescente, comparando o valor da altura do pico em relação ao sinal/ruído até atingir a relação de 10 (LQ) e 3 (LD) vezes esta relação.

3.6.4.2 – Eficiência de encapsulação

A determinação da quantidade total do composto presente nas nanopartículas é um fator complexo pelo tamanho reduzido destes sistemas que dificulta a separação da parte do composto livre em relação ao encapsulado (SCHAFFAZICK et al., 2003). Assim, foi utilizada a técnica de ultracentrifugação e ultrafiltração-centrifugação, sendo que esta última utiliza-se de uma membrana que, através da centrifugação, separa uma parte da fase aquosa (onde as nanopartículas estão dispersas) da suspensão coloidal. Ou seja, foi adicionado 500 µL da suspensão em um tubo e após centrifugação, obteve-se entre 200 a 300 µL da fase aquosa. Portanto, o cálculo da quantidade total de composto encapsulado é feito através da diferença das concentrações do composto ativo total e livre na suspensão coloidal. A FIGURA 3.38 ilustra o sistema de filtros, da marca Corning, modelo Costar Spin-X, utilizados na ultrafiltração-centrifugação.



Fonte:
https://dotscientific.com/Products.aspx?G_id=42&C_id=191&SC_id=550&T_id=2290

FIGURA 3.38 – Sistema de ultrafiltração-centrifugação.

A EQUAÇÃO 4 representa o cálculo realizado para a determinação da quantidade total, ou seja, a determinação da Eficiência de encapsulação, onde A é a concentração total do composto na dispersão coloidal e B é a concentração obtida no meio de dispersão:

$$EE (\%) = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad (4)$$

3.6.4.3 – Taxa de recuperação

A recuperação mostra a quantidade do composto ativo presente em relação ao adicionado na formulação, onde este analito é extraído da matriz e quantificado (RIBANI et al., 2004). Especificamente para as nanopartículas, este parâmetro fornece uma importante informação no que diz respeito à estabilidade do composto na matriz. Fatores como degradação do composto ativo, perdas do mesmo pela escolha da metodologia de preparo ou mesmo perdas em determinada etapa, entre outros fatores, são vistos através deste parâmetro.

Para isso, foi realizada uma metodologia de abertura da amostra, ou seja, liberar por completo todo o princípio ativo presente nas nanopartículas para, assim, avaliar o teor total presente neste sistema coloidal. Assim, foi pipetado o volume de 100 µL da suspensão coloidal em 900 µL de uma mistura de THF:MeOH 7:3. Esta solução foi mantida em repouso por 120 minutos sob agitação em vortex e centrifugada por 20 minutos à 14000 rpm. Posteriormente, uma alíquota de 500 µL foi seca utilizando o equipamento SpeedVac, o produto seco foi ressuscitado em MeOH e analisada via HPLC. Vale ressaltar que foram realizados diversos testes de solubilidade dos compostos utilizados no processo de nanoencapsulamento nestes solventes, onde todos apresentaram total solubilidade nos mesmos. Juntamente, foi verificado que a mesma quantidade destes compostos são totalmente solúveis nos dois sistemas, portanto ambos os solventes, apesar de serem diferentes, são específicos para cada composto utilizado.

3.6.4.4 – Diâmetro médio / Índice de polidispersão

Os diâmetros médios e, conseqüentemente os valores de Índice de polidispersão foram obtidos através da análise nos equipamentos da marca Malvern Instruments, modelo Zeta Sizer Nano Series (Nano-ZS), pertencente à Universidade do Porto e da marca Microtrac, modelo Zetatrac, pertencente ao Laboratório de Polímeros do Instituto de Física – Universidade de São Paulo. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.6.4.5 – Potencial zeta

Os valores de potencial zeta foram obtidos através da análise nos equipamentos da marca Malvern Instruments, modelo Zeta Sizer Nano Series (Nano-ZS), pertencente à Universidade do Porto e da marca Microtrac, modelo Zetatrac, pertencente ao Laboratório de Polímeros do Instituto de Física – Universidade de São Paulo. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

3.6.4.6 – Análise morfológica

As análises da morfologia das nanopartículas foram realizadas nos equipamentos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da marca Fei, modelos Magellan 400L e Inspect S50, pertencente ao Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos. Em relação ao preparo, todas foram colocadas sobre um suporte de alumínio de tamanho específico para os equipamentos supracitados, previamente limpos e polidos com pasta de diamante. Em relação às nanopartículas na forma líquida, estas foram colocadas diretamente sobre os porta-amostras. As nanopartículas na forma de pó, foram colocadas sobre uma fita de carbono dupla face e afixada no porta-amostra. Todas foram mantidas em dessecador para eliminação de qualquer partícula de H₂O e, por último, todas foram recobertas por uma camada de ouro (processo de metalização).

3.6.4.7 – Determinação do pH

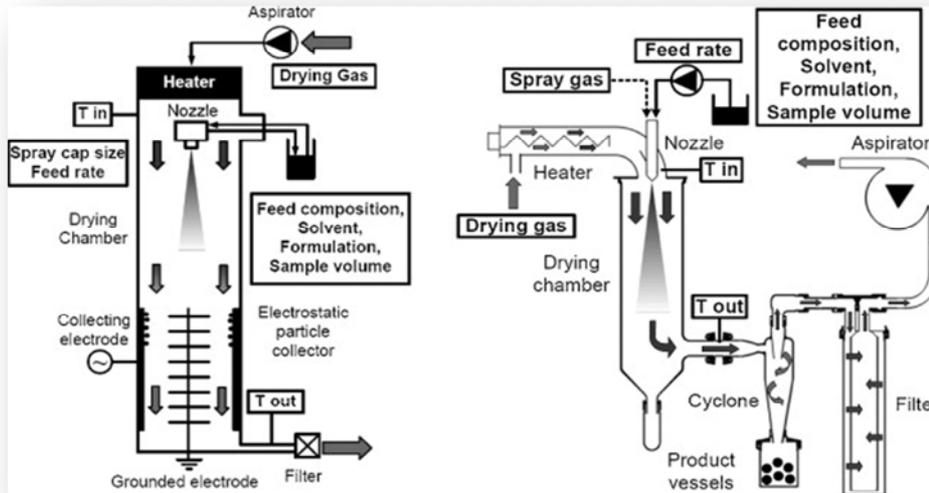
Os valores de pH obtidos diretamente das suspensões coloidais de nanopartículas no equipamento da marca Qualxtron, modelo 8010, calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0, já que os valores medidos se encontravam neste intervalo de valores. As medidas foram realizadas no ato da confecção das formulações e em 30 dias de armazenamento à 6°C.

3.6.4.8 – Estudo da cinética de liberação “in vitro” das nanopartículas

Para esta etapa do trabalho, o estudo de cinética de liberação “in vitro” das nanopartículas, principalmente no ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, foi considerado como o resultado do próprio ensaio, onde se verificou a mortalidade de 50 % das operárias. Isto é explicado pela extrema dificuldade de mimetizar as condições do ensaio, já que não há razão para realizar esta etapa do trabalho em uma condição totalmente diferente ao formigueiro. Como foi já discutido no item **3.3.2**, todos os compostos ativos ensaiados foram incorporados na dieta e, sendo esta dieta sólida, aumentou-se mais a dificuldade da mimetização do ambiente onde os compostos estão presentes para a realização da investigação em relação à cinética de liberação.

3.6.4.9 – Secagem das nanopartículas

Para esta etapa, a secagem por nebulização de todas as suspensões coloidais foi realizada através do uso do equipamento Spray-Dryer da marca Büchi, modelo B-290. Resumidamente, o processo de nebulização utiliza como adjuvante o dióxido de silício coloidal (Aerosil®) para secagem e se baseia na passagem da solução por um pequeno orifício, tornando-as pequenas gotículas que passarão para uma câmara de secagem sob aquecimento. Assim, ao entrar em contato com o ar quente, ocorre a rápida secagem das gotículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). A FIGURA 3.39 apresenta esquematicamente o funcionamento deste sistema de secagem.



Fonte: Adaptado de BÜRKI et al., 2011.

FIGURA 3.39 – Sistema de secagem por nebulização.

Após a passagem de toda a solução, é recolhido o pó, cuja característica principal é ser extremamente fino. Uma característica se dá pela formação de aglomerados de nanopartículas pela secagem aliada á presença do adjuvante dióxido de silício coloidal, ou seja, micropartículas revestidas de nanopartículas evitando a aglutinação das nanopartículas (DOMINGUES et al., 2008, FIGURA 3.40).

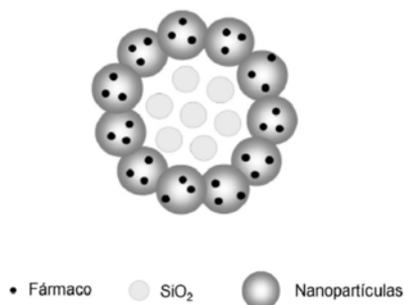


FIGURA 3.40 – Representação das esferas de nanopartículas adsorvidas ao núcleo contendo SiO₂.

Antes da etapa final de secagem, foram realizados diversos testes para a otimização nos parâmetros operacionais do Spray-Dryer. O principal resultado avaliado foi a porcentagem de rendimento gerando assim o máximo de rendimento das nanopartículas secas. Assim, após a otimização, todas as amostras foram secas seguindo os parâmetros descritos na TABELA 3.34.

TABELA 3.34 – Condições utilizadas para secagem das nanopartículas

Parâmetros	Valores otimizados
Temperatura de entrada do ar	120°C
Bomba de aspiração	37 m ³ /hora
Fluxo da bomba peristáltica	5 mL/min
Fluxo do ar	473 L/hora

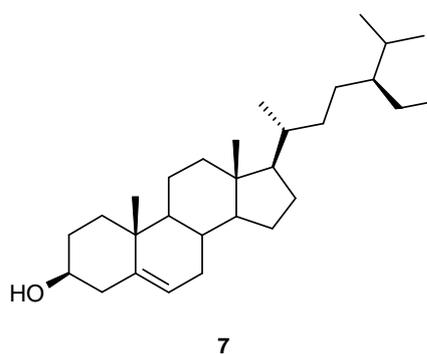
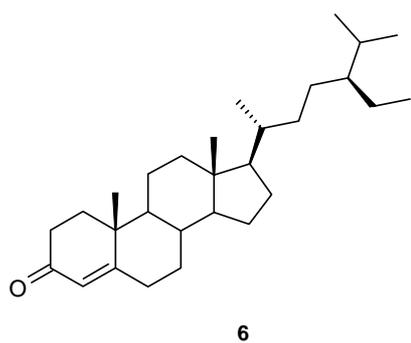
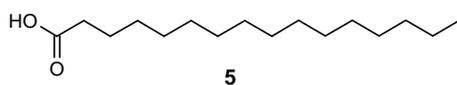
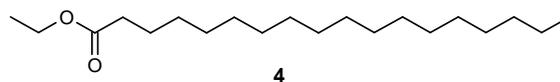
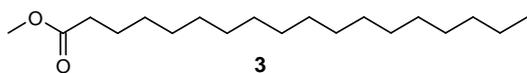
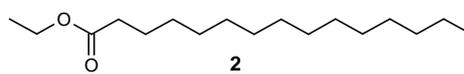
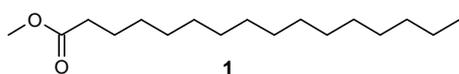
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

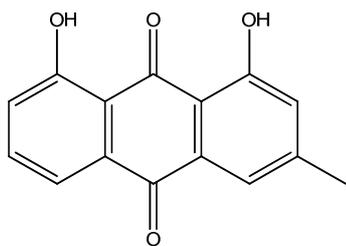
4.1 – METABÓLITOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS

Os estudos fitoquímicos envolvendo as plantas *P. bahiensis* e *T. schomburgkianum* culminou no isolamento e identificação de 24 metabólitos secundários, como mostrado na TABELA 4.1.

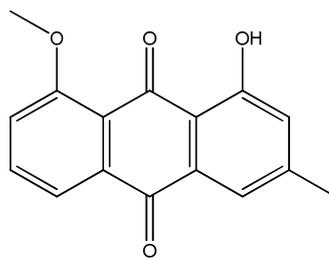
TABELA 4.1 – Metabólitos identificados

P. bahiensis

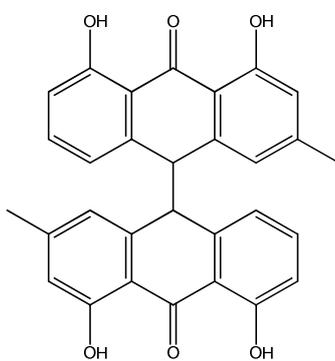




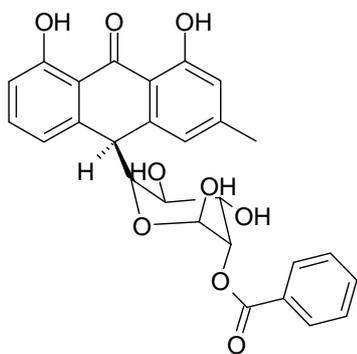
8



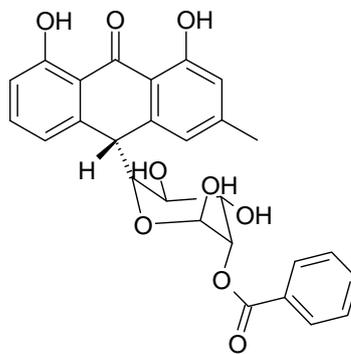
9



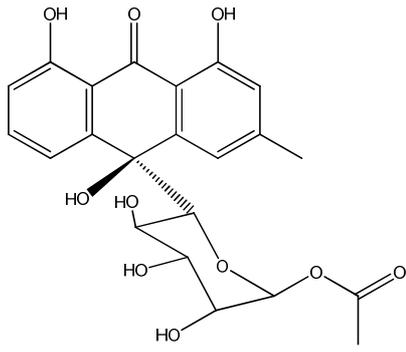
10



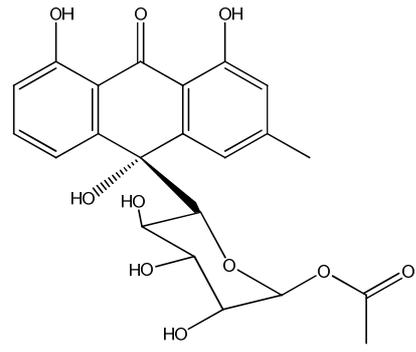
11



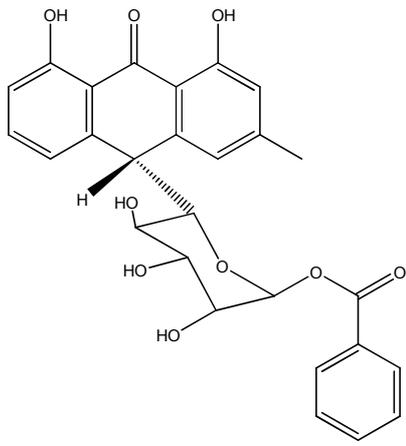
12



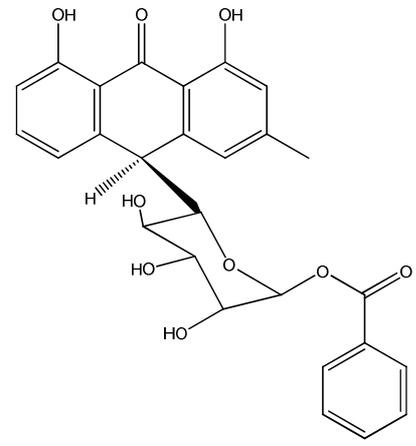
13



14

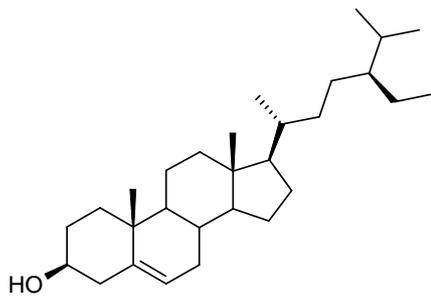


15

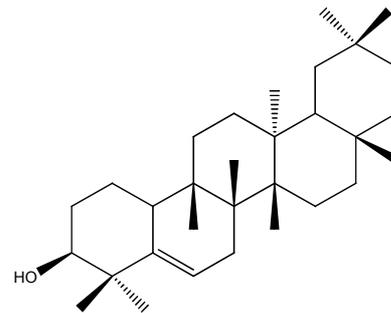


16

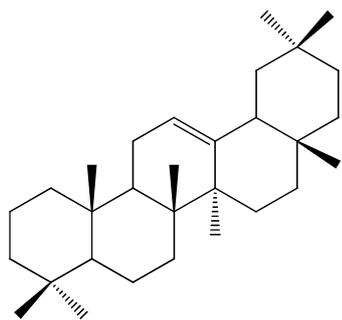
T. schomburgkianum



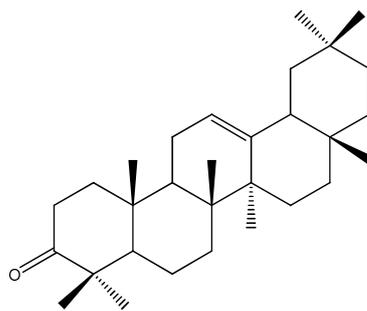
7



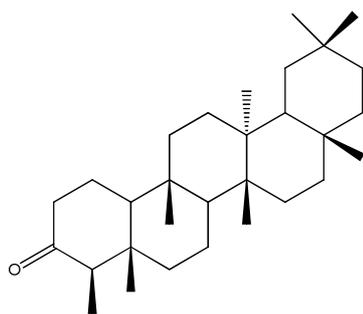
17



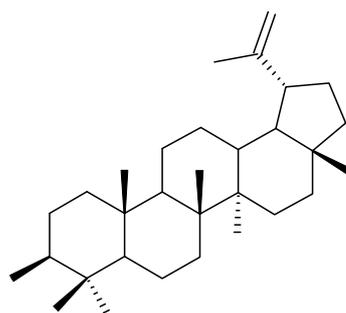
18



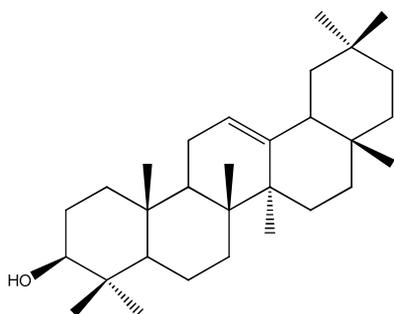
19



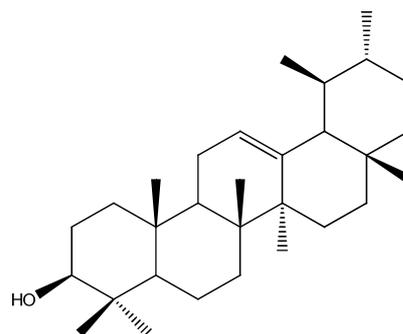
20



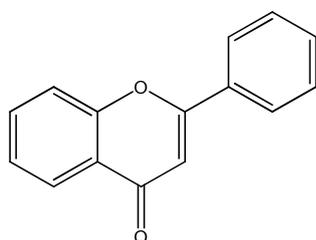
21



22



23



24

4.1.1 – Ácidos e ésteres de cadeia longa

Todas as frações foram analisadas via CG/EM nas mesmas condições já descritas no item 3.4.3.3. Assim, foram identificados através da análise em CG/EM os compostos: palmitato de metila (1), pentadecanoato de etila (2), estearato de metila (3) e estearato de etila (4) presentes em uma única mistura.

Para o composto 2 é mostrado abaixo seu espectro de massas obtido, juntamente com sua comparação no Banco de dados do aparelho (FIGURA 4.1).

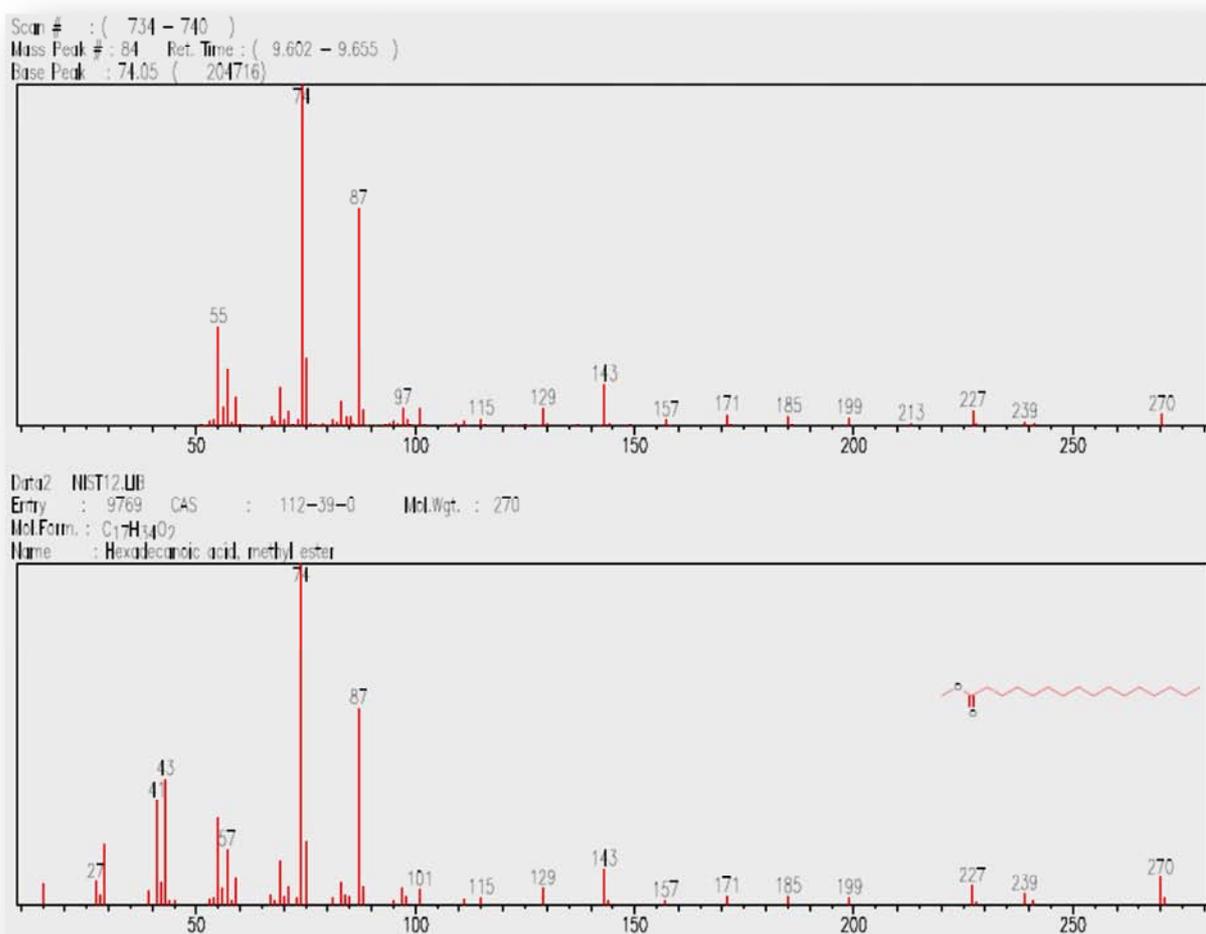


FIGURA 4.1 – Espectro de massas do palmitato de metila (1).

No espectro de massas observou-se a presença do pico do íon molecular (M^+) em m/z 270, correspondente a fórmula molecular $C_{17}H_{34}O_2$. Através

deste e dos demais picos e em conjunto com comparação, foi definido para esse espectro o composto palmitato de metila (1).

Para o composto 2 é mostrado abaixo seu espectro de massas juntamente com a comparação deste com Banco de Dados do aparelho (FIGURA 4.2).

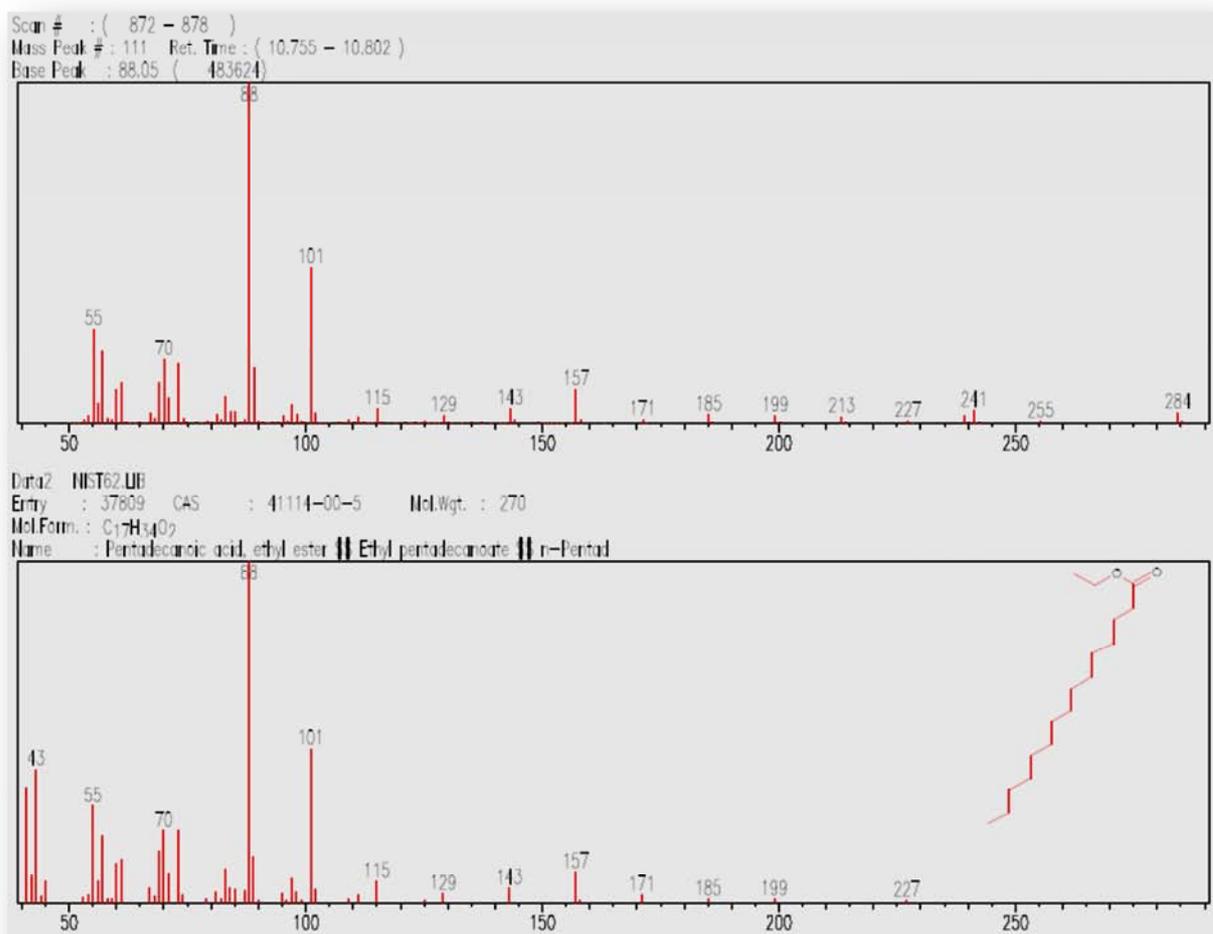


FIGURA 4.2 – Espectro de massas do pentadecanoato de etila (2).

No espectro não foi observado a presença do M^+ , porém o padrão de fragmentação demonstrou uma semelhança parcial com o composto 1, tendo uma mudança no pico base (P.B.). Esta mudança se deu em 14 unidades de massa atômica em relação ao anterior, dando a informação de um aumento de um grupo metileno originando o grupo etila. Assim com base nesses dados foi definida a identificação do pentadecanoato de etila (2).

Para o estearato de metila (**3**), é mostrado abaixo seu espectro de massas juntamente com uma comparação na biblioteca NIST do equipamento (FIGURA 4.3).

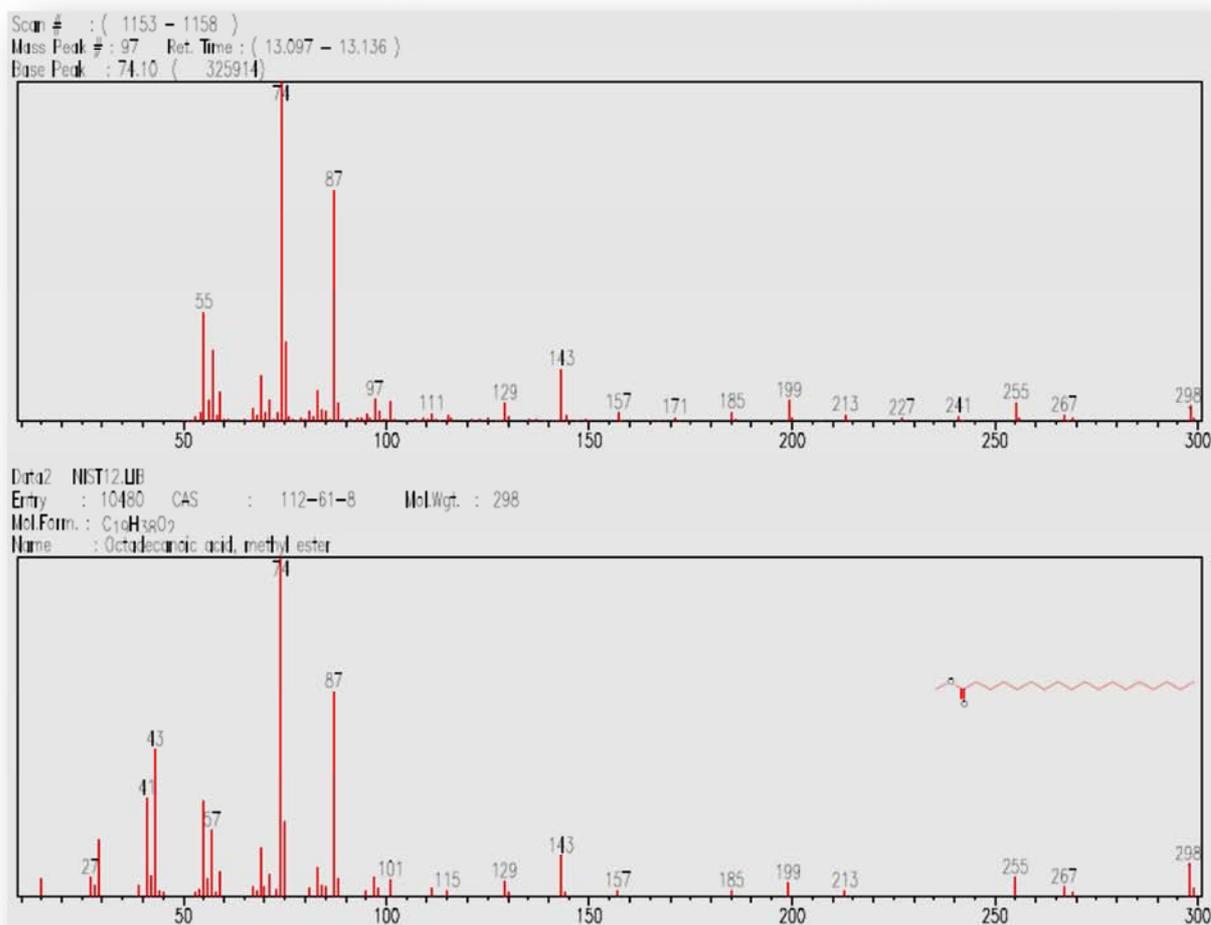


FIGURA 4.3 – Espectro de massas do estearato de metila (**3**).

No espectro de massas observou-se a presença de M^+ em m/z 298. Neste caso, comparando com o espectro obtido para o composto **2**, nota-se uma mudança no M^+ , porém mantendo o P.B. Essa mudança em 14 unidades mostrou um aumento na cadeia alquílica proveniente do ácido graxo, definindo assim a identificação do estearato de metila (**3**).

Para o composto estearato de etila (**4**) é mostrado abaixo seu espectro de massas juntamente com comparação com Banco de Dados (FIGURA 4.4).

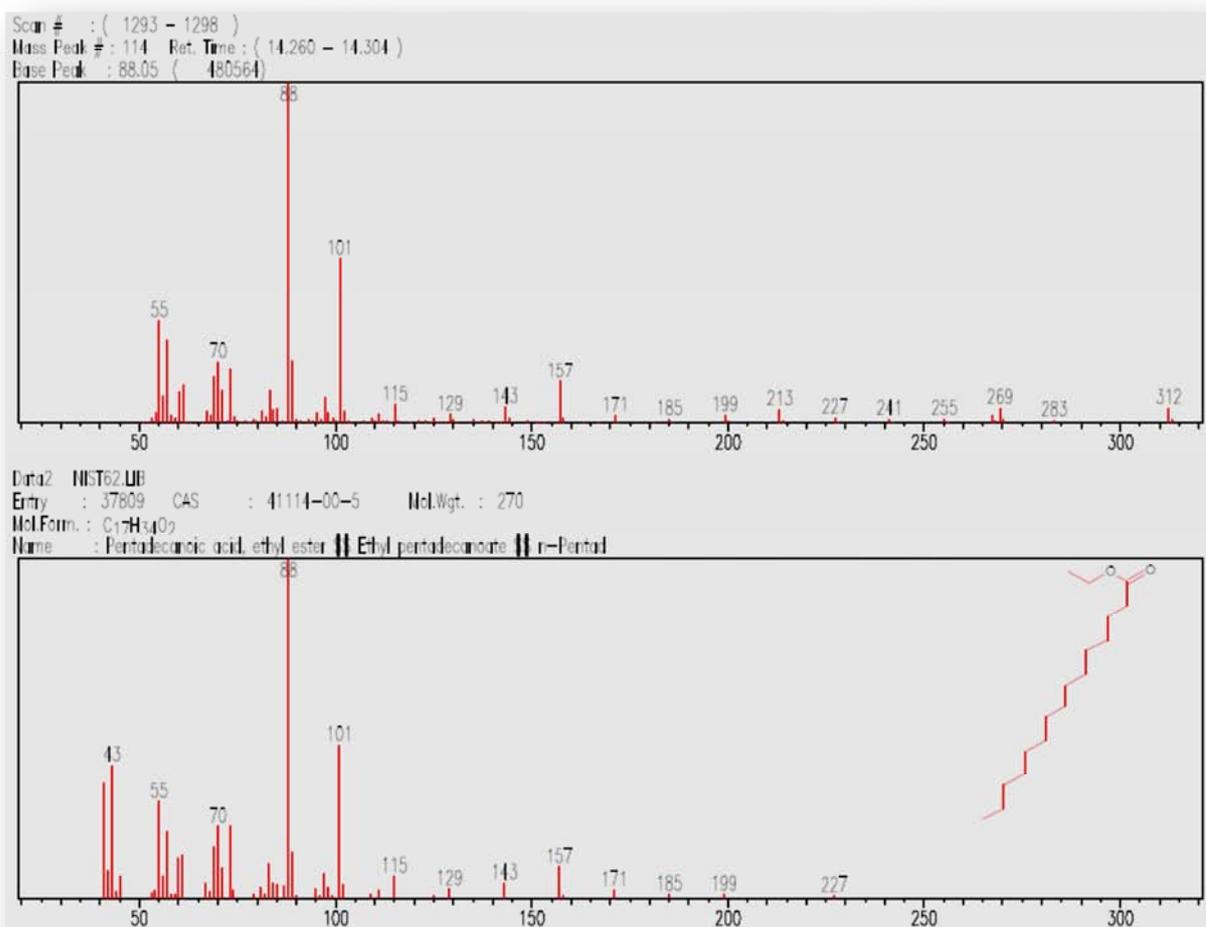


FIGURA 4.4 – Espectro de massas do estearato de etila (4).

Foi observada semelhança com o espectro obtido para o composto (2), porém com a mudança no M^+ em m/z 312. Isto implica em um aumento de duas unidades de grupos metílicos na cadeia, permanecendo o grupo etila pela presença do pico em m/z 88. Assim foi definida a identificação do estearato de etila (4). A comparação com banco de dados do aparelho forneceu o pentadecanoato de etila, sendo que foi buscado o Banco de dados do NIST para esse composto.

No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) desta mistura observou-se um sinal em δ_{H} 4,11 (quarteto), juntamente com um sinal em δ_{H} 3,66 (singleto), estes referentes ao grupo metileno e metílico da etila e metila, respectivamente. Também foi observado um sinal em δ_{H} 2,29 (triplete distorcido), referente ao grupo metileno diretamente ligado a carboxila e sinais no intervalo entre δ_{H} 2,0 a 0,66 (grupos metílicos e metílicos da cadeia alquílica). Com base em todos esses dados,

se confirmou a identificação dos compostos descritos acima. A FIGURA 4.5 corresponde ao espectro de RMN de ^1H desta mistura.

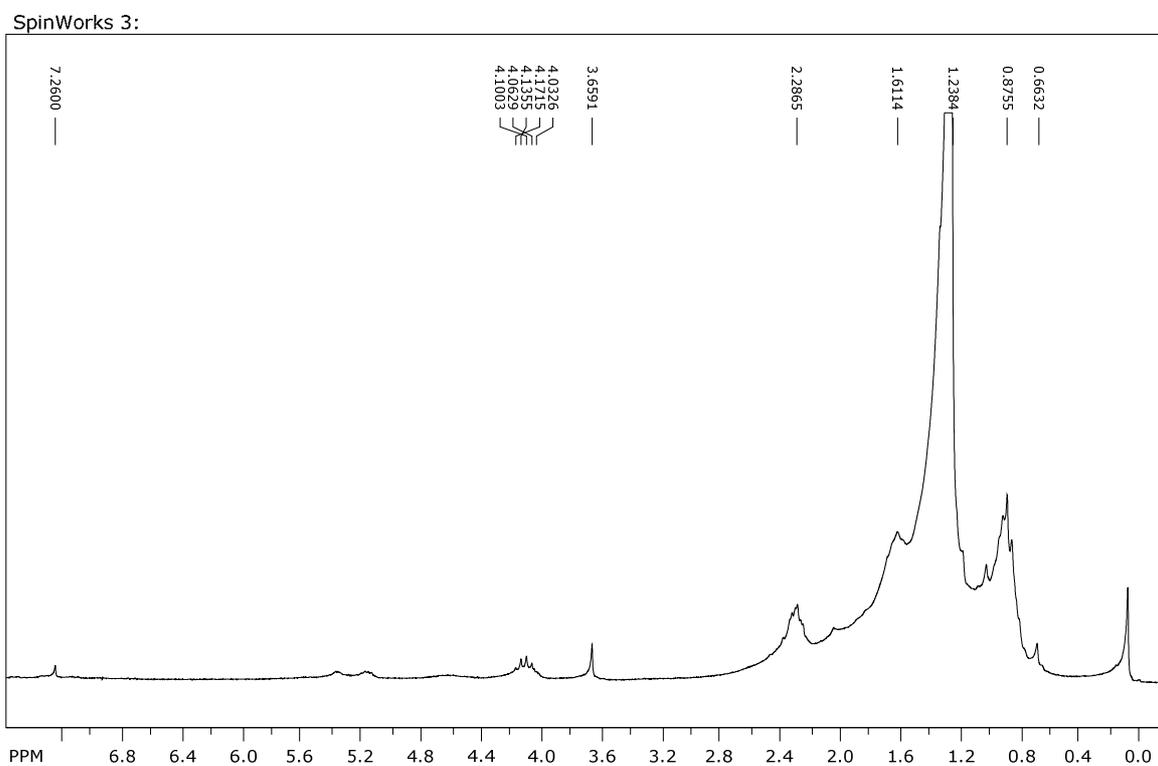


FIGURA 4.5 – Espectro de RMN de ^1H da mistura dos ésteres de ácidos graxos **1-4**.

A partir da fração H+D/01/01/05, proveniente das raízes de *P. bahiensis*, foram identificados o ácido palmítico (**5**) e sitostenona (**6**). Para o composto (**5**), é mostrado o espectro de massas, juntamente com a comparação com o banco de dados do próprio aparelho (FIGURA 4.6).

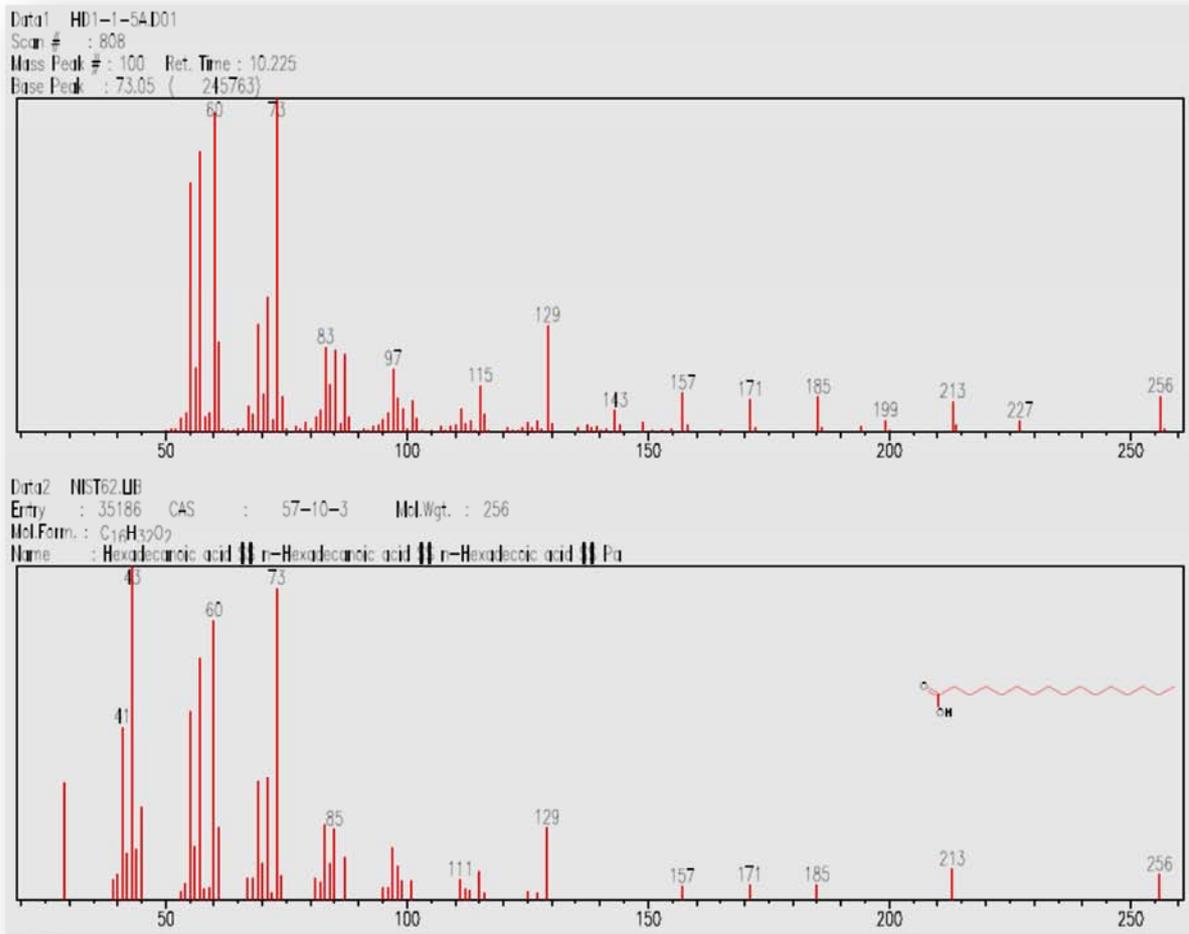


FIGURA 4.6 - Espectro de massas do ácido palmítico (5).

Assim, após a análise junto ao banco de dados do NIST, verificou-se o ácido palmítico presente na mistura. Uma única diferença foi observada em comparação com os bancos de dados, a mudança do P.B. em relação ao espectro obtido (m/z 73) com m/z 43 (espectro utilizado como comparação). Isto pode ser explicado já que para a análise foi selecionado a varredura das unidades de massa atômica no intervalo de 50 a 500. Assim, a ausência do pico em m/z 43 torna o segundo pico mais intenso como o pico base.

Para o composto **6** é mostrado abaixo o espectro de massas obtido com sua comparação com o banco de dados (FIGURA 4.7).

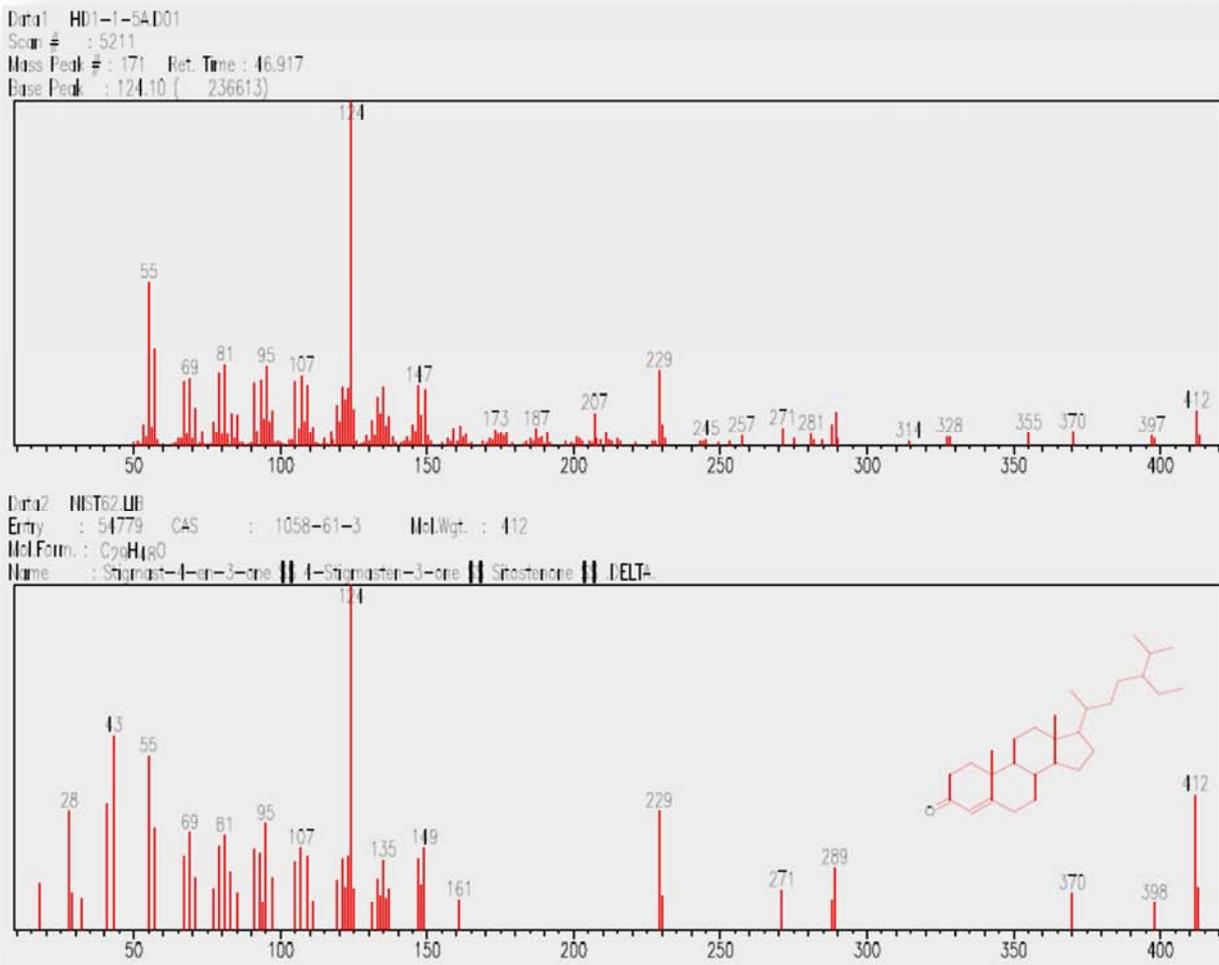


FIGURA 4.7 - Espectro de massas da sitostenona (6).

O mesmo também foi comparado com o banco de dados no NIST e foi observada uma semelhança entre os espectros, assim indicando haver na mistura a sitostenona.

Analisando o espectro de RMN de ¹H (CDCl₃, 200 MHz), observou-se um sinal em δ_H 5,62, referente ao grupo metino da dupla ligação do esteróide, tripleto em δ_H 2,33 referente ao metileno do ácido de cadeia longa e sinais na região entre δ_H 2,0 a 0,7 referentes a grupos metilenos e metílicos dos compostos em mistura, tendo estes sinais como confirmação da identificação desses compostos, conforme é mostrado na FIGURA 4.8.

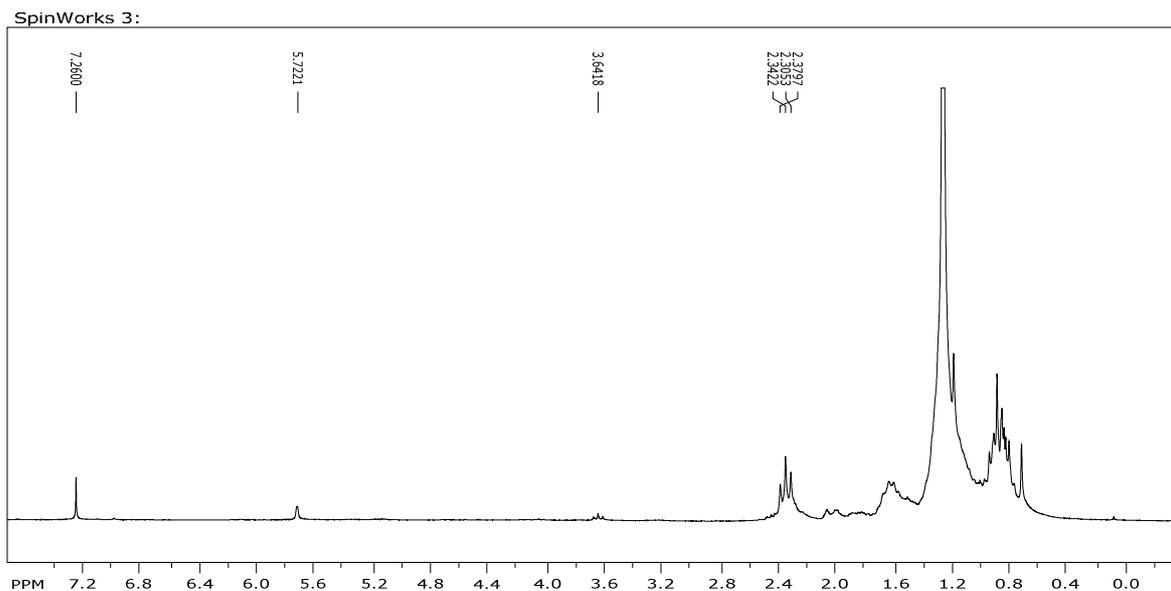


FIGURA 4.8 - Espectro de RMN de ^1H da mistura **5** e **6**.

Ainda com a análise por CG/EM, a partir da fração H+D/01/01/06, mostrou a presença de um pico minoritário bem como a presença de um majoritário. Como foram utilizadas as mesmas condições de análise para todos, o primeiro pico mencionado teve o tempo de retenção semelhante ao composto (**5**) já citado anteriormente. A partir do espectro foi observada a presença novamente do ácido palmítico (FIGURA 4.9).

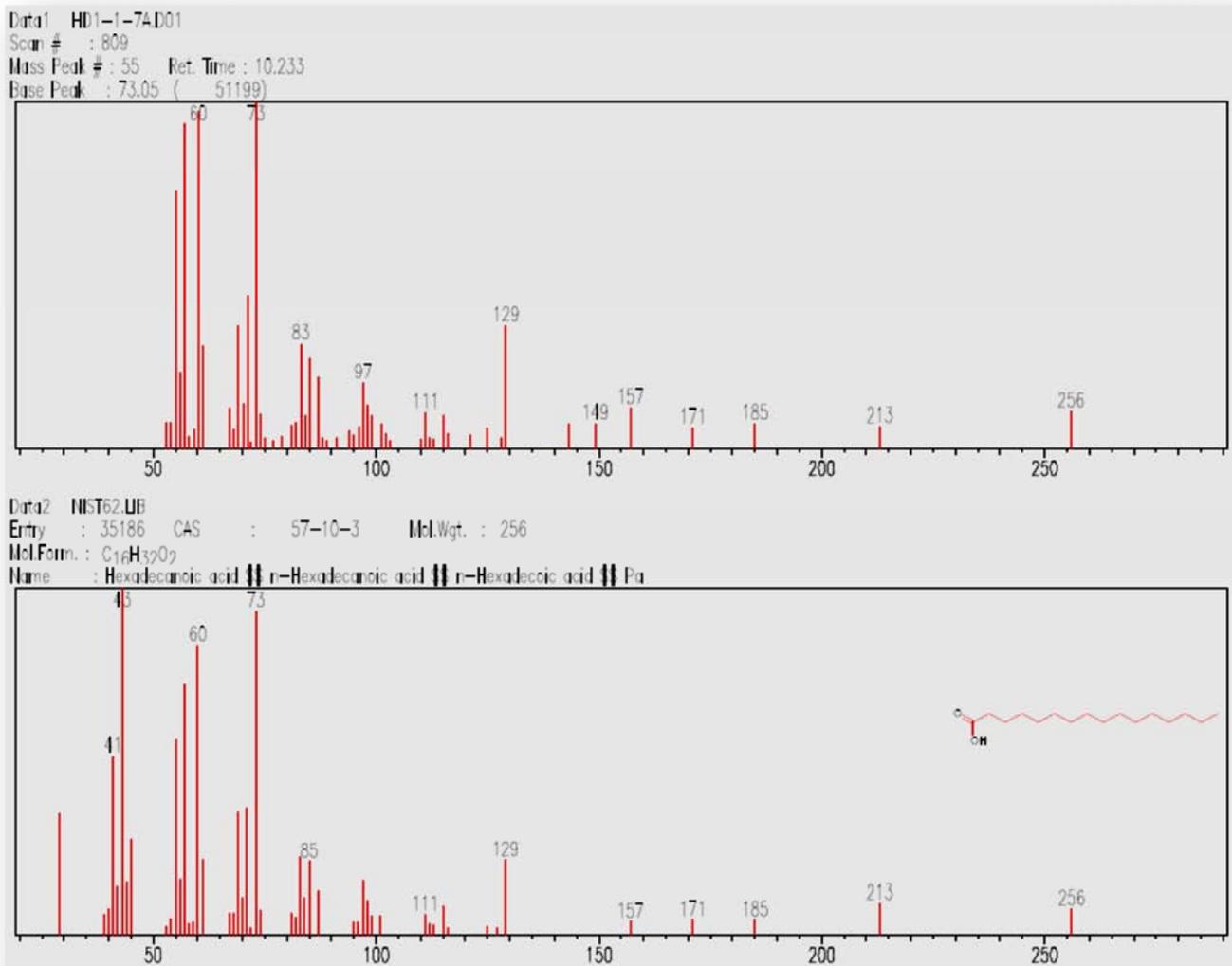


FIGURA 4.9 - Espectro de massas de **5**.

Para o composto em presença majoritária, seu espectro obtido foi comparado com o banco de dados do próprio aparelho, juntamente com o banco de dados do NIST mostrando uma semelhança para o composto sitosterol (**7**) como mostrado na FIGURA 4.10.

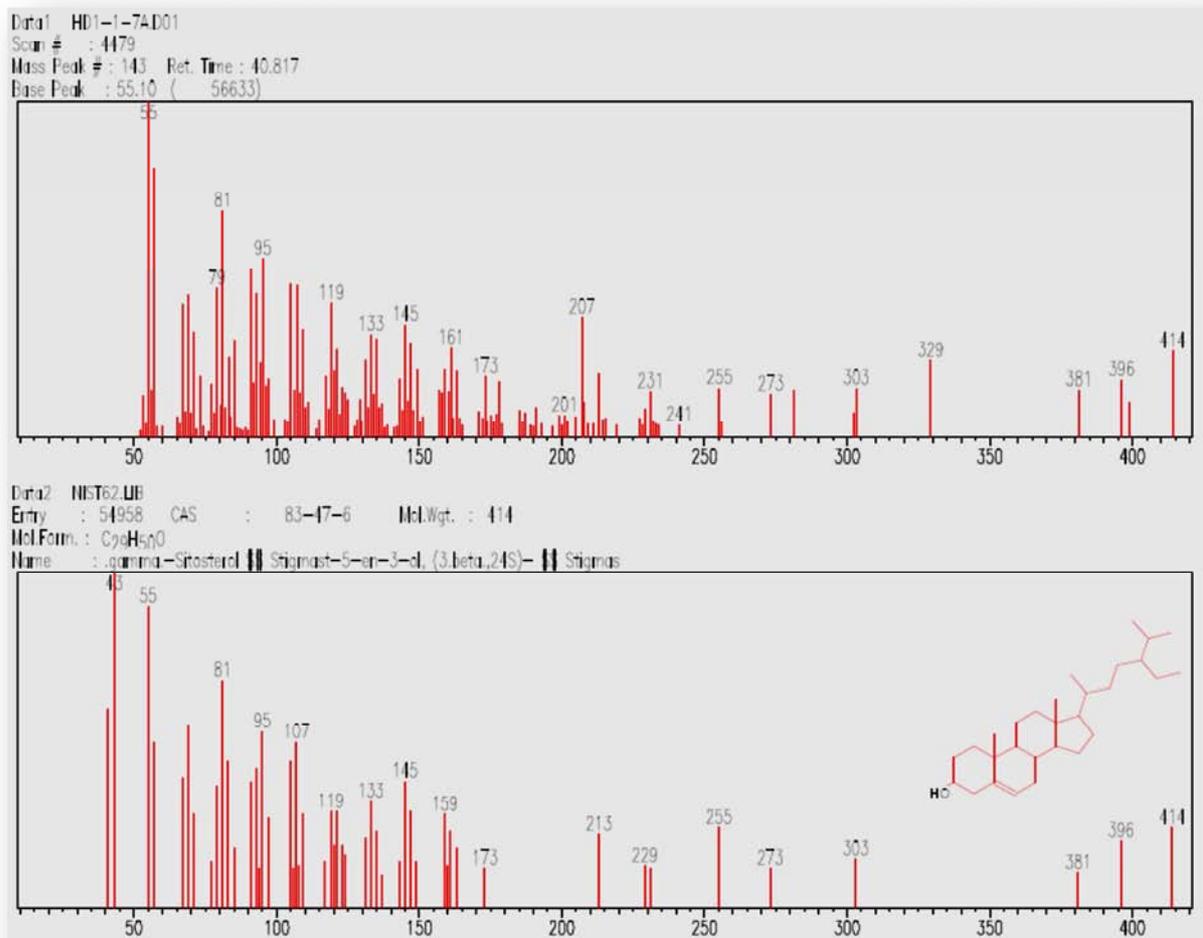


FIGURA 4.10 - Espectro de massas do sitosterol (7).

Analisando o espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) desta mistura, observou-se um dubleto em δ_{H} 5,32 referente ao grupo metino da dupla ligação do sitosterol, multipletto em δ_{H} 3,52 referente ao grupo metino ligado a hidroxila do sitosterol, sinal em δ_{H} 2,33 (*t*) referente ao grupo metileno do ácido de cadeia longa e sinais na região entre δ_{H} 2,0 a 0,7 referentes a grupos metilenos e metílicos dos compostos em mistura. Com estes dados, há a confirmação da identificação destes compostos em mistura. A FIGURA 4.11 mostra o espectro de RMN de ^1H desta mistura.

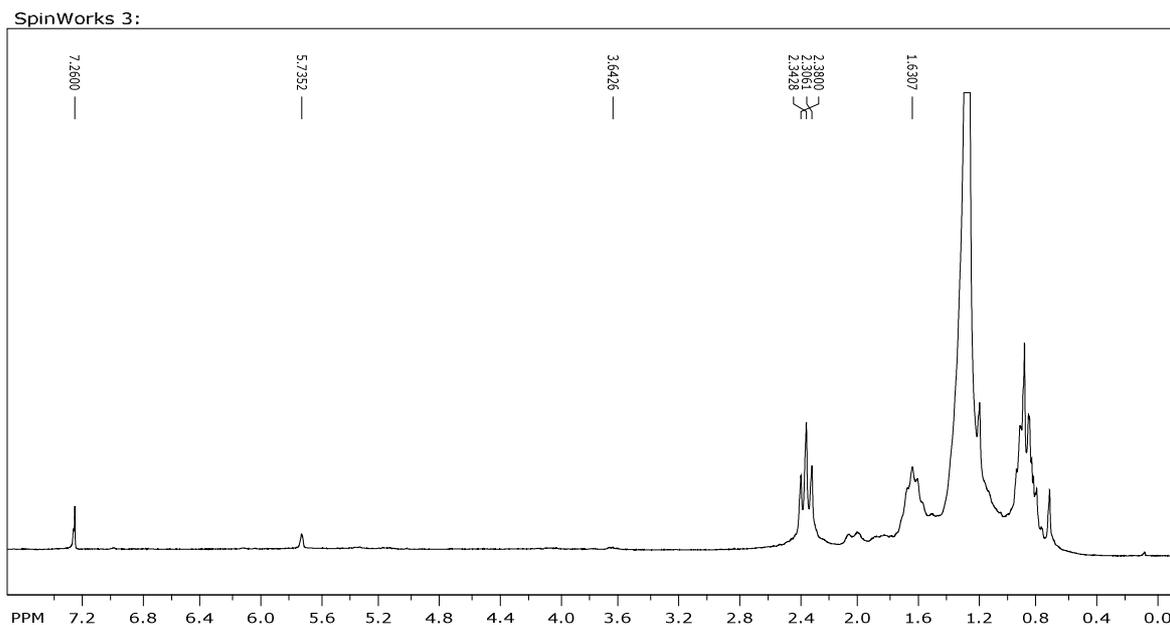


FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de ^1H da mistura **5** e **7**.

4.1.2 – Antraquinonas

4.1.2.1 – *Crisofanol* (**8**)

Crisofanol (**8**), proveniente das raízes de *P. bahiensis*, apresentou-se como um sólido cristalino de cor alaranjada e foi isolado em grande quantidade a partir de diversas frações, tais como H+D/01/01/02, H+D/01/01/03, H+D/01/01/04 e H+D/01/03/03/03. A identificação estrutural foi realizada através da comparação com dados da literatura (DANIELSEN et al., 1992; RODRIGUEZ-GAMBOA, 2001; SANTOS et al., 2008), confirmando assim o isolamento do composto 1,8-diidroxi-3-metilantraquinona (*crisofanol*, **8**), tendo o espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) mostrado na FIGURA 4.12. Este composto apresentou atividade inseticida e fungicida frente às formigas-cortadeiras.

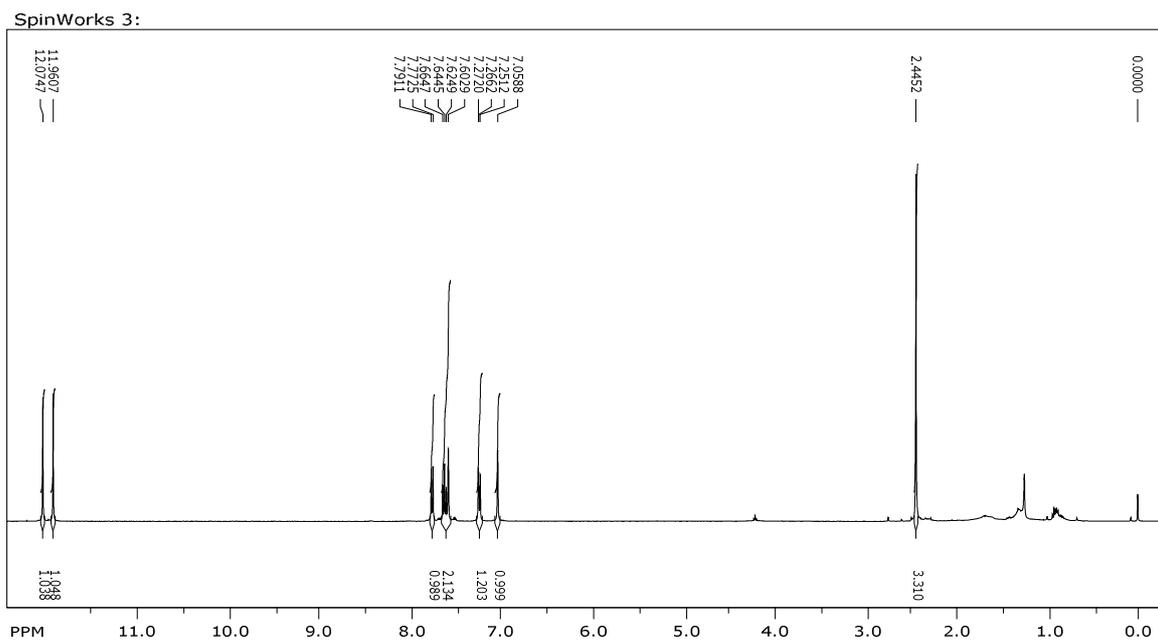


FIGURA 4.12 - Espectro de RMN de ^1H da substância **8**.

A ampliação do espectro de RMN de ^1H indicou a presença de dois singletos em δ_{H} 11,96 e 12,07, cada sinal integrando para 1 hidrogênio, sendo estes característicos de sistemas 1,5 contendo duas hidroxilas queladas (FIGURA 4.13), característicos em antraquinonas, como é mostrado na ampliação do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.14).

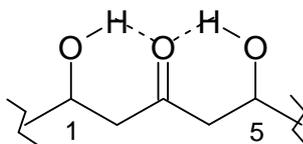


FIGURA 4.13 - Proposta para os sinais em δ_{H} 11,96 e 12,07.

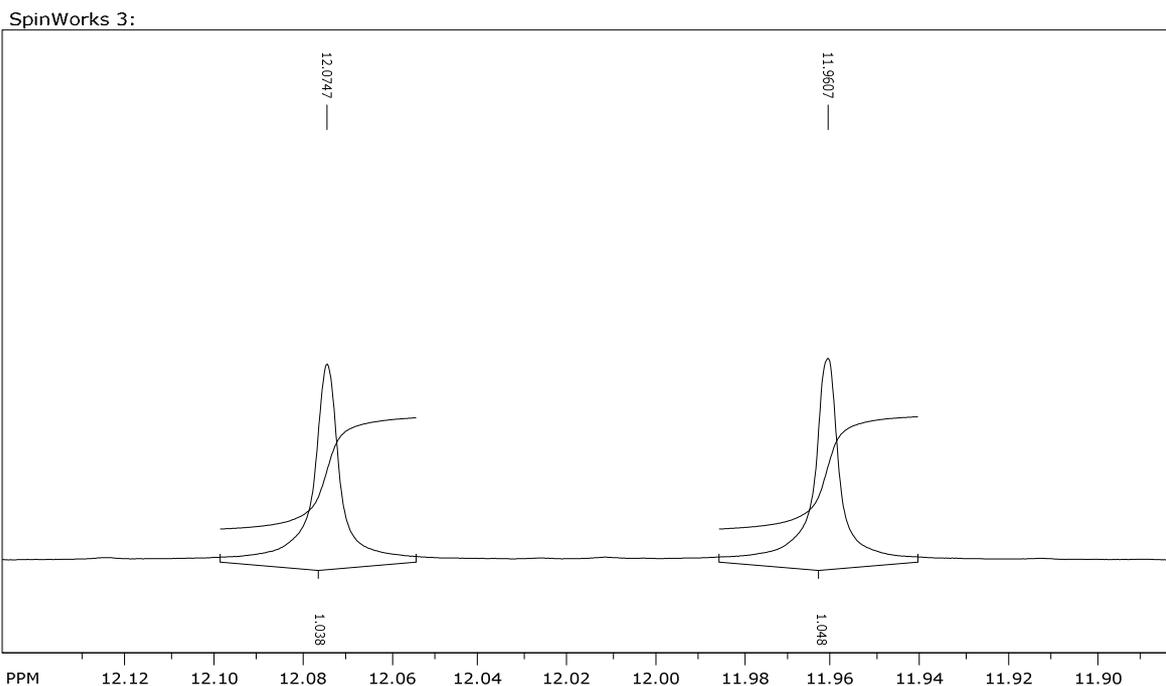


FIGURA 4.14 - Ampliação dos sinais referentes aos hidrogênios das hidroxilas queladas.

Ainda no espectro de RMN de ^1H , sinais correspondentes a hidrogênios ligados a anéis aromáticos em δ_{H} 7,78 (*d*, $J = 7,8$ Hz, 1H), δ_{H} 7,64 (*t*, $J = 7,8$ Hz, 1H), δ_{H} 7,60 (*sl*, 1H), δ_{H} 7,26 (*d*, $J = 7,8$ Hz, 1H), δ_{H} 7,06 (*sl*, 1H) que associado à presença de um singlete em δ_{H} 2,44 (3H) (TABELA 4.2) sugere a estrutura do crisofanol, como mostrado nas FIGURAS 4.15 e 4.16.

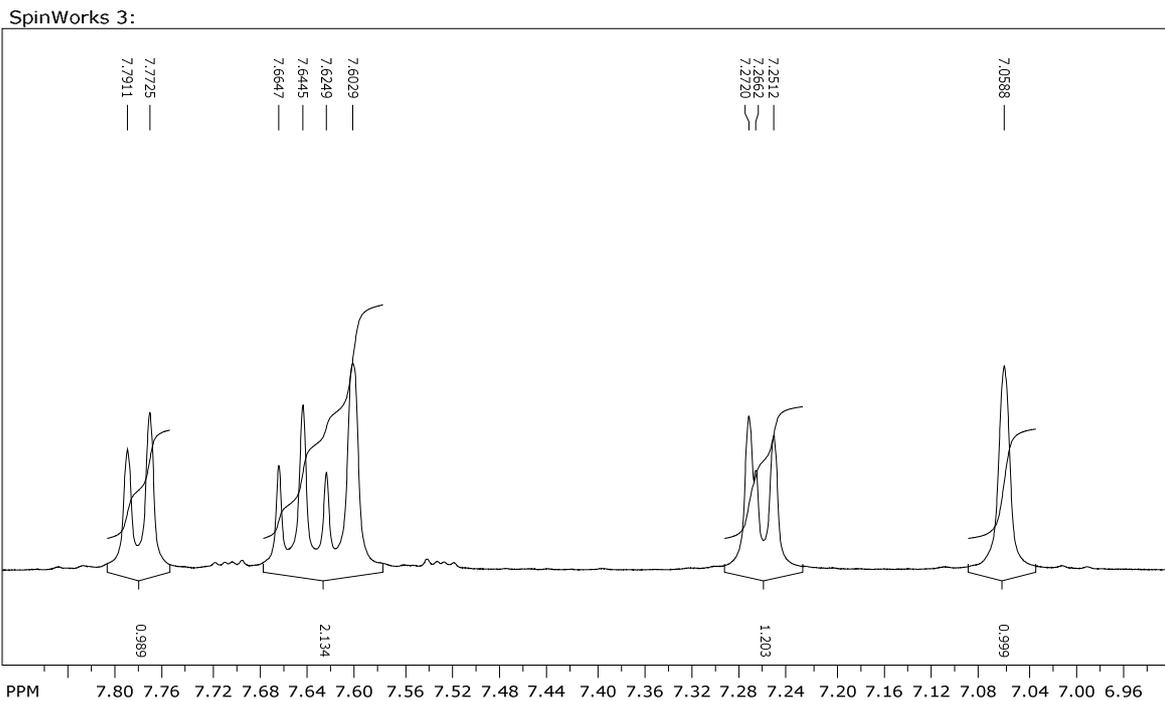


FIGURA 4.15 - Ampliação dos sinais na região de aromáticos de **8**.

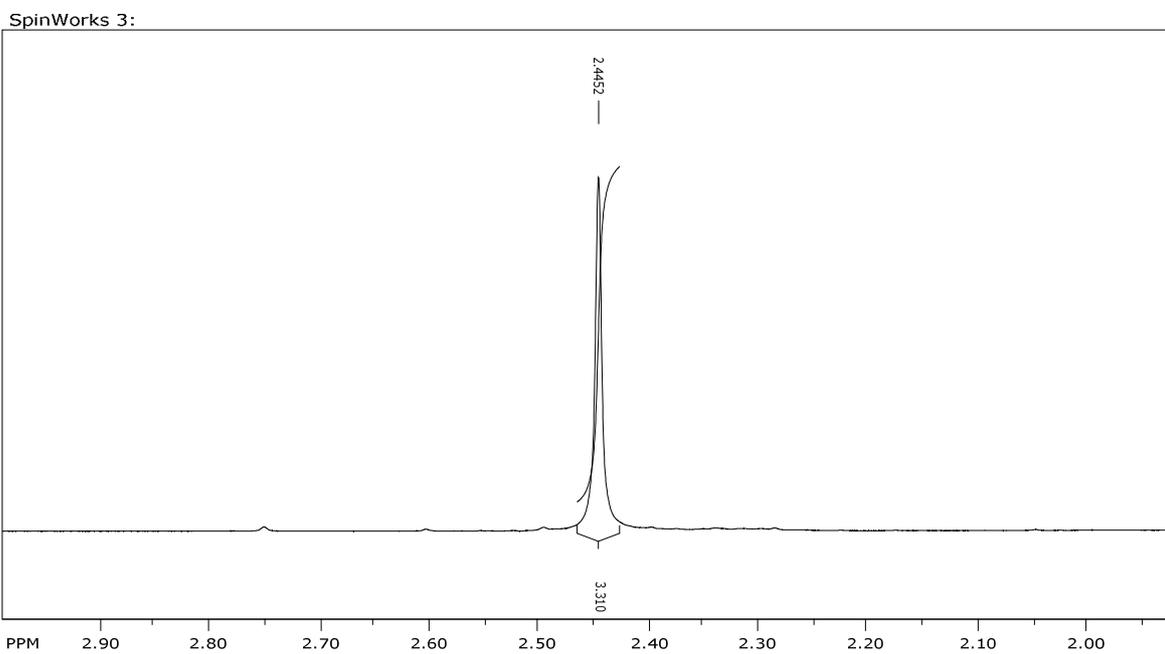


FIGURA 4.16 - Ampliação do sinal referente à metila ligada a sistema aromático de **8**.

A partir da análise em CG/EM, observou-se no espectro de massas a presença de um pico do íon molecular em m/z 254 (compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_4$), sendo este também o pico base (FIGURA 4.17).

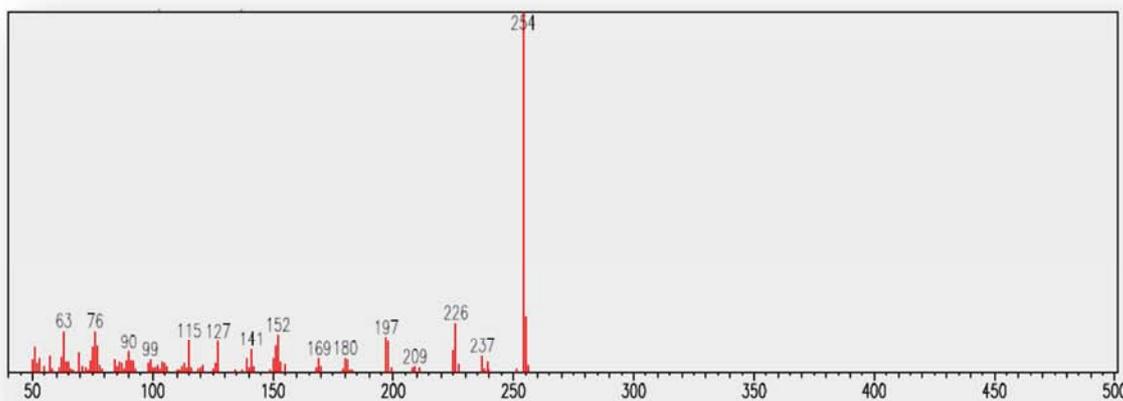


FIGURA 4.17 - Espectro de massas do crisofanol.

Com base no espectro obtido, bem como os dados de RMN 1H e comparação com a literatura (RODRIGUEZ-GAMBOA, 2001), foi confirmada a estrutura do crisofanol. Os dados de deslocamentos químicos e da literatura são apresentados na TABELA 4.2.

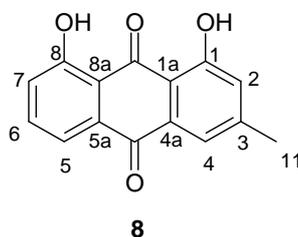


TABELA 4.2 - Dados de deslocamentos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do crisofanol (**8**) e comparação com a literatura

C	δ_{H}	δ_{H} Lit. ^a (J)
2	7,06 <i>sl</i>	7,10 <i>dq</i> (1,6; 0,8 Hz)
4	7,60 <i>sl</i>	7,66 <i>dl</i> (1,6 Hz)
5	7,78 <i>d</i> (7,8 Hz)	7,82 <i>dd</i> (7,6; 1,3 Hz)
6	7,64 <i>t</i> (7,8 Hz)	7,67 <i>tl</i> (7,6 Hz)
7	7,26 <i>d</i> (7,8 Hz)	7,28 <i>dd</i> (8,3; 1,3 Hz)
11	2,44 <i>s</i>	2,47 <i>t</i> (0,8 Hz)
1-OH	11,96 ^b	12,02 ^b <i>s</i>
8-OH	12,07 ^b	12,13 ^b <i>s</i>

^aRODRIGUEZ-GAMBOA, 2001. ^bSinais podem estar trocados.

4.1.2.2 – 8-O-metilcrisofanol (**9**)

A substância (**9**) foi isolada da fração H+D/01/02/11/01 proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato H+D das raízes de *P. bahiensis*. A fração de partida (H+D/01) apresentou atividade inseticida frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, porém não foi possível realizar o ensaio do composto isolado pela pouca quantidade. Vale ressaltar que, apesar desse composto já possuir sua descrição na literatura, este somente foi relatado em espécies de *Cassia* (Leguminosae) e em duas espécies de *Rheum* (Polygonaceae), sem relatos do isolamento em espécies de *Picramnia*.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), mostrou um único singlete em δ_{H} 12,93, integrando para 1 hidrogênio, mostrando que este composto possuía somente a presença de uma única hidroxila quelada, tendo como outro substituinte não mais uma segunda hidroxila, na outra posição β à carbonila (FIGURA 4.18), diferentemente do composto isolado anteriormente, como é mostrado na ampliação do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.19).

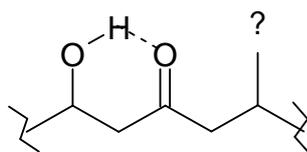


FIGURA 4.18 - Proposta para o único sinal em δ_H 12,93 (pode ter posição trocada).

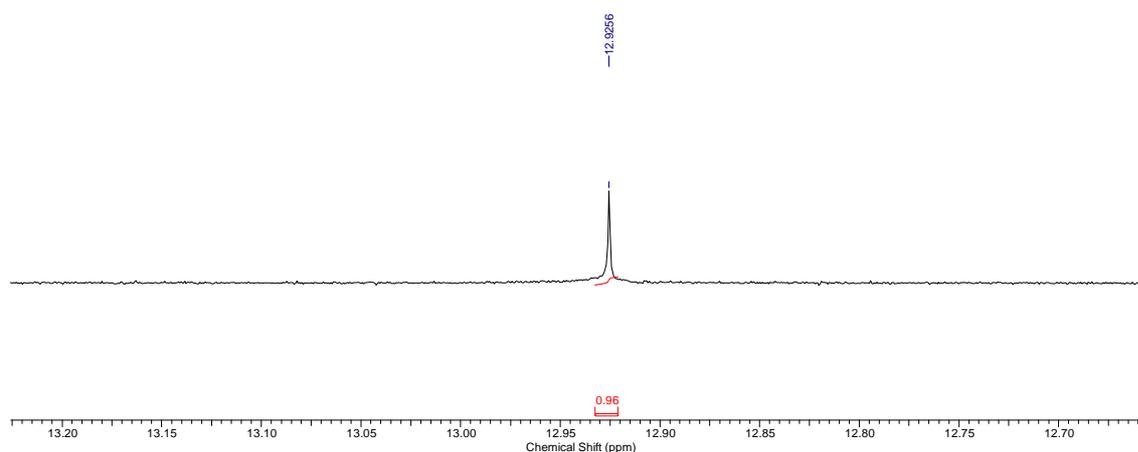


FIGURA 4.19 - Ampliação dos sinais de RMN¹H referentes à hidroxila quelada de **9**.

No espectro de RMN de ¹H são vistos ainda sinais na região de sinais de hidrogênios ligados a anéis aromáticos em δ_H 7,97 (*dd*, $J = 1,2$ e $8,0$ Hz, 1H), δ_H 7,74 (*tl*, $J = 8,0$ Hz, 1H), δ_H 7,60 (*ddist*, $J = 0,8$ Hz, 1H), δ_H 7,36 (*dd*, $J = 1,2$ e $8,0$ Hz, 1H), δ_H 7,10 (*q*, $J = 0,8$ Hz, 1H), sendo que a partir das multiplicidades dos sinais dos hidrogênios ligados à anéis aromáticos, nota-se uma similaridade no padrão de substituição ao do crisofanol (com alguns sinais desblindados), como mostrado na FIGURA 4.20.

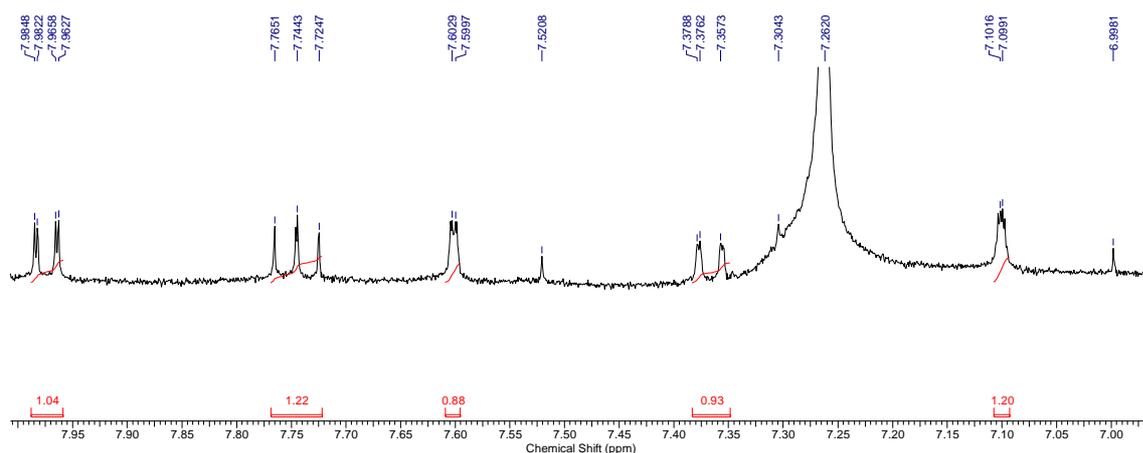


FIGURA 4.20 - Ampliação dos sinais de RMN¹H na região de aromáticos de **9**.

O espectro de RMN de ¹H tem também a presença de um sinal em δ_H 4,08 (s, 3H) (FIGURA 4.21), este característico de uma metoxila altamente desblindada e, aliado ao fato de que há somente a presença de uma única hidroxila quelada, existe a possibilidade que o mesmo seja o outro substituinte na posição β à carbonila no esqueleto antraquinônico. Outro sinal é visto em δ_H 2,45 (s, 3H) referente aos hidrogênios da metila ligada ao sistema aromático.

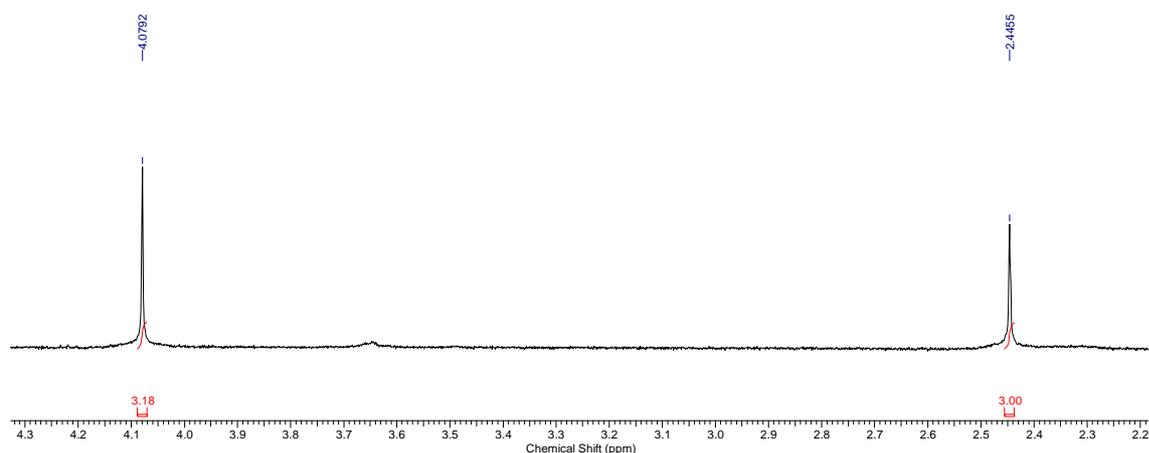


FIGURA 4.21 - Ampliação do espectro de RMN de ¹H relativo aos sinais referentes à metoxila e metila de **9**.

Assumindo que as multiplicidades dos sinais vistos na região referente aos hidrogênios ligados a anéis aromáticos possuem o mesmo padrão de

substituição do composto crisofanol, exceto pelos seus valores de deslocamentos químicos, aliado a presença de um único sinal característico a hidrogênio quelado e de uma metoxila, há agora o aparecimento de duas possibilidades de localização em relação ao posicionamento do substituinte metoxila e hidroxila, juntamente com comparação aos deslocamentos químicos de **8**, como mostrado abaixo (FIGURA 4.22).

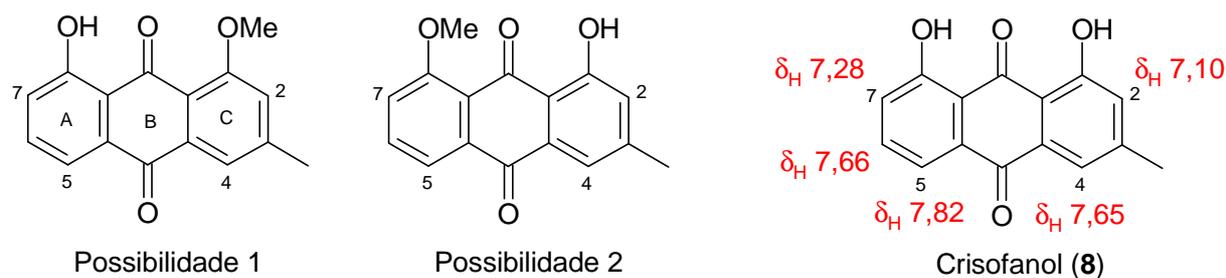


FIGURA 4.22 – Existência de duas possibilidades no posicionamento da metoxila ao anel.

Para o posicionamento dos substituintes metoxila e hidroxila nas posições 1 e 8, ao analisar-se os sinais comparados com o de **8**, na FIGURA 4.22, com os observados, mostram que o anel A tem seus sinais de RMN sofrendo mudança nos valores de deslocamentos químicos, sendo que os do anel C não sofreram quaisquer mudanças. Analisando que os deslocamentos químicos nas posições C-5, C-6 e C-7 deslocaram todos para uma região mais desblindada, propõe-se que a metoxila ocupe a posição em C-8. Assim, estes dados permitiram a confirmação do isolamento do composto 1-hidróxi-8-metóxi-3-metilantraquinona ou 8-O-metilcrisofanol (**9**), juntamente com comparação na literatura (TIETZE et al., 2007). Os dados de deslocamento químico e da literatura são mostrados na TABELA 4.3.

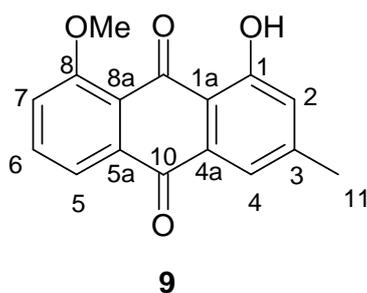


TABELA 4.3 - Dados de deslocamentos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) do 8-O-metilcrisofanol (**9**) e comparação com a literatura

C	δ_{H} (J)	δ_{H} Lit. (J)
2	7,10 <i>q</i> (0,8 Hz)	7,06 <i>d</i> (0,6 Hz)
4	7,60 <i>ddist</i> (0,8 Hz)	7,55 <i>d</i> (1,1 Hz)
5	7,97 <i>dd</i> (8,0; 1,2 Hz)	7,92 <i>dd</i> (7,5; 0,8 Hz)
6	7,74 <i>tl</i> (8,0 Hz)	7,71 <i>t</i> (8,4 Hz)
7	7,36 <i>dd</i> (8,0; 1,2 Hz)	7,33 <i>dd</i> (8,4; 0,6 Hz)
11	2,45 <i>s</i>	2,43 <i>s</i>
1-OH	12,93 <i>s</i>	12,90 <i>s</i>
8-OMe	4,08 <i>s</i>	4,06 <i>s</i>

4.1.2.3 – *Biantrona do crisofanol (10)*

A substância **10** foi isolada da fração H+D/02/03/02/01/04/02/03 proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato H+D das raízes de *P. bahiensis*. Como mencionado no composto anterior, a fração de origem apresentou atividade inseticida, porém, como foi isolado em pequena quantidade, para este também não foi possível avaliar a atividade.

No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) foram observados a presença de sinais de deslocamentos químicos referentes à 4 hidrogênios quelados, hidrogênios ligados a anéis aromáticos, hidrogênios de metila ligada a sistema aromático e um sinal em δ_{H} 4,49, como mostra a FIGURA 4.23.

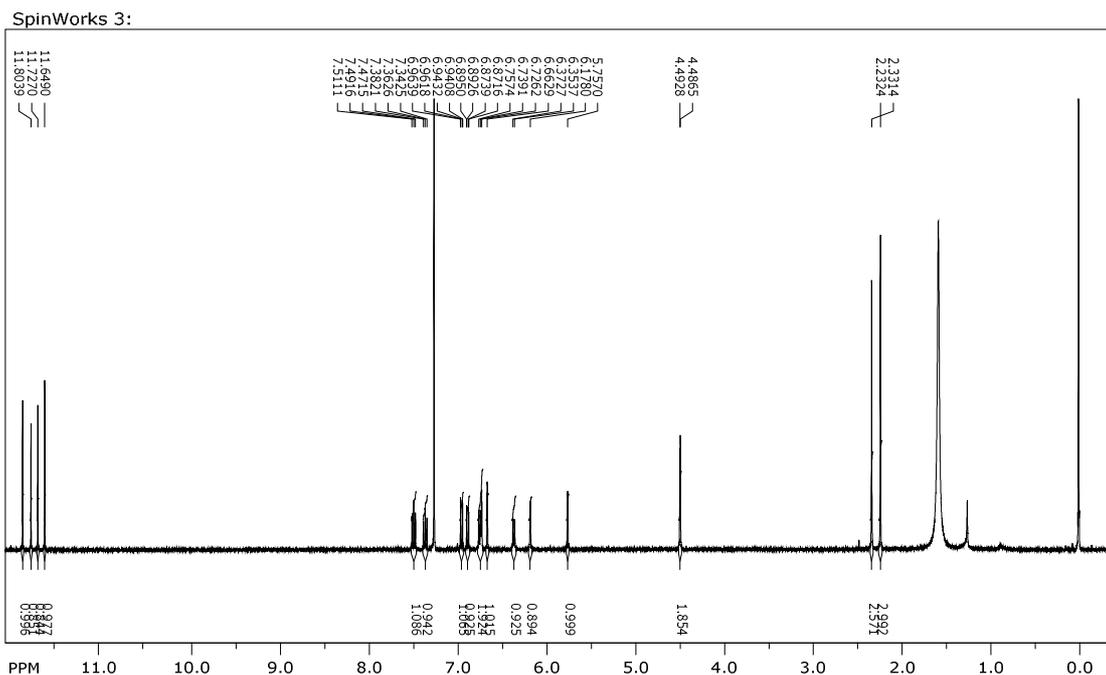


FIGURA 4.23 – Espectro de RMN de ^1H da substância **10**.

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H observou-se para os hidrogênios ligados aos sistemas aromáticos as seguintes multiplicidades: tripleto largo, dois duplo-dubletos e dois singletos, sendo que estes estão aos pares (Figura 4.24). Uma possível atribuição para essas multiplicidades pode ser para um núcleo crisofanol-9-antrona (FIGURA 4.25).

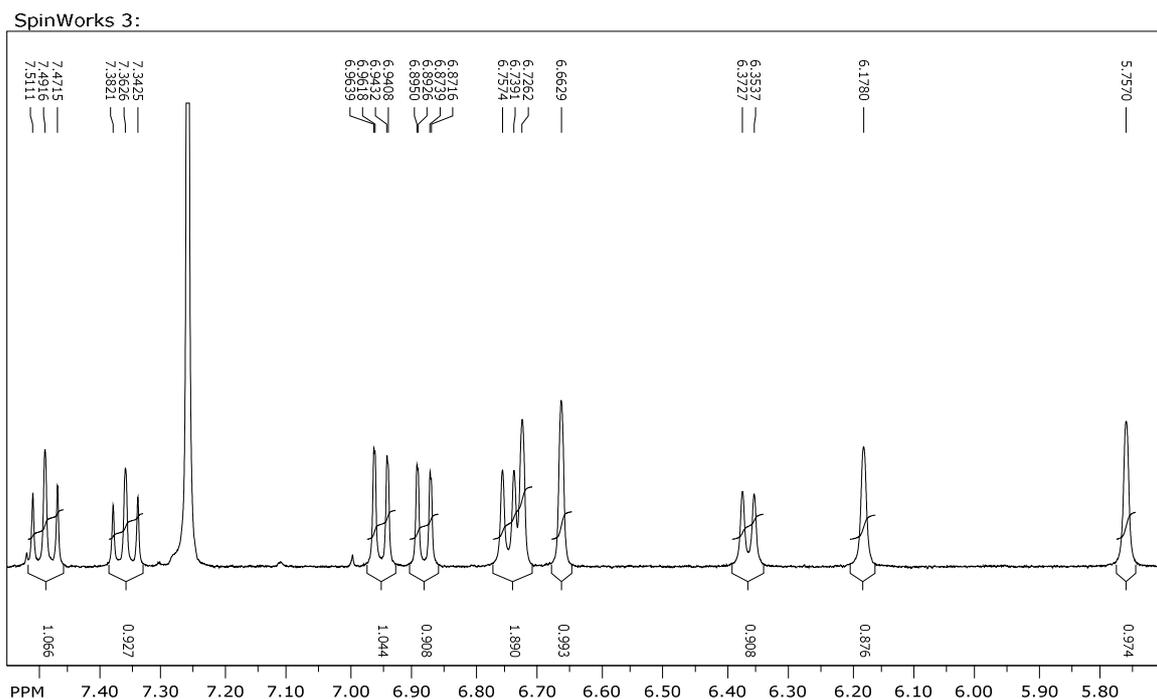


FIGURA 4.24 – Ampliação do espectro de RMN ^1H na região aromática da substância **10**.

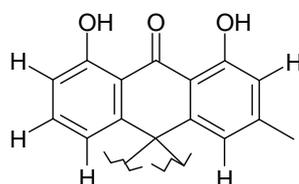


FIGURA 4.25 – Estrutura representativa do núcleo crisofanol-9-antrona.

Ainda no espectro de RMN de ^1H , com ampliações nas outras regiões, mostrou a possibilidade da presença de uma mistura que seria atribuída pela presença de pares de sinais de deslocamento químicos na região desblindada (FIGURA 4.26) e na região blindada, referente às metilas ligadas aos sistemas aromáticas (FIGURA 4.27).

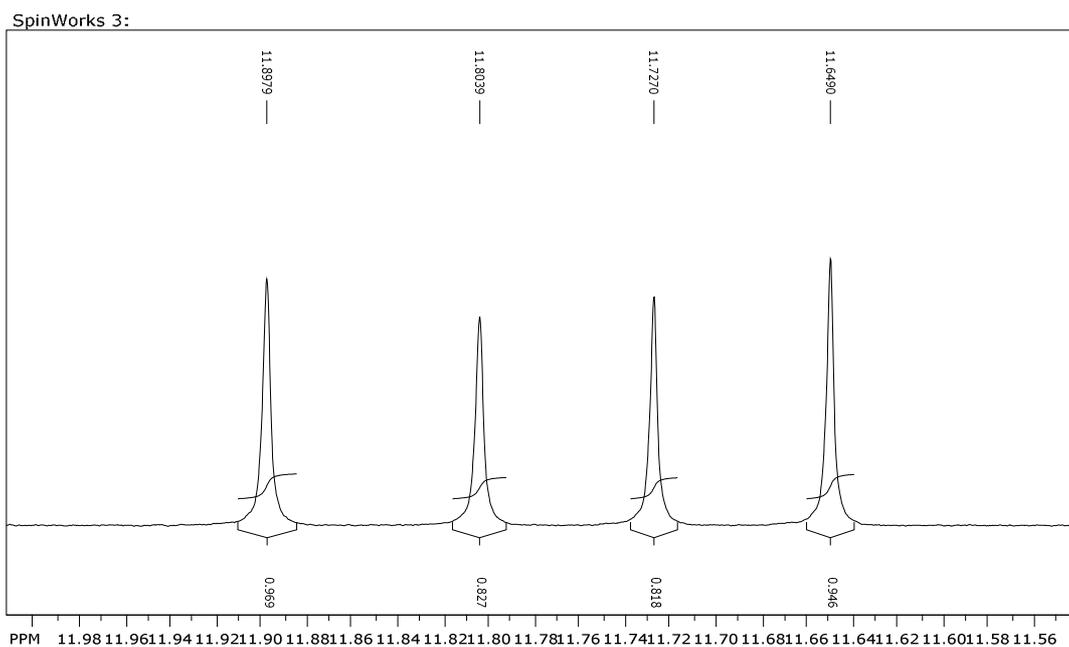


FIGURA 4.26 – Ampliação da região desblindada do espectro de RMN de ^1H de **10**.

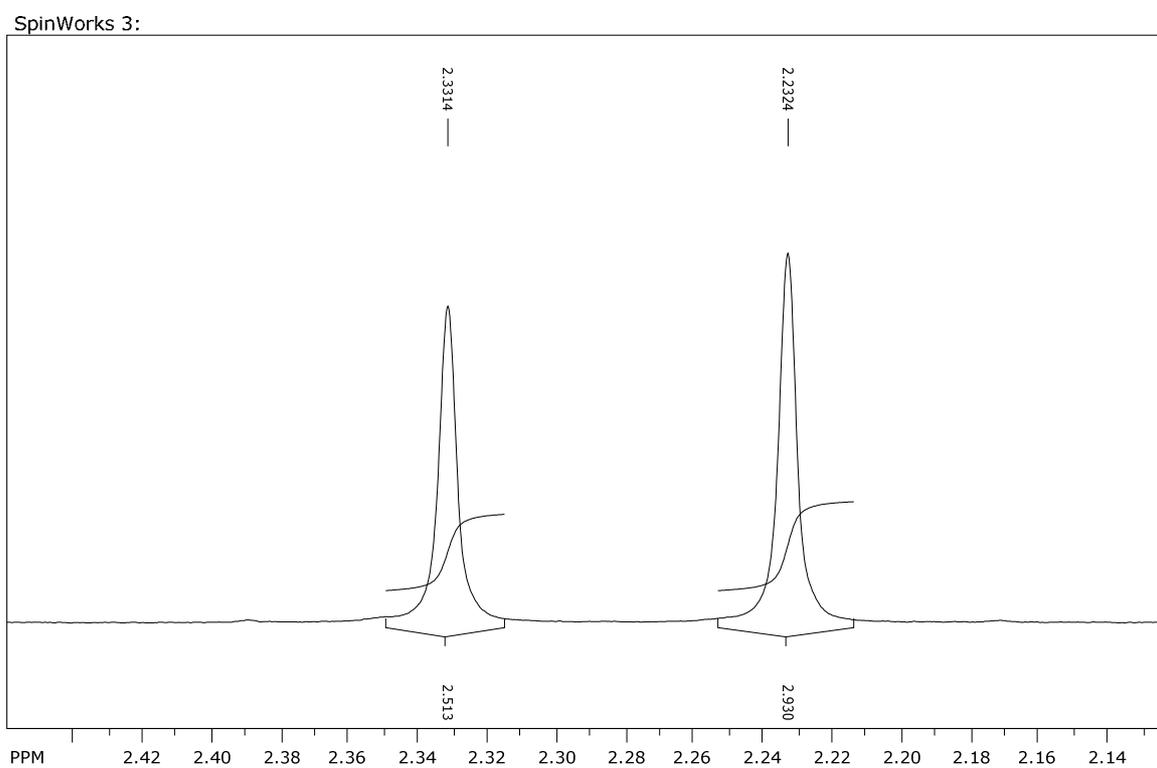


FIGURA 4.27 – Ampliação da região blindada do espectro de RMN de ^1H de **10**.

A partir dos espectros mostrados acima, foi confirmada a presença do núcleo já citado, crisofanol-9-antrona, porém a presença do sinal em δ_H 4,49 (FIGURA 4.28), fez com que houvesse uma possibilidade de atribuição deste sinal para os hidrogênios ligados a C-10, tornando-o agora um carbono metilênico (antronas) ou metínico (oxantronas) e não mais um carbono carbonílico, ao qual caracteriza a classe das antraquinonas (FIGURA 4.29).

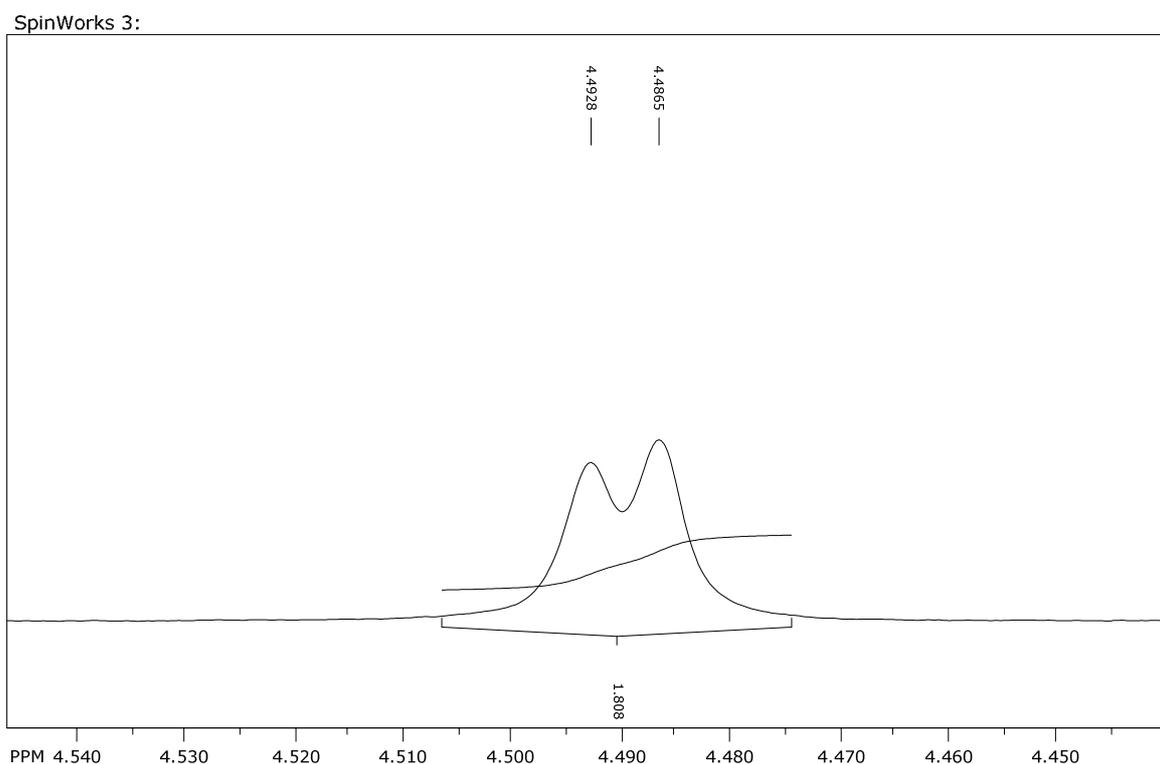


FIGURA 4.28 – Ampliação do sinal em δ_H 4,49 do espectro de RMN de 1H de **10**.

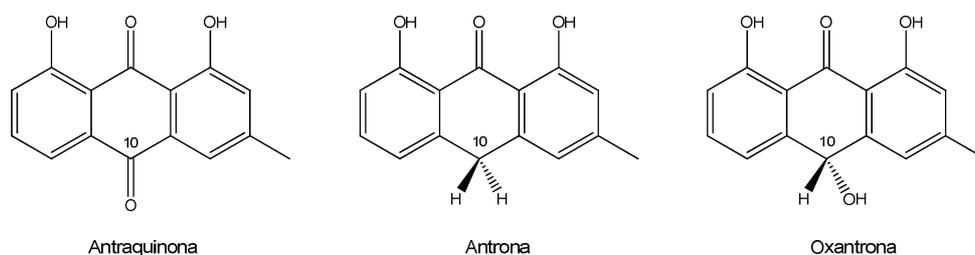


FIGURA 4.29 – Possibilidades das classes químicas em relação à substituição em C-10.

Porém, já que este sinal não se duplicou em nenhum momento, diferentemente dos demais sinais. A única possibilidade é de este ser referente a dois hidrogênios ligados a C-10 por se tratar da existência de duas moléculas e conseqüentemente da integração do mesmo para dois hidrogênios, faltando assim outro substituinte no mesmo carbono. Assim, esta substância foi tratada como sendo uma biantrona onde que foi considerada a multiplicidade do sinal em δ_H 4,49 como sendo dois singletos já que em nenhum momento, visto no espectro, há um acoplamento com este sinal. A confirmação da estrutura se deu através somente da comparação com a literatura (MAI et al., 2001; SANTOS et al., 2008) pois não foi possível a aquisição dos espectros 2D, já que a mesma foi perdida no momento da secagem em capela.

A atribuição dos sinais, principalmente com base nas referências supracitadas, foi muito duvidosa, pois SANTOS et al (2008) indicou apenas a presença de um singletto em δ_H 4,49 referente à H-10 e H-10' sem a determinação da estereoquímica e MAI et al. (2001) mostrou a presença de dois isômeros (*cis* e *trans*), porém a atribuição dos sinais foi dada como sendo a mesma para as duas moléculas diastereoisoméricas. Ao analisar detalhadamente o espectro de RMN de 1H mostrados até aqui, quando houve a ampliação dos pares de sinais, a integração dos mesmos não se manteve constante, ou seja, em relação a um sinal ao outro houve uma variação neste valor, sempre um maior em relação ao outro. Este fato pode implicar na presença de duas moléculas isoméricas, sendo que cada uma possui os deslocamentos químicos diferentes ou mesmo a presença somente de uma molécula na qual pela rotação livre entre C-10 e C-10' forneça duas conformações. A FIGURA 4.30 mostra as duas possibilidades dos isômeros.

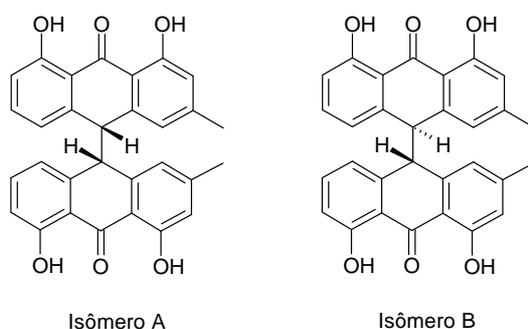


FIGURA 4.30 – Duas possibilidades diastereoisoméricas para **10**.

Sendo assim, através das informações e discussões supracitadas, diferentemente das atribuições feitas nas referências aqui utilizadas, foram atribuídos os sinais supondo a existência de dois isômeros, como mostrado na figura acima, porém estudos mais aprofundados ainda estão sendo realizado, tal como experimento de dupla irradiação e com baixa temperatura, assim neste presente momento foram somente atribuídos os sinais sendo que os mesmos possam estar trocados. A atribuição foi feita com base no conhecimento de que compostos de configuração *trans* são mais estáveis em relação ao *cis*, assim sendo os sinais com o maior valor de integração foram atribuídos para o isômero B. Através da análise por espectrometria de massas utilizando parte da quantidade restante da fração contendo **10**, foi possível confirmar a massa de m/z 477 ao analisar em modo *full scan* operando com ionização negativa (ESI⁻-MS), como mostrado na FIGURA 4.31.

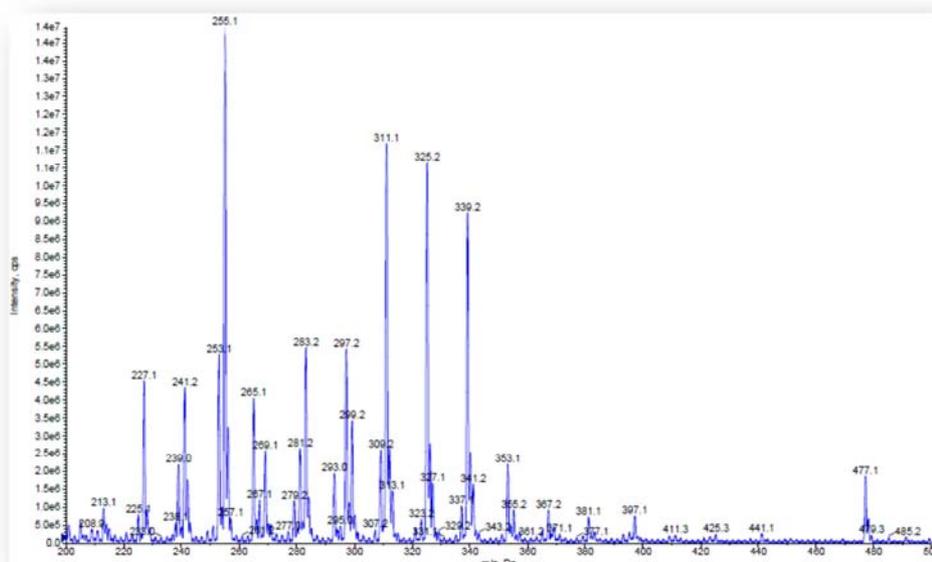
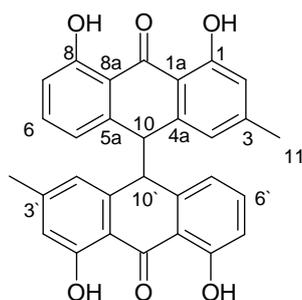


FIGURA 4.31 – Análise no modo *full scan* do composto **10**.

Este composto, apesar de estar descrito na literatura, foi inédito no gênero *Picramnia*. Os dados de deslocamento químico da substância **10** e da literatura (SANTOS et al., 2008 e MAI et al., 2001) são mostrados na TABELA 4.4.



10

Tabela 4.4 - Dados de deslocamentos de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) da biantrona do crisofanol (**10**) e comparação com a literatura

	Isômero A	Isômero B	Não Definido	Mistura de A e B
C	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)	δ_{H} Lit. ¹ (J)	δ_{H} Lit. ² (J)
2	6,73 s	6,66 s	6,73 <i>sl</i>	6,68 <i>d</i> (1,0 Hz)
4	6,18 s	5,76 s	6,18 <i>sl</i>	6,00 <i>d</i> (1,0 Hz)
5	6,36 <i>d</i> (7,6 Hz)	6,75 <i>d</i> (7,3 Hz)	6,75 <i>d</i> (7,9 Hz)	6,68 <i>dd</i> (8,0; 1,0 Hz)
6	7,36 <i>t</i> (7,9 Hz)	7,49 <i>t</i> (7,9 Hz)	7,49 <i>t</i> (7,9 Hz)	7,41 <i>t</i> (8,0 Hz)
7	6,88 <i>dd</i> (8,4; 0,9 Hz)	6,95 <i>dd</i> (8,4; 0,9 Hz)	6,95 <i>d</i> (7,9 Hz)	6,89 <i>dd</i> (8,0; 1,0 Hz)
10	4,49 s	4,48 s	4,49 s	4,49 s
11	2,33 s	2,23 s	2,37 s	2,25 s
1-OH	11,73 s	11,65 s	11,72 s	11,63 s
8-OH	11,90 s	11,90 s	11,90 s	11,85 s
2'	6,73 s	6,66 s	6,67 <i>sl</i>	6,60 <i>d</i> (1,0 Hz)
4'	6,18 s	5,76 s	5,76 <i>sl</i>	5,70 <i>d</i> (1,0 Hz)
5'	6,36 <i>d</i> (7,6 Hz)	6,75 <i>d</i> (7,3 Hz)	6,36 <i>d</i> (8,0 Hz)	6,29 <i>dd</i> (8,0; 1,0 Hz)
6'	7,36 <i>t</i> (7,9 Hz)	7,49 <i>t</i> (7,9 Hz)	7,36 <i>t</i> (8,0 Hz)	7,29 <i>t</i> (8,0 Hz)
7'	6,88 <i>dd</i> (8,4; 0,9 Hz)	6,95 <i>dd</i> (8,4; 0,9 Hz)	6,88 <i>d</i> (8,0 Hz)	6,81 <i>dd</i> (8,0; 1,0 Hz)
10'	4,49 s	4,48 s	4,49 s	4,51 s
11'	2,33 s	2,23 s	2,24 s	2,15 s
1'-OH	11,73 s	11,65 s	11,65 s	11,58 s
8'-OH	11,90 s	11,90 s	11,80 s	11,75 s

* Todos foram obtidos em CDCl_3 ; ¹: SANTOS et al., 2008 e ²: MAI et al., 2001.

4.1.2.4 – Substâncias com esqueleto antraquinônico identificadas via HPLC/ESI-MS/MS

Como foi mencionado no item **3.5**, foram realizadas algumas análises qualitativas em HPLC/ESI-MS/MS, utilizando um Espectrômetro de Massas sob Plataforma API 2000 (*Applied Biosystems*) com algumas frações e subfrações na qual possibilitou a identificação de alguns compostos descritos adiante. Com este enfoque de trabalho, foram escolhidas algumas frações e subfrações de *P. bahiensis* que possuíam alguns sinais de deslocamentos químicos relativos a esqueletos de antrons e seus derivados no espectro de RMN de ^1H os quais, por análise mais detalhada, se mostraram muito similares aos compostos isolados por RODRIGUEZ-GAMBOA (2001). A partir dessas informações, juntamente com alguns artigos selecionados (ACKACHA et al., 2003; JIN et al., 2007; SONG et al., 2009), foi iniciado o trabalho de identificação simultânea destes compostos.

Inicialmente, baseado nos artigos tomados como base, foi proposto a análise utilizando as condições descritos nos mesmos, onde a análise se dava através do modo negativo com a utilização de ácido fórmico e acético como aditivos na fase aquosa. Este fato, a princípio, pode parecer contraditório o uso de pH baixo em análise no modo negativo, porém trabalhos como KELLY et al. (1992), onde os estudos a partir de observações similares foram também descritos. Porém, ao analisar algumas corridas simultâneas de mesma origem mostrou uma variação na ionização, ou seja, em determinadas bandas, aleatoriamente, a intensidade do sinal estava mostrando uma grande variação. Ou seja, em determinada análise o mesmo composto ionizava fortemente e em outras, fracamente. Desta forma, uma possível explicação foi devido a algum tipo de supressão de íons ocasionado pela adição do ácido, podendo haver uma competição entre os íons gerados já que ao analisar no modo negativo, há a necessidade da presença do ânion hidroxila para atuar na retirada de um próton do analito, porém a presença do ácido inibe esta reação. Juntamente, outra possibilidade se dá pela neutralização deste ânion necessário pelo ácido, pois ao analisar este fato por uma reação redox, tanto a água e o metanol presente na fase móvel podem reduzir na geração deste ânion (modo negativo). Assim, para a continuidade do trabalho, foi substituído o aditivo presente na fase aquosa pelo acetato de amônio mantendo o modo de ionização negativo (DERKSEN et al., 2002). Para tanto, foram testadas duas concentrações, 10 e 20

mM, onde a última concentração foi escolhida pelo melhor poder de ionização, comparando as análises realizadas em duplicatas com as duas concentrações utilizando a mesma amostra. Operando no modo de ionização negativo, foi realizado a otimização dos parâmetros como descrito no item **3.5.3**. Para tanto, foi infundido o composto crisofanol à 10 µg/ml (infusão direta) e 100 µg/ml (análise por injeção em fluxo) em MeOH grau MS utilizando o modo *Q1 Multiple Ion*, onde foi selecionado o íon de m/z 253 em 150 msec mantendo a duração da análise por 10 minutos para o ajuste dos parâmetros da fonte/gás (não dependentes do composto). Como estes parâmetros não são ajustáveis através do programa, tal como uma varredura em um intervalo de trabalho e a verificação do melhor valor com a maior intensidade, no intervalo de tempo programado de duração do experimento, foi variado cada parâmetro e avaliou-se o comportamento desta variação em relação à intensidade do íon selecionado, levando em conta o aumento ou a diminuição, dentro da faixa limite de trabalho sugerido pelo manual do equipamento. Vale ressaltar que para a avaliação da temperatura foi realizado a análise por injeção em fluxo com duração da análise por 1,3 minutos. Para os parâmetros dependentes do composto, nas análises MS e MS/MS, foram realizadas as otimizações, na maioria dos casos, através de um ajuste semi-automático das energias através da realização de “rampas”, ou seja, no próprio *software* existe a possibilidade da escolha da opção onde um intervalo definido de trabalho, há uma varredura em um incremento definido pelo operador e se avalia, através de um gráfico, cada valor de energia versus sua intensidade. Assim, todos os parâmetros avaliados e otimizados se encontram na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 - Parâmetros dependente da fonte, gás e do composto avaliados e otimizados

Partes do equipamento	Parâmetros	Faixa de trabalho	Incremento	Valor otimizado
Fonte	Posição da agulha (horizontal)	0 a 10 mm	1	4 mm
	Posição da agulha (vertical)	2 a 10 mm	1	5 mm
	<i>IS</i>	-2000 a -4500 V	500	-4500 V
	<i>TEM</i>	200 a 450 °C	50	400 °C
Gás	<i>CUR</i>	10 a 50 psi	5	40 psi
	<i>GS1</i>	10 a 50 psi	5	50 psi
	<i>GS2</i>	10 a 50 psi	5	45 psi
Espectrômetro	<i>DP</i>	-200 a 0 V	1	-58 V
	<i>FP</i>	-400 a -50 V	1	-380 V
	<i>EP</i>	-12 a -1 V	1	-10 V
	<i>CEP</i>	-188 a 0 V	1	-16 V
	<i>CAD</i>	2 a 8 V	1	4 V
	<i>CE</i>	-130 a -5 V	1	-52 V
	<i>CXP</i>	-58 a 0 V	1	-4 V

A partir desta etapa de otimização obteve-se a maior abundância dos íons, $[M-H]^+$ no modo *full scan* para o padrão utilizado (FIGURA 4.32), juntamente com o cromatograma obtido no modo *product ion* (FIGURA 4.33), foi verificado, a partir da proposta de fragmentação, um padrão da mesma para os compostos com esqueleto atraquinônico.

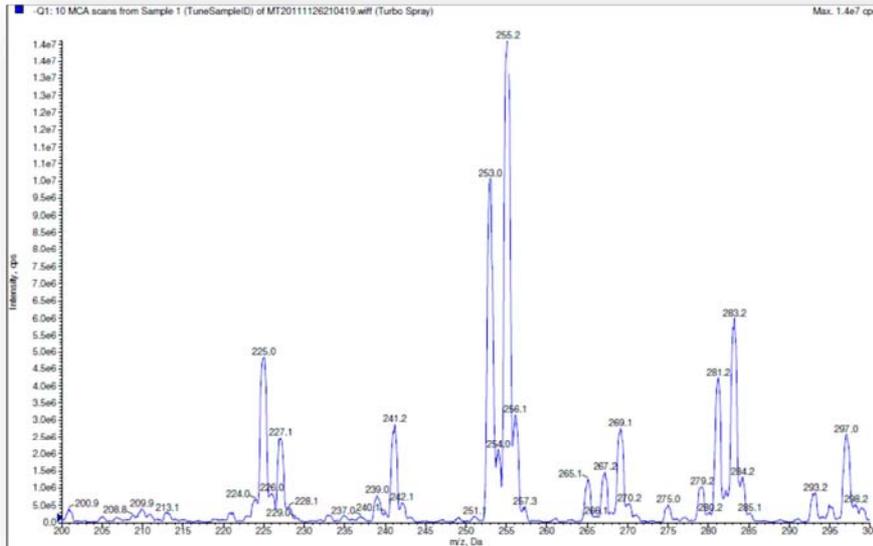


FIGURA 4.32 – Espectro de massas no modo *full scan* para o padrão usado com m/z 254.

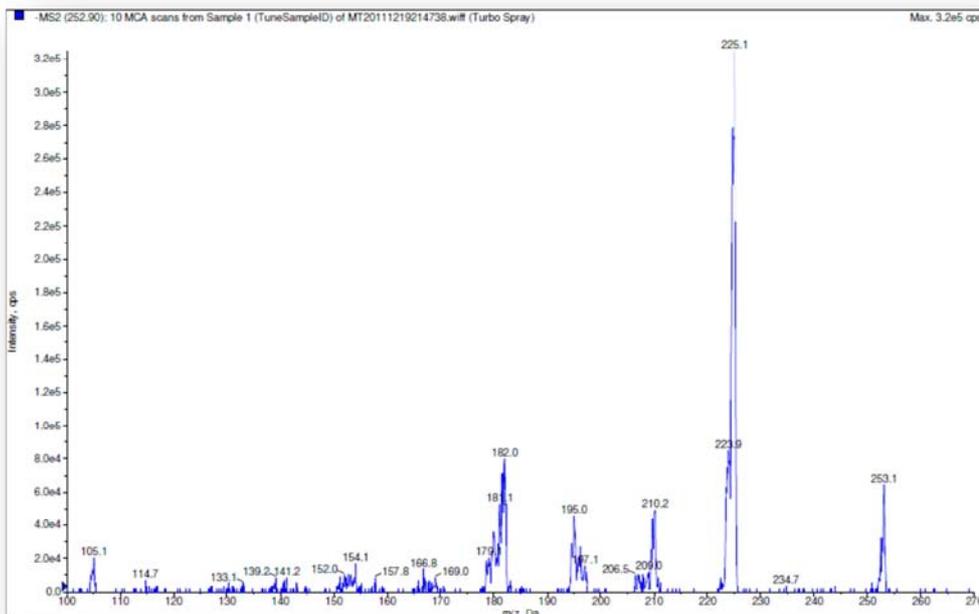
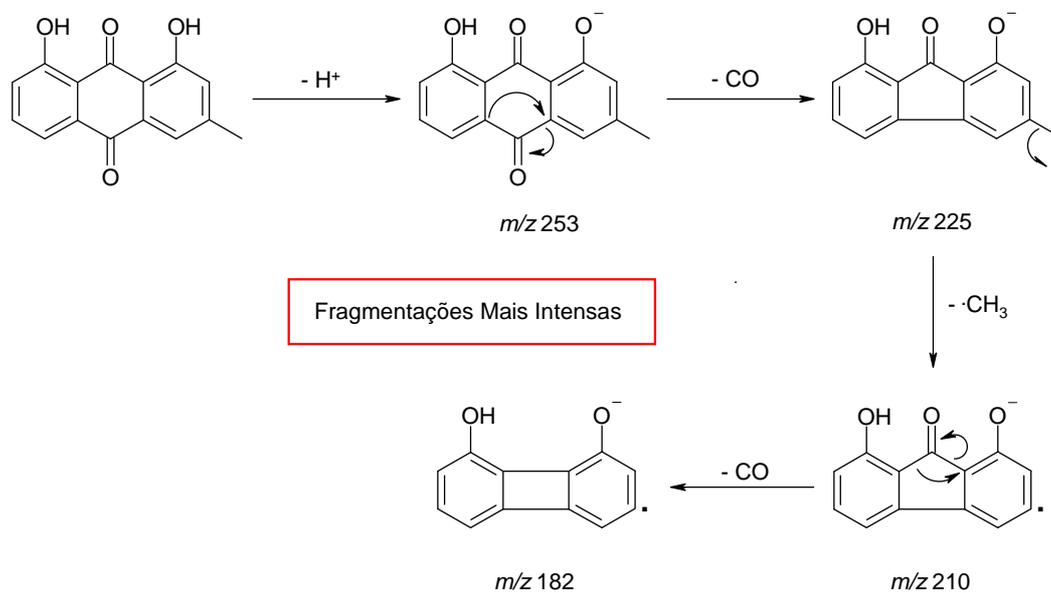


FIGURA 4.33 – Espectro de massas no modo *product ion* para o padrão usado com m/z 253.

A partir destes cromatogramas, aliado a alguns experimentos no modo *precursor ion*, foram propostas algumas possíveis fragmentações, como mostrado na FIGURA 4.34.



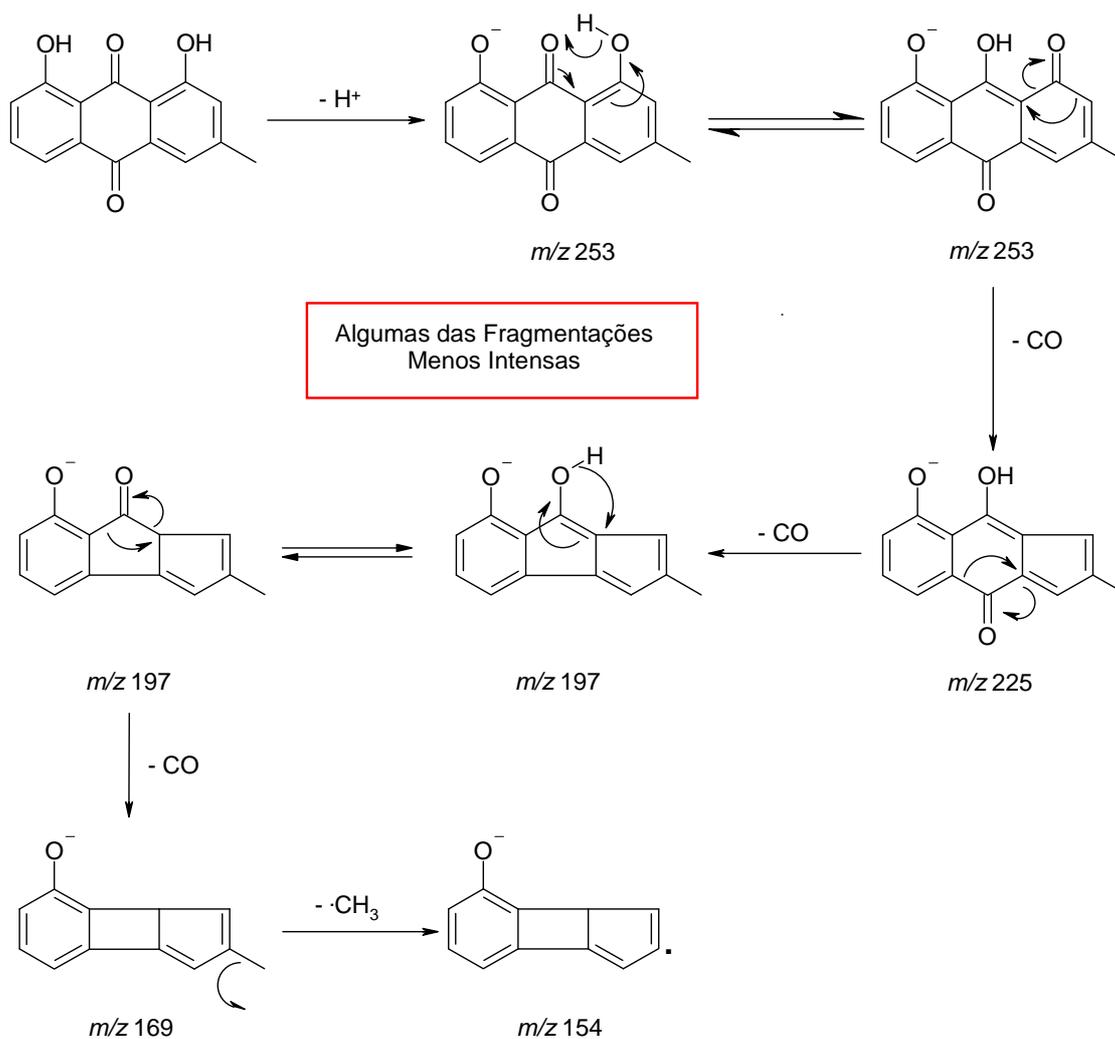


FIGURA 4.34 – Proposta de fragmentação para o composto crisofanol utilizado como padrão.

Com base neste conhecimento em relação ao comportamento nas fragmentações mostradas acima através da proposta, principalmente para os íons mais intensos, este foi o ponto de partida para as análises de cada banda cromatográfica mostrada em cada corrida cromatográfica feita para as frações estudadas, aliada também com o monitoramento dos espectros de U.V. obtidos para as mesmas bandas através do detector de arranjo de diodos.

4.1.2.4.1 – Antronas glico-benzoiladas **11** e **12**

As substâncias diastereoisoméricas **11** e **12** foram isoladas a partir da fração H+D/02/03/02/01/04/02/04 proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato H+D das raízes de *P. bahiensis*. A fração de partida (H+D/02) apresentou atividade inseticida frente às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e não foi submetida ao ensaio biológico devido a pouca quantidade de material. Porém, já que a fração H+D/02 foi a segunda mais ativa dentre as testadas, há um grande indício dos mesmos contribuírem para esta atividade, já que como será discutida abaixo, esta fração foi rica em antronas e oxantronas glicosiladas, sendo estes presentes majoritariamente. Estes compostos nunca foram relatados na literatura, sendo, portanto, ambos inéditos.

Como foi discutido no item **4.1.2.4**, a partir das otimizações descritas, foi realizada uma análise em modo *full scan* da fração aos quais as mesmas estavam presentes, como mostrado na FIGURA 4.35.

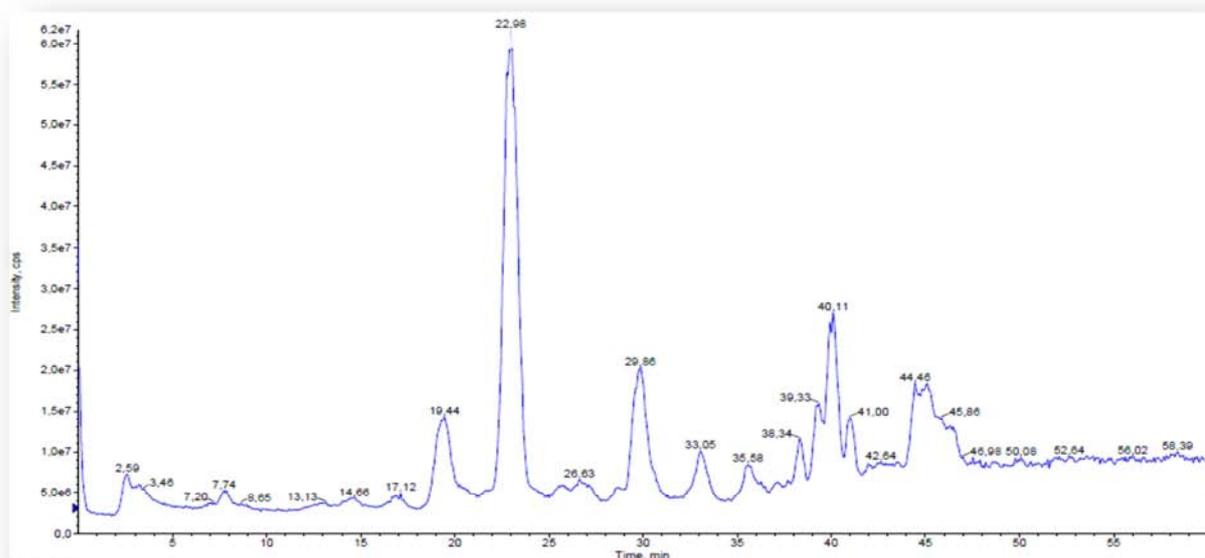


FIGURA 4.35 – Análise em modo *full scan* a partir da fração rica em **11** e **12**.

A partir desta análise do espectro de U.V. (arranjo de diodos), foi verificado que a banda com t_R 22,98 min. mostrava um espectro referente à composto altamente conjugado (FIGURA 4.36).

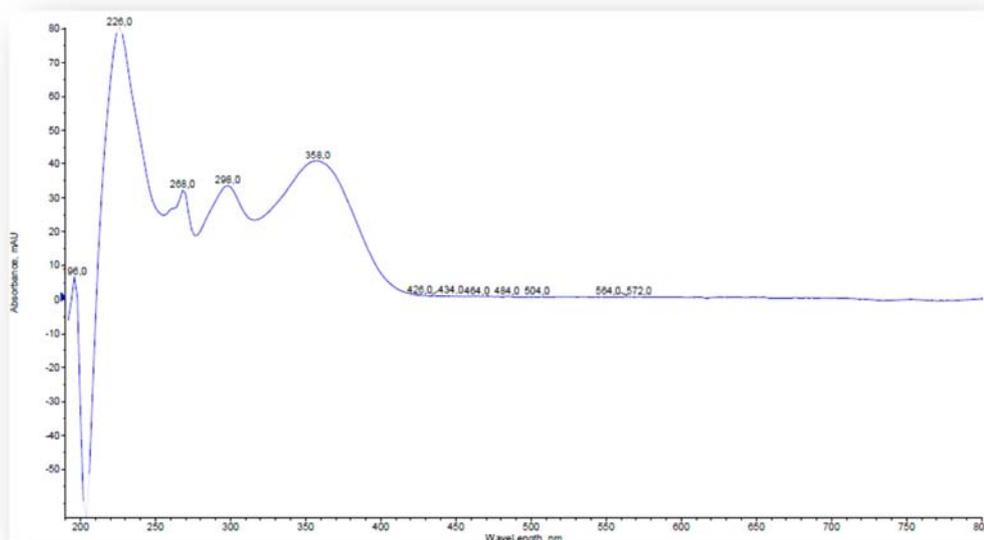


FIGURA 4.36 – Espectro de U.V. referente à banda em t_R 22,98 min.

Ao analisar o espectro de massas gerado a partir da seleção desta banda (FIGURA 4.37), observou-se um íon de m/z 491, juntamente com outros dois íons intensos de m/z 239 e 281, indicam fragmentação do ion pseudo molecular de um composto glicosilado, onde os fragmentos correspondem à aglicona e outro, possivelmente, a uma fragmentação cruzada no açúcar, comportamento característico para esses compostos (RAFAËLLY et al., 2008; ZAIA, 2004).

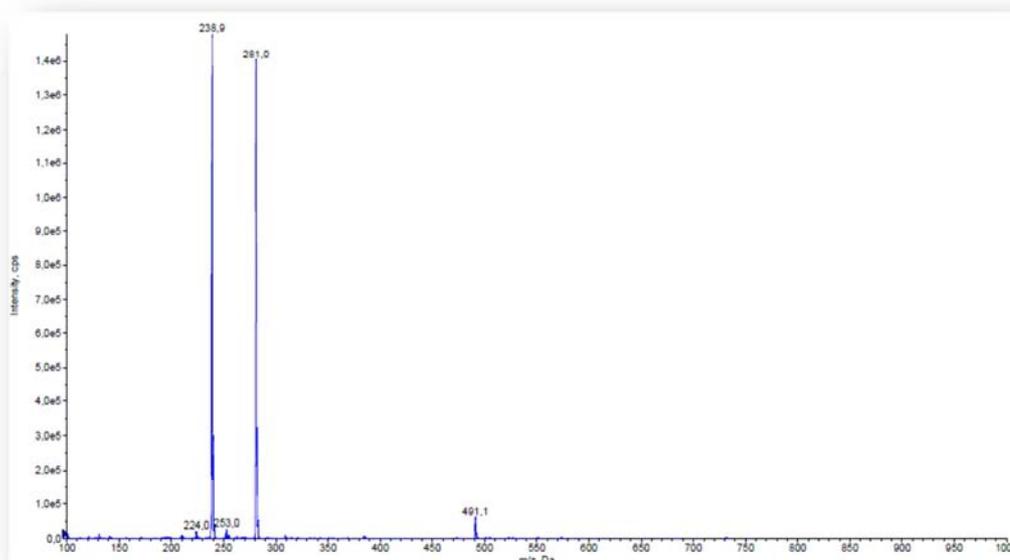


FIGURA 4.37 – Espectro de massas gerado a partir da banda com t_R 22,98 min.

Foram realizados também diversos experimentos, tais como, *neutral loss* (verificar a perda de moléculas neutras, neste caso de CO, característico para um esqueleto antraquinônico), *precursor ion* (confirmar a fragmentação) e *product ion* (confirmar a estrutura através da proposta de fragmentação). Não serão mostrados todos os experimentos realizados, porém, o experimento que está representado pela FIGURA 4.38 foi o ponto principal na confirmação da molécula desprotonada $[M-H]^-$ com m/z 491, já que o experimento obtido no modo “*precursor ion*” forneceu as informações necessárias pela transição entre m/z 491 \rightarrow m/z 281 e, além disso, o aparecimento dos adutos $[M + Cl]^-$ e $[M + \text{unidade de acetato}]^-$, com m/z 527 e 551, respectivamente.

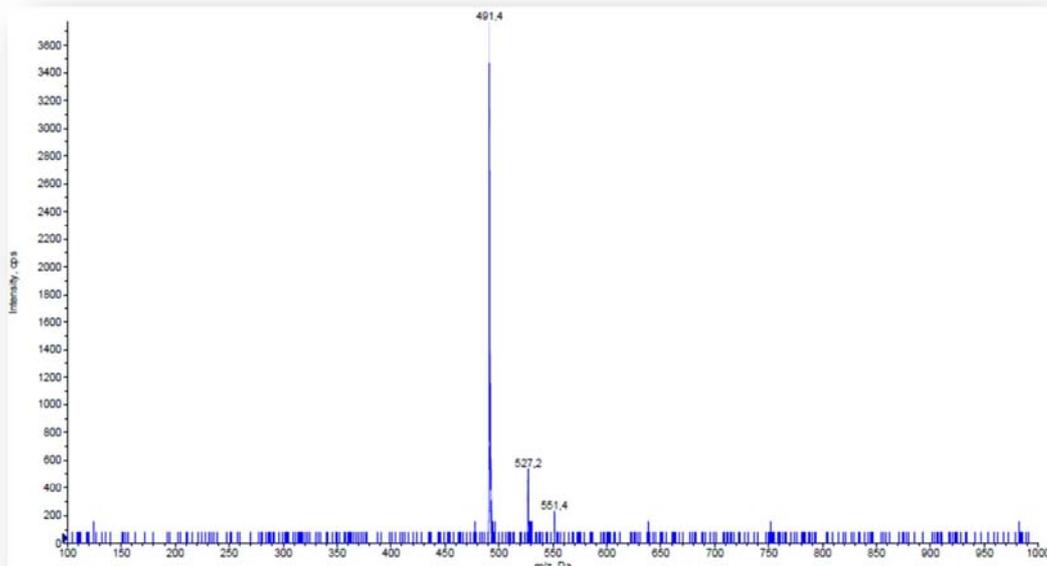


FIGURA 4.38 – Análise no modo *precursor ion* para a transição m/z 491 \rightarrow m/z 281.

Com base nesses dados, foi realizado um levantamento bibliográfico no gênero contendo compostos antraquinônicos glicosilados com a massa de 492 u.m.a., onde a partir do artigo descrito por HERNANDEZ-MEDEL et al. (1998), foi isolado o composto da classe das antrons, especificamente, a substância Uveosídeo. Este fato levou a verificar outras referências (DIAZ et al., 2004; PHIFER et al., 2007), onde foram relatados o isolamento de diastereoisômeros, onde a configuração da unidade de açúcar alterava somente em C-10. Assim, para a verificação da existência de um par de diastereoisômeros foram registrados os espectros de 1 e 2 D de RMN (CDCl_3 , 400 MHz, FIGURA 4.39).

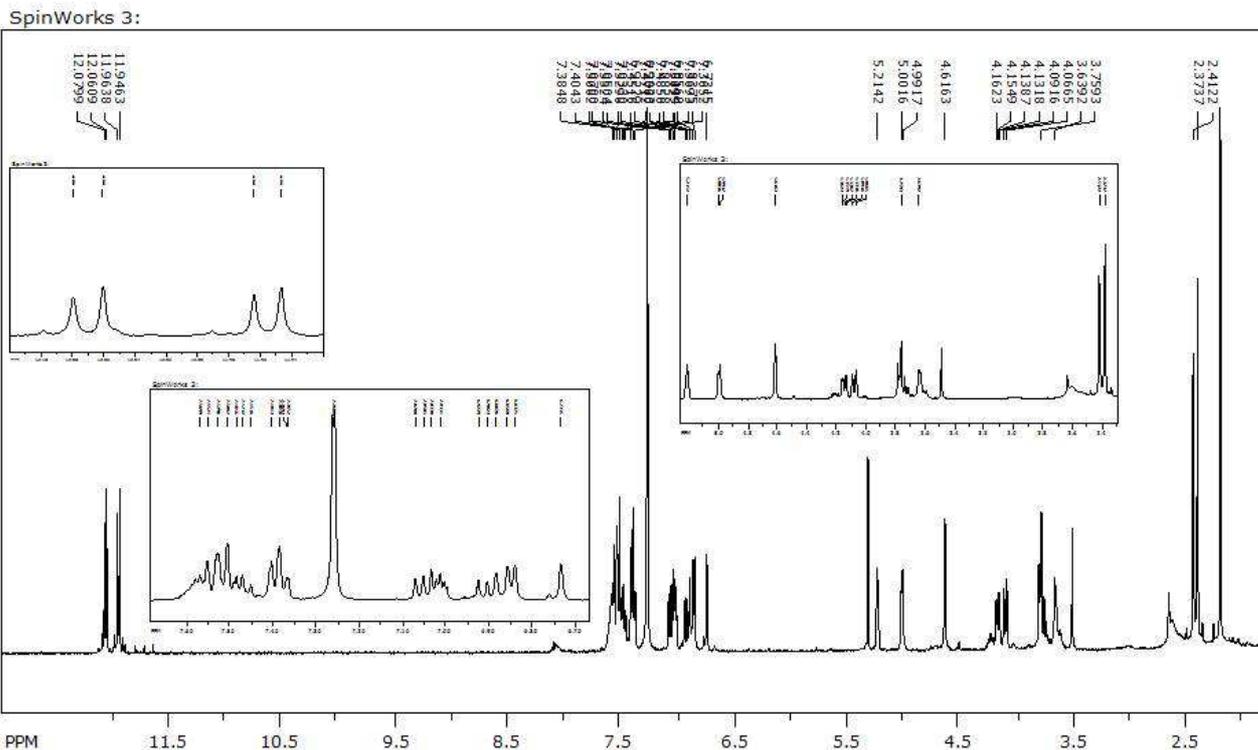


FIGURA 4.39 – Espectro de RMN de ^1H das substâncias **11** e **12**.

A partir da análise detalhada do espectro de RMN de ^1H foi possível confirmar a presença da mistura de diastereoisômeros, como sugerido acima, pela presença de pares de sinais em δ_{H} 12,09; 12,06; 11,96 e 11,95 referentes aos hidrogênios quelados à carbonila e em δ_{H} 2,41 e 2,37 referentes às metilas ligadas ao anel aromático. Além disso, a presença de sinais entre δ_{H} 5,21 e 3,75 indicaram a presença de uma unidade de açúcar na molécula. O espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz, FIGURA 4.40), apesar da baixa intensidades dos sinais, mostrou a presença dos carbonos referentes ao esqueleto proposto. Alguns sinais foram determinantes nesta atribuição, tais como a presença de uma carbonila em δ_{C} 193,84 juntamente com os sinais em δ_{H} 43,79 e 43,73, mostrando que em C-10 houve a redução da carbonila, sendo este um carbono metínico com uma substituição de uma unidade de glicose.

SpinWorks 3:

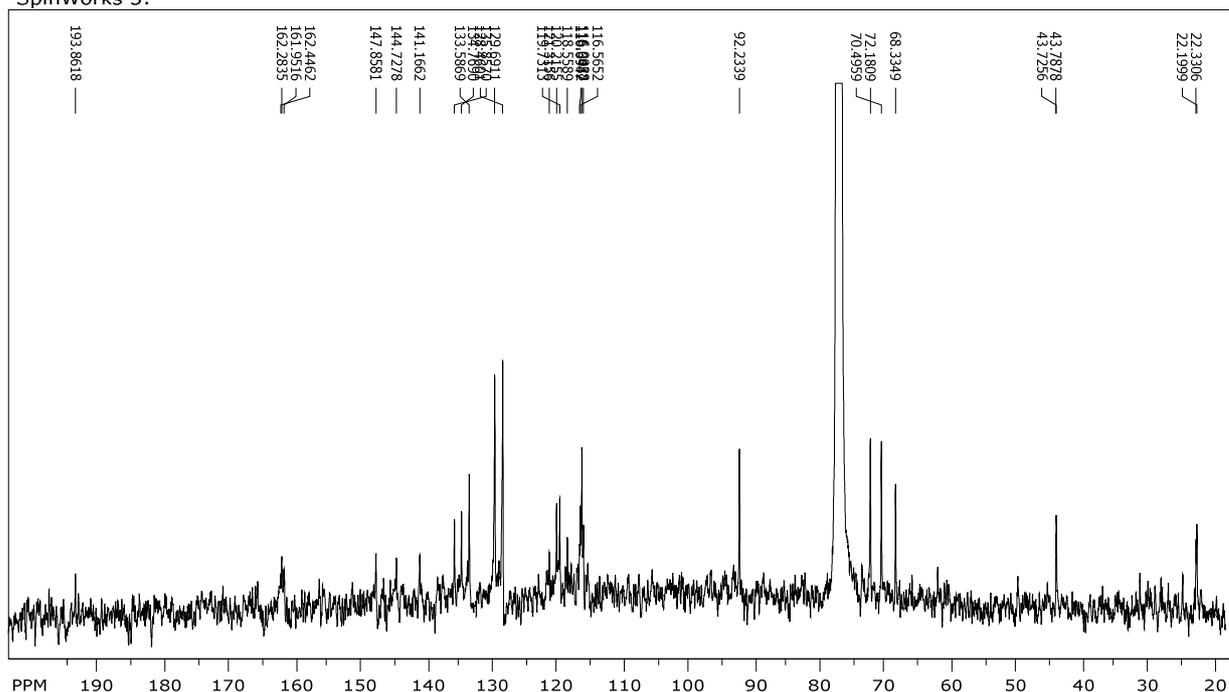


FIGURA 4.40 – Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias **11** e **12**.

Ainda no espectro de RMN de ^{13}C , a presença de dois sinais intensos em δ_{C} 128,42 e 129,69, característicos da presença de um anel benzênico monosubstituído e aliado a presença de um sinal δ_{C} 162,28 mostrou a presença do grupo benzoila ligada a unidade da glicose, já que o padrão do esqueleto carbônico da aglicona mostrou ser pertencente ao crisofanol-9-antrona. Os mapas de contornos HSQC e HMBC permitiram a completa atribuição dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C através dos picos cruzados (FIGURAS 4.41 a 4.46).

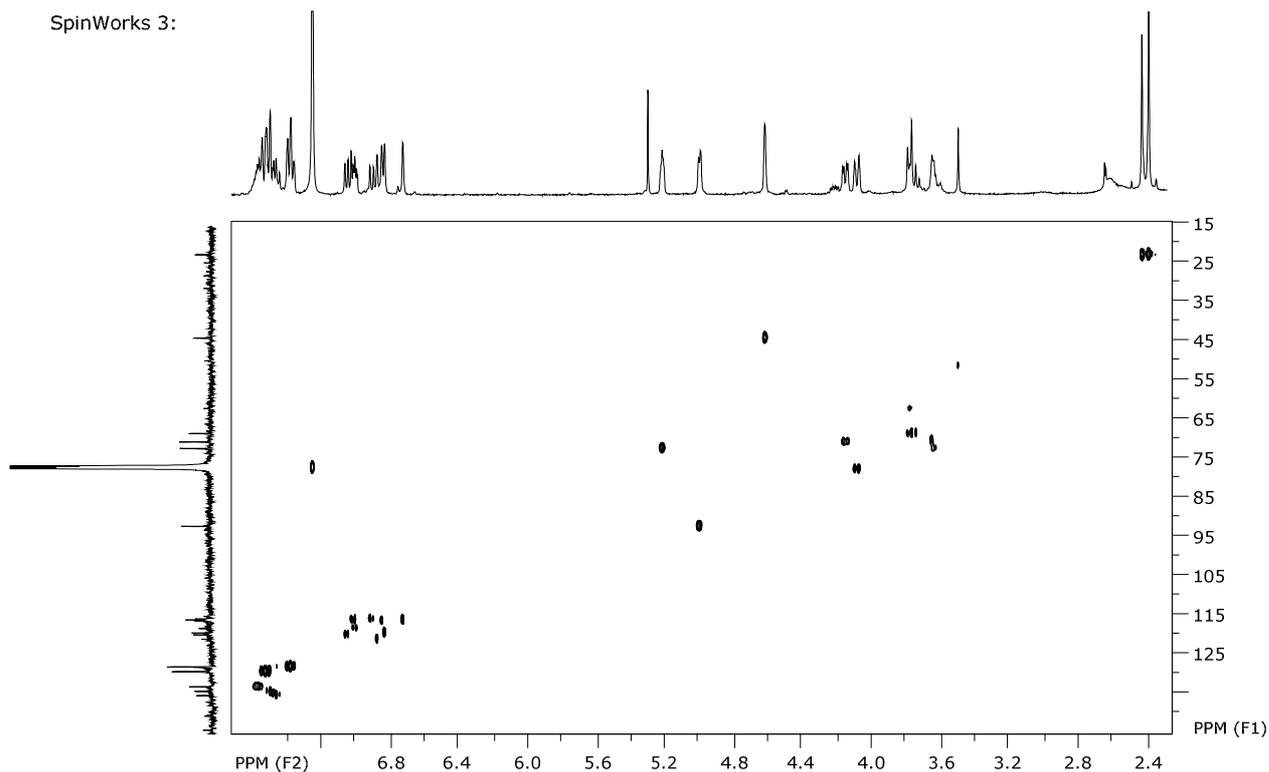


FIGURA 4.41 – Mapa de contornos HSQC das substâncias **11** e **12**.

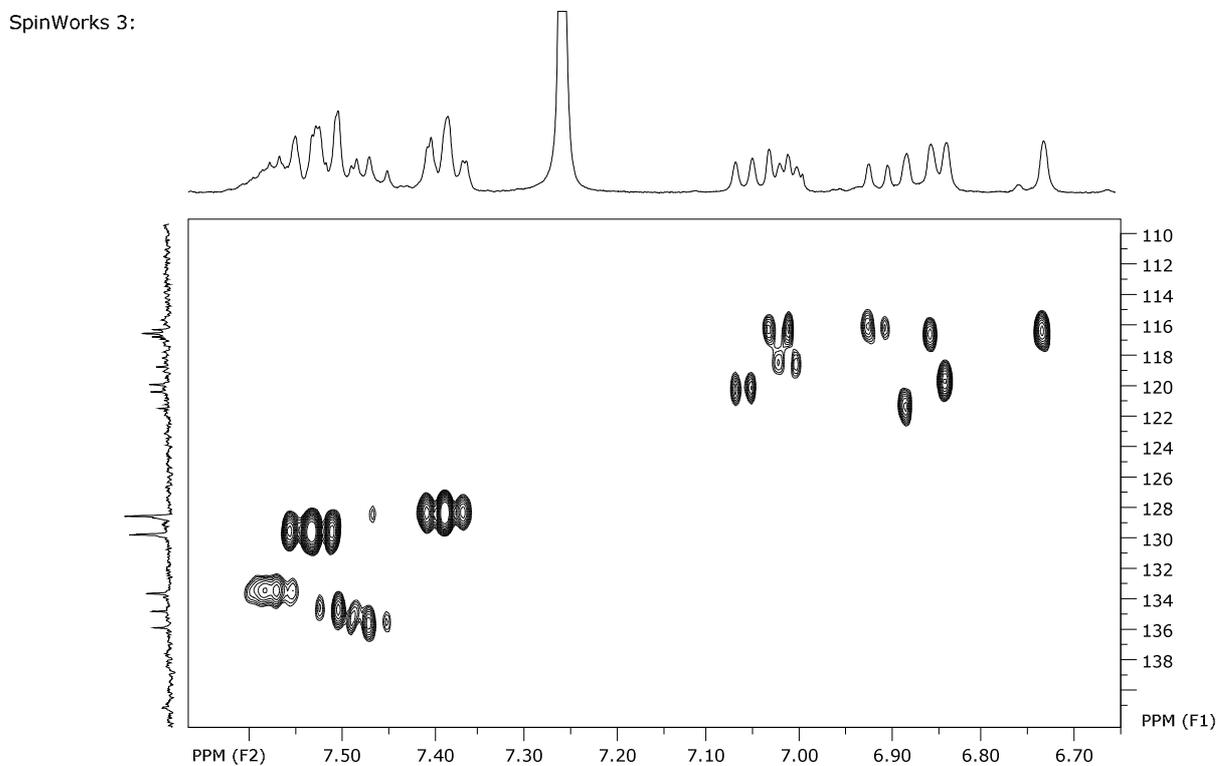


FIGURA 4.42 – Ampliação do mapa de contorno HSQC das substâncias **11** e **12**.

SpinWorks 3:

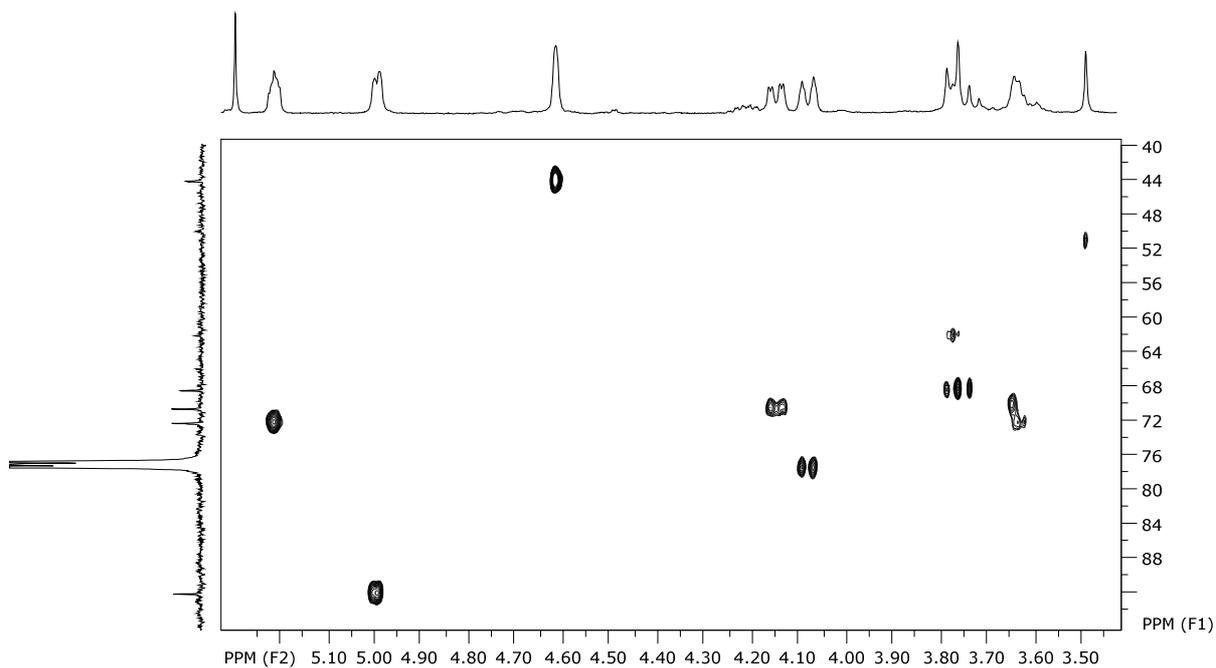


FIGURA 4.43 – Ampliação mapa de contornos HSQC das substâncias **11** e **12**.

SpinWorks 3:

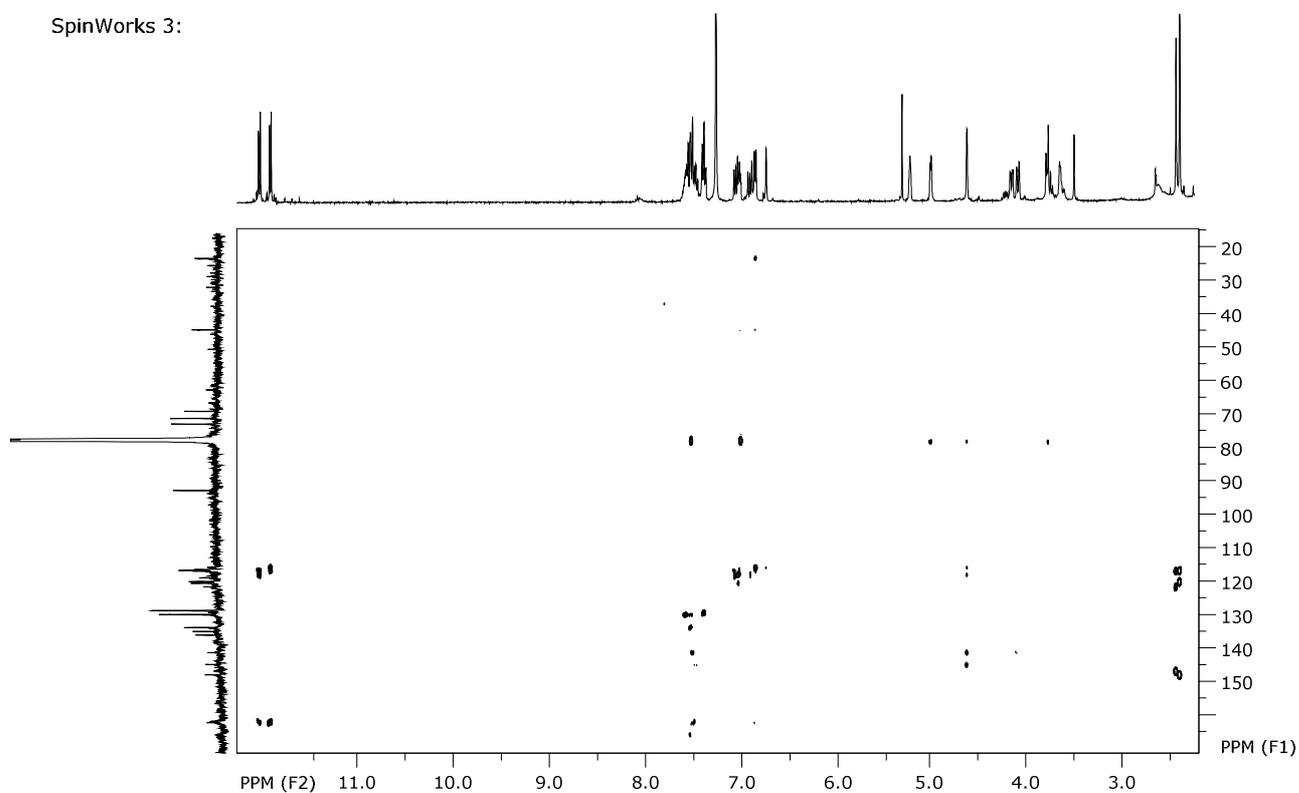


FIGURA 4.44 – Mapa de contornos HMBC das substâncias **11** e **12**.

SpinWorks 3:

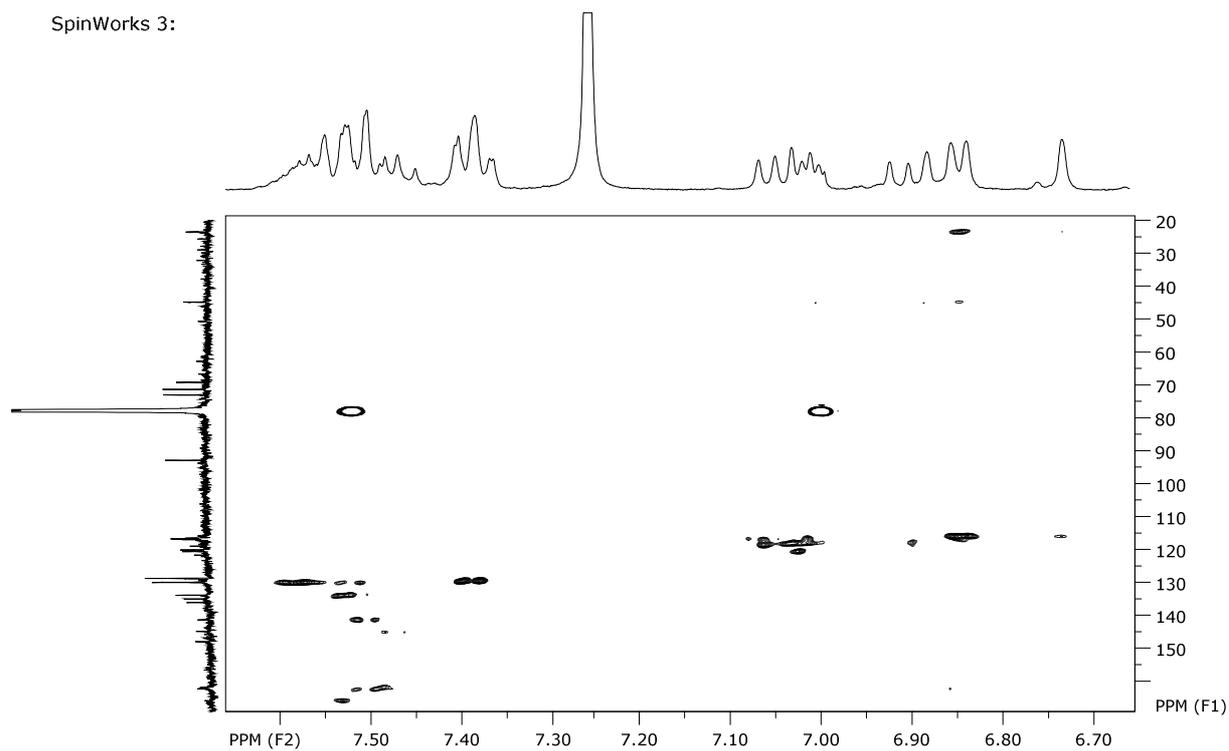


FIGURA 4.45 – Ampliação do mapa de contornos HMBC das substâncias **11** e **12**.

SpinWorks 3:

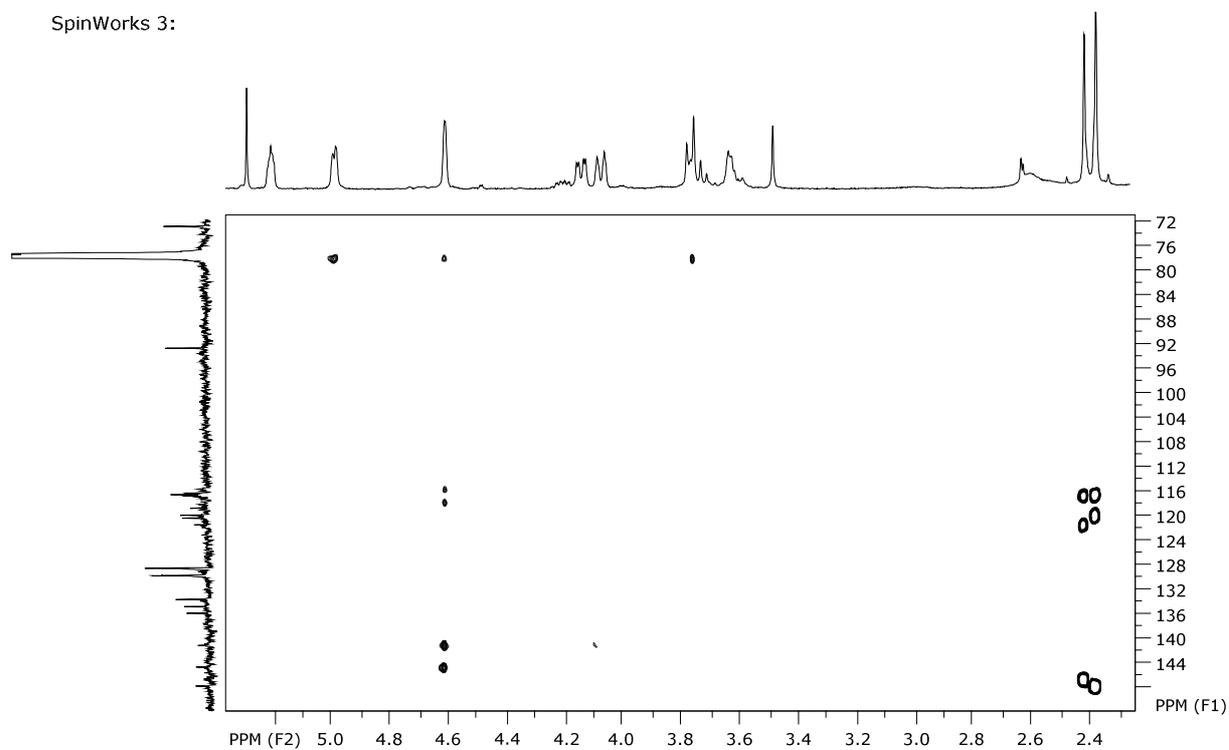


FIGURA 4.46 – Ampliação do mapa de contornos HMBC das substâncias **11** e **12**.

A partir das análises utilizando como modelo o composto descrito por HERNANDEZ-MEDEL et al. (1998), que tem a mesma aglicona, diferindo na unidade da glicose e o posicionamento do grupo benzoila, confirmou a caracterização dos compostos **10** e **11**, não relatados na literatura (FIGURA 4.47).

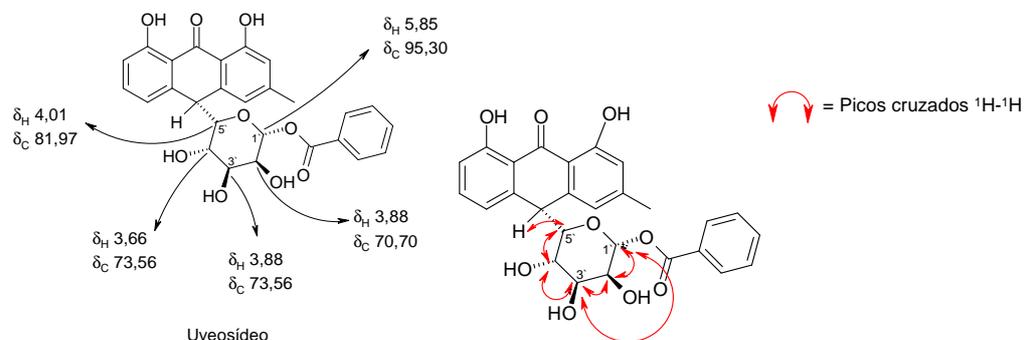


FIGURA 4.47 – Comparação dos sinais atribuídos para uveosídeo e suas respectivas correlações 1H – 1H .

A análise do espectro de COSY (FIGURAS 4.48 e 4.49) mostrou as principais correlações na diferenciação da glicose, juntamente com o posicionamento dos substituintes no mesmo. Os acoplamentos entre H-5' e H-4', H-5' e H-10, H-4' e H-3', H-3' e H-2' foram as correlações determinantes para esta justificativa, juntamente com as correlações mostradas no mapa de contornos HSQC.

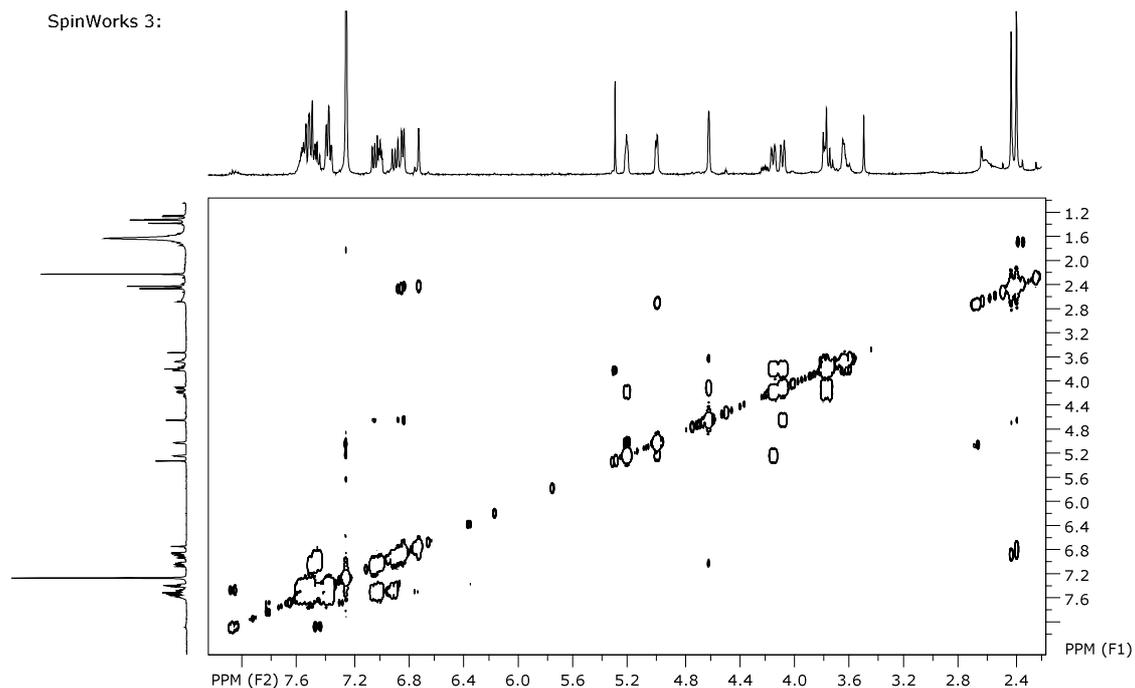


FIGURA 4.48 – Espectro de RMN Bidimensional COSY das substâncias **11** e **12**.

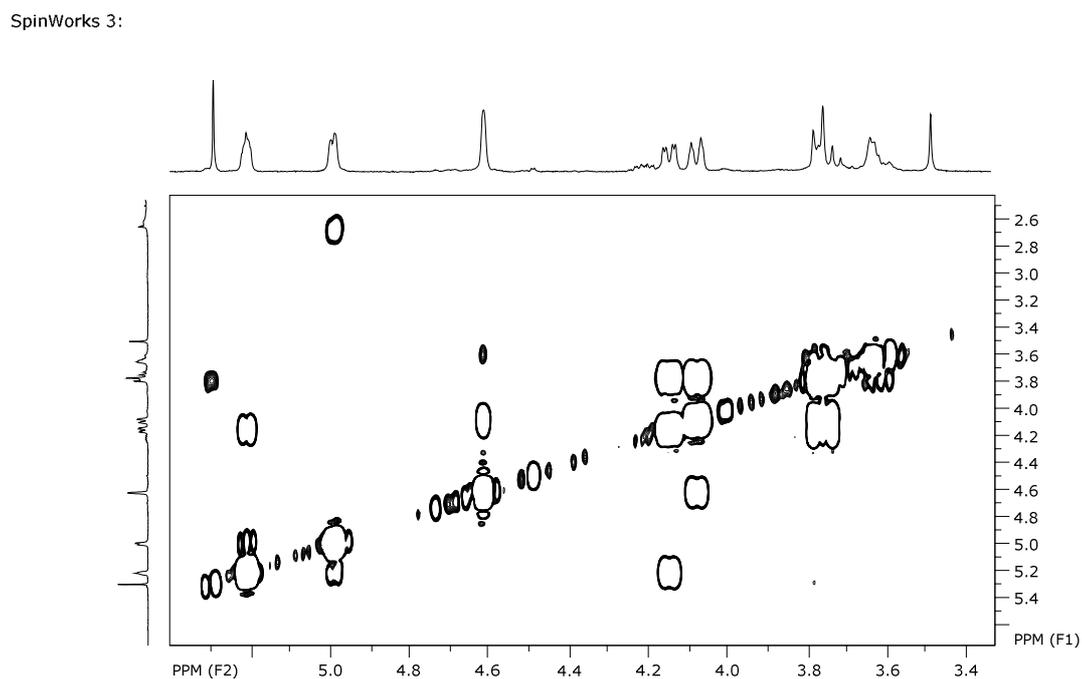


FIGURA 4.49 – Ampliação do espectro de RMN Bidimensional COSY das substâncias **11** e **12**.

Assim, a observações dos íons m/z 491, 281 e 239 mostradas na FIGURA 4.37, agora podem ser justificadas através da proposta de fragmentação abaixo (FIGURA 4.50).

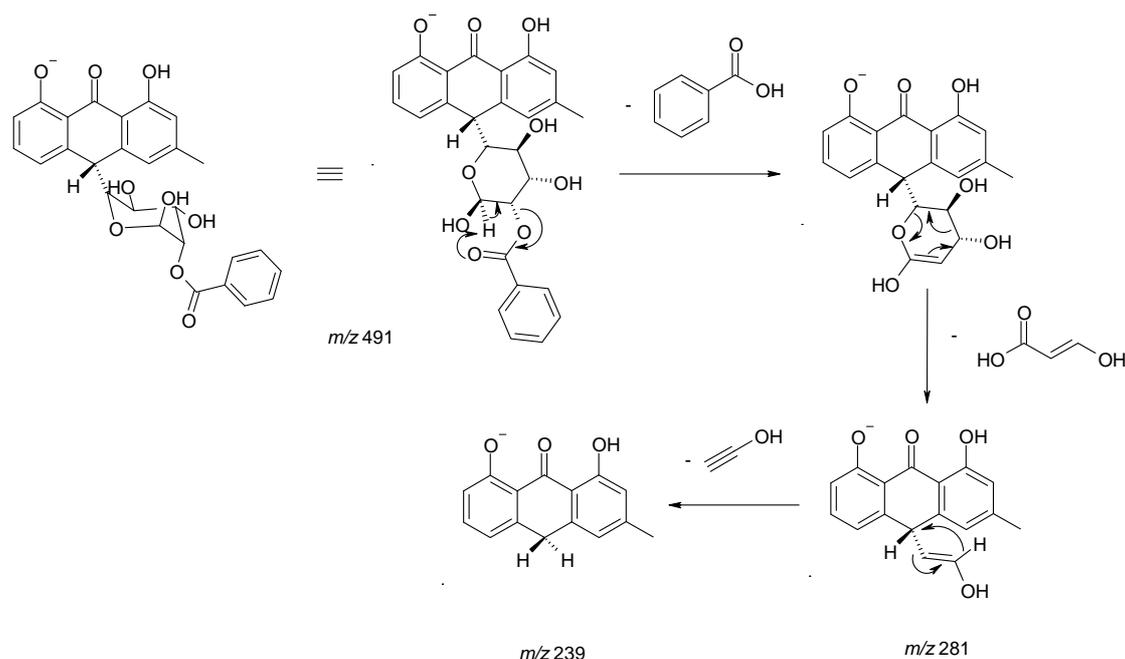


FIGURA 4.50 – Proposta de fragmentação ocorrida nas substâncias **11** e **12**.

A partir de todos os dados discutidos e confirmação a partir da massa molecular 492 u.m.a. e fórmula molecular $C_{27}H_{24}O_9$ para ambos os diastereoisômeros **11** e **12**, foram elucidadas as estruturais dos mesmos, sendo que experimentos de massas de alta resolução e a determinação da configuração absoluta em C-10 em **11** e **12**, através de análises de dicroísmo circular serão realizados. A determinação da configuração absoluta dos isômeros se trata de uma etapa complicada já que o trabalho de RODRIGUEZ-GAMBOA (2001) provou que a partir do isolamento de um dos diastereoisômeros, ele pode levar ao outro isômero pela epimerização, formando novamente a mistura de ambos os compostos, uma vez que um deles é mais estável. A TABELA 4.6 apresenta a proposta de atribuição completa dos dados de RMN de 1H e ^{13}C dos compostos **11** e **12**, inéditos na literatura, denominados Uveosídeo B e C.

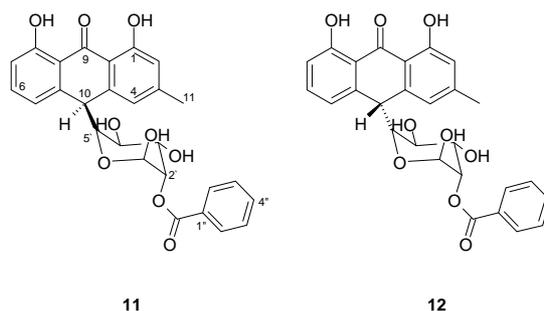


TABELA 4.6 – Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) das antronas inéditas **11** e **12**

C	11		12	
	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}
1	-	161,94**	-	161,94**
1a	-	115,41**	-	115,41**
2	6,86 s	116,56	6,73 s	116,33
3	-	147,84**	-	147,84**
4	6,88 s	121,31	6,84 s	119,73
4a	-	141,17**	-	144,72**
5	7,01 <i>d</i> (7,84 Hz)	118,56	7,05 <i>d</i> (8,0 Hz)	120,31
5a	-	144,72**	-	141,12**
6	7,47 <i>m</i>	135,85	7,49 <i>m</i>	134,76
7	6,91 <i>d</i> (8,4 Hz)	116,11	7,02 <i>d</i> (8,24 Hz)	116,33
8	-	161,84**	-	161,84**
8a	-	116,70**	-	116,70**
9	-	193,84**	-	193,84**
10	4,61 <i>sl</i>	43,79	4,61 <i>sl</i>	43,73
11	2,41 s	22,34	2,37 s	22,20
1-OH	12,08 s	-	12,06 s	-
8-OH	11,96 s	-	11,95 s	-
1`	4,99 <i>d</i> (3,88 Hz)	92,23	4,99 <i>d</i> (3,88 Hz)	92,23
2`	5,22 <i>m</i>	72,18	5,22 <i>m</i>	72,18
3`	4,14 <i>dd</i> (9,5; 3,08 Hz)	70,50	4,14 <i>dd</i> (9,5; 3,08 Hz)	70,50
4`	3,76 <i>t</i> (9,5 Hz)	68,34	3,76 <i>t</i> (9,5 Hz)	68,34
5`	4,08 <i>d</i> (9,5 Hz)	77,00*	4,08 <i>d</i> (9,5 Hz)	77,00*
1`-C=O	-	162,28**	-	162,28**
1''	-	129,64**	-	129,64**
2'' / 6''	7,53 <i>m</i>	129,69	7,53 <i>m</i>	129,69
3'' / 5''	7,38 <i>t</i> (7,96 Hz)	128,42	7,38 <i>t</i> (7,96 Hz)	128,42
4''	7,57 <i>m</i>	133,58	7,57 <i>m</i>	133,58

* Sinal coalescido com o sinal de CDCl_3 .

** As atribuições dos carbonos quaternários podem estar trocados pela baixa intensidade obtida e/ou pelo coalescimento no registro do espectro de RMN de ^{13}C .

4.1.2.4.2 – Oxantronas glico-benzoiladas **13** e **14**

As substâncias **13** e **14** foram isoladas parcialmente da fração H+D/02/03/02/01/04/02/04 proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato H+D das raízes de *P. bahiensis*. Novamente, esta etapa do trabalho de identificação total ou parcial dos componentes desta fração está relacionada com a atividade inseticida apresentada pela fração original. Estas substâncias estavam presentes em quantidades minoritárias em relação aos majoritários descritos no item anterior. Estes compostos foram identificados somente através da Espectrometria de Massas, portanto foi baseada nas fragmentações obtidas no modo *full scan*, aliada a análise dos espectros de U.V. A comparação do espectro de U.V. destes compostos (FIGURA 4.51) com o dos compostos **11** e **12** (FIGURA 4.36) mostrou semelhança muito grande e indicando um sistema altamente conjugado.

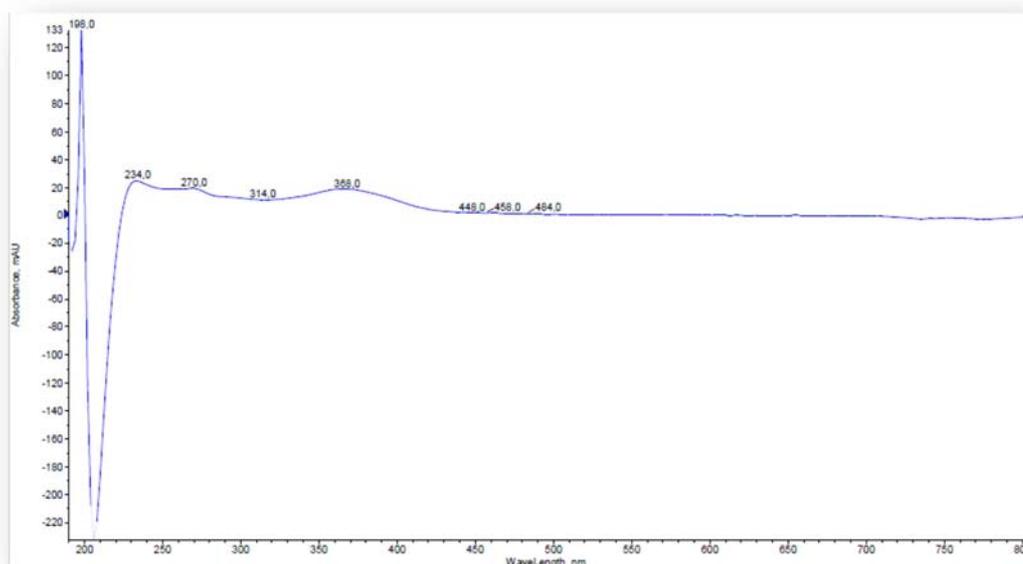


FIGURA 4.51 – Espectro de U.V. obtido para as substâncias **13** e **14**.

Aliado a esta informação, o espectro de massas no modo *full scan* (FIGURA 4.52) se observa presença de um íon de m/z 507, diferentemente do obtido para as substâncias **11** e **12**.

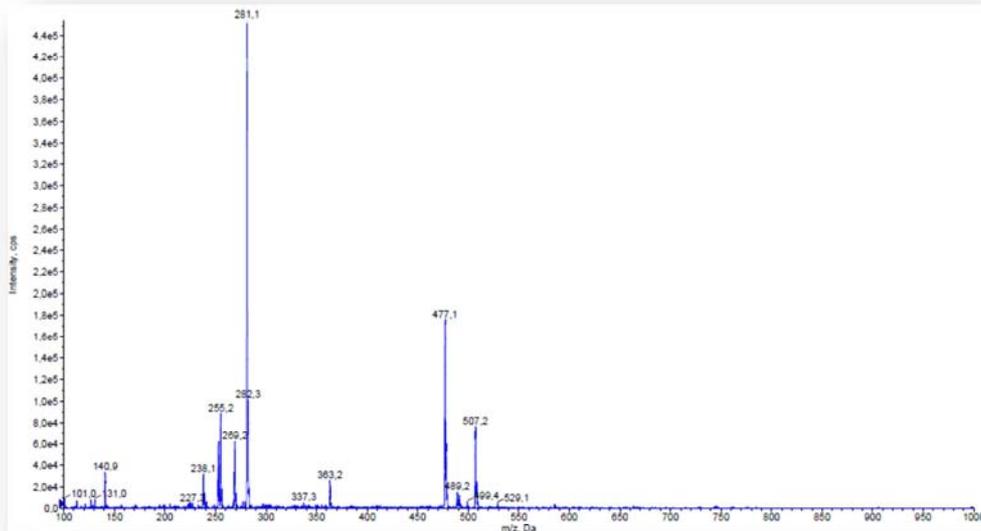


FIGURA 4.52 – Espectro de massas no modo *full scan* obtido para as substâncias **13** e **14**.

Considerando uma diferença de 16 u.m.a. entre os valores de m/z 507 e 491, ela indica a presença de um grupo hidroxila na molécula sugerindo as estruturas da FIGURA 4.53.

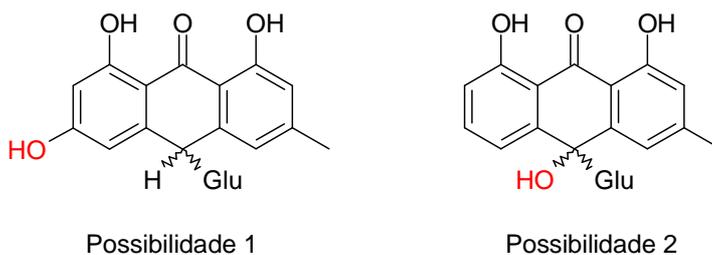


FIGURA 4.53 – Duas mais prováveis possibilidades no posicionamento do grupo hidroxila nas substâncias **13** e **14**.

Ao considerar a primeira possibilidade no posicionamento da hidroxila, tornando o esqueleto antraquinônico semelhante à antraquinona emodina, muito provavelmente o posicionamento da mesma na posição *para* à carbonila mostraria um efeito batocrômico no U.V., mais especificamente um incremento de +25 nm na

banda referente ao anel da aglicona. Porém, os valores de comprimentos de onda são muito próximos (268 e 270 nm), descartando esta possibilidade. Além disso, a presença de alguns íons, tais como, m/z 255 e 281, diferindo dos compostos **11** e **12**, mostrou que a segunda possibilidade estaria mais plausível pela proposta de fragmentação mostrada na FIGURA 4.54.

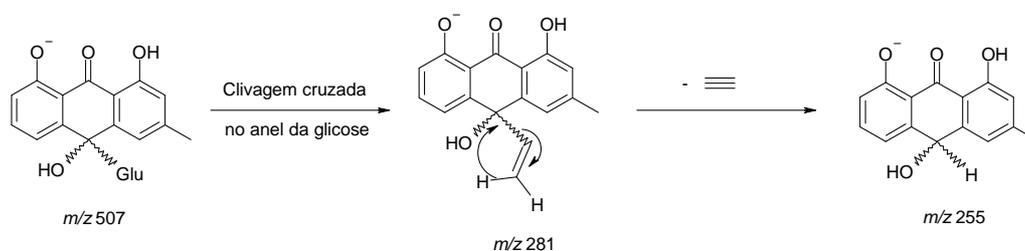


FIGURA 4.54 – Proposta de fragmentação provável para definição parcial de **13** e **14**.

Assim, apesar de não ter sido possível a obtenção dos dados de RMN para definição total das substâncias, e com base nos dados de U.V. e Espectrometria de Massas, foram propostas as estruturas para **13** e **14**, pertencentes à classe das oxantronas (FIGURA 4.55), muito comum na Família Picramniaceae.

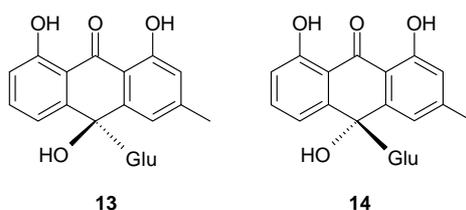


FIGURA 4.55 – Possíveis estruturas para **13** e **14**.

4.1.2.4.3 – Antronas glico-acetiladas **15** e **16**

As substâncias alvaradoina E (**15**) e alvaradoina F (**16**) foram isoladas na forma de pares de diastereoisômeros e identificadas a partir da fração H+D/03/03 proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato H+D das

raízes de *P. bahiensis*. A fração de partida (H+D/03) apresentou-se como a mais ativa como inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* e os mesmos não foram submetidos ao ensaio pela pouca quantidade obtida. Há, portanto, indício destes compostos estarem relacionados a esta atividade, já que os mesmos mostraram estarem presentes majoritariamente na fração, determinado através de comparação dos espectros de RMN de ^1H da fração original e dos compostos **15** e **16**.

Como foi discutido no item **4.1.2.4**, a partir das otimizações descritas, foi realizada análise no modo *full scan* da fração na qual as mesmas estavam presentes (FIGURA 4.56).

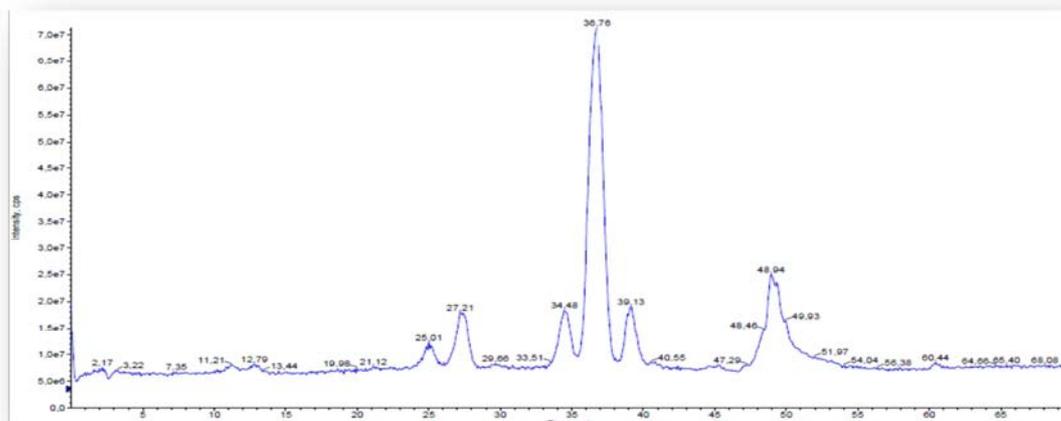


FIGURA 4.56 – Espectro de massas no modo *full scan* da fração HD/03/03.

A partir desta análise, foi verificado que a banda com t_R 36,76 min. mostra na região do U.V. espectro referente à composto altamente conjugado (FIGURA 4.57).

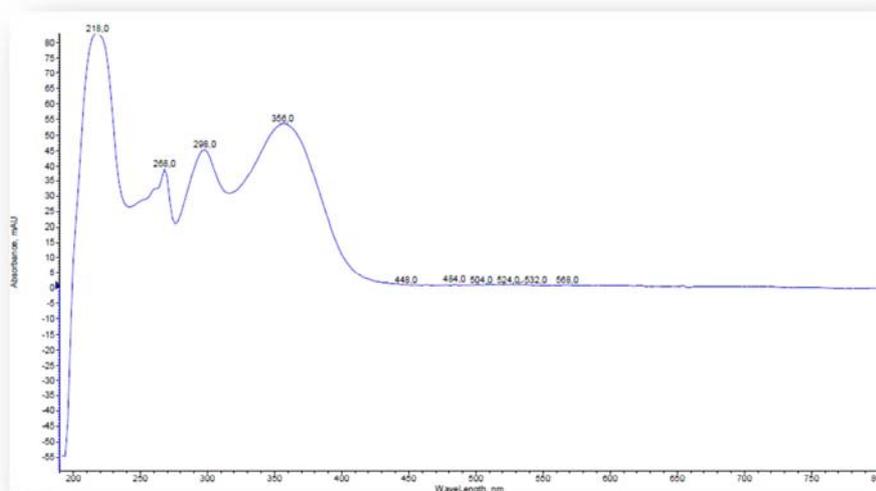


FIGURA 4.57 – Espectro de U.V. referente à banda em t_R 36,76 min.

Ao analisar o espectro de massas gerado a partir da seleção desta banda (FIGURA 4.58), o aparecimento de um íon de m/z 429, juntamente com outros íons intensos de m/z 369, 281 e 239 sugeriu a ocorrência de fragmentação a partir da molécula desprotonada de um composto glicosilado, onde os outros dois íons pertenciam à aglicona e outro relativo à fragmentação cruzada no açúcar, comportamento este característico para esses compostos (RAFAËLLY et al., 2008; ZAIA, 2004), porém com diferenças em relação aos compostos **11** e **12**, onde uma diminuição na massa molecular se dava pela ausência do grupo benzoila na unidade da glicose.

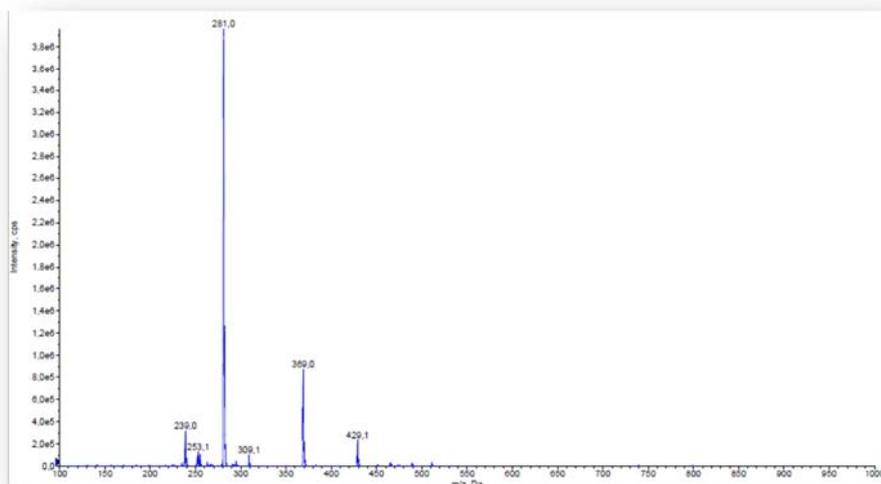


FIGURA 4.58 – Espectro de massas no modo *full scan* gerado a partir da banda com t_R 36,76 min.

Foram também realizados diversos experimentos, tais como *neutral loss* (verificar a perda da molécula de CO, característico para um esqueleto antraquinônico), *precursor ion* (confirmar a fragmentação) e *product ion* (confirmar a estrutura através da proposta de fragmentação). As FIGURAS 4.59 (análise no modo *precursor ion* de m/z 239) e 4.60 (análise no modo *precursor ion* de m/z 281) mostraram que todos proviam do íon de m/z 369 e do íon pseudo molecular m/z 429.

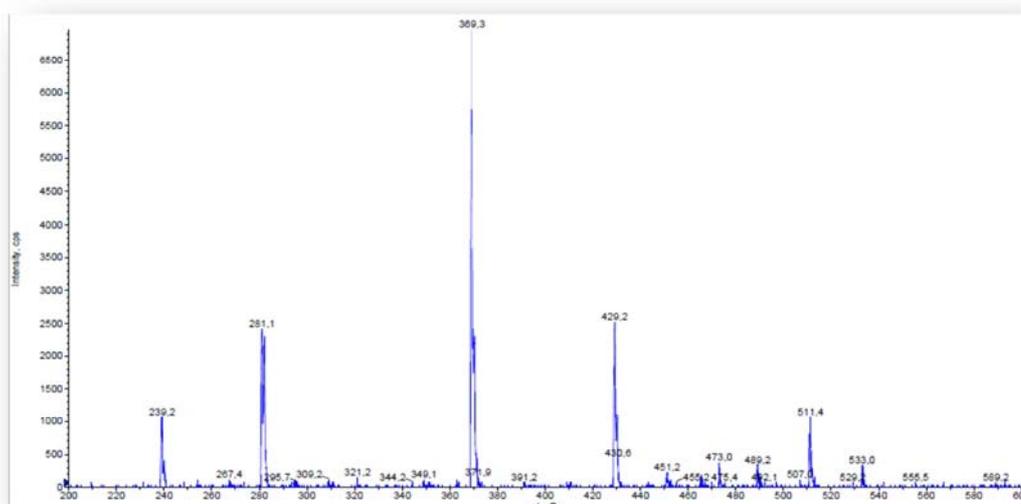


FIGURA 4.59 – Espectro de massas no modo *precursor ion* para a transição m/z 429 \rightarrow m/z 239.

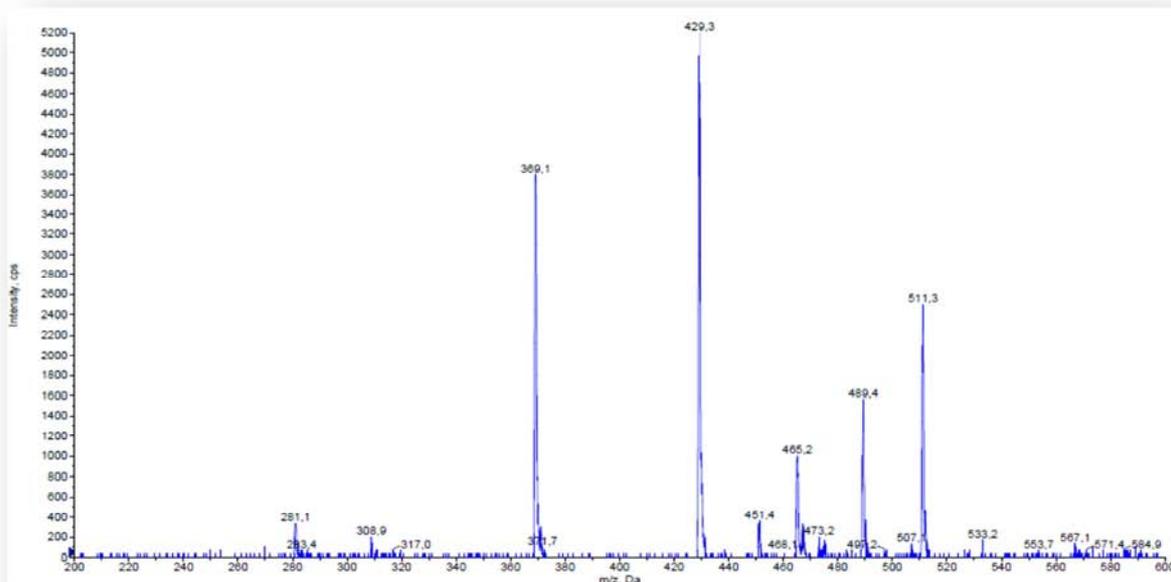


FIGURA 4.60 – Espectro de massas no modo *precursor ion* para a transição m/z 429 \rightarrow m/z 281.

Com base nesses dados, foi realizado um levantamento bibliográfico no gênero contendo compostos antraquinônicos glicosilados com a massa de 429 u.m.a., onde, a partir do artigo descrito por PHIFER et al. (2007), foram isoladas substâncias da classe das antronas, especificamente, os compostos Alvaraoina E e F. Assim sendo foi obtido o espectro de RMN de ^1H (CD_3OD e CDCl_3 , 400 MHz) para esta mistura (FIGURAS 4.61 e 4.62). O registro do espectro de RMN em clorofórmio deuterado foi realizado para a verificação da presença das hidroxilas queladas, típicos para estes compostos em questão.

SpinWorks 3:

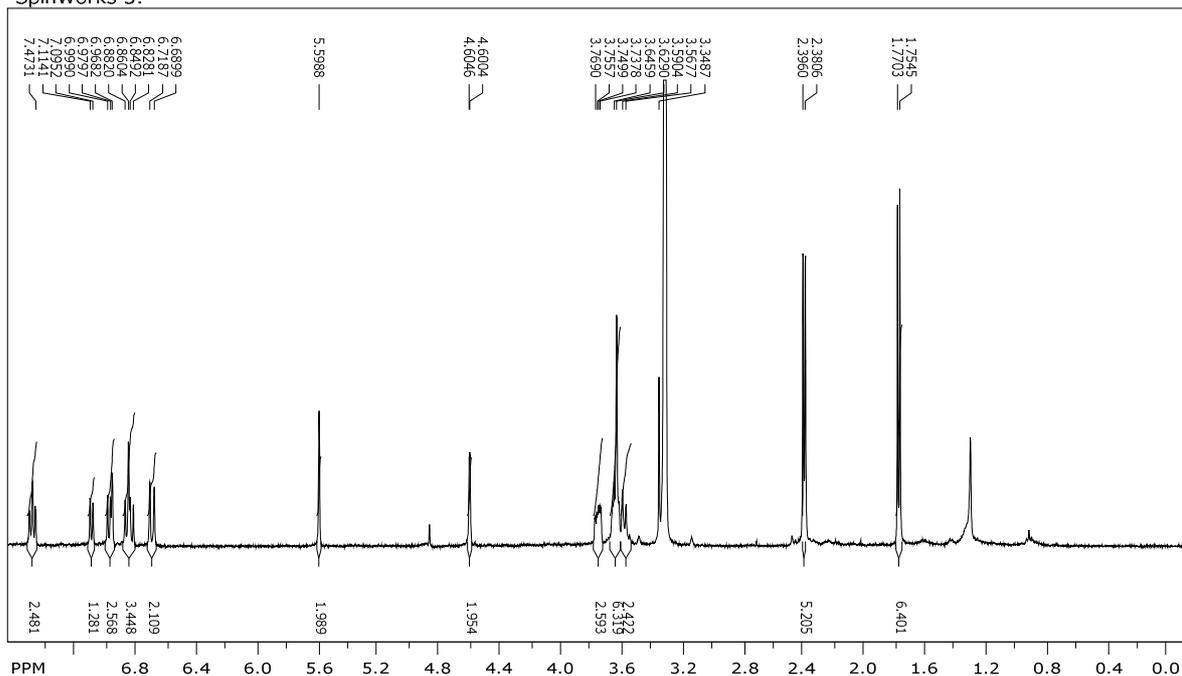


FIGURA 4.61 – Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD das substâncias **15** e **16**.

SpinWorks 3:

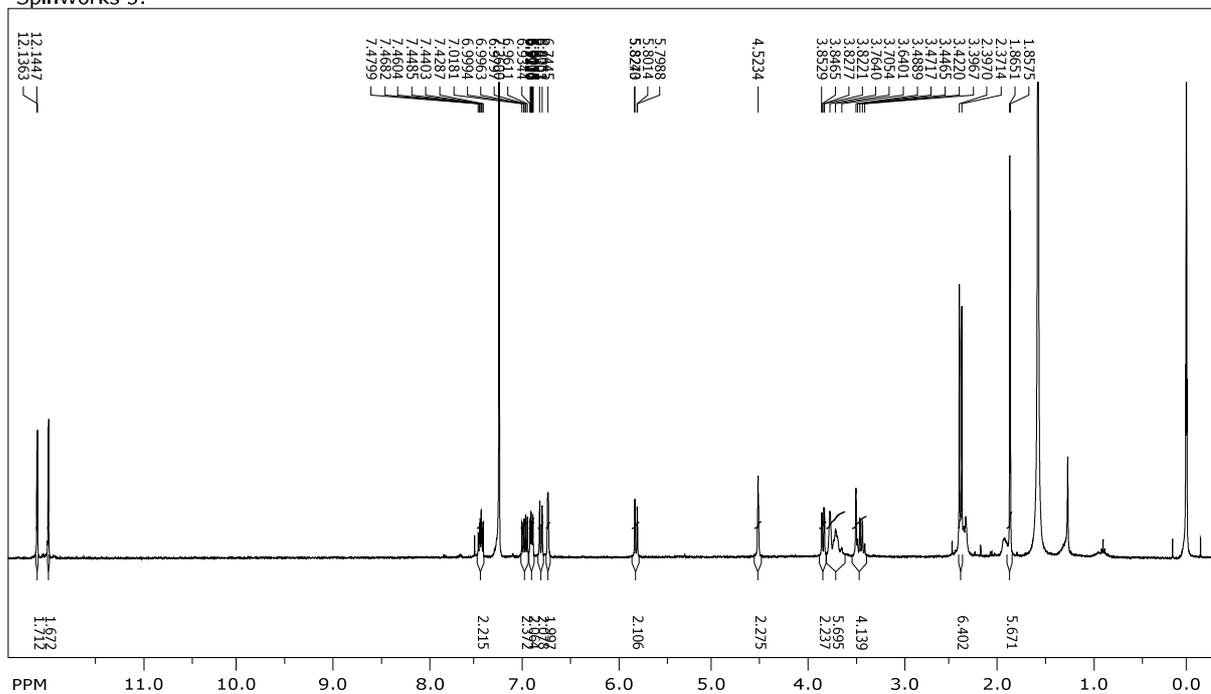


FIGURA 4.62 – Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 das substâncias **15** e **16**.

Analisando o espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 , foi verificado a presença de sinais em δ_{H} 12,14; 12,13; 12,02 e 12,01 confirmando a presença de duas moléculas diastereoisoméricas, aliada a outros sinais mostrados no espectro. Em relação aos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos, a melhor separação dos mesmos e a resolução dos sinais foi aquela do registro em CD_3OD , diferentemente dos sinais relativos à glicose, onde que o registro em CDCl_3 foi gerado um melhor espectro (FIGURAS 4.63 e 4.64).

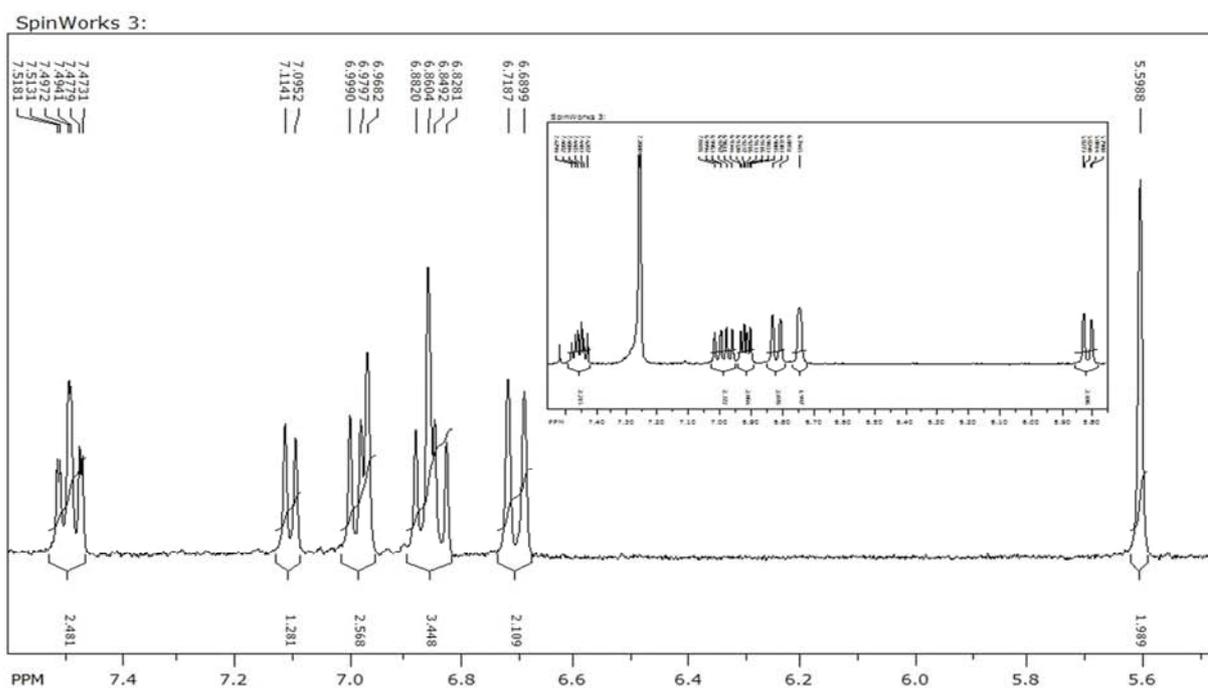


FIGURA 4.63 – Comparação da região aromática no espectro de RMN de ^1H em CD_3OD em relação à CDCl_3 das substâncias **15** e **16**.

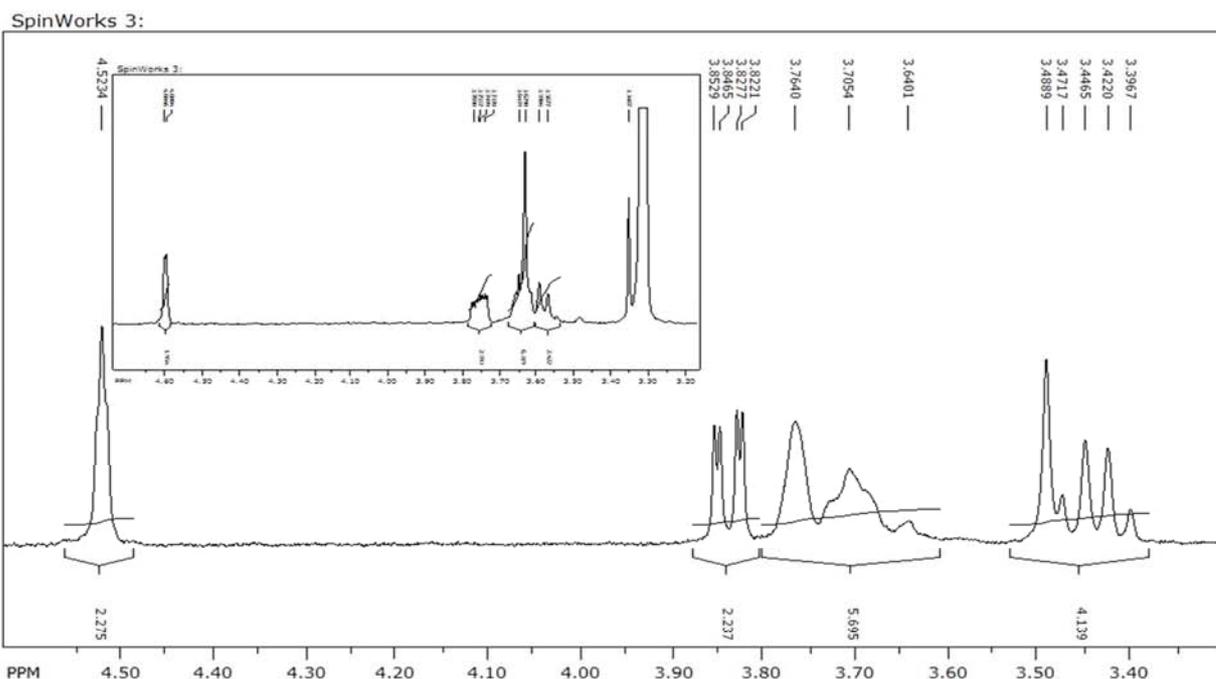


FIGURA 4.64 – Comparação da região da glicose no espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 em relação à CD_3OD das substâncias **15** e **16**.

O espectro de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz, FIGURA 4.65), apesar das baixas intensidades dos sinais, mostrou a presença dos carbonos referentes ao esqueleto crisofanol-9-antrona, como já discutido anteriormente, confirmado pelos sinais referente à carbonila em δ_c 195,34 juntamente com o sinal em δ_c 44,30, sendo este um carbono metínico com uma substituição de uma unidade de glicose.

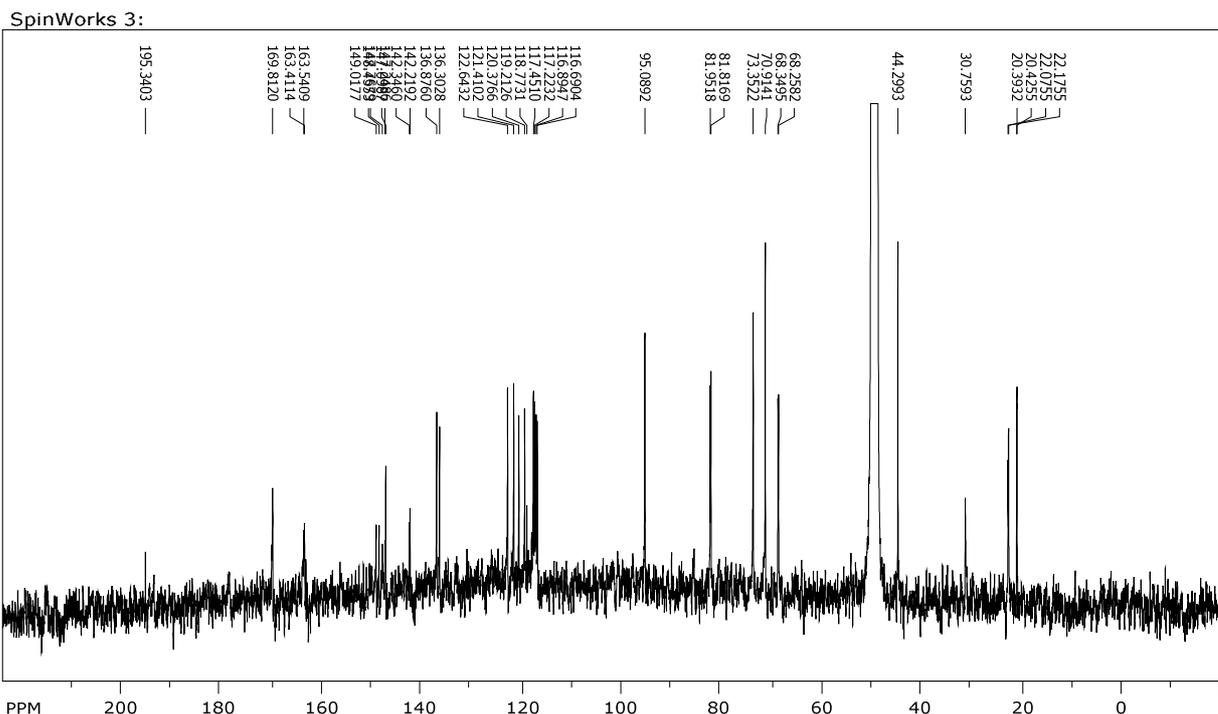


FIGURA 4.65 – Espectro de RMN de ^{13}C das substâncias **15** e **16**.

Ainda no espectro de RMN de ^{13}C , a ausência de sinais característicos de um anel benzênico e, agora com a presença de dois sinais em δ_{C} 20,39 e 20,43, além dos sinais referentes às metilas ligadas à aglicona, característicos da presença de um grupo acetato ligado à unidade da glicose, já que, em comparação com **11** e **12**, não houve mudança no padrão do esqueleto carbônico da aglicona. Nos mapas de contornos HSQC e HMBC permitiram a completa atribuição dos sinais de RMN de ^1H e ^{13}C através dos picos cruzados (FIGURAS 4.66 e 4.67).

SpinWorks 3:

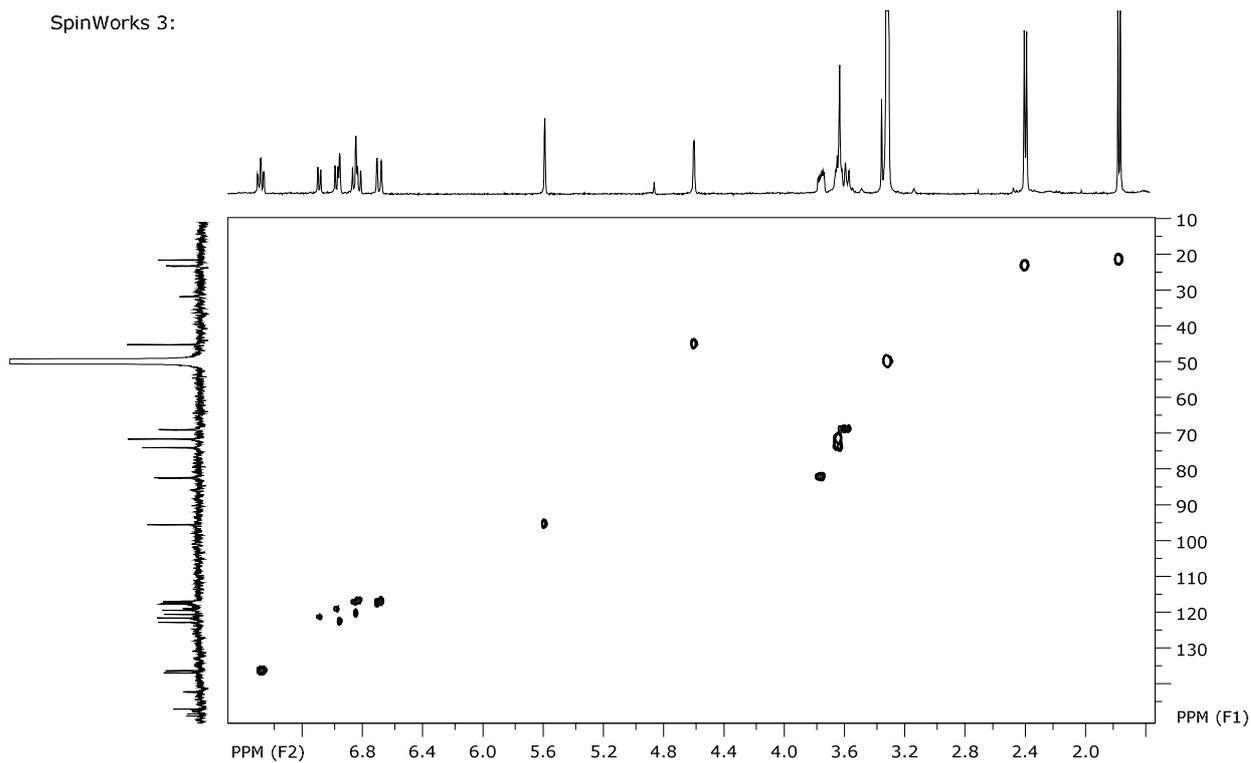


FIGURA 4.66 – Mapa de contorno HSQC das substâncias **15** e **16**.

SpinWorks 3:

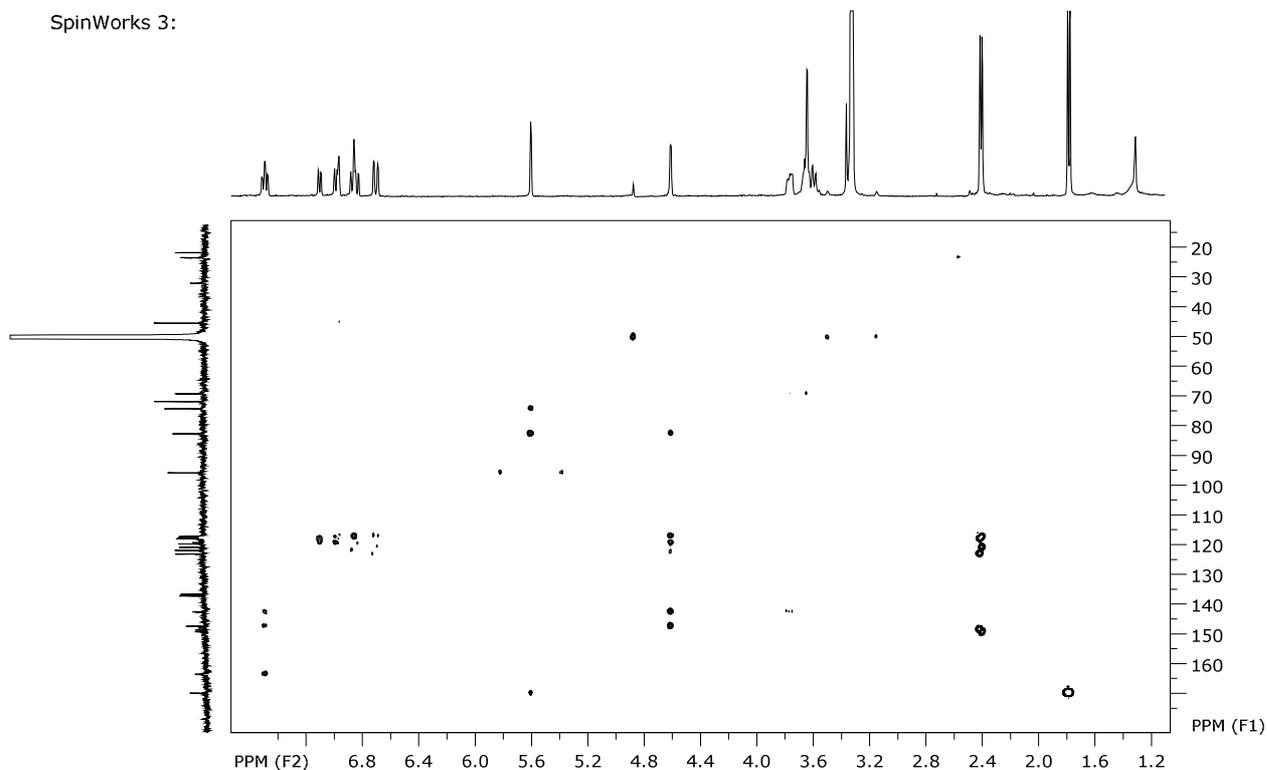


FIGURA 4.67 – Mapa de contorno HMBC das substâncias **15** e **16**.

A partir das análises, foi verificado o isolamento dos compostos Alvaradoina E e F, porém relatados somente no gênero *Alvaradoa*, estes nunca foram relatados no gênero *Picramnia*, mostrando que a eliminação deste gênero na Família Simaroubaceae e inclusão na Família Picramniaceae, com ambos os gêneros citados inclusos nela, em relação ao perfil químico, se reforça a partir desse relato.

Em relação ao espectro de massas no modo *full scan* (FIGURA 4.58), ele confirmou a presença de ambas as moléculas através da proposta de fragmentação mostrada na FIGURA 4.68.

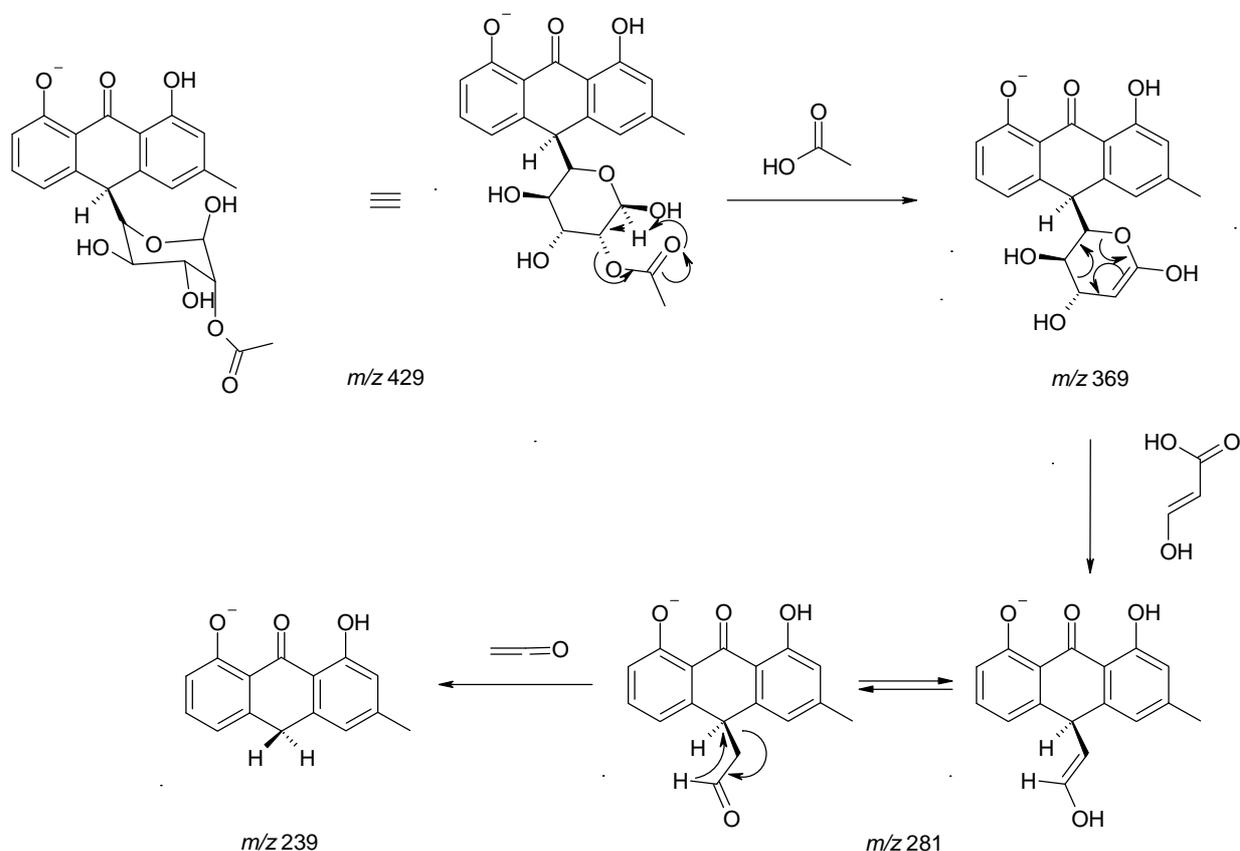
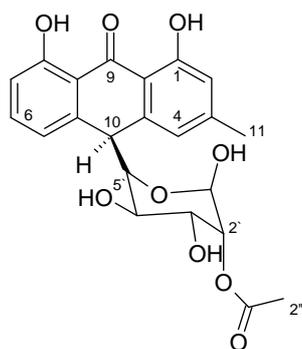


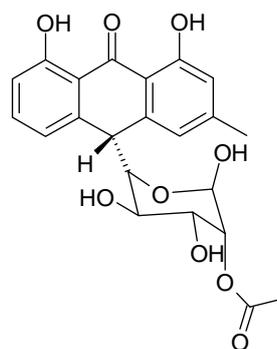
FIGURA 4.68 – Proposta de fragmentação ocorrida nas substâncias **15** e **16**.

A partir de todos os dados discutidos, a confirmação da massa molecular m/z 429 para ambos os diastereoisômeros **15** e **16**, e as atribuições de RMN de ^1H e ^{13}C (TABELA 4.7) em comparação com a literatura (PHIFER et al.,

2007) foram identificadas as substâncias **15** e **16**. Apesar de esta comparação ter sido realizada em solventes deuterados distintos, o relato das correlações bidimensionais citadas no artigo fez com que houvesse a confirmação dos mesmos em mistura. São apresentados os dados de um dos compostos da literatura utilizado como base de referência (PHIFER et al., 2007).



15



16

TABELA 4.7 – Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) das antronas **15** e **16** e comparação com a literatura

C	15		16		Alvaradoina F (16)	
	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} Lit. * (J)	δ_{C} Lit. * (J)
1	-	163,41**	-	163,41**	-	162,9
1a	-	118,77**	-	116,62**	-	116,1
2	6,72 <i>s</i>	117,45**	6,69 <i>s</i>	116,89**	6,70 <i>s</i>	116,6
3	-	148,46**	-	149,02**	-	148,7
4	6,97 <i>s</i>	122,64	6,86 <i>s</i>	116,69	6,90 <i>s</i>	120,2
4a	-	142,22**	-	147,77**	-	146,7
5	6,99 <i>d</i> (7,48 Hz)	119,21	7,10 <i>d</i> (7,32 Hz)	121,41	7,18 <i>d</i> (7,5 Hz)	121,2
5a	-	147,25**	-	142,35**	-	142,4
6	7,49 <i>t</i> (7,5 Hz)	136,88**	7,49 <i>t</i> (7,5 Hz)	136,30**	7,53 <i>dd</i> (8,0; 7,9 Hz)	136,1
7	6,83 <i>d</i> (8,56 Hz)	116,69	6,87 <i>d</i> (8,56 Hz)	117,22	6,88 <i>d</i> (7,9 Hz)	116,8
8	-	163,54**	-	163,54**	-	163,1
8a	-	116,62**	-	118,77**	-	118,3
9	-	195,34	-	195,34	-	195,0
10	4,60 <i>sl</i>	44,30	4,60 <i>sl</i>	44,30	4,66 <i>d</i> (2,3 Hz)	43,9
11	2,38 <i>s</i>	22,08	2,40 <i>s</i>	22,18	2,40 <i>s</i>	22,0
1-OH	-	-	-	-	11,92	-
8-OH	-	-	-	-	12,04	-
1`	5,60 <i>s</i>	95,09	5,60 <i>s</i>	95,09	5,62 <i>s</i>	94,4
2`	3,62 – 3,67 <i>m</i>	70,91	3,62 – 3,67 <i>m</i>	70,91	3,66 – 3,70 <i>m</i>	70,5
3`	3,62 – 3,67 <i>m</i>	73,35	3,62 – 3,67 <i>m</i>	73,35	3,66 – 3,70 <i>m</i>	73,1
4`	3,55 – 3,64 <i>m</i>	68,26**	3,55 – 3,64 <i>m</i>	68,35**	3,59 – 3,61 <i>m</i>	68,3
5`	3,75 <i>m</i>	81,82**	3,75 <i>m</i>	81,95**	3,86 <i>dd</i> (9,9; 2,5 Hz)	81,4
1''	-	169,81	-	169,81	-	168,3
2''	1,75 <i>s</i>	20,39**	1,77 <i>s</i>	20,43**	1,78 <i>s</i>	20,4

* Obtido em acetona deuterada.

** As atribuições dos carbonos quaternários podem estar trocados pela baixa intensidade obtida e/ou pelo coalescimento no registro do espectro de RMN de ^{13}C .

4.1.3 – Esteróides

4.1.3.1 – β -Sitosterol (7)

A substância **7** foi isolada da fração TSPH/05/06, proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos da partição hexânica do caule de *T. schomburgkianum*. Como este composto já foi discutido neste trabalho, aqui será somente mostrado o espectro de RMN de ^1H (FIGURA 4.69) e o espectro de massas via CG/EM (FIGURA 4.70) na confirmação da substância **7**.

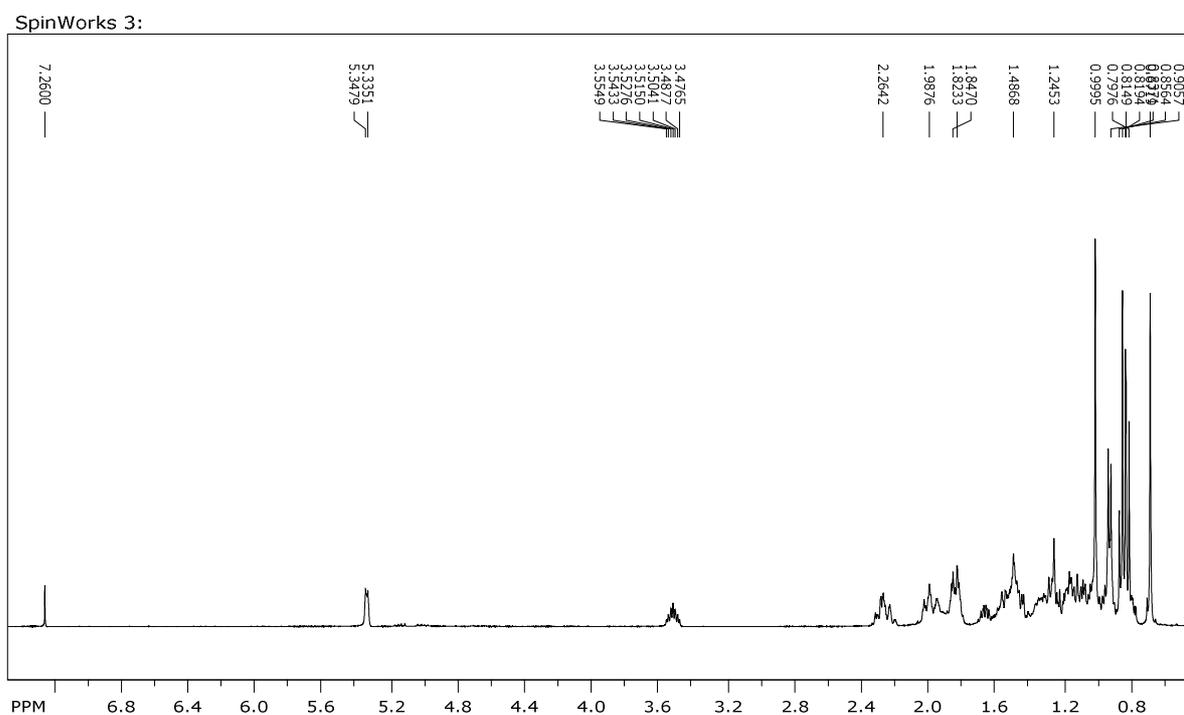


FIGURA 4.69 – Espectro de RMN ^1H como confirmação do isolamento de **7**.

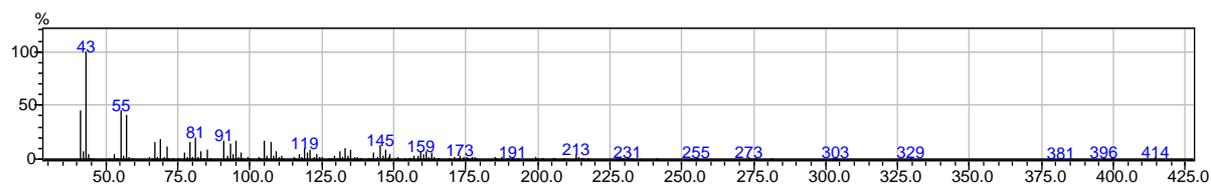


FIGURA 4.70 – Espectro de massas via CG/EM como confirmação do isolamento de **7**.

4.1.4 – Triterperenos

4.1.4.1 – 3 β -hidróxiglutin-5-eno (17)

A substância **17** foi isolada da fração TSPH/02/02+03/02, proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos da partição hexânica do caule de *T. schomburgkianum*. Para este composto, apesar de não ser inédito, uma busca feita através do banco de dados *SciFinder* mostrou oito referências do composto acima, entretanto, na Família Anacardiaceae é o primeiro relato do seu isolamento. Esta substância foi enviada para a avaliação da atividade inseticida e fungicida.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) mostrou um sinal em δ_{H} 5,63 (*dl*, $J = 6,0$ Hz) integrando para 1H, característico de hidrogênio olefínico, um sinal em δ_{H} 3,46 (*ddl*, $J = 2,3; 3,3$ Hz) integrando também para 1H, referente ao hidrogênio ligado no C-3 geminal a uma hidroxila (FIGURA 4.71).

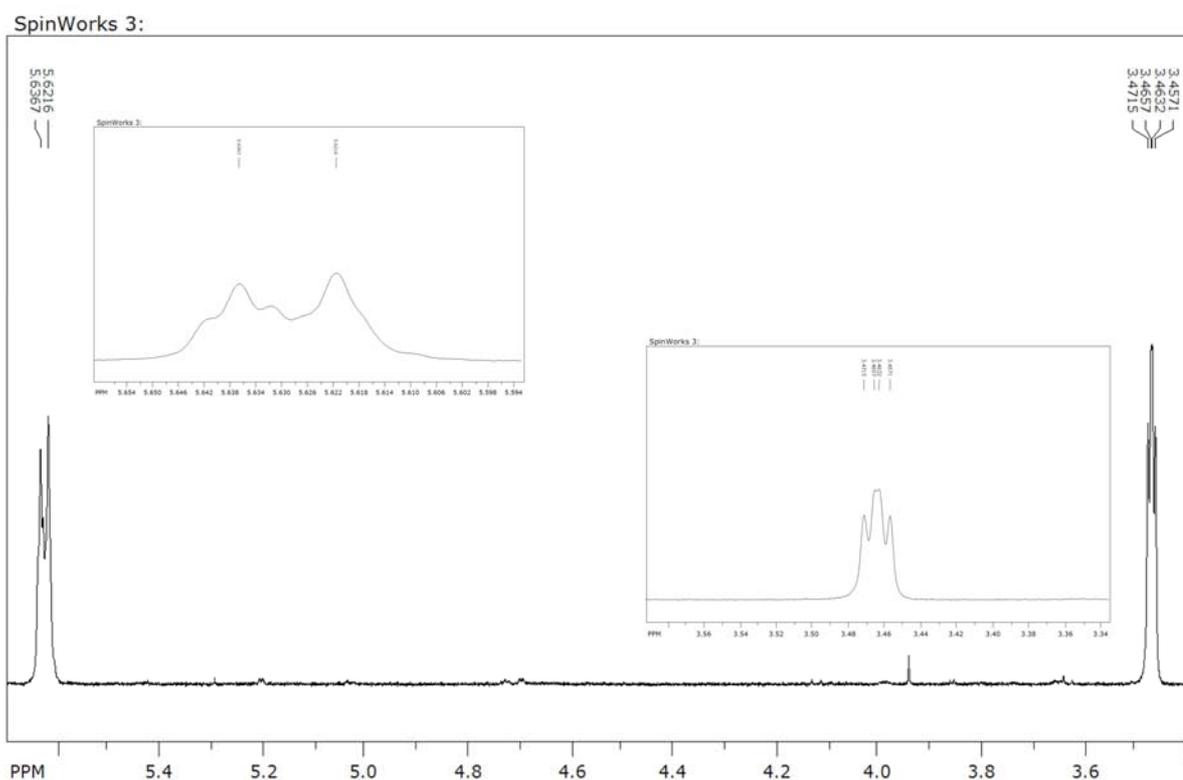


FIGURA 4.71 – Região relativa aos sinais desblindados do espectro de RMN ^1H de **17**.

Na região mais blindada do espectro observa-se, além dos sinais referentes aos grupos metilênicos entre δ_H 2,04 a 1,22, oito sinais referentes a grupos metílicos em δ_H 1,16; 1,14; 1,09; 1,04; 1,00; 0,99; 0,96 e 0,85, como mostra a FIGURA 4.72.

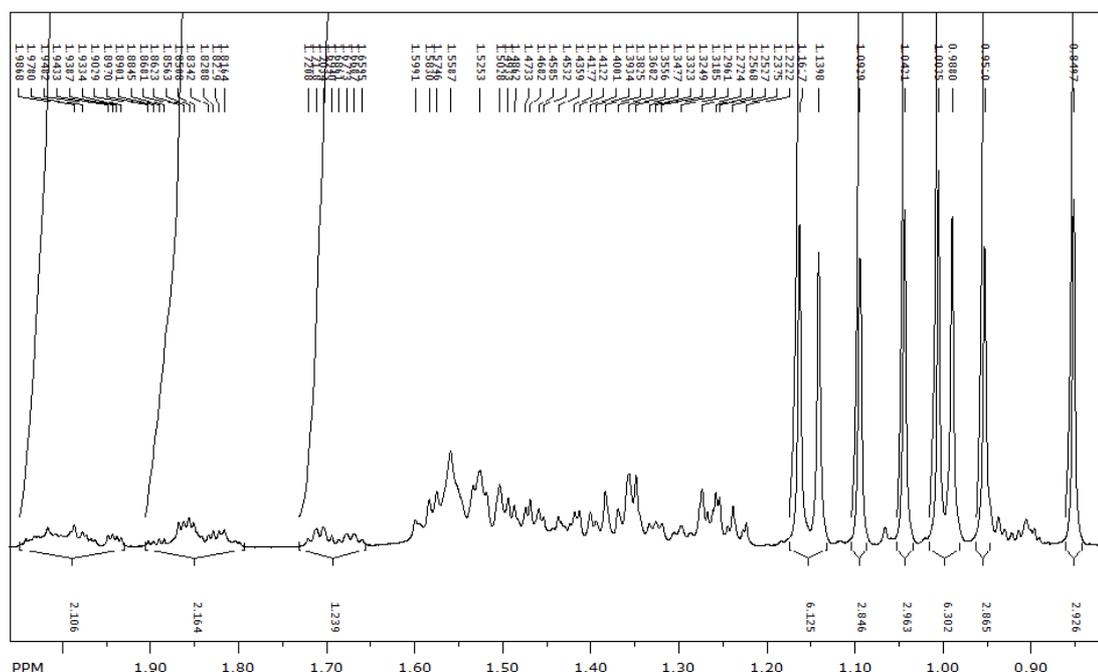


FIGURA 4.72 – Região relativa aos sinais blindados do espectro de RMN 1H de **17**.

O espectro de RMN de ^{13}C contém 30 sinais de deslocamentos químicos, sendo que foram observados, além dos sinais referentes à região de carbonos do tipo sp^3 metílicos, metilênicos, metínicos e quaternários não funcionalizados, um sinal em δ_c 76,3 referente ao carbono metínico ligado a hidroxila e dois sinais em δ_c 141,6 e 122,0 característicos de carbono do tipo sp^2 , como mostra a FIGURA 4.73.

Na análise do espectro de HSQC, foram observados os picos cruzados entre δ_H 3,46 / δ_c 76,3; δ_H 5,63 / δ_c 122,0, mostrando que o carbono em δ_c 141,6 trata-se de um carbono totalmente substituído, indicando o posicionamento da dupla ligação em C-5. Os picos cruzados referentes aos grupos metílicos foram observados entre δ_H 1,16 / δ_c 32,0; δ_H 1,14 / δ_c 25,4; δ_H 1,09 / δ_c 19,6; δ_H 1,04 / δ_c 28,9; δ_H 1,00 / δ_c 18,2; δ_H 0,99 / δ_c 32,4; δ_H 0,96 / δ_c 34,5 e δ_H 0,85 / δ_c 16,2.

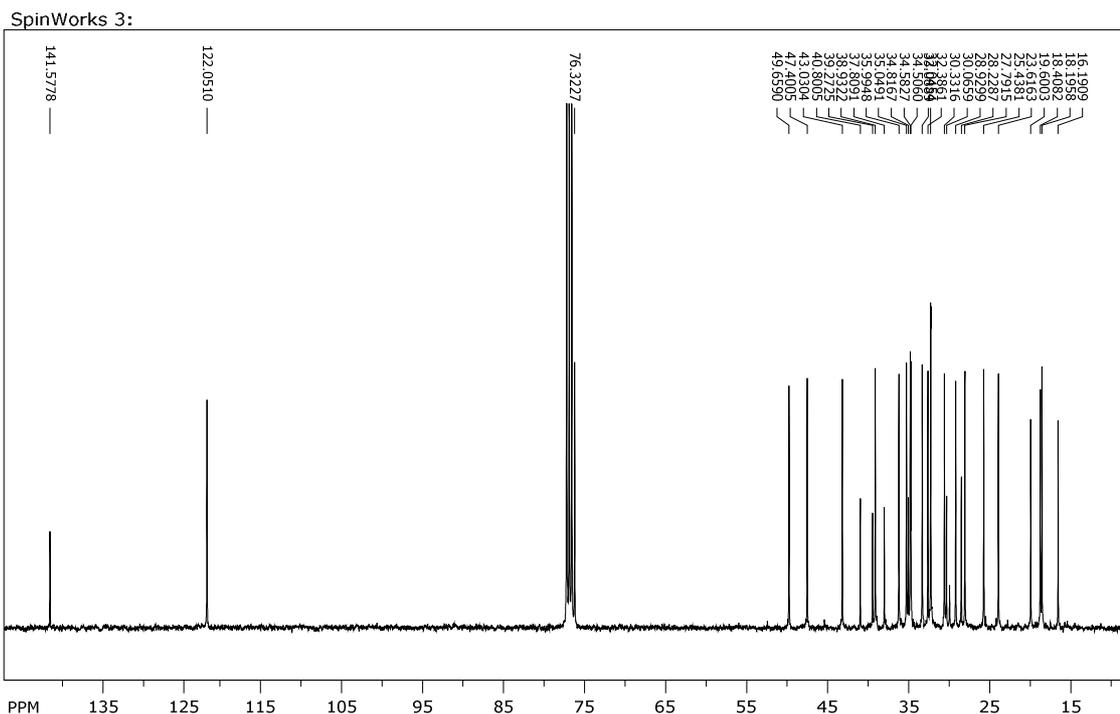


FIGURA 4.73 – Espectro de RMN de ^{13}C do composto **17**.

Assim, através destas análises e em comparação com a literatura (GONZÁLEZ et al., 1987), foi possível a confirmação do isolamento do composto triterpênico pentacíclico do tipo oleanano conhecido como 3 β -hidróxiglutin-5-eno (**17**). A Tabela 4.8 apresenta os dados de RMN de ^{13}C de **17** em comparação com a literatura (GONZÁLEZ et al., 1987).

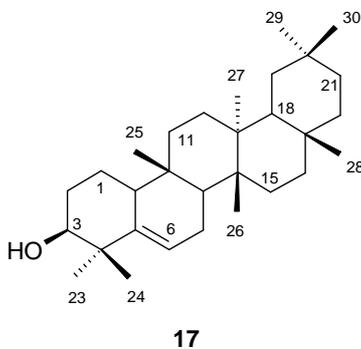


TABELA 4.8 - Dados de deslocamentos de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) do 3 β -hidróxiglutin-5-eno (**17**) e comparação com a literatura

H	δ_c	δ_c Lit.
1	18,2	18,3
2	27,8	27,9
3	76,3	76,4
4	40,8	40,9
5	141,6	141,7
6	122,0	122,1
7	23,6	23,7
8	47,4	47,5
9	34,2	34,9
10	49,7	49,8
11	33,1	33,2
12	30,3	30,4
13	37,8	37,9
14	39,3	39,4
15	34,6	34,7
16	36,0	35,1
17	30,3	30,1
18	43,0	43,2
19	35,0	35,1
20	28,2	28,3
21	32,0	32,2
22	38,9	39,0
23	28,9	29,0
24	25,4	25,5
25	16,2	16,2
26	18,2	18,4
27	19,6	19,6
28	32,4	32,4
29	32,0	32,1
30	34,5	34,6

4.1.4.2 – Mistura de olean-12-eno (18), β -amirenona (19) e friedelina (20)

As substâncias **18** - **20** foram identificadas em mistura contida na fração TSPH/02/02+03/01, proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos da partição hexânica do caule de *T. schomburgkianum*. Devido a pouca quantidade deste material, foi dado enfoque na análise via CG/EM por, além de ser uma técnica mais sensível em relação, por exemplo, à Ressonância Magnética Nuclear, poderia, em teoria, fornecer uma maior informação estrutural na diferenciação dos diferentes tipos de classes de terpenos pelas fragmentações propostas. Vale ressaltar que foram realizados os espectros de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz), porém estas informações foram utilizadas somente na confirmação da estrutura.

Na análise do espectro de CG/EM, foram vistas três bandas majoritárias durante a corrida cromatográfica, como mostra a FIGURA 4.74.

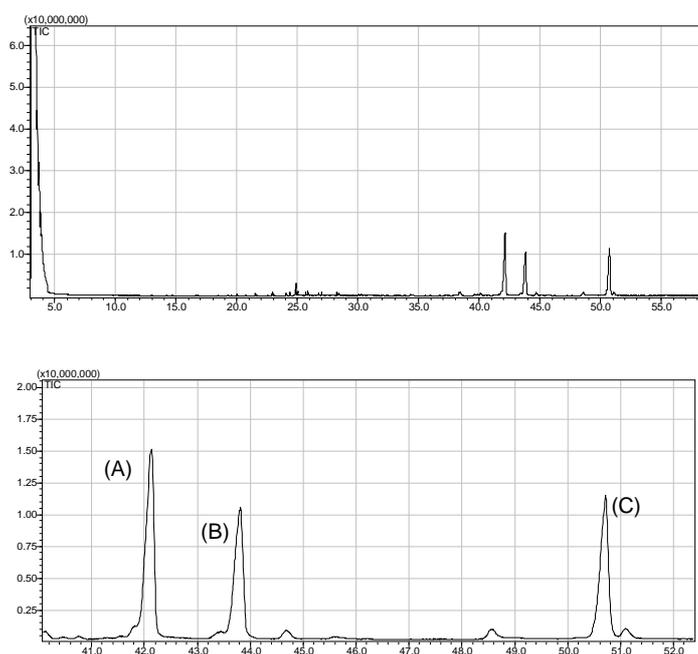


FIGURA 4.74 – Espectro de CG/EM, juntamente com a ampliação, da mistura de **18** - **20**.

Foram gerados os espectros de massas de cada uma das bandas e descritos conforme o aumento de seu tempo de retenção (Figura 4.75).

Ao analisar todos os espectros de massas, pode-se notar uma semelhança na faixa intermediária dos picos de massas, mais especificamente os íons m/z 218 e 205 (OGIHARA e tal., 2000; SHIOJIMA e tal., 1992). Por se tratar de uma mistura de triterpenos, isso gera uma dúvida quanto às suas classes. Assim, pela presença destes fragmentos, existiu uma grande possibilidade de se tratar de um esqueleto friedelano, ursano ou oleanano, juntamente com o posicionamento da dupla ligação em C-12 (Figura 4.76)

Vale ressaltar que todos os M^+ estabelecidos para os compostos descritos abaixo foram considerados como uma unidade de massa atômica a menos que o valor mostrado no espectro de massas, devido a um problema de calibração para as massas de alta unidade de massa atômica.

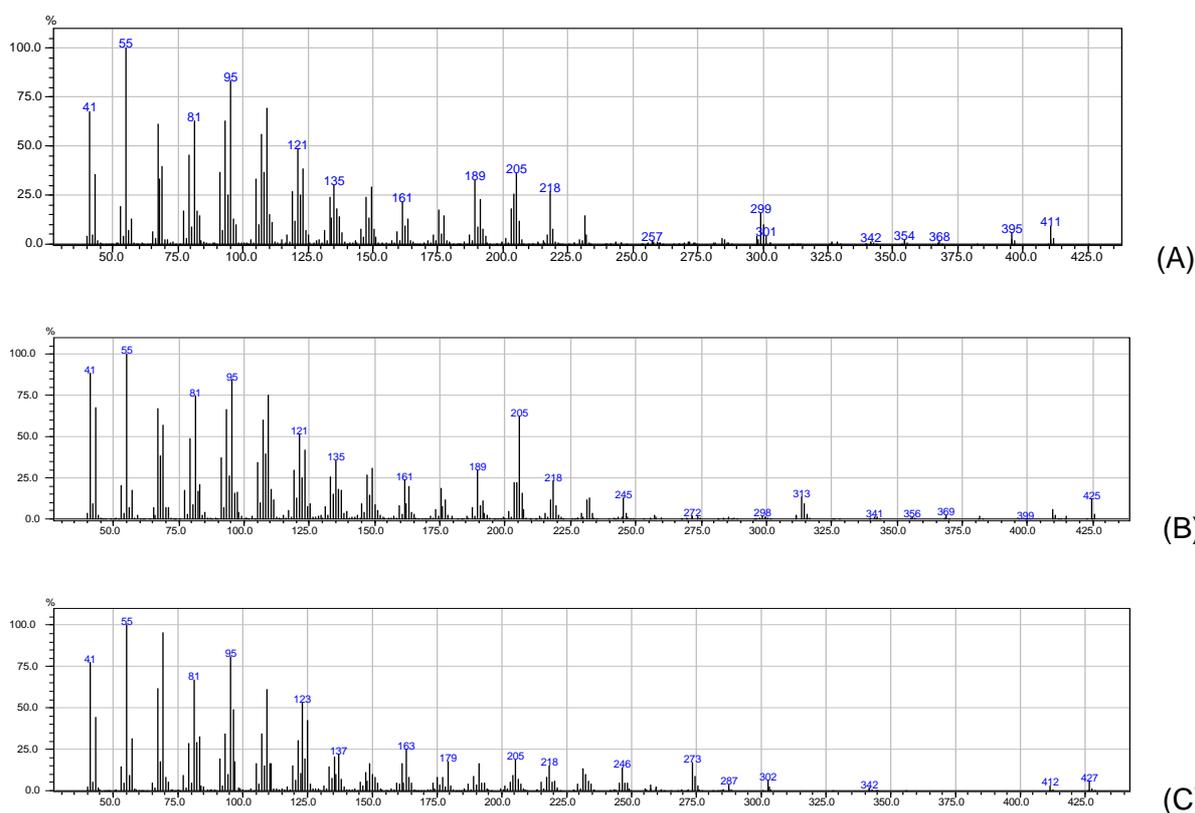


FIGURA 4.75 – Espectros de Massa: (A) primeira banda cromatográfica; (B) segunda banda cromatográfica e (C) terceira banda cromatográfica.

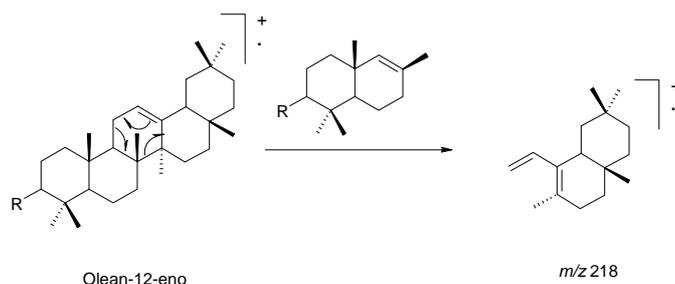


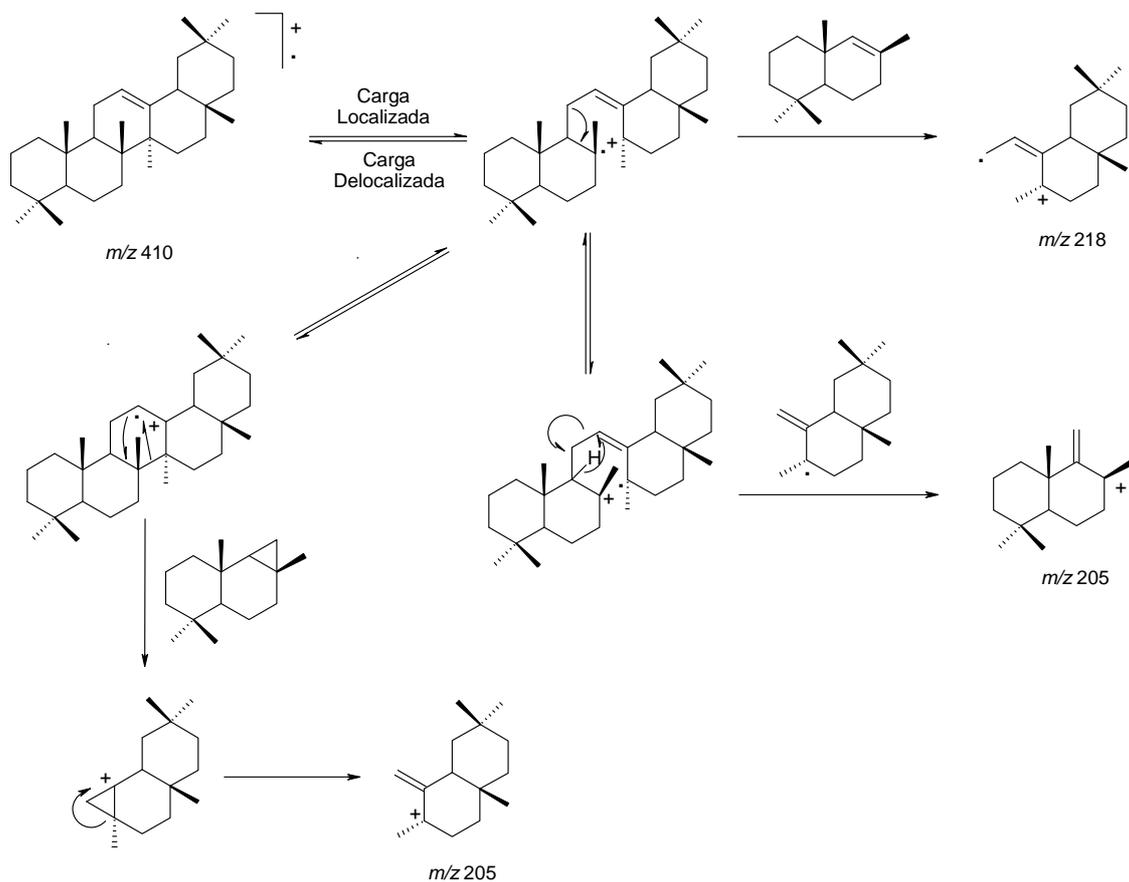
FIGURA 4.76 – Fragmentação do tipo Retro Diels-Alder gerando o fragmento m/z 218.

Para o espectro obtido em (A), a análise do último íon gerado como sendo o pico do íon molecular M^+ , m/z 411, obrigatoriamente esta molécula em questão deveria possuir um número ímpar do átomo de nitrogênio, sendo assim impossível para os compostos em discussão ou o equipamento se descalibrou para massas altas. Com isso, há duas possibilidades em assumir M^+ como sendo m/z 410 ou m/z 412, porém a última hipótese foi descartada pela ausência de um sinal referente a um hidrogênio oximetínico no espectro de RMN de 1H , indicando a probabilidade de não ter nenhum substituinte em C-3 ou a presença de carbonila naquela posição. Assim, a análise da fragmentação feita na FIGURA 4.76, assumindo M^+ como sendo m/z 410 e a formação do fragmento em m/z 218, o fragmento perdido passa a ser m/z 192, e a única possibilidade é possuir dois hidrogênios ligados em C-3 ($R = H$). Portanto, para a banda (A), o composto foi identificado como olean-12-eno (**20**), com base em comparação com a literatura (AGETA et al., 1995).

Para o espectro obtido em (B, FIGURA 4.75), há uma grande similaridade com o discutido anteriormente, com exceção de alguns íons e de possuir uma maior intensidade em m/z 205, mostrando pertencer à mesma classe de triterpeno, oleaneno. Juntamente com este fato, a presença agora de M^+ como sendo m/z 424, faz com que haja outro padrão de substituição em C-3 e, pela diferença das unidades de massa atômica com M^+ do composto discutido anteriormente, mostra agora a presença de um grupo carbonila em C-3.

Uma diferença significativa entre os espectros em (A) e (B) é vista no íon m/z 205, sendo que em (B) sua intensidade relativa é muito maior. Uma hipótese pode ser dada a uma maior contribuição de um determinado fragmento com a mesma unidade de massa atômica e que pode estar sendo influenciada, por

exemplo, por um determinado grupo funcional. Algumas possibilidades de fragmentações para os íons m/z 218 e m/z 205 das moléculas sem presença de substituinte em C-3 e com a substituição com o grupo carbonila em C-3 são mostrados abaixo (FIGURA 4.77).



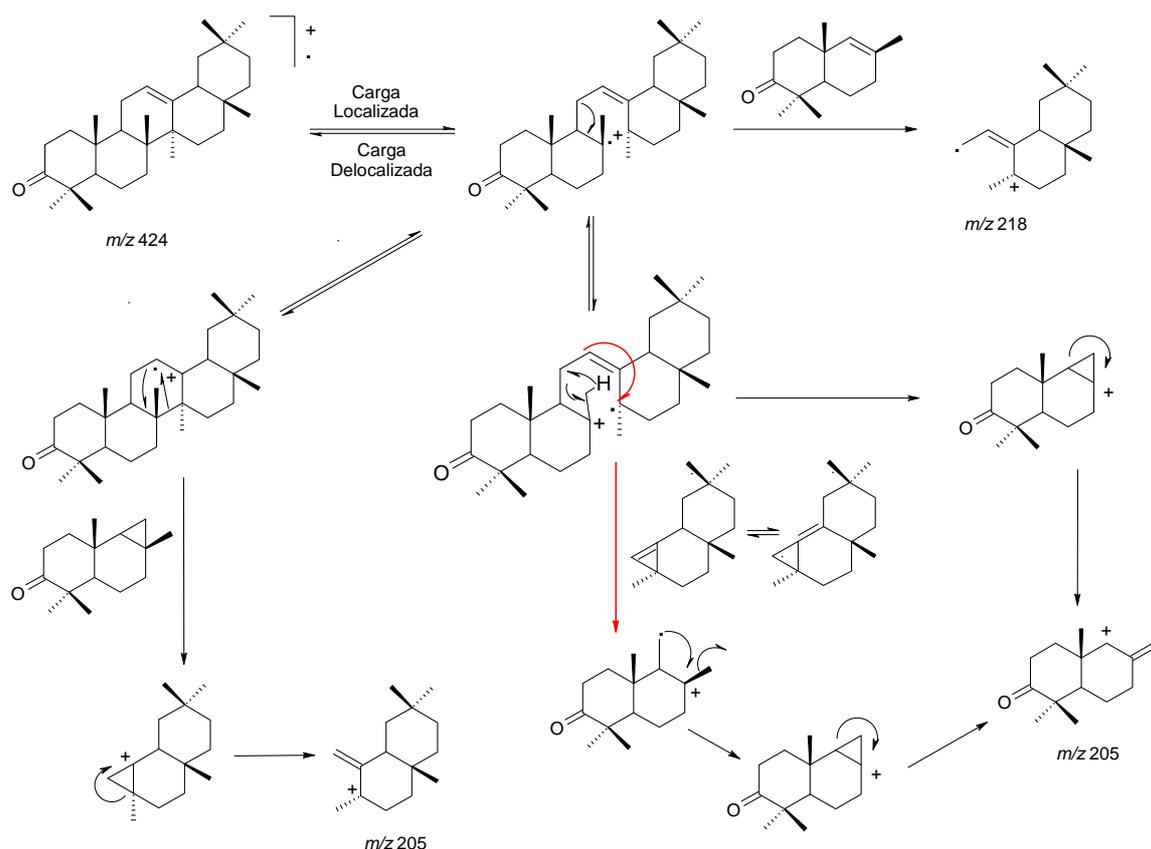


FIGURA 4.77 – Possibilidades de fragmentações para os íons em m/z 218 e m/z 205 para as moléculas sem substituição em C-3 e com a presença do grupo carbonila em C-3.

Com estas propostas de fragmentação, juntamente com dados da literatura (CARVALHO et al., 1998), foi identificado este composto como sendo 3-oxo-olean-12-eno (**19**), mais conhecido como β -amirenona.

Para a última banda observada (C), ao analisar o espectro de massas, principalmente M^+ em m/z 426 em comparação com o anterior (m/z 424), mostra um aumento de duas unidades de massa atômica, o que representa a possibilidade de não mais possuir uma dupla ligação na molécula. Com estes dados e comparação com a literatura (IGOLI & GRAY, 2008), este foi identificado como friedelan-3-ona (IGOLI & GRAY, 2008), que apresenta os íons em comum de 426 $[M]^+$; 302; 273; 218; 205; 163; 123 e 95 u.m.a. tendo intensidades semelhantes a **20**, (FIGURA 4.75) e este foi identificado como friedelan-3-ona (**20**), conhecida também como friedelina.

Assim, as estruturas identificadas na fração TSPH/02/02+03/01 como uma mistura ternária são ilustradas na FIGURA 4.78.

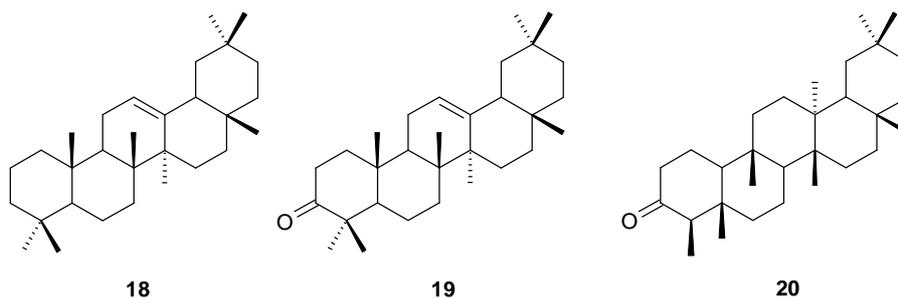


FIGURA 4.78 – Substâncias identificadas na fração TSPH/02/02+03/01.

4.1.4.3 – Lupeol (21)

O composto **21**, proveniente da fração TSPH/03+04/04/03/02/05, foi identificado como sendo o composto majoritário da mistura. Os compostos minoritários foram identificados e descritos no próximo item da presente tese.

No espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) desta fração foram observados sinais característicos de compostos com o esqueleto triterpênico, como relatado anteriormente (FIGURA 4.79).

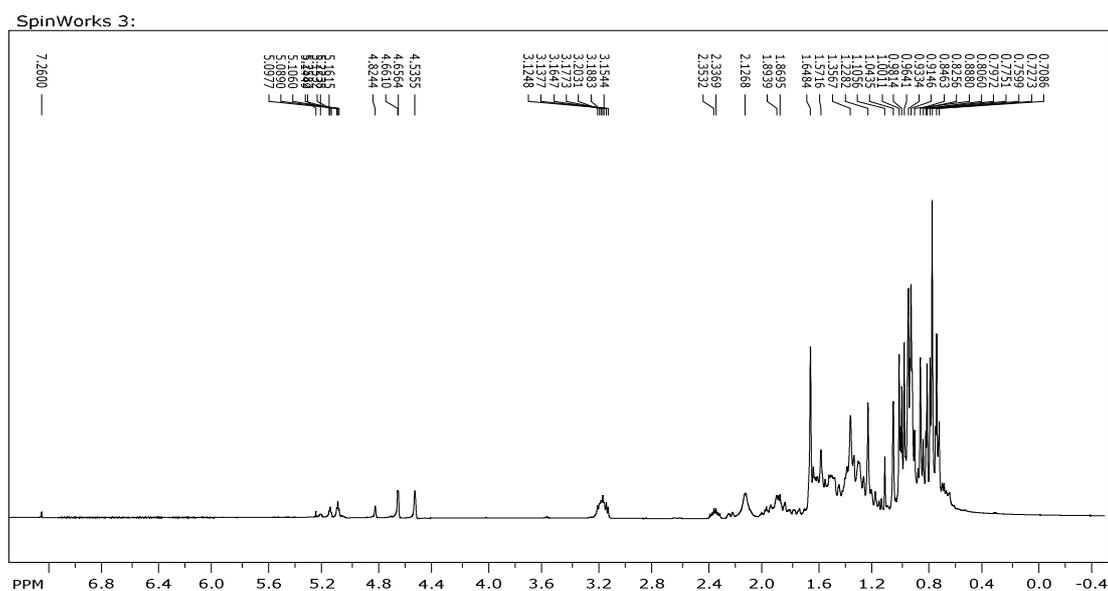


FIGURA 4.79 – Espectro de RMN de ^1H da fração TSPH/03+04/04/03/02/05.

Pode se observar que, além da região referente aos deslocamentos químicos dos grupos metílicos, metilênicos, metínicos não funcionalizados, existem sinais referentes a hidrogênio oximetínico e hidrogênios ligados a carbono de hibridação sp^2 . Isto leva a possibilidade de haver um triterpeno com um grupo hidroxila ligado em C-3, como foi verificado no composto **17**, porém a presença de um singlete em δ_H 1,65 (referente a um grupo metilênico ligado a carbono sp^2) e os sinais em δ_H 4,66 (*d*, $J = 2,3$ Hz) e δ_H 4,53 (*ddd*, $J = 1,2$ e $2,3$ Hz) demonstram que não mais se trata de uma dupla ligação endocíclica, deve existir uma cadeia lateral no esqueleto triterpênico devido a estes sinais observados. Portanto, devido a estas observações, esta molécula pertence à classe dos triterpenos do tipo lupano, e com os deslocamentos químicos vistos, mostram ser característicos do composto lupeol.

Para a comparação com o composto lupeol (padrão), foi registrado o espectro de RMN de 1H do mesmo e comparado com a fração TSPH/03+04/04/03/02/05, como mostra a FIGURA 4.80.

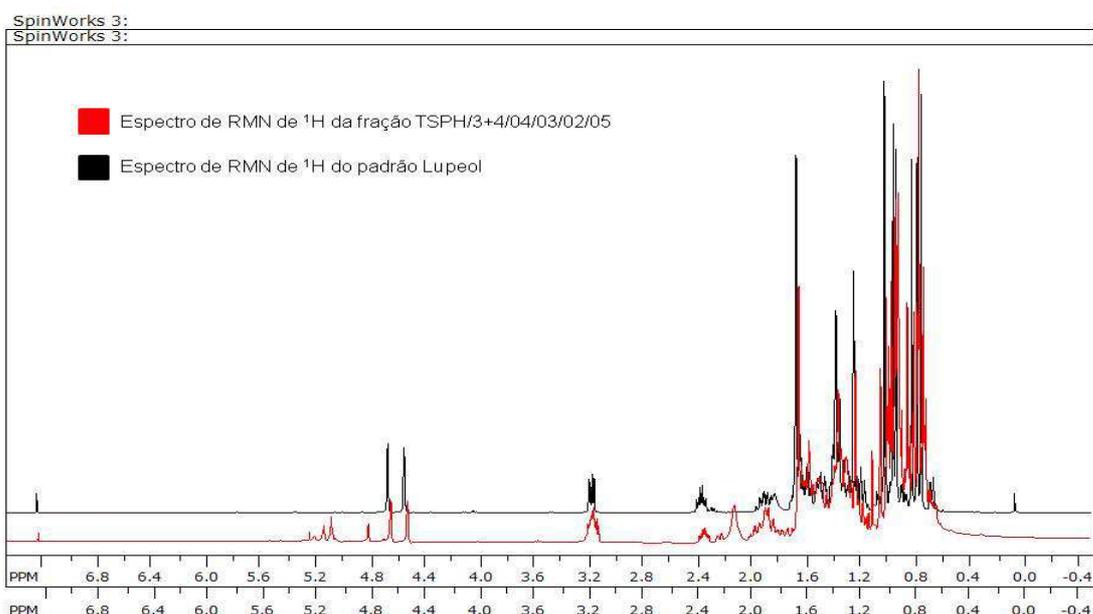


FIGURA 4.80 – Comparação dos espectros de RMN de 1H entre o padrão lupeol e a fração TSPH/03+04/04/03/02/05.

Esta fração foi injetada no CG/EM, juntamente com o padrão lupeol, como mostra a FIGURA 4.81.

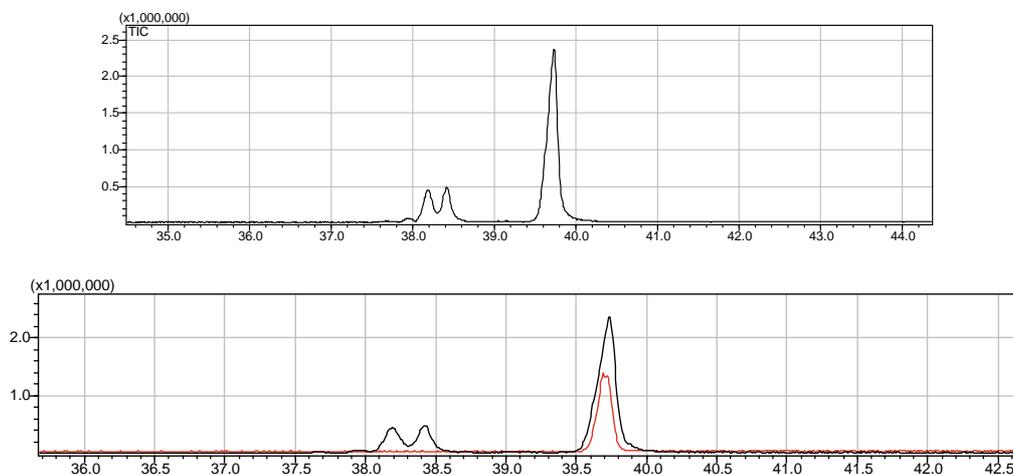


FIGURA 4.81 – Espectro de CG/EM da fração TSPH/03+04/04/03/02/05, junto com a comparação com o padrão lupeol (em vermelho).

Assim, a estrutura referente ao composto majoritário identificada na fração TSPH/03+04/04/03/02/05 é mostrada na FIGURA 4.82.

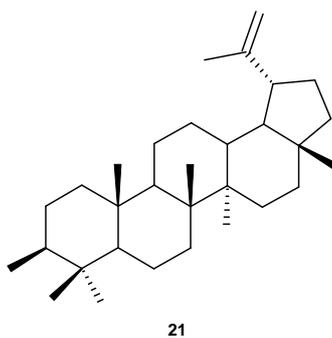


FIGURA 4.82 – Substância **21** identificada na fração TSPH/03+04/04/03/02/05.

4.1.4.4 – Mistura de β -amirina (22) e α -amirina (23)

As substâncias **22** e **23** provenientes da fração TSPH/03+04/04/03/02/05 foram identificadas como sendo os compostos minoritários da mistura, como mostrado no cromatograma descrito no item anterior (FIGURA 4.83).

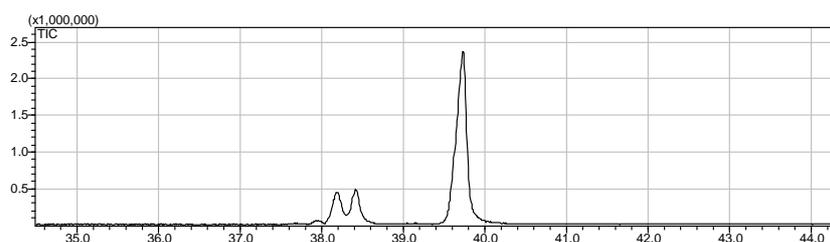


FIGURA 4.83 – Cromatograma de CG/EM da fração TSPH/03+04/04/03/02/05 e a presença dos minoritários **22** e **23**.

Na tentativa da identificação dos compostos minoritários, inicialmente realizou-se análise no espectrômetro de massas, através de infusão direta utilizando a fonte APCI, nos modos *full scan* e *product ion* (FIGURA 4.84). Esta análise não mostrou suficiente para a identificação dos mesmos, pois uma hipótese foi levantada nesta parte, se existe a possibilidade da presença de massas moleculares idênticas dos compostos minoritários juntamente com o lupeol e, portanto, somente a realização de uma infusão direta não distinguiria os compostos minoritários, diferentemente da realização de um experimento de CG/EM com a separação de cada banda cromatográfica.

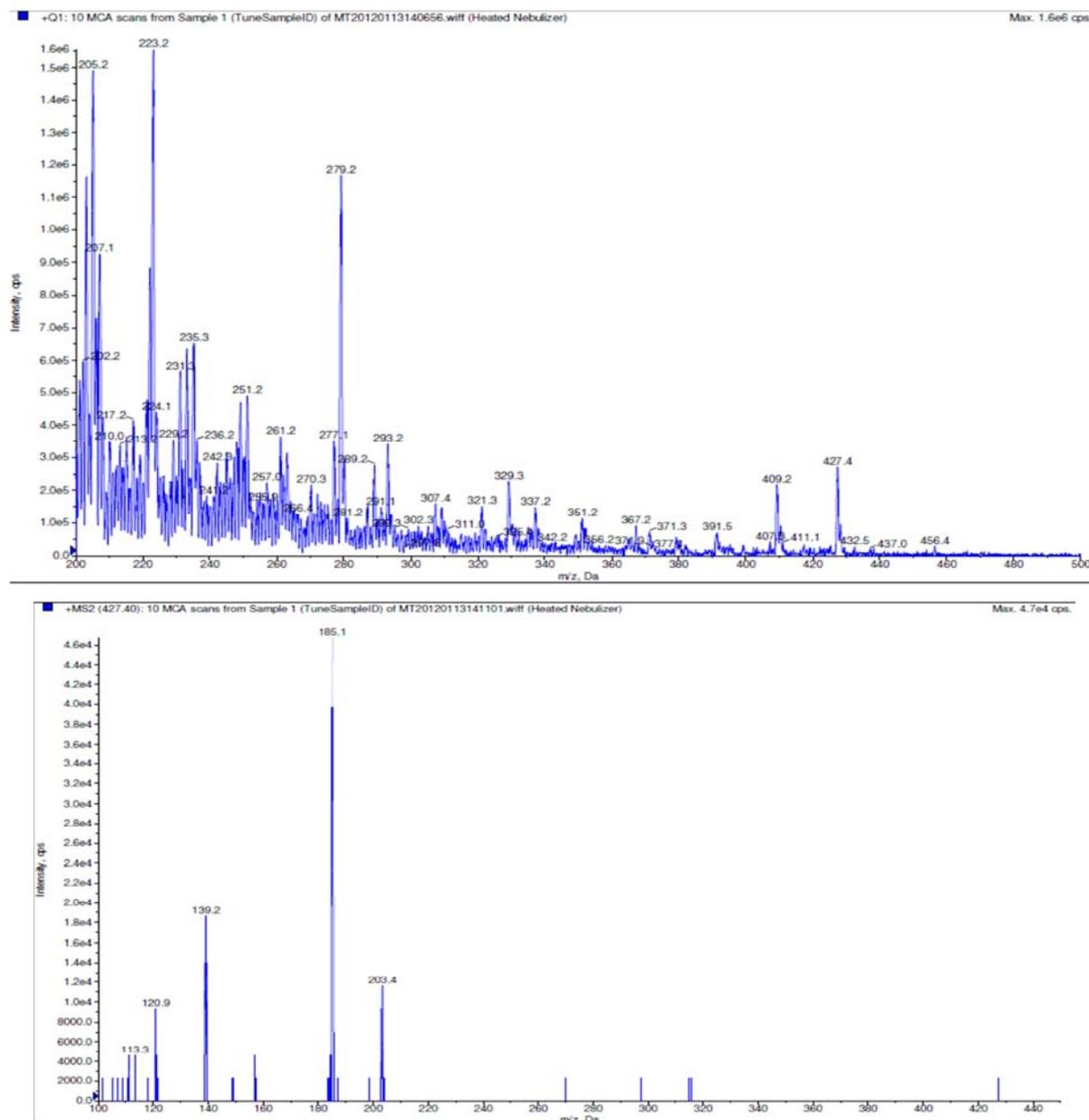


FIGURA 4.84 – Espectro de massas no modo *full scan* da fração TSPH/03+04/04/03/02/05, juntamente com o espectro no modo *product ion* do íon m/z 427.

Assim, foram analisadas as bandas minoritárias através dos espectros de massas por impacto eletrônico gerados das mesmas (FIGURAS 4.85 e 4.86). A análise mais detalhada indica presença novamente de compostos da classe dos terpenos pelas fragmentações características já discutidas.

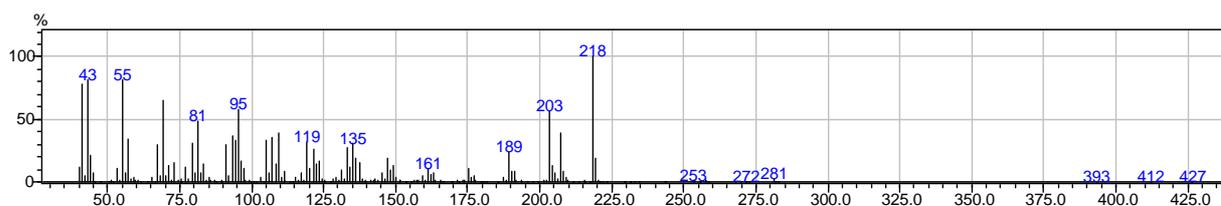


FIGURA 4.85 – Espectro de massas via CG/EM da primeira banda minoritária proveniente da fração TSPH/03+04/04/03/02/05.

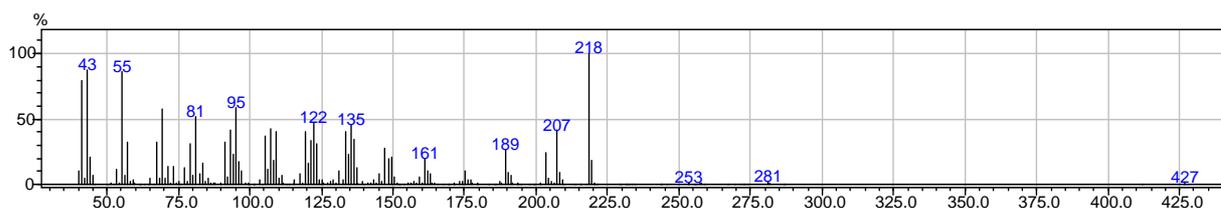


FIGURA 4.86 – Espectro de massas via CG/EM da segunda banda minoritária proveniente da fração TSPH/03+04/04/03/02/05.

Como já foi discutido no item anterior, o composto majoritário presente nesta fração está em quantidade muito alta em relação aos outros dois compostos, visto que no espectro de RMN de ^1H não se define os sinais característicos dos compostos minoritários por estarem em uma relação sinal/ruído muito baixa, o que é esperado, visto que esta técnica não se mostra tão sensível comparada com a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Assim, a partir de uma análise detalhada dos fragmentos, juntamente com comparação com a literatura (ASSIMOPOULOU & PAPAGEORGIOU, 2005) e eles apresentarem grande similaridade e a presença do pico base com m/z 218, relativo ao retro-Diels-Alder da molécula, indica a presença de compostos da classe dos oleananos e ursanos com insaturação em C-12. Os demais fragmentos possuem m/z 203 e 207 (FIGURA 4.87).

Com base nestas informações e principalmente por comparação dos espectros relatados no trabalho de DIAS et al. (2011), foram identificadas as substâncias como β -amirina (**22**) e α -amirina (**23**). Dias e colaboradores (2011) efetuaram a separação destes isômeros através da Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência no modo semi-preparativo e confirmou as estruturas presentes através dos registros dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Em relação à fragmentação referente ao composto β -amirina, a transição entre m/z 218 à m/z 203, além de gerar um anel de seis membros, mais estável em relação ao outro composto, a clivagem homolítica com saída da metila torna a presença de um radical terciário, muito mais estável que as outras fragmentações apresentadas para a α -amirina. Assim sendo, com base nesta justificativa proposta, foi definida a primeira banda cromatográfica para **22** e a segunda para **23**.

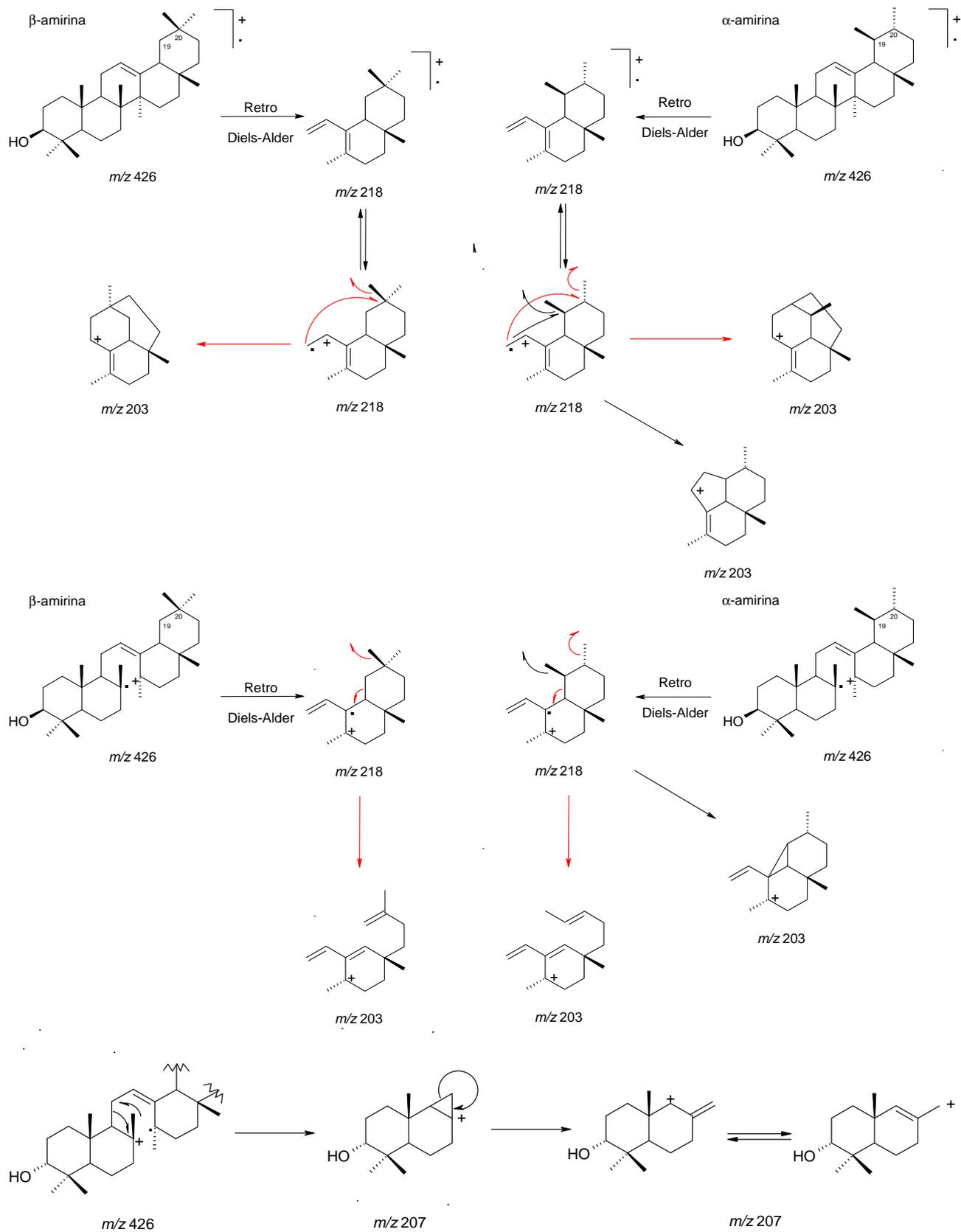


FIGURA 4.87 – Proposta de fragmentação para a diferenciação dos isômeros **22** e **23**.

4.1.5 – Flavonóides

4.1.5.1 – Flavona (24)

A substância **24**, presente na fração TSPH/07/04/05, proveniente dos sucessivos fracionamentos cromatográficos da partição hexânica do caule de *T. schomburgkianum* foi identificada como sendo um flavonóide da classe da flavona, sem a presença de nenhum substituinte em seu anel aromático, cujo nome IUPAC é 2-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona (**24**). Este composto já é descrito na literatura juntamente com suas atividades biológicas (VALDAMERI et al., 2010), porém o seu isolamento de Anacardiaceae nunca foi descrito.

O espectro de RMN de ^1H mostrou a presença, além de sinais de deslocamentos químicos referentes à impureza, sinais com características de hidrogênios aromáticos desblindados, característicos da classe dos flavonóides (FIGURA 4.88, RMN de ^1H , CD_3OD , 400 MHz).

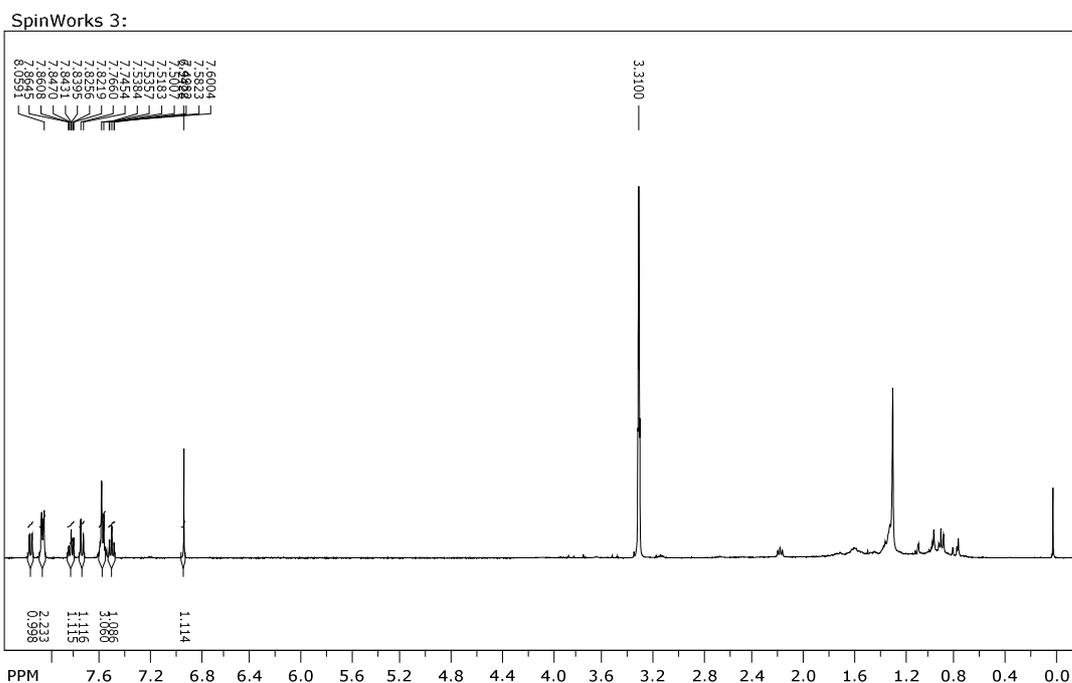


FIGURA 4.88 – Espectro de RMN de ^1H da substância **24**.

A partir da ampliação dos sinais referentes ao composto (FIGURA 4.89), a presença de um singlete em δ_H 6,96 determinou a presença de um esqueleto típico de um flavonóide, sendo este característico de hidrogênio H-3 presentes em flavonas. Em relação à região aromática, foram verificados a presença de 9 sinais para os hidrogênios, mostrando que a mesma não possui nenhum substituinte nos anéis A e B. Assim, somente com o registro dos espectros de 1D tornaria difícil distinguir cada sinal para sua correta atribuição. O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 4.90) mostrou a presença de 13 sinais para carbonos, já que a ausência de substituinte tornam os hidrogênios H-2` equivalente à H-6` e H-3` equivalente à H-5` e, conseqüentemente, o mesmo efeito com os carbonos ligados à estes hidrogênios, totalizando assim 15 carbonos.

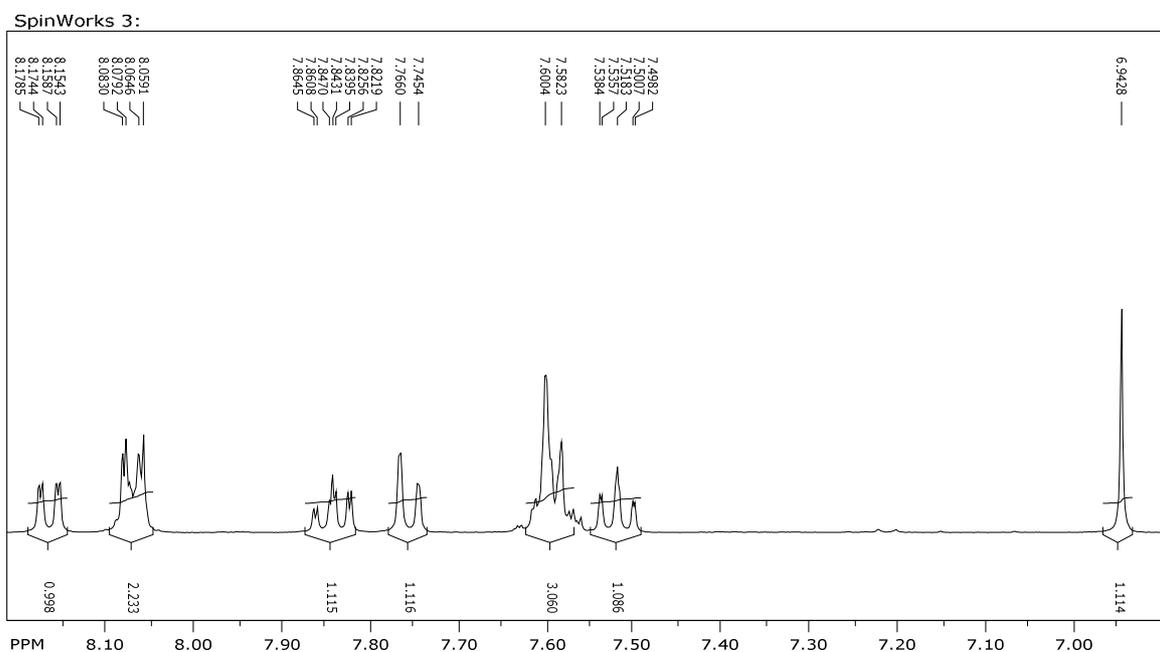


FIGURA 4.89 – Ampliação do espectro de RMN de 1H da substância **24**.

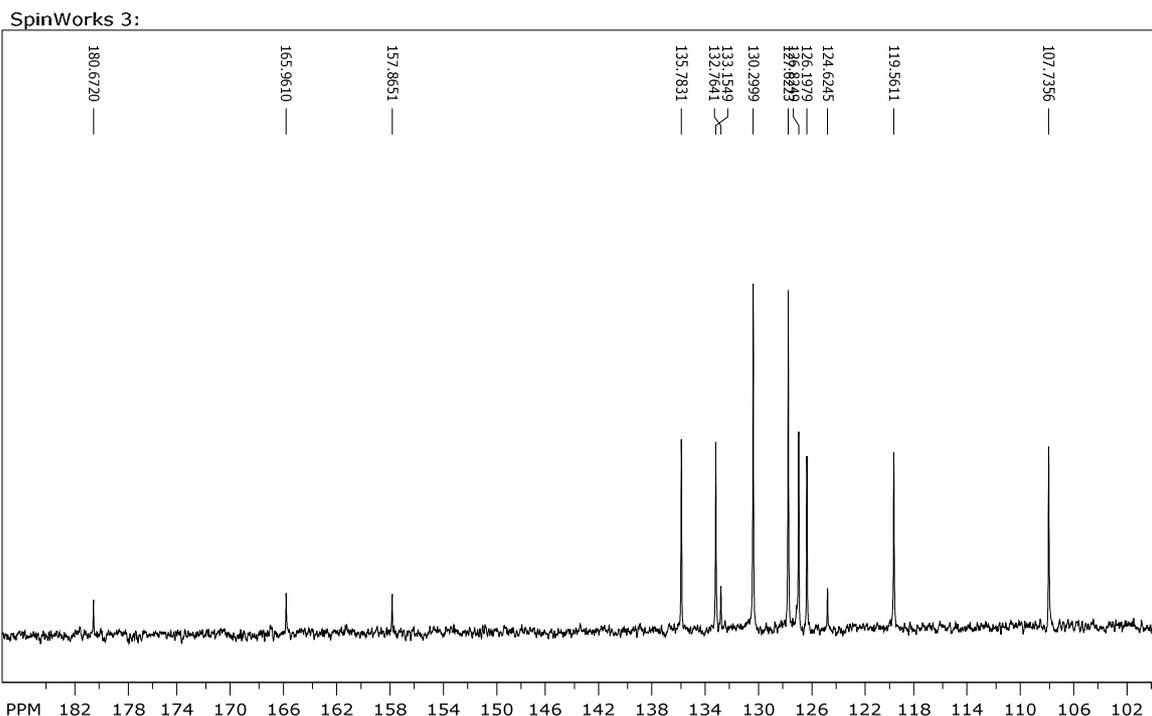


FIGURA 4.90 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância **24**.

A confirmação em relação à correta atribuição dos valores de deslocamentos e suas respectivas posições se deu através dos mapas de contornos HSQC (FIGURA 4.91) e HMBC (FIGURAS 4.92 e 4.93). Vale ressaltar que, apesar da molécula já ser descrita em artigos especializados, em relação à atribuição de deslocamentos químicos, não foi possível encontrar dados confiáveis para a molécula em questão.

A partir da análise dos mapas de contornos mostrados abaixo, onde foram atribuídos todos os carbonos e hidrogênios, assim como as correlações a longa distância, principalmente os picos cruzados entre H-3 / C-4, C-4a, C-2 e C-1` e H-6 / C-8 e C-4a (TABELA 4.9), aliada a informação obtida através da análise via CG/EM ($[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 222, M^+ e P.B.), como mostrado na FIGURA 4.94, confirmou a estrutura de **24**.

SpinWorks 3:

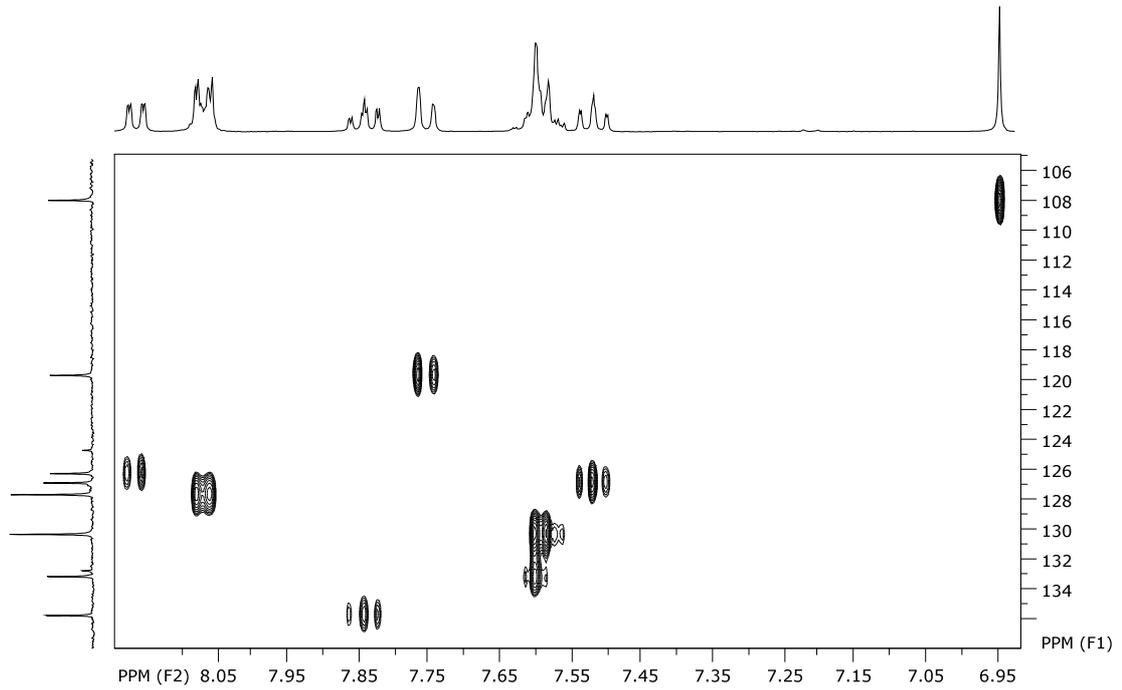


FIGURA 4.91 – Mapa de contornos HSQC da substância **24**.

SpinWorks 3:

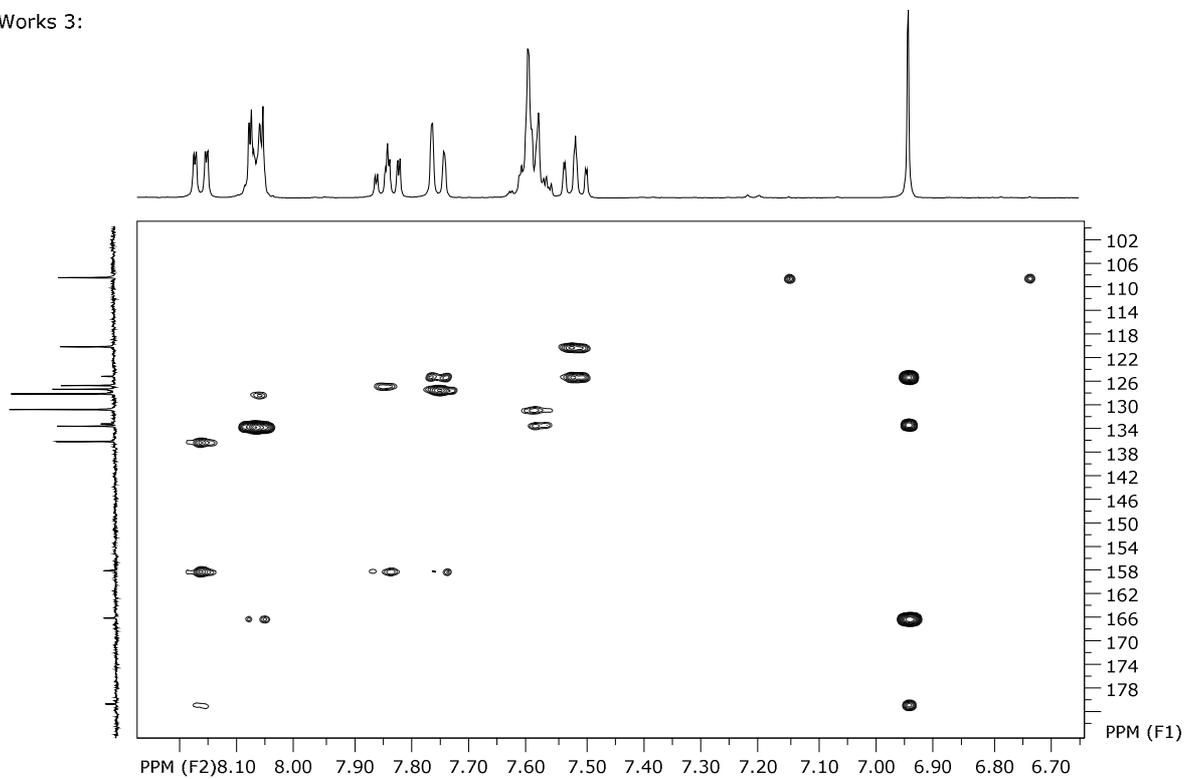


FIGURA 4.92 – Mapa de contornos HMBC da substância **24**.

SpinWorks 3:

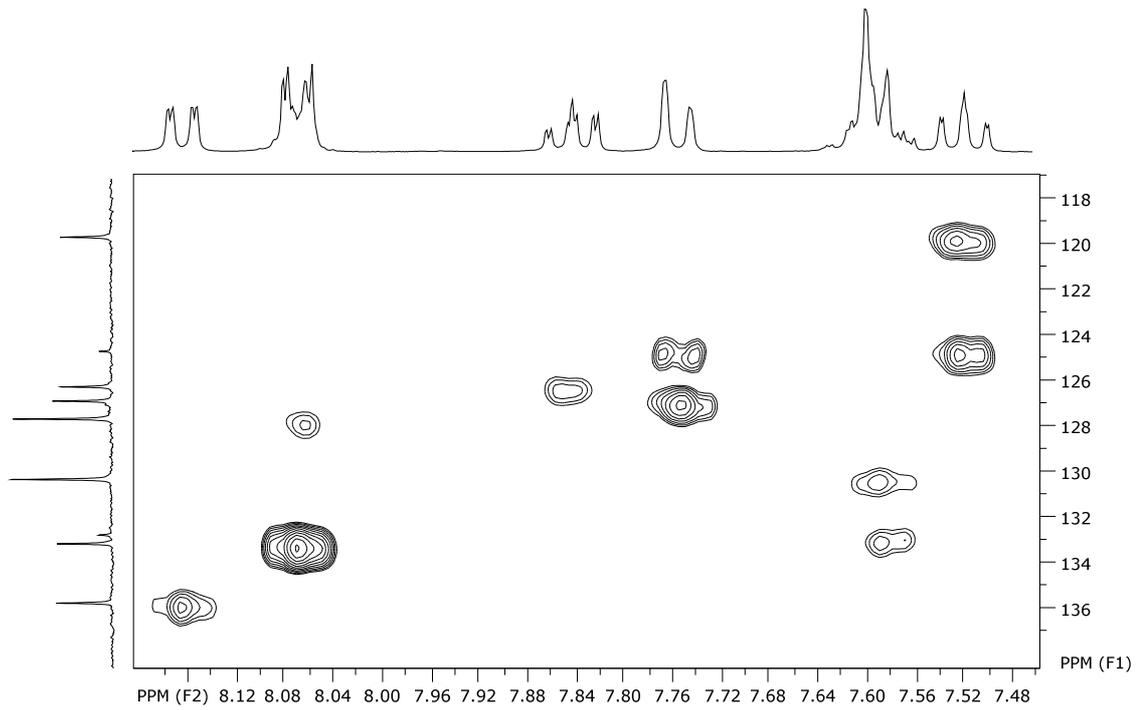


FIGURA 4.93 – Ampliação do mapa de contornos HMBC da substância **24**.

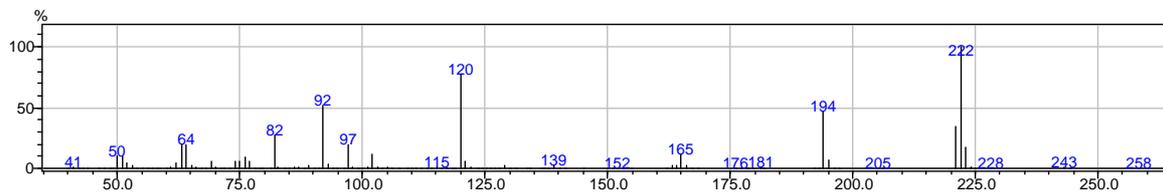
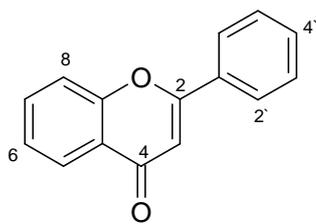


FIGURA 4.94 – Espectro de massas via CG/EM de **24**.



24

TABELA 4.9 - Dados de deslocamentos de RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) de **24**

Posição	δ_{H} (J)	δ_{C}
2	-	165,96
3	6,94 s	107,73
4	-	180,67
4a	-	124,62
5	8,17 <i>dd</i> (8,0 e 1,6 Hz)	126,20
6	7,52 <i>td</i> (8,0 e 1,0 Hz)	126,82
7	7,84 <i>ddd</i> (8,2; 8,0 e 1,6 Hz)	135,78
8	7,76 <i>dd</i> (8,2 e 1,0 Hz)	119,56
8a	-	157,87
1'	-	132,76
2'	8,07 <i>dd</i> (7,7 e 1,5 Hz)	127,62
3'	7,58 – 7,61 <i>m</i>	130,30
4'	7,58 – 7,61 <i>m</i>	133,15
5'	7,58 – 7,61 <i>m</i>	130,30
6'	8,07 <i>dd</i> (7,7 e 1,5 Hz)	127,62

4.2 – NANOPARTÍCULAS

Neste item deste presente trabalho será discutido todo o desenvolvimento das nanopartículas contendo compostos ativos, sendo que este foi realizado em duas partes, ou seja, o trabalho foi inicialmente realizado no Centro de Química Medicinal (CEQUIMED-UP) da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto sob co-orientação da Profa. Dra. Madalena Maria de Magalhães Pinto, onde foram obtidos resultados não tão satisfatórios, porém promissores para posterior estudo e melhoramento dos parâmetros avaliados. Finalmente esta parte do trabalho foi concluída no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, no Laboratório de Nanopartículas, sob co-orientação do Prof. Dr. Moacir Rossi Forim.

4.2.1 – Início do desenvolvimento das nanopartículas

Para o início do processo de encapsulamento foi estudado o composto alizarina, visto que, sendo este adquirido comercialmente, se dispôr de uma maior quantidade para os testes iniciais. Após estabelecimento dos parâmetros importantes, foi iniciado o estudo com o composto crisofanol.

Como parte inicial do trabalho, foram registrados os espectros de U.V. da alizarina e crisofanol, juntamente com a determinação de suas solubilidades em MeOH e ACN, para determinar o máximo de absorção para, posteriormente, ser analisada em HPLC. Para isso, foram colocadas as mesmas quantidades de alizarina (1,1 mg) em 2 mL de MeOH e ACN para ver a solubilidade neles. Para o ensaio em ACN, não houve completa solubilidade, permanecendo a amostra turva, diferentemente da solução preparada em MeOH. Assim, através de uma diluição, foi obtida uma nova solução de 50 μ M e obtido seu espectro de U.V., como mostrado abaixo pela FIGURA 4.95.

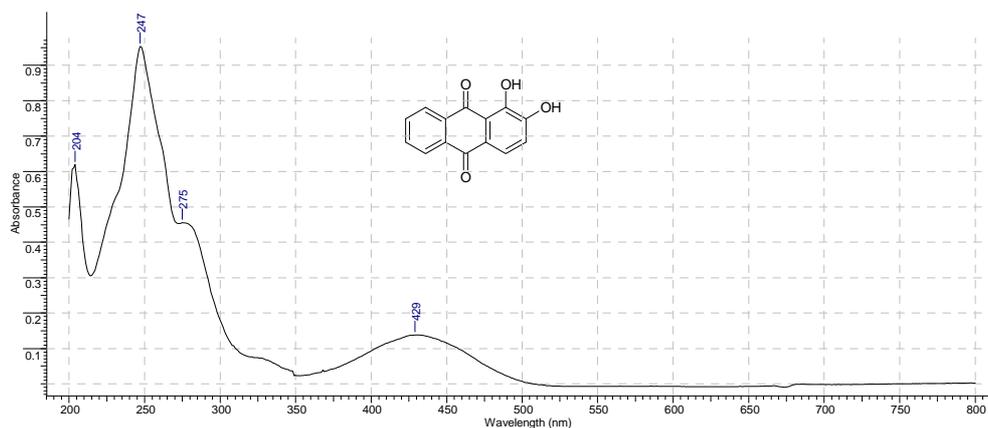


FIGURA 4.95 - Espectro de U.V. em MeOH do composto alizarina.

A partir da determinação do comprimento de onda a ser utilizado nas análises em HPLC (λ 247 nm), e após diversos testes cromatográficos em busca de uma otimização da metodologia de análise, foi definido a utilização da coluna Nucleosil C18 (ϕ 4,6 x 250 mm, 5 μ m), volume de injeção de 20 μ L, fluxo de 1 mL/min, tempo de corrida em 10 minutos utilizando como fase móvel o sistema MeOH:H₂O 8:2.

Para o composto crisofanol foi utilizado o mesmo procedimento descrito acima para a obtenção do espectro de U.V. em MeOH como é mostrado abaixo através da FIGURA 4.96.

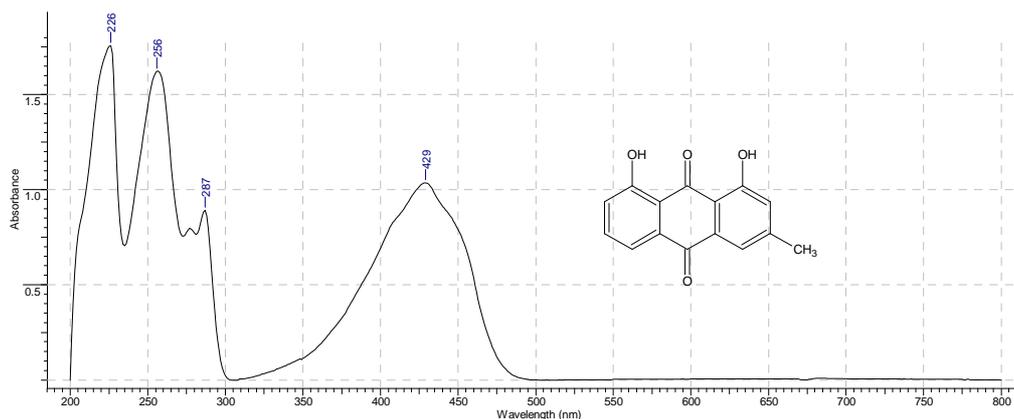


FIGURA 4.96 - Espectro de U.V. em MeOH do composto crisofanol.

A partir da determinação do comprimento onda utilizado nas análises em HPLC (λ 257 nm), os parâmetros cromatográficos foram os mesmos otimizados para o composto alizarina.

A partir deste ponto, foi realizada uma busca de uma metodologia eficiente e estável para as nanopartículas, iniciando o trabalho utilizando protocolos de preparação já utilizados anteriormente pelo grupo de pesquisa (TEIXEIRA et al., 2005), preparando somente as nanoesferas com o polímero PLGA com volume final de 10 ml, cuja composição utilizada encontra-se descrita na TABELA 4.10.

TABELA 4.10 – Composição das nanoesferas contendo Pluronic® F-68

Composição	Nanoesferas
Fase Orgânica	
PLGA	50 mg
Alizarina	Diferentes concentrações
Acetona	10 mL
Fase aquosa	
0,25% (w/v) Pluronic® F-68	10 mL

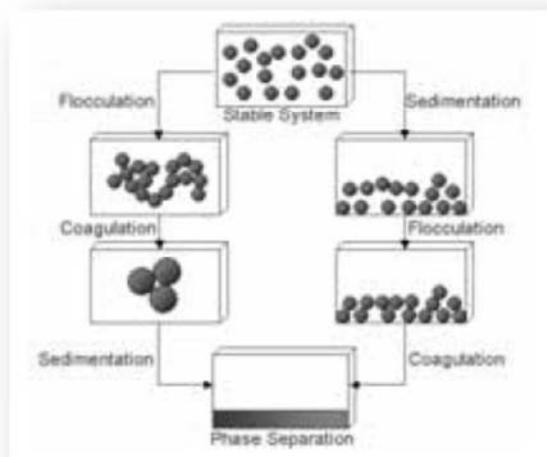
As concentrações utilizadas foram 150, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, sendo que em todos os casos (duplicata), houve instabilidade na formulação e a não formação das nanoesferas, ilustradas pela FIGURA 4.97.



Fonte: Foto do autor

FIGURA 4.97 – Exemplos de nanoesferas de PLGA contendo alizarina.

Ao analisar detalhadamente, provavelmente a instabilidade do sistema disperso causou a agregação, onde as partículas aderiram umas às outras, aumentando de tamanho sucessivamente. Inicialmente houve a formação de floculação, este podendo ou não sedimentar ou formar a separação das fases. Contudo, com a formação de partículas maiores e mais densas, houve a formação de coagulação, onde foi visível a formação de partículas mais densas que o meio (sedimentação) e a formação de creme pela formação de partículas menos densas que o meio. Todas estas observações foram vistas nos sistemas contendo os ingredientes contidos e já descritos na formulação em questão. A FIGURA 4.98 ilustra este processo de instabilidade.



Fonte: Adaptado de Zetasizer Nano Series Technical Note

FIGURA 4.98 – Diferentes mecanismos gerados no processo de instabilidade de uma dispersão.

Na tentativa de se obter uma formulação que fornecesse as nanoesferas estáveis, foi substituído o polímero PLGA pelo polímero PCL (BERNARDI et al., 2009) e utilizando a concentração do composto alizarina de 25 µg/mL em duas formulações diferentes (TABELA 4.11).

TABELA 4.11 – Composição das nanoesferas contendo Span 60 e Tween 80

1ª Formulação		2ª Formulação	
Composição		Composição	
Fase Orgânica		Fase Orgânica	
PCL	100 mg	PCL	50 mg
Alizarina	25 µg/mL	Alizarina	25 µg/mL
Span® 60	77 mg	Span® 60	77 mg
Acetona	27,32 mL	Acetona	27,5 mL
Fase aquosa		Fase aquosa	
77 mg Tween® 80	53 mL	77 mg Tween® 80	53 mL

A partir da preparação destas, a segunda formulação apresentou uma maior estabilidade, porém ainda não satisfatório, já que formavam aglomerados de polímero, causando assim um problema na formulação final. Apesar deste fator, foram confeccionadas nanoesferas com concentração de 75 e 50 µg/mL utilizando a segunda formulação para obter um valor estimativo em relação à análise da taxa de encapsulação.

Para as etapas seguintes, adição do açúcar (agente crioprotetor) e centrifugação foi testada em diversos sistemas contendo trealose e glucose em porcentagens diferentes (5, 4 e 3% para cada) e análise do tempo e rotação para a parte da centrifugação utilizando nanoesferas vazias. Assim, através dos resultados obtidos, foi verificado que a adição de 5% de glucose não causava nenhum tipo de instabilidade nas nanoesferas. Porém, na centrifugação, a utilização de 9000 rpm por 3 h não foi suficiente para a sedimentação das mesmas, sendo necessária a utilização de uma ultracentrífuga que disponha de rotações acima deste valor.

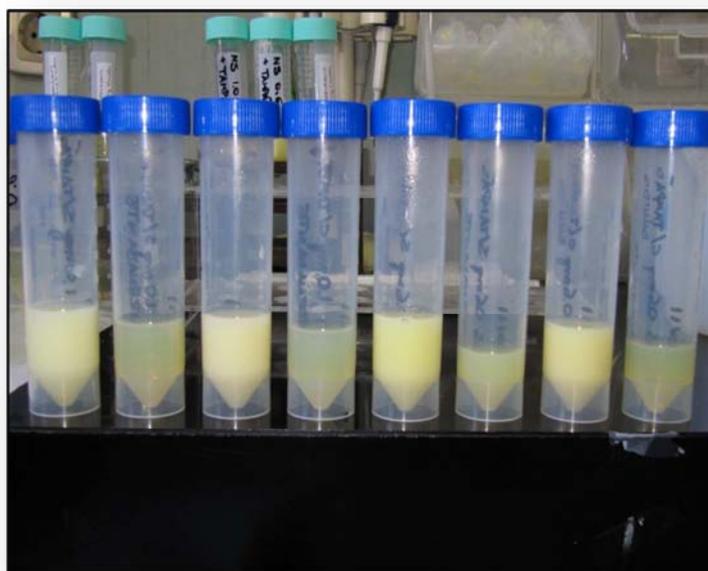
Em relação à adição do agente crioprotetor, este foi avaliado para posterior secagem do material através do processo de *freeze-drying*, com o objetivo de aumentar a estabilidade da formulação, quanto em manter as características físico-químicas, evitando alterações ou mesmo degradação do material ao longo do tempo de armazenagem. Este processo envolve três passos principais: congelamento ou solidificação do material, secagem primária (envolve a sublimação da água no estado sólido) e secagem secundária (desorção da água residual), e como este processo pode gerar muito estresse e desestabilizando a suspensão coloidal das nanopartículas, há a necessidade de se utilizar um agente crioprotetor a fim de proteger de possível agregação das nanopartículas durante o estresse causado pelo congelamento (ABDELWAHED et al., 2006).

Apesar de obter um melhor resultado utilizando esta nova formulação das nanoesferas, esta apresentava precipitação do polímero em algumas amostras e instabilidade no armazenamento a baixa temperatura. Assim, por estes aspectos, foi feito uma busca bibliográfica em artigos especializados para obter indicações sobre formulações que fornecessem um melhor comportamento no que diz respeito à estabilidade em todos os parâmetros descritos anteriormente. Assim, um procedimento encontrado (ZILI et al., 2005) que se aproximava mais dos dados já

obtidos, foi adotado porém com algumas modificações na formulação descrita pelo artigo (TABELA 4.12 e FIGURA 4.99).

TABELA 4.12 – Composição das nanoesferas contendo Span® 80 e Tween® 80

Composição	Nanoesferas
Fase Orgânica	
PCL	69 mg
Princípio ativo	Diferentes quantidades
Acetona	13 ml
Span® 80	25 mg
Fase aquosa	
Tween® 80	50 mg
Água	25 ml



Fonte: Foto do autor

FIGURA 4.99 – Exemplos de nanoesferas e nanocápsulas de PCL contendo crisofanol.

Ao verificar que esta metodologia fornecia nanoesferas estáveis, foram preparadas nanoesferas vazias para ajustar o valor de centrifugação que melhor resultasse na sedimentação da mesma. Assim foram realizados diversos testes variando a velocidade (10000 a 30000 rpm) e tempo (15 a 30 min) de permanência na centrífuga, obtendo assim um valor de 20000 rpm por 25 minutos a 20°C. Foi repetido o ensaio para determinar a quantidade do agente crioprotetor (trealose e glucose em diferentes concentrações) e obtendo o valor de 5% de massa em relação ao volume.

Com todos os parâmetros ajustados na preparação de nanoesferas, foram utilizadas diferentes quantidades dos compostos alizarina e crisofanol sem e com a presença de uma solução tampão fosfato 0,001M ajustado a pH 5,0 para avaliar uma possível melhora na taxa de encapsulação.

Para a busca de uma metodologia para as nanocápsulas, houve também problemas para obter uma formulação que apresentasse uma melhor estabilidade, sendo que foram testadas as mesmas composições acima descritas com a diferença da adição de um óleo (Myritol® 812 ou miristato de isopropila). Todas as formulações descritas acima com a presença deste óleo causaram também instabilidade para as nanocápsulas, exceto com a formulação modificada (ZILI et al., 2005).

Um fator importante foi verificar se a estabilidade poderia ser somente devido à mudança do polímero ou pela utilização do óleo. Para isso, foi testada a solubilidade dos compostos em miristato de isopropila e em benzoato de benzila, ambos já bastante relatados os seus usos na confecção de nanocápsulas. Para isso, foi testada a solubilidade da alizarina em miristato de isopropila e em benzoato de benzila, sendo que neste teste foi adicionada uma quantidade do composto até notar a saturação do mesmo no óleo. A FIGURA 4.100 mostra um dos testes comparando a solubilidade do composto alizarina em miristato de isopropila e benzoato de benzila.



FIGURA 4.100 – Miristato de isopropila (esq.) e benzoato de benzila (dir.), cada um contendo 5 mg de alizarina.

Assim, foi verificado que uma maior solubilidade se deu em benzoato de benzila, provavelmente pela maior interação π - π do anel aromático em relação às interações entre a carboxila do miristato de isopropila frente ao esqueleto antraquinônico. Aliado a esta observação, nas nanocápsulas, a porcentagem de composto encapsulado aumenta significativamente se o material que constitui o núcleo, neste caso o óleo, é um bom solvente para o composto em questão, ou seja, a maior solubilidade auxilia na porcentagem e na eficiência de encapsulação em termos de sua concentração (COUVREUR et al., 2002). Esta consideração é que torna as nanocápsulas mais vantajosas em relação às nanoesferas quando há uma necessidade de se obter o máximo de composto encapsulado, já que isto torna alta a capacidade de encapsulamento comparando com o baixo conteúdo polimérico (FRESTA et al., 1996).

Assim, a partir da escolha do benzoato de benzila como o óleo a ser utilizado, outro aspecto analisado foi a quantidade do mesmo na formulação. Sendo assim, foram testados diversos volumes de óleo (125 μ L, 150 μ L, 200 μ L e 250 μ L) e verificando se, após centrifugação, apresentava sobre a superfície gotículas de óleo não encapsulado. Com isso, foi determinado que o volume utilizado seria de 200 μ L de benzoato de benzila.

4.2.1.1 – Formulação das nanoesferas e nanocápsulas

Como foi descrito anteriormente, após diversas alterações e modificações na formulação, seguem abaixo as formulações iniciais para nanoesferas (TABELA 4.13) e nanocápsulas (TABELA 4.14) com todos os ingredientes otimizados.

TABELA 4.13 – Formulação inicial para nanoesferas

Composição	Nanoesferas
Fase Orgânica	
PCL	69 mg
Composto a ser encapsulado	Diferentes quantidades*
Acetona	13 mL
Span® 80	25 mg
Fase aquosa	
Tween® 80	50 mg
Água	25 mL

*Alizarina: 1,0; 0,6 mg e 0,6 mg utilizando uma solução tampão fosfato ajustada a pH 5,0.

Crisofanol: 1,0; 0,5; 0,2 mg e 0,2 mg utilizando uma solução tampão fosfato ajustada a pH 5,0.

TABELA 4.14 – Formulação inicial para nanocápsulas

Composição	Nanocápsulas
Fase Orgânica	
PCL	69 mg
Benzoato de benzila	200 µL*
Acetona	13 mL
Span® 80	50 mg
Fase aquosa	
Tween® 80	50 mg
Água	25 mL

* No volume de 200 µL utilizou-se da solução saturada, previamente preparada, após filtração em 0,45 µm.

4.2.1.2 – Determinação da taxa de recuperação e eficiência de encapsulação nas nanopartículas

Para a determinação da taxa de encapsulação das nanoesferas e nanocápsulas, juntamente com a determinação da quantidade máxima dos compostos dissolvidos em benzoato de benzila para as nanocápsulas com a quantidade máxima de composto, foram confeccionadas suas respectivas curvas de calibração e analisadas via HPLC. Em relação à determinação dos parâmetros supracitados, inicialmente, foi verificado que não haveria a existência de nenhum outro composto presente na composição que poderia estar coeluinto e interferindo na medição durante as análises via HPLC. Assim, foi obtido um espectro de U.V. da alizarina, crisofanol e benzoato de benzila (o único provável interferente na quantificação) para garantir que, tendo como base a escolha dos comprimentos de onda a ser utilizado e, conseqüentemente na determinação da quantidade de compostos encapsulados, não haveria a existência de nenhum outro composto em coeluição e garantindo assim que a medição seja o valor real existente na amostra. Para essa análise foi realizada também a injeção da mistura alizarina e crisofanol/benzoato de benzila. Os espectros de U.V. foram obtidos nas mesmas concentrações (20 µM) para os três compostos citados anteriormente (FIGURA 4.101).

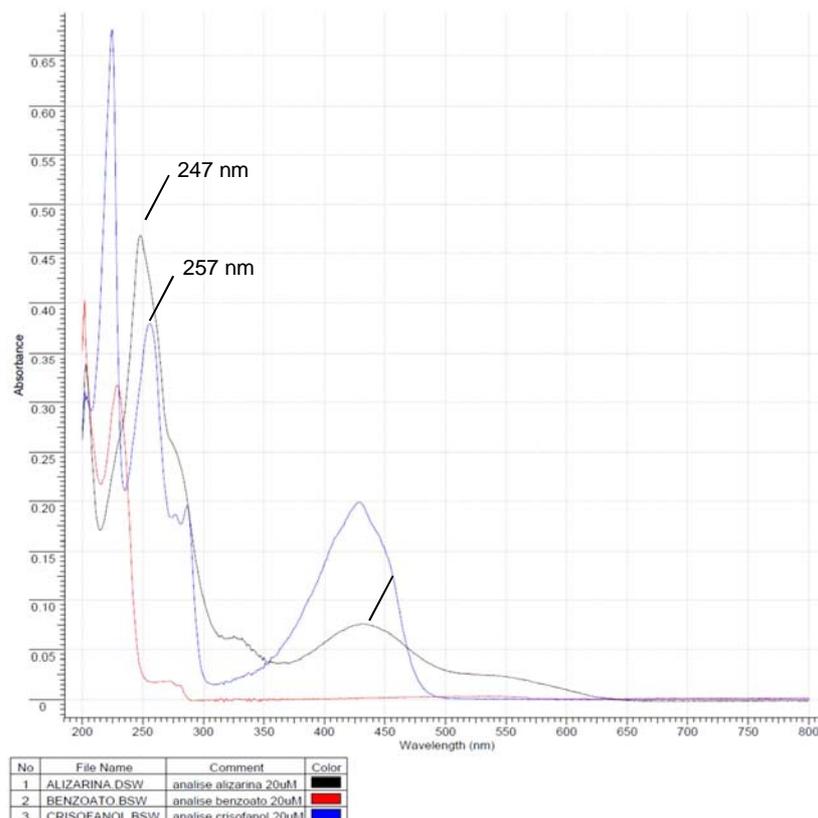


FIGURA 4.101 – Espectro de U.V. de alizarina, crisofanol e benzoato de benzila em iguais concentrações.

Como mostra a FIGURA 4.101, apesar da interferência na absorção do benzoato de benzila nos comprimentos de onda escolhidos para a análise da alizarina e do crisofanol, 247 e 257 nm, respectivamente, seria possível a análise de alizarina e crisofanol na presença do óleo por cromatografia. Assim, ao proceder à análise em HPLC, os resultados foram satisfatórios para a mistura crisofanol/benzoato de benzila, mas para a mistura alizarina/benzoato de benzila a diferença nos tempos de retenção foi muito pequena (0,02 min.), e mesmo para diferentes fases móveis (acetonitrila, isopropanol, butanol, hexano), diferentes fluxos, proporções e diferentes fases estacionárias (em fase normal houve uma separação, mas não total para permitir assim a quantificação). Uma alternativa para solucionar este problema foi trabalhar no comprimento de onda visível para a quantificação (430 nm) para as nanocápsulas, já que neste comprimento de onda não houve a interferência do óleo, sendo que para esta análise foram alteradas as concentrações para a curva de calibração pela menor detecção com relação à absorção. Portanto, para a análise das nanopartículas contendo alizarina foi feita a

247 nm para as nanoesferas e a 430 nm para as nanocápsulas e, para nanopartículas contendo crisofanol, a 257 nm para as nanoesferas e nanocápsulas.

4.2.1.2.1 – Curva de calibração para nanopartículas contendo alizarina e as respectivas porcentagens de encapsulamento

Para a realização das curvas de calibração foram obtidas soluções nas concentrações de 50; 25; 12; 9; 6; 3 e 1,5 µg/mL, preparadas a partir da solução estoque de 100 µg/mL em THF:MeOH 7:3, para as análises das nanoesferas (Figura 4.102).



FIGURA 4.102 – Curva de calibração da alizarina a 247 nm para análise das nanoesferas.

Em relação às nanocápsulas, foi utilizada uma solução estoque de 1000 µg/mL em THF:MeOH 7:3, e a partir da mesma foram preparadas soluções nas concentrações de 500; 250; 120; 90 e 60 µg/mL (Figura 4.103).



FIGURA 4.103 – Curva de calibração da alizarina a 430 nm para análise das nanocápsulas.

A partir das medições das áreas obtidas em triplicatas nas análises das nanopartículas pela integração das bandas de HPLC e seguido de interpolação através da equação da reta para cada uma das concentrações, foram obtidos os valores de taxa de encapsulação (TABELA 4.15).

TABELA 4.15 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.) das nanoesferas e nanocápsulas contendo alizarina

Quantidade (mg)	Conc. (µg/ml)	Média Área (mV), n=3	Desvio Padrão (Área)	%Rec. ± Desvio Padrão	%E.E. ± Desvio Padrão
Nanoesferas					
NSA 1,0	66,67	520,23	66,54	58,70 ± 4,13	92,30 ± 4,60
NSA 0,6	40,00	209,70	21,47	66,44 ± 2,85	96,29 ± 2,98
NSA 0,6 + Tampão a pH 5	40,00	244,67	16,35	70,87 ± 0,66	99,03 ± 1,11
Nanocápsulas					
6,15	40,97	63,79	1,54	90,48 ± 1,01	99,86 ± 1,27

Em relação às nanoesferas sem e com a presença da solução tampão, não houve uma mudança significativa nos resultados obtidos, uma vez que o composto não é totalmente insolúvel em H₂O e este fato provavelmente fez com que a adição do ácido não alterasse a concentração do composto presente nas nanoesferas.

4.2.1.2.2 – Curva de calibração para nanopartículas contendo crisofanol e as respectivas porcentagens de encapsulamento

Para a realização das curvas de calibrações foram utilizadas uma solução estoque de 100 µg/mL em THF:MeOH 7:3, preparada a partir das mesmas concentrações de 50; 25; 12; 9; 6; 3 e 1,5 µg/mL para as análises das nanoesferas e nanocápsulas (Figura 4.104).



FIGURA 4.104 - Curva de calibração do crisofanol a 257 nm para análise das nanoesferas e nanocápsulas.

A partir das análises em CLAE e em triplicatas para cada uma das concentrações e, a partir da medição das áreas obtida nas análises das nanopartículas e seguido de uma interpolação através da equação da reta, foram obtidos os valores de taxa de encapsulação (TABELA 4.16).

TABELA 4.16 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.) das nanoesferas e nanocápsulas contendo crisofanol

Quantidade (mg)	Conc. (µg/ml)	Média Área (mV), n=3	Desvio Padrão (Área)	%Rec. ± Desvio Padrão	%E.E. ± Desvio Padrão
Nanoesferas					
NSC 1,0	66,67	57,75	2,48	15,57 ± 0,61	98,87 ± 0,89
NSC 0,5	33,33	116,99	8,82	58,09 ± 3,91	86,15 ± 2,87
NSC 0,2	13,33	33,99	2,51	48,77 ± 3,67	98,85 ± 2,99
NSC 0,2 + Tampão a pH 5	13,33	44,75	2,79	61,20 ± 3,08	99,77 ± 2,93
Nanocápsulas					
24,99	166,60	1040,59	16,37	96,19 ± 1,50	99,89 ± 2,02

Ao comparar os resultados obtidos sem e com a adição do tampão, a presença do tampão a pH 5 mostrou ser importante fator no aumento da porcentagem de encapsulação. Uma explicação se dá pelo fato de que a presença do tampão, ou seja, o aumento na quantidade de íons na fase aquosa criou o processo de *salting-out*, fazendo com que a maior parte do composto se deslocasse para a fase orgânica, e aliado ao fato de que com a solução a pH 5 houve total deslocamento no equilíbrio para a forma neutra. Assim sendo, neste caso, a total insolubilidade do composto tornou o fator de pH importante no maior concentração do composto na suspensão.

4.2.1.3 – Caracterização das nanopartículas

Para a caracterização físico-química das nanopartículas, foram analisados somente dois parâmetros importantes: tamanho médio das partículas com seu índice de polidispersão e potencial zeta.

4.2.1.3.1 – Tamanho de partículas / Índice de polidispersão e Potencial zeta para nanopartículas contendo alizarina

Todos os parâmetros de caracterização físico-química envolvidos nesta etapa do trabalho foram obtidos em duplicatas, no equipamento Zeta Sizer Nano Series (Nano-ZS), onde que todos os valores foram gerados simultaneamente. Os resultados obtidos estão na TABELA 4.17.

TABELA 4.17 – Tamanho de partículas e potencial zeta para nanopartículas contendo alizarina

Tamanho das partículas				
Amostras	Média (nm), n=3	Diâmetro Médio ± Desvio Padrão	Índice de Polidispersão ± Desvio Padrão	
NSA 1,0	152,9	152,9 ± 1,05	0,08 ± 0,03	
NSA 0,6	149,4	149,4 ± 0,99	0,05 ± 0,02	
NSA 0,6 + Tampão a pH 5	177,7	177,7 ± 1,77	0,04 ± 0,01	
NCA	208,8	208,8 ± 2,12	0,09 ± 0,04	
NS vazias	156,4	156,4 ± 1,17	0,08 ± 0,01	
NC vazias	200,8	200,8 ± 1,80	0,05 ± 0,01	
Potencial Zeta				
Amostras	Média (mV), n=3	Desvio Padrão	Condutância (mS/cm) ± Desvio Padrão	Potencial Zeta ± Desvio Padrão
NSA 1,0	-9,47	0,47	1,15 ± 0,05	-9,47 ± 0,47
NSA 0,6	-8,86	0,42	1,15 ± 0,05	-8,86 ± 0,42
NSA 0,6 + Tampão a pH 5	-8,90	0,34	1,15 ± 0,05	-8,90 ± 0,34
NCA	-10,19	0,62	1,26 ± 0,06	-10,19 ± 0,62
NS vazias	-8,13	0,45	1,14 ± 0,05	-8,13 ± 0,45
NC vazias	-9,59	0,27	1,23 ± 0,07	-9,59 ± 0,27

Em relação aos resultados obtidos na caracterização, ao se tratar do tamanho médio, tanto das nanoesferas, quanto das nanocápsulas, foram obtidos valores de grande interesse, já que além dos resultados estarem ótimos referentes

ao tamanho das partículas, estes podem ser administrados frente às formigas sem ficar retidos no sistema de filtro, alcançando o alvo (trato digestivo). Além disso, os valores obtidos de índice de polidispersão mostraram-se também como ótimos resultados, já que valores na faixa entre 0 a 0,08 são considerados sistemas monodispersos, ou seja, as partículas ali presentes possuem tamanhos uniformes.

Em relação aos resultados do potencial zeta, estes não mostraram satisfatórios, uma vez que para considerar um sistema estável, os valores obtidos devem estar acima de 30 mV, podendo ser tanto positivo quanto negativo, porém mesmo não tendo alcançado algo satisfatório, como resultados preliminares este se torna razoável, pois outros parâmetros importantes como desenvolvimento da formulação, estabilidade inicial no momento da confecção, entre outros foram alcançados.

4.2.1.3.2 – Tamanho de partículas / Índice de polidispersão e Potencial zeta para nanopartículas contendo crisofanol

Todos os parâmetros foram obtidos no mesmo protocolo descrito no item anterior. Os resultados obtidos constam da TABELA 4.18.

TABELA 4.18 - Tamanho de partículas e potencial zeta para nanopartículas contendo crisofanol

Tamanho das partículas				
Amostras	Média (nm), n=3	Diâmetro Médio ± Desvio Padrão	Índice de Polidispersão ± Desvio Padrão	
NSC 1,0	158,6	158,6 ± 6,06	0,06 ± 0,01	
NSC 0,5	163,0	163,0 ± 0,70	0,04 ± 0,01	
NSC 0,2	158,2	158,2 ± 2,19	0,05 ± 0,01	
NSC 0,2 +	181,7	181,7 ± 1,17	0,06 ± 0,01	
Tampão a pH 5				
NCC	184,1	184,1 ± 0,59	0,03 ± 0,02	
NS vazias	156,4	156,4 ± 1,17	0,08 ± 0,01	
NC vazias	200,8	200,8 ± 1,81	0,05 ± 0,01	
Potencial Zeta				
Amostras	Média (mV), n=3	Desvio Padrão	Condutância (mS/cm) ± Desvio Padrão	Potencial Zeta ± Desvio Padrão
NSC 1,0	-2,20	2,09	0,02 ± 0,01	-2,20 ± 2,10
NSC 0,5	-8,26	0,34	0,01 ± 0,01	-8,26 ± 0,33
NSC 0,2	-8,64	0,24	1,12 ± 0,04	-8,64 ± 0,24
NSC 0,2 +	-10,50	0,67	1,14 ± 0,05	-10,50 ± 0,67
Tampão a pH 5				
NCC	-9,30	0,40	1,27 ± 0,07	-9,30 ± 0,40
NS vazias	-8,13	0,45	1,14 ± 0,05	-8,13 ± 0,45
NC vazias	-9,59	0,27	1,23 ± 0,07	-9,59 ± 0,27

Em relação aos resultados obtidos, foi observado o mesmo padrão obtido inicialmente para ambos os compostos. Apesar da obtenção de resultados satisfatórios em relação ao tamanho das partículas, novamente o parâmetro do potencial zeta não se mostrou satisfatório.

Os resultados até aqui descritos mostram que desde a formulação, confecção, carga contida nas nanopartículas e sua caracterização, foram obtidos resultados não satisfatórios, porém promissores para a continuidade do mesmo, aperfeiçoando alguns pontos importantes para que, após resultados positivos em relação à caracterização físico-química e, juntamente com a validação do método cromatográfico para a obtenção de dados confiáveis de quantificação, estes possam ser administrados frente às formigas-cortadeiras para a avaliação da sua eficácia frente ao seu real ambiente e avaliando o comportamento das nanopartículas no mesmo.

4.2.2 – Continuidade e finalização do desenvolvimento das formulações das nanopartículas

Para a continuidade no estudo do processo de nanoencapsulamento dos compostos ativos, inicialmente foi proposto aumentar o estudo utilizando compostos da mesma classe química ou com o esqueleto carbônico muito similar. Assim sendo, foram avaliados os seguintes compostos comerciais: antraquinona, 2-metil-antraquinona, ambos da classe das antraquinonas e menadiona e 1,4-naftoquinona ambos da classe das naftoquinonas.

Em relação à atividade biológica, que será discutido em detalhes posteriormente, curiosamente somente às pertencentes à classe das naftoquinonas foram as mais ativas frente aos ensaios inseticida e fungicida. Assim, apesar de ter desenvolvido o trabalho inicial de nanoencapsulamento utilizando alizarina, este foi descartado já que não apresentou atividade inseticida e fungicida em potencial. Assim, o trabalho foi desenvolvido e ampliado com a encapsulação do composto comercial menadiona, juntamente com o crisofanol, previamente isolado naturalmente das raízes de *P. bahiensis*.

Para aperfeiçoamento e modificações na formulação das nanopartículas, foram realizadas diversas modificações tanto nos parâmetros externos à formulação, quanto à alteração na própria formulação. Em relação aos parâmetros externos, foi utilizada uma placa de agitação da marca IKA (modelo RT-10), onde a mesma é munida de agitação e aquecimento constante e, principalmente, a possibilidade de confeccionar 5 formulações em série. Para tanto, a agitação foi mantida em 6000 rpm sob aquecimento em 50°C. As soluções contendo dispersões das nanopartículas foram sempre concentradas em rotaevaporador a 40°C para o volume final de 15 mL.

Em relação à mudança na formulação das nanoesferas contendo os compostos crisofanol e menadiona, foi substituído o tensioativo Span 80 para Span 60 em quantidades alteradas, juntamente com o aumento do volume de acetona em 15 mL. A TABELA 4.19 apresenta a formulação final para as nanoesferas.

TABELA 4.19 – Formulação final para nanoesferas

Composição	Nanoesferas
Fase Orgânica	
PCL	69 mg
Composto a ser encapsulado	Diferentes quantidades*
Acetona	15 mL
Span® 80	50 mg
Fase aquosa	
Tween® 80	50 mg
Água	25 mL

*Crisofanol: 1,0 e 0,5 mg.

Menadiona: 5,0; 3,0; 2,5; 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 mg.

Para as nanocápsulas, as mesmas alterações foram também feitas neste caso, porém foi alterado o volume adicionado do óleo na formulação, já que testes posteriores mostraram que a carga máxima alcançada do óleo no sistema foi de 400 µL. Assim, foram confeccionadas duas formulações variando a quantidade

de óleo, 200 e 400 μL com concentrações determinadas e duas formulações contendo as mesmas quantidades de óleo, porém com redução na quantidade do composto, a fim de avaliar posteriormente, se essa redução na quantidade do composto bioativo interfere em muito a atividade em relação à cinética de liberação. A nova formulação obtida para as nanocápsulas é mostrada na TABELA 4.20.

TABELA 4.20 – Formulação final para nanocápsulas

Composição	Nanocápsulas
Fase Orgânica	
PCL	69 mg
Benzoato de benzila	200 e 400 μL
Acetona	15 mL
Span® 60	50 mg
Fase aquosa	
Tween® 80	50 mg
Água	25 mL

* Nos volumes de 200 e 400 μL utilizou-se da solução saturada, previamente preparada, após filtração em 0,45 μm .

Assim, foram confeccionadas todas as formulações descritas acima em duplicata, juntamente com as nanoesferas vazias (NSV) e nanocápsulas vazias com 200 e 400 μL de benzoato de benzila (NCV200 e NCV400). Todas as formulações foram preparadas para análise via HPLC para a quantificação dos compostos bioativos encapsulados e para as caracterizações físico-químicas. Para tanto será discutido primeiro toda a validação do método feito na parte cromatográfica para ambos os compostos encapsulados.

4.2.3 – Validação dos métodos cromatográficos via HPLC para crisofanol e menadiona

Para esta parte, foram avaliados todos os parâmetros já descritos anteriormente envolvendo a validação do método analítico utilizando como base as recomendações a partir da Resolução ANVISA RE nº 899, de 29/05/2003 (ANVISA, 2003) na execução correta da mesma.

Com o intuito de simplificar a discussão de cada etapa do processo de validação (linearidade, seletividade, especificidade, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção), foi introduzido e discutido cada etapa deste processo e neles os experimentos de ambos os compostos encapsulados. Os tempos de retenção de cada composto foram: crisofanol (t_r : 10,4 min.) e menadiona (t_r : 12,2 min.).

4.2.3.1 – Linearidade do método

A linearidade foi determinada através do cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (coeficiente de correlação do gráfico, r^2), a partir da confecção da curva de calibração para cada um dos compostos.

4.2.3.1.1 – Crisofanol

A curva de calibração foi obtida através da confecção do gráfico da área da banda referente ao analito versus as suas respectivas concentrações. Assim, as concentrações estudadas foram 5; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 600; 800; 1000 $\mu\text{g/mL}$. A FIGURA 4.105 mostra a curva de calibração obtida para crisofanol.

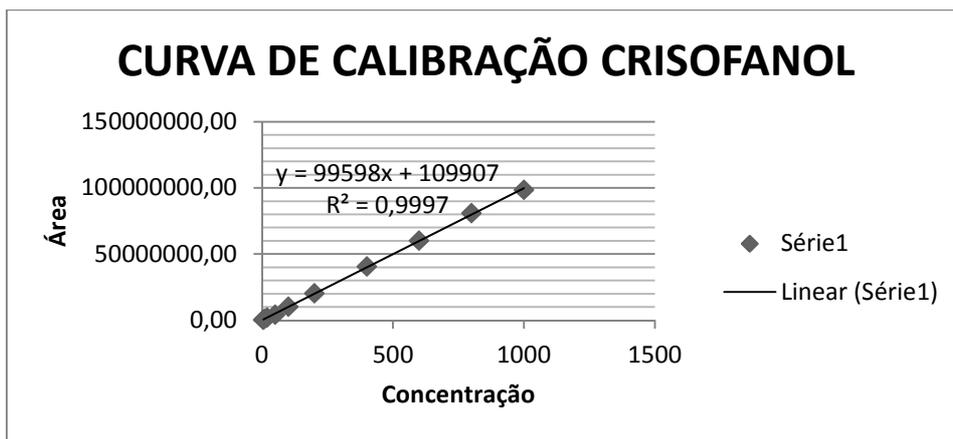


FIGURA 4.105 – Curva de calibração referente ao crisofanol.

A partir da curva foram obtidos os valores pertencentes à equação da reta ($y = 99598x + 109907$) e o valor de $r^2 = 0,9997$. Estes valores obtidos indicam ótima linearidade em toda a faixa de concentração investigada, ou seja, todos os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração, dentro da faixa de concentração trabalhada.

4.2.3.1.2 – Menadiona

Para este composto, foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 400 $\mu\text{g/mL}$ e a Figura 4.106 mostra a sua curva de calibração.



FIGURA 4.106 – Curva de calibração referente à menadiona.

Foi obtida a equação da reta ($y = 81228x - 55223$) com valor de $r^2 = 0,9997$. Como no composto anterior, foi obtida uma ótima linearidade em toda a faixa de concentração investigada, ou seja, todos os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração, dentro da faixa de concentração trabalhada.

4.2.3.2 – Seletividade do método

Para este parâmetro de validação do método cromatográfico, foram avaliados possíveis interferentes em coeluição com a banda cromatográfica referente ao analito. Assim, foram realizados todos os procedimentos de abertura de amostras, ou seja, o rompimento das nanopartículas para liberação de todo o conteúdo do ativo presente em seu interior, para nanoesferas e nanocápsulas vazias, sem a presença dos analitos e, através da análise dessas amostras nas mesmas condições cromatográficas, foi verificado a presença ou ausência de interferentes presentes na matriz com o mesmo tempo de retenção do analito na amostra. As análises foram realizadas em duplicata nos dois métodos cromatográficos, já que cada composto foi analisado em métodos diferentes.

Em relação às nanoesferas vazias, em ambos os métodos cromatográficos, não houve a aparição de nenhuma banda de algum possível interferente na matriz que coeluisse com o analito, mostrando que os métodos foram seletivos. A FIGURA 4.107 mostra o cromatograma obtido para a análise de nanoesferas vazias utilizando o método cromatográfico referente ao crisofanol.



FIGURA 4.107 – Análise da seletividade em nanoesferas vazias.

Para as análises relacionadas às nanocápsulas, foram realizadas duas análises, já que foram realizadas duas formulações com quantidades distintas de óleo. Assim, foram analisadas as nanocápsulas vazias contendo 200 e 400 μL em ambos os métodos, sendo que serão mostradas somente as análises realizadas no método cromatográfico referente ao crisofanol através das FIGURAS 4.108, 4.109 e 4.110.

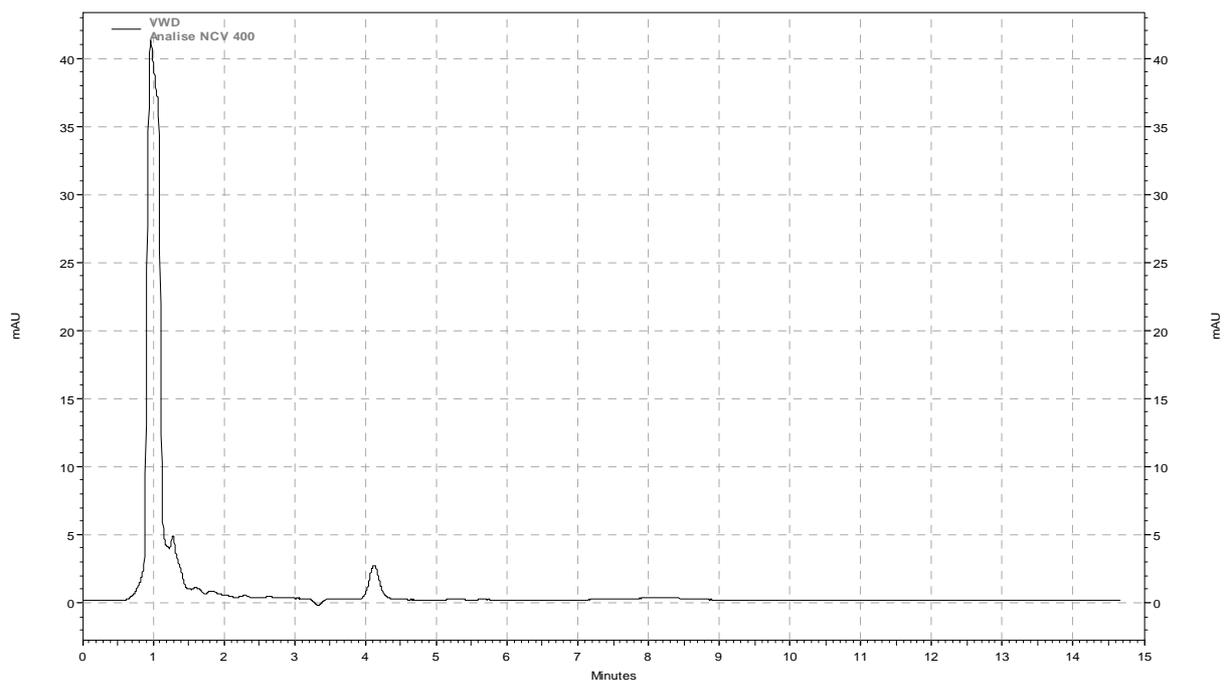


FIGURA 4.108 – Cromatograma da seletividade em nanocápsulas vazias contendo 200 µL de óleo.

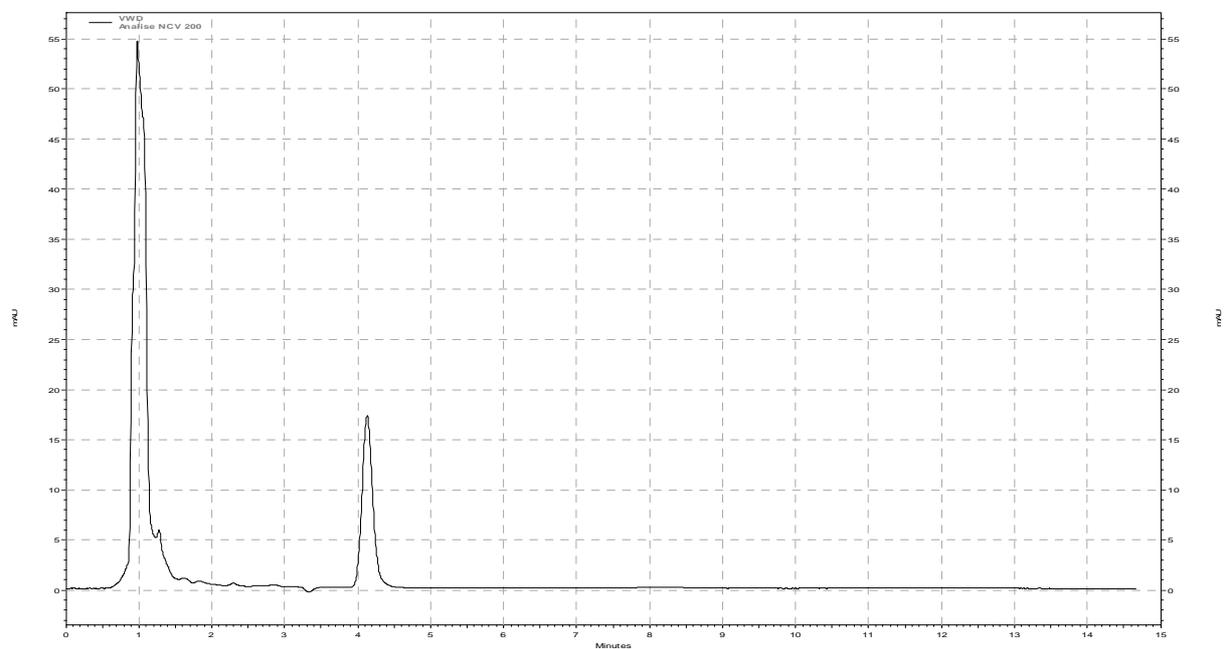


FIGURA 4.109 – Cromatograma da seletividade em nanocápsulas vazias contendo 400 µL de óleo.

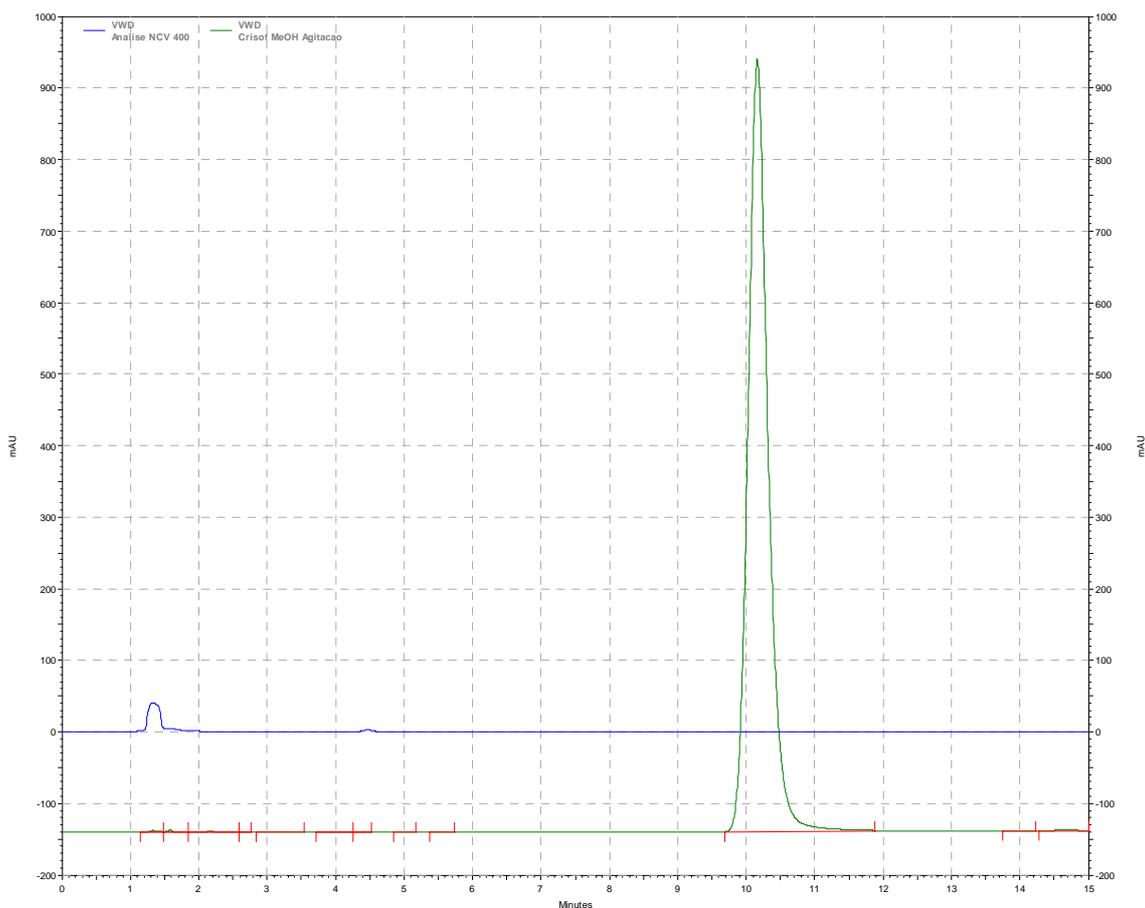


FIGURA 4.110 – Cromatograma da comparação entre a análise de nanocápsulas vazias contendo 400 µL de óleo e crisofanol.

Assim, a partir destas análises, houve a confirmação de que os métodos cromatográficos foram capazes de distinguir as bandas dos analitos e medir exatamente os analitos mesmo na presença de outros interferentes, componentes em sua matriz.

4.2.3.3 – Especificidade do método

Para este parâmetro, foi avaliada a capacidade das diferentes metodologias utilizando diferentes solventes de extração na obtenção da mesma resposta do analito. Especificamente para o composto crisofanol, como a abertura da amostra e a confecção da curva de calibração foi realizada utilizando o sistema

THF:MeOH 7:3, enquanto que para a ressuspensão e extração do composto na matriz para quantificação do mesmo via HPLC foi realizada utilizando o solvente MeOH, houve a necessidade de investigar se uma mesma quantidade do composto era totalmente solubilizado nos dois sistemas de solvente para garantir a especificidade de ambos os métodos de extração e solubilização. A FIGURA 4.111 mostra a análise realizada para o composto crisofanol nos diferentes sistemas de solventes. As FIGURAS 4.112 e 4.113 mostram a análise em cada sistema de solvente com suas respectivas integrações das bandas cromatográficas do analito.

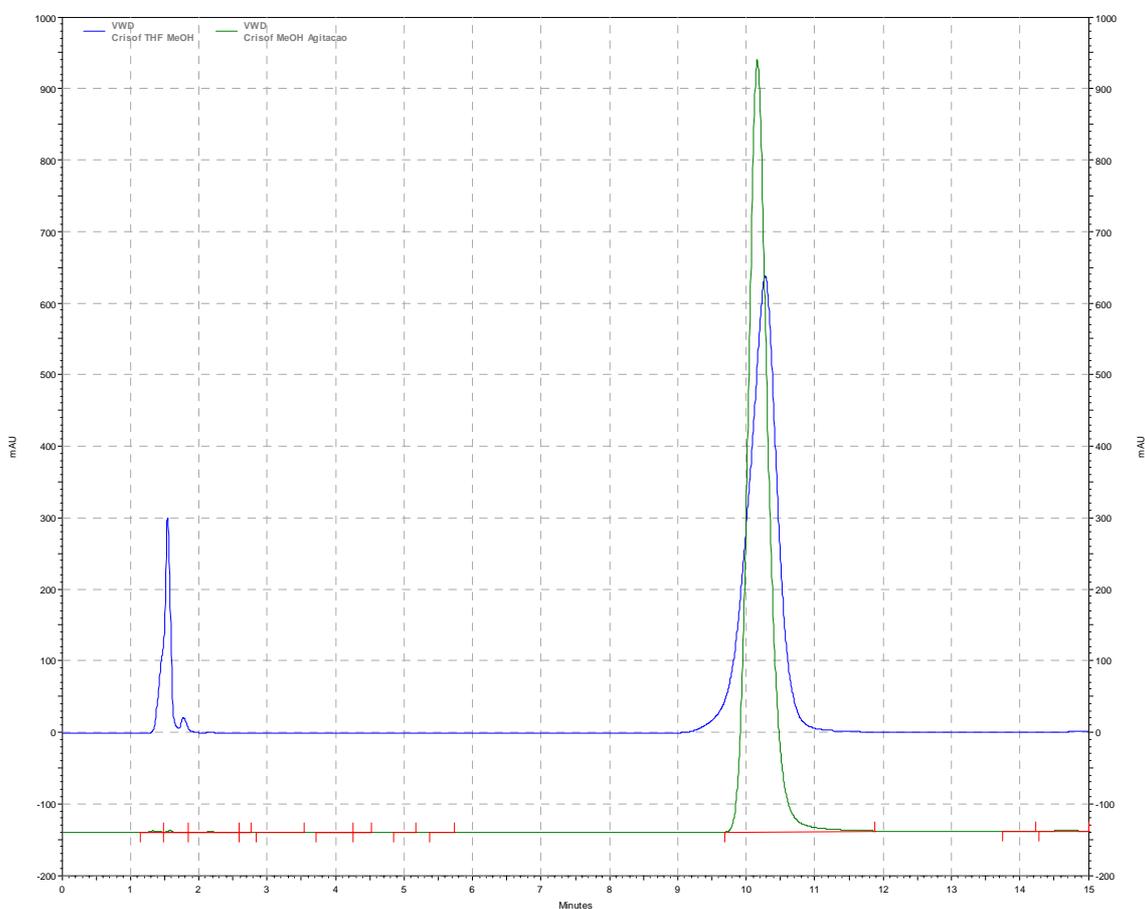


FIGURA 4.111 – Cromatograma da especificidade de dois sistemas de solvente para o composto crisofanol.

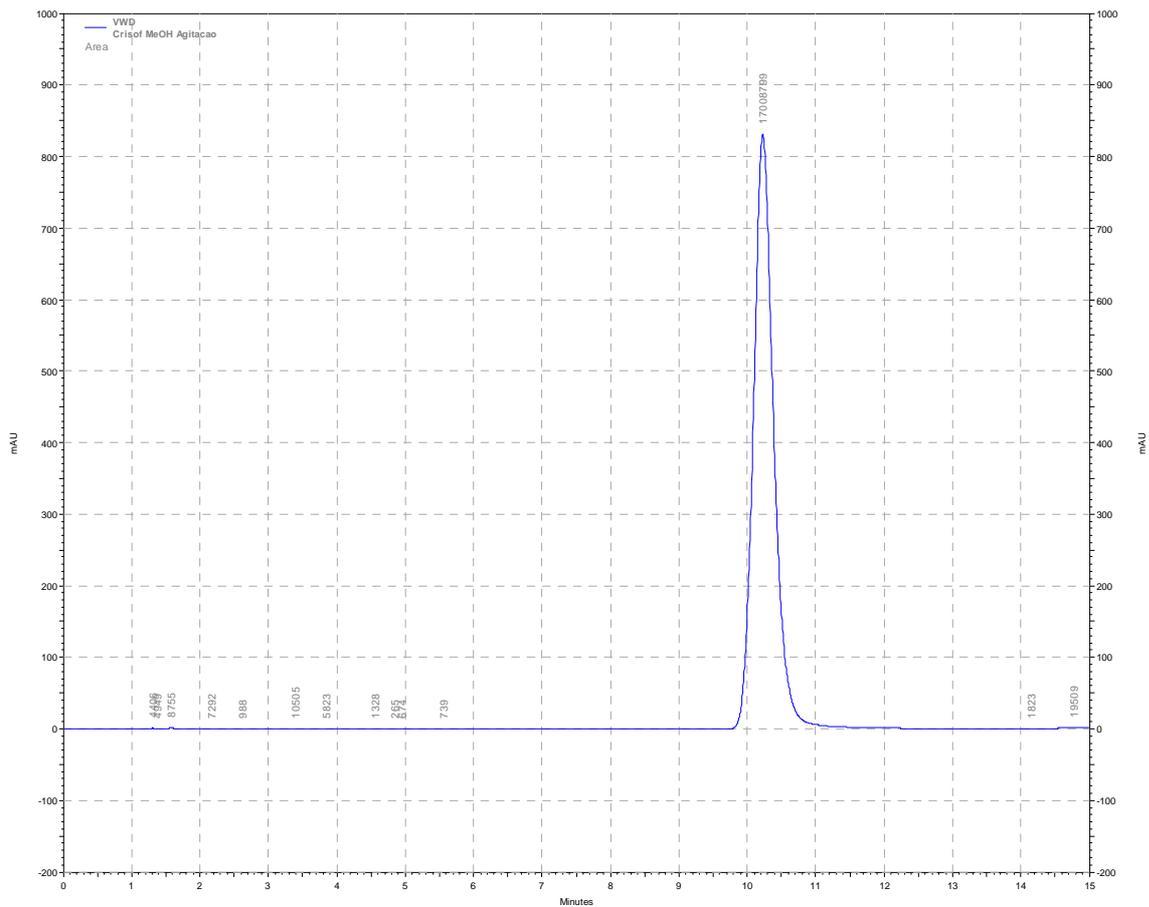


FIGURA 4.112 – Cromatograma obtido para o composto crisofanol em MeOH com a respectiva integração da banda correspondente.

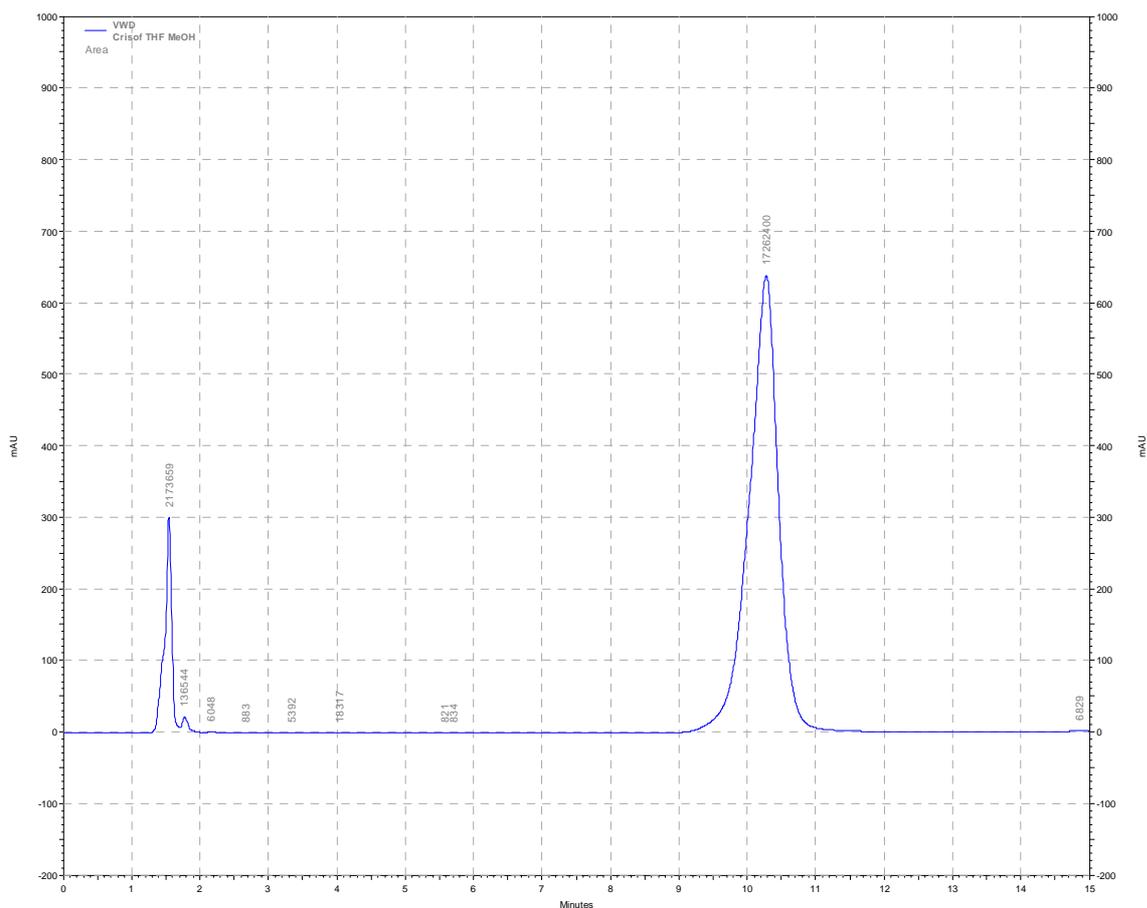


FIGURA 4.113 – Cromatograma obtido para o composto crisofanol em THF:MeOH 7:3 com a respectiva integração da banda correspondente.

Como se pode observar, principalmente ao analisar detalhadamente a FIGURA 4.111, apesar da banda cromatográfica analisada em THF:MeOH 7:3 ter apresentado um maior alargamento em relação ao analisado em MeOH, ambas as integrações mostraram estar próximas, sendo que a variação foi menor que 1,5%, mostrando que não há diferenças significativas em ambos os solventes.

4.2.3.4 – Precisão e exatidão do método

A exatidão e precisão foram avaliadas através das medições de três concentrações diferentes dos padrões em quintuplicatas: 120% do valor utilizado no primeiro ponto da curva de calibração, a segunda entre 40-60% do maior

concentração usada na curva (foi utilizada 43%) e a terceira também entre 90-100% do maior ponto da curva (foi utilizada 93,8%). As amostras foram preparadas e analisadas em dias não consecutivos (inter-corridas) e em um único dia (intra-corrída).

4.2.3.4.1 – Crisofanol

Para a medida da precisão e exatidão do composto crisofanol, foram preparadas três soluções (em quintuplicata) que abrangesse a faixa linear de trabalho, sendo que a primeira solução de validação foi de 6 µg/mL, sendo esta 120% maior que o primeiro ponto da curva de calibração. As outras soluções de validação foram de 430 µg/mL (43% do último ponto da curva) e 938 µg/mL (93,8% do último ponto da curva), totalizando 15 amostras. As TABELAS 4.21 e 4.22 mostram, respectivamente, os resultados obtidos para a precisão e exatidão na validação do composto crisofanol.

TABELA 4.21 – Precisão (CV%) das soluções contendo crisofanol para a validação do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Intra-dia 1, n= 5	Intra-dia 2, n= 5	Intra-dia 3, n= 5	Inter-dias, n= 15
6	1,4	1,7	2,2	1,8
430	2,0	1,0	1,7	1,6
938	0,8	0,4	1,7	1,0

TABELA 4.22 – Exatidão (%) das soluções contendo crisofanol para a validação do método cromatográfico

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão, n= 15
6	97,6
430	100,0
938	100,2

Em relação à consideração de um método preciso, há a necessidade da primeira solução de menor concentração estar abaixo de 20% em relação aos valores obtidos de CV% e, para as duas soluções de concentrações intermediária e alta, 15%. Assim sendo, através dos valores obtidos, os mesmos indicaram a obtenção de uma boa precisão e exatidão para o presente método analítico.

4.2.3.4.2 – Menadiona

Para a medida da precisão e exatidão do composto menadiona, foi seguido o mesmo protocolo de preparação das soluções de validação descritas no item anterior. Sendo assim, a primeira solução de validação foi de 0,75 $\mu\text{g/mL}$, sendo esta 120% maior que o primeiro ponto da curva de calibração. As outras soluções de validação foram de 172 $\mu\text{g/mL}$ (43% do último ponto da curva) e 376 $\mu\text{g/mL}$ (94% do último ponto da curva), totalizando 15 amostras. As TABELAS 4.23 e 4.24 mostram, respectivamente, os resultados obtidos para a precisão e exatidão na validação do composto menadiona.

TABELA 4.23 – Precisão (CV%) das soluções contendo menadiona para a validação do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Intra-dia 1, n= 5	Intra-dia 2, n= 5	Intra-dia 3, n= 5	Inter-dias, n= 15
0,75	2,8	1,9	2,7	2,5
172	1,2	1,7	0,8	1,2
376	1,3	1,0	0,2	0,8

TABELA 4.24 – Exatidão (%) das soluções contendo menadiona para a validação do método cromatográfico

Concentração (µg/mL)	Exatidão, n= 15
0,75	97,5
172	99,2
376	99,5

Em relação à precisão deste método, apesar dos resultados apresentarem uma menor precisão e exatidão comparada com o método anterior, pelos resultados apresentados, os mesmos indicaram a obtenção de precisão e exatidão satisfatórias para o presente método analítico.

4.2.3.5 – Limites de quantificação e detecção

Os limites de quantificação e detecção foram obtidos experimentalmente através de sucessivas diluições partindo de uma solução estoque, onde cada concentração foi analisada através da comparação da altura da banda cromatográfica em relação à altura do ruído até atingirem a relação sinal/ruído de 10 (LQ) e 3 vezes (LD). Assim, para o composto crisofanol foi determinado que o limite de quantificação em 2,5 µg/mL e detecção em 313 ng/mL.

Para o composto menadiona, foi obtida a concentração de 39 ng/mL como o limite de quantificação e 1,95 ng/mL para detecção.

4.2.4 – Caracterização físico-química

Para esta parte serão discutidos os principais pontos relacionados à caracterização físico-química: taxa de recuperação, eficiência de encapsulação, diâmetro de partículas, potencial zeta, medição do pH, secagem das nanopartículas e análise morfológica. Os resultados aqui obtidos foram muito diferentes dos citados inicialmente, onde foram alcançados resultados muito satisfatórios e promissores para posterior administração frente ao controle de formigas-cortadeiras e seu fungo simbiote.

4.2.4.1 – Taxa de recuperação, Eficiência de encapsulação, diâmetro de partículas, potencial zeta e medição do pH

4.2.4.1.1 – Crisofanol

As nanopartículas contendo crisofanol avaliadas e quantificadas foram: nanoesferas contendo 0,5 (NSC0,5) e 1,0 mg (NSC1,0) do ativo e nanocápsulas contendo 200 e 400 µL sem e com a redução da quantidade de ativo. A TABELA 4.25 mostra os resultados obtidos para todas as formulações realizadas com crisofanol.

TABELA 4.25 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.), diâmetro de partículas, Potencial zeta e pH para nanoesferas e nanocápsulas contendo crisofanol

Nanopartículas	Conc. (µg/mL)	%Rec	%E.E.	Diâmetro (nm)	Potencial zeta	pH
Nanoesferas						
NSC 0,5	33,33	73,60	99,15	107,30	-13,99	5,36
NSC 1,0	66,67	100,80	100,48	97,30	-19,61	5,47
Nanocápsulas						
NCC 200	200,00	100,40	100,47	149,90	-30,46	5,31
NCC 400	400,00	100,00	100,26	147,21	-32,16	5,40
NCC 200 reduz.	116,67	100,40	100,12	133,00	-27,78	5,40
NCC 400 reduz.	233,33	100,11	100,29	144,10	-30,16	5,52

Em relação aos parâmetros de taxa de recuperação e eficiência de encapsulação, foram obtidos resultados satisfatórios alcançando o máximo de carga de composto encapsulado, tanto em nanoesferas, quanto em nanocápsulas. Em relação às nanoesferas, e comparando com o controle (nanoesferas vazias), o diâmetro de partículas foi muito satisfatório em termos de minimizar o tamanho das mesmas, alcançando um valor próximo à 100 nm, sendo que as vazias mostraram um diâmetro de 99,60 nm. Em relação às nanocápsulas, foi alcançada uma média de 143,55 nm, em comparação com as vazias com 141,56 nm. Especificamente para o controle de formigas-cortadeiras, este tamanho nanométrico se torna algo muito eficaz em relação à não filtração pelos filtros presentes na cavidade bucal e, conseqüentemente, alcançar o trato digestivo como alvo principal no controle efetivo das mesmas. A FIGURA 4.114 exemplifica a comparação dos tamanhos médios entre NCC 200 e nanocápsulas vazias em 3 e 2 dimensões.

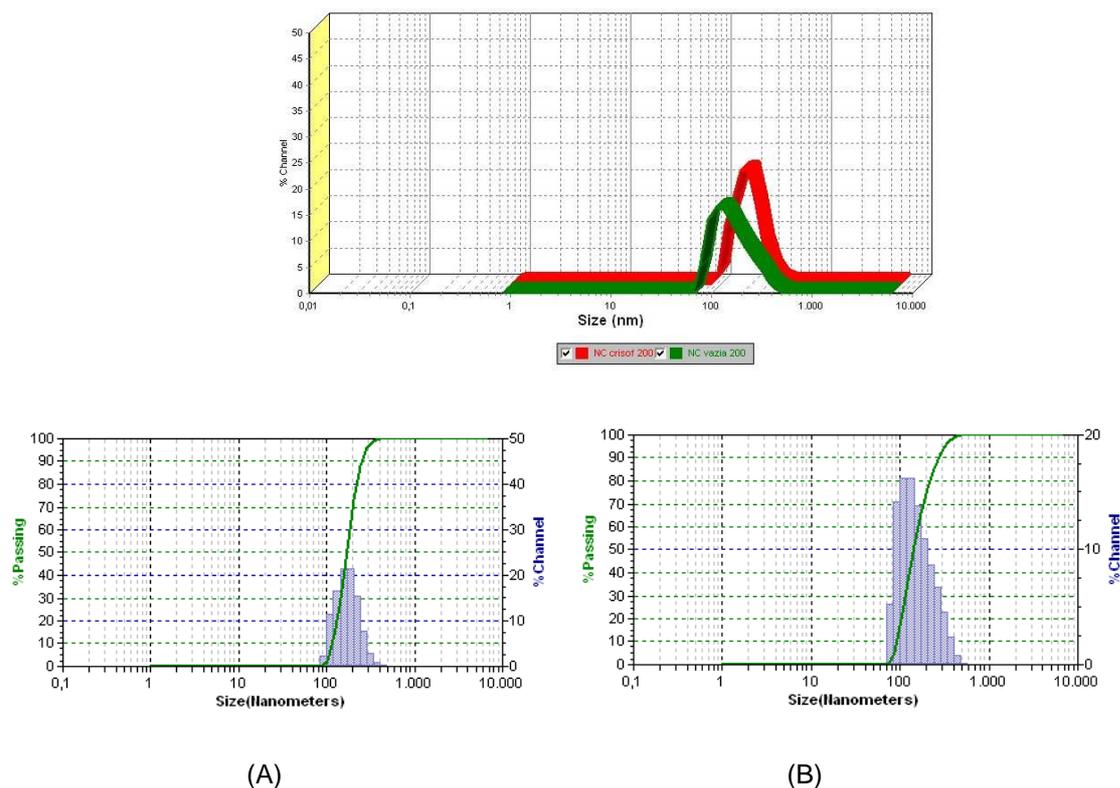


FIGURA 4.114 – Comparativo entre NCV e NCC 200 em 3 dimensões (acima); Curva referente à NCC 200 (A) e Curva referente à NSV (B).

Analisando o potencial zeta, para as nanocápsulas foram obtidos valores satisfatórios, onde foram alcançados valores próximos a -30 mV, podendo considerar um sistema estável quanto à diminuição da probabilidade de formar aglomerados. Para as nanoesferas, o valor deste parâmetro foi diminuído drasticamente para quase a metade do valor, mostrando que as nanoesferas são menos estáveis em relação às nanocápsulas, já que a mesma é composta somente de uma matriz polimérica entrelaçada, além disso, a comparação com nanoesferas vazias, que mostrou valor de -27,17 mV mostra que esse entrelaçamento tornou uma forma ao qual, provavelmente, o fator predominante através de interações dipolo-dipolo entre o polímero (constituído de grupo éster) e composto fez com que houvesse uma estabilização nas cargas sobre a superfície para consequente estabilização do sistema.

Quanto aos valores obtidos de pH, este se torna importante para a avaliação da estabilidade da suspensão em função do tempo de armazenamento,

onde a variação do pH pode ser um indício da degradação do polímero (SCHAFFAZICK et al., 2003). A medição foi realizada no ato da confecção das nanopartículas e após 30 dias de armazenamento sob refrigeração e foi comprovado que as mesmas não sofreram nenhuma alteração em função da medição deste parâmetro. Porém este fator torna não tão importante já que todas as formulações foram testadas em sua forma seca, tornando-as um pó extremamente fino para submetê-las a testes.

4.2.4.1.2 – Menadiona

Para este composto, foi verificado que, em relação às nanoesferas contendo menadiona, após diversas tentativas de se obter uma taxa de recuperação e, conseqüentemente uma eficiência de encapsulação muito próximo ou igual a 100%, não foi alcançado. Como houve pouco tempo de estudo no desenvolvimento e aperfeiçoamento para esta melhoria, foram discutidos os parâmetros supracitados somente para as nanocápsulas contendo menadiona. Vale salientar que, apesar de não ter alcançado os objetivos de uma boa taxa de recuperação e eficiência de encapsulação, outros parâmetros tais como diâmetro de partículas, potencial zeta e medição de pH não foram deixados de serem submetidos à análise, já que uma avaliação destes parâmetros comprovariam que as baixas taxas, provavelmente, originaram da formulação. Assim sendo, foram avaliadas e quantificadas as nanocápsulas contendo menadiona 200 e 400 µL sem e com a redução da quantidade de ativo. A TABELA 4.26 mostra os resultados obtidos para todas as formulações realizadas com menadiona.

TABELA 4.26 – Taxa de recuperação (%Rec.) e eficiência de encapsulação (%E.E.), diâmetro de partículas, Potencial zeta e pH para nanoesferas e nanocápsulas contendo menadiona

Nanopartículas	Conc. (µg/mL)	%Rec	%E.E.	Diâmetro (nm)	Potencial zeta	pH
Nanoesferas						
NSM 0,5	33,33	*	-	93,00	-25,40	5,69
NSM 1,0	66,67	*	-	109,90	-22,33	5,70
NSM 1,5	100,00	*	-	95,10	-16,38	5,38
NSM 2,0	133,33	*	-	90,30	-20,02	5,80
NSM 2,5	166,67	*	-	105,1	-20,12	5,78
NSM 3,0	200,00	*	-	95,60	-20,62	5,98
NSM 5,0	333,33	*	-	96,00	-19,14	6,00
Nanocápsulas						
NCM 200	1333,34	83,19	100,00	165,43	-29,85	5,49
NCM 400	2666,66	75,00	100,12	173,22	-30,87	5,93
NCM 200 reduz.	666,67	54,2	99,99	146,30	-31,16	5,28
NCM 400 reduz.	1333,33	54,4	100,08	164,10	-32,16	5,40

* baixa taxa de recuperação ($\leq 15,00\%$)

Com exceção às taxas de recuperação e eficiência de encapsulação de nanocápsulas e, principalmente de nanoesferas contendo menadiona, todos os parâmetros se assemelharam em muito aos obtidos para crisofanol. A FIGURA 4.115 mostra um comparativo do parâmetro de tamanho de partículas entre seis formulações obtidas, mostrando uma similaridade nos tamanhos obtidos das nanopartículas.

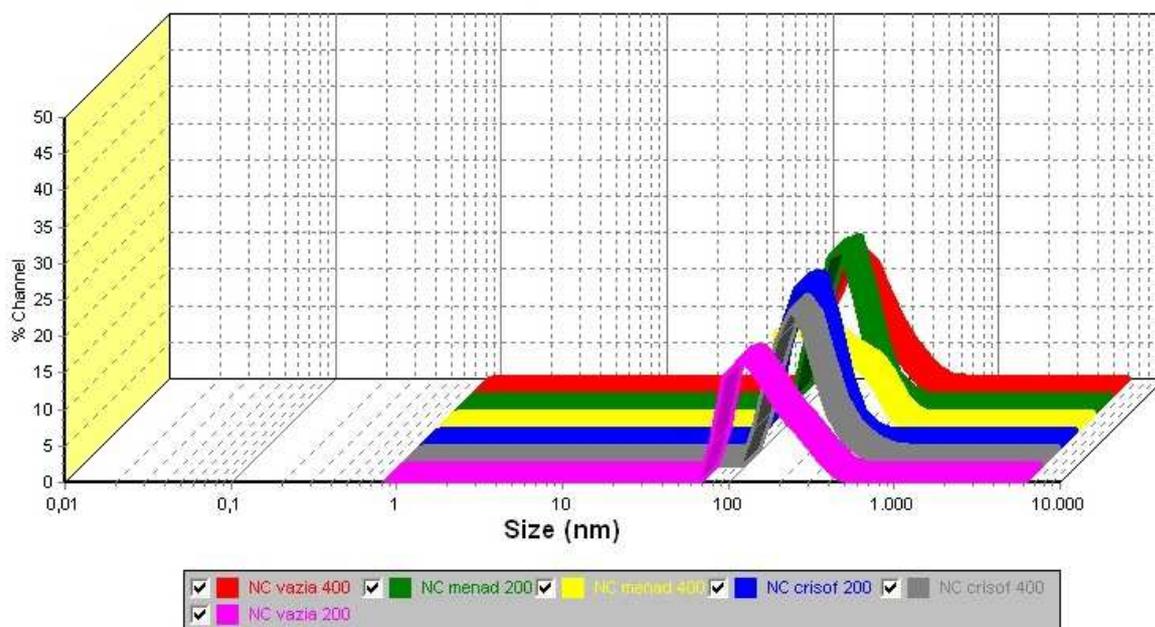


FIGURA 4.115 – Comparativo entre os tamanhos médios de partículas de seis formulações de nanocápsulas.

Em relação aos valores das taxas de recuperação, apesar da obtenção de uma maior carga de compostos através dos valores de concentração, uma possível explicação à diminuição dos valores se deu pelo solvente pertencente à fase orgânica juntamente com a quantidade de tensoativos em ambas as fases. Se analisar o princípio de formação das nanopartículas através do método utilizado, uma primeira etapa se dá através da formação de uma dispersão de nanogotículas e após a rápida difusão do solvente, há a formação e precipitação do polímero. Assim, a presença de uma grande quantidade de composto ativo em um volume pequeno de solvente no sistema provoque a rápida precipitação do mesmo causado pela instabilidade na interface do sistema, portanto a diminuição do encapsulamento.

Mesmo com todos estes fatores desfavoráveis, os encapsulados foram submetidos a ensaio biológico frente às formigas-cortadeiras e seu fungo simbiote para avaliar a atividade em função das taxas de recuperação e eficiência de encapsulação para a compreensão desta relação.

4.2.4.2 – Secagem das nanopartículas

Uma das limitações relacionadas às suspensões de nanopartículas é o problema causado pela estabilidade em função do tempo de armazenamento. Um problema muito encontrado ao se armazenar estas soluções é que, devido a presença da fase aquosa, isto faz com que as formulações fiquem suscetíveis a qualquer contaminação de micro-organismos e/ou alterações físico-químicas (DOMINGUES et al., 2008), afetando, principalmente, os testes biológicos. Assim, pelo fato de evitar ou minimizar os problemas de estabilidade após a confecção das nanopartículas, a estratégia utilizada foi a utilização do processo de secagem das formulações.

Para a verificação dessa possível contaminação, foi realizado um experimento em conjunto com o Dr. Leonardo Toffano, no Laboratório de Bioensaios do Laboratório de Produtos Naturais da UFSCar, sendo que as formulações previamente feitas, onde em todo o processo de manuseio foram tomados os devidos cuidados em relação à contaminação, foram esterilizadas sob luz U.V. em fluxo laminar por 10, 20, 30 e 40 minutos, utilizando como controle uma formulação sem a realização da etapa de esterilização. O teste foi realizado com diferentes formulações para aumentar a confirmação ou não da possível contaminação, sendo que será mostrado somente o teste realizado com as nanocápsulas vazias, como mostrado na FIGURA 4.116.

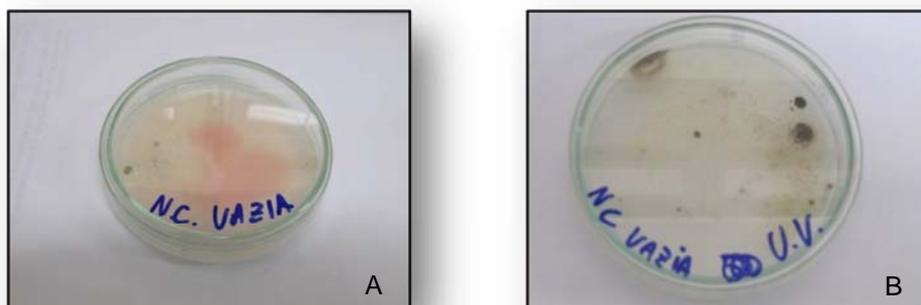


FIGURA 4.116 – Adição da suspensão de nanopartículas em meio BDA para avaliação de possível contaminação. Sem esterilização por 40 minutos em luz U.V. em fluxo laminar (A); Com esterilização por 40 minutos em luz U.V. em fluxo laminar (B).

Em todos os experimentos realizados foram encontradas contaminações de micro-organismos, comprovando que mesmo após a esterilização sob luz U.V. há um indício de contaminação que pode inviabilizar os testes biológicos utilizando as suspensões coloidais.

Algumas metodologias são utilizadas para a secagem, tais como liofilização e nebulização. Resumidamente, o processo de nebulização utiliza como adjuvante o dióxido de silício coloidal (Aerosil®) para secagem e se baseia na passagem da solução por um pequeno orifício, tornando-as pequenas gotículas que passarão para uma câmara de secagem sob aquecimento e, assim, ao entrar em contato com o ar quente, ocorre a rápida secagem das gotículas (SCHAFFAZICK et al., 2003). Após a passagem de toda a solução, é recolhido o pó, cuja característica principal é ser extremamente fino. É de se esperar que, com a utilização do suporte de secagem, neste caso o adjuvante constituído de sílica, as nanopartículas secas formem um aglomerado de micropartículas nessa matriz sólida. A formação de uma micropartícula de nanopartículas, a princípio pode parecer um fator desfavorável em relação ao aumento do tamanho, porém este fato fornece uma maior estabilidade no momento da secagem, já que previne a aglomeração de forma irreversível das nanopartículas.

Antes da etapa final de secagem foram realizados diversos testes para otimização dos parâmetros descritos adiante para a obtenção de uma maior porcentagem de recolha gerando assim o máximo de rendimento das nanopartículas secas. Após esta otimização, foram confeccionadas volumes exatos de nanopartículas (10 formulações de cada suspensão coloidal), misturando com uma massa exata do suporte de secagem, tomando o cuidado de homogeneizar esta solução sob agitação magnética e, por fim, a introdução da mesma no equipamento de Spray Dryer. Todas as amostras foram secas seguindo os parâmetros descritos no item **3.6.4.9**.

Em relação ao rendimento, este foi calculado partindo da somatória das massas dos componentes sólidos presentes da formulação, juntamente com a massa adicionada de Aerosil®. A TABELA 4.27 mostra os rendimentos obtidos nas formulações submetidas à secagem.

TABELA 4.27 – Cálculo do rendimento na secagem das nanopartículas vazias e contendo crisofanol e menadiona

Formulações	Rendimento (%)
NS vazias	60,42
NC vazias 200	58,10
NC vazias 400	66,30
NSC 0,5	78,95
NSC 1,0	80,67
NCC 200	73,20
NCC 400	74,36
NCC 200 reduz.	76,50
NCC 400 reduz.	79,40
NSM 0,5	52,80
NSM 1,0	60,98
NSM 1,5	72,92
NSM 2,0	74,83
NSM 2,5	71,30
NSM 3,0	72,40
NSM 5,0	76,60
NCM 200	64,50
NCM 400	60,70
NCM 200 reduz.	78,70
NCM 400 reduz.	72,10

Analisando os resultados de rendimento, pode-se dizer que os mesmos foram satisfatórios, uma vez que há a produção de um pó extremamente fino, qualquer ajuste incorreto leva a uma grande perda de massa. Isto explica o fato de que para a secagem de algumas formulações resultaram em um menor rendimento,

pois estas foram as primeiras soluções a serem submetidas à secagem, havendo uma impregnação do pó nas paredes do sistema e gerando um menor rendimento. Todas as formulações secas foram submetidas a testes biológicos.

4.2.4.3 – Análise morfológica

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada nesta etapa do trabalho para se obter uma maior informação morfológica, como a forma e tamanho das nanopartículas. Assim foram geradas algumas imagens, tanto da formulação líquida, quanto seca (em pó), com exceção das nanocápsulas vazias, como mostrado abaixo, para verificar as diferenças na morfologia de cada uma das formulações.

4.2.4.3.1 – Nanoesferas contendo crisofanol (NSC 1,0)

Para a avaliação morfológica desta formulação, foram realizadas imagens das formulações líquidas e secas. Em relação à imagem obtida a partir da formulação líquida (FIGURA 4.117), o não aparecimento de nanoesferas na imagem não demonstra que as mesmas foram confeccionadas de forma errada em não produzir nanopartículas, como na formulação líquida houve a necessidade de remover toda a água presente na dispersão coloidal, além da secagem da mesma sobre o porta amostra e houve ainda a necessidade de mantê-la em dessecador para a remoção de qualquer vestígio de água. Sendo assim, em alguns casos, este processo de secagem “forçada” da amostra pode favorecer a aglomeração das nanopartículas com a formação indesejada de um filme polimérico por toda a extensão da amostra, tornando impossível de se visualizar as partículas.

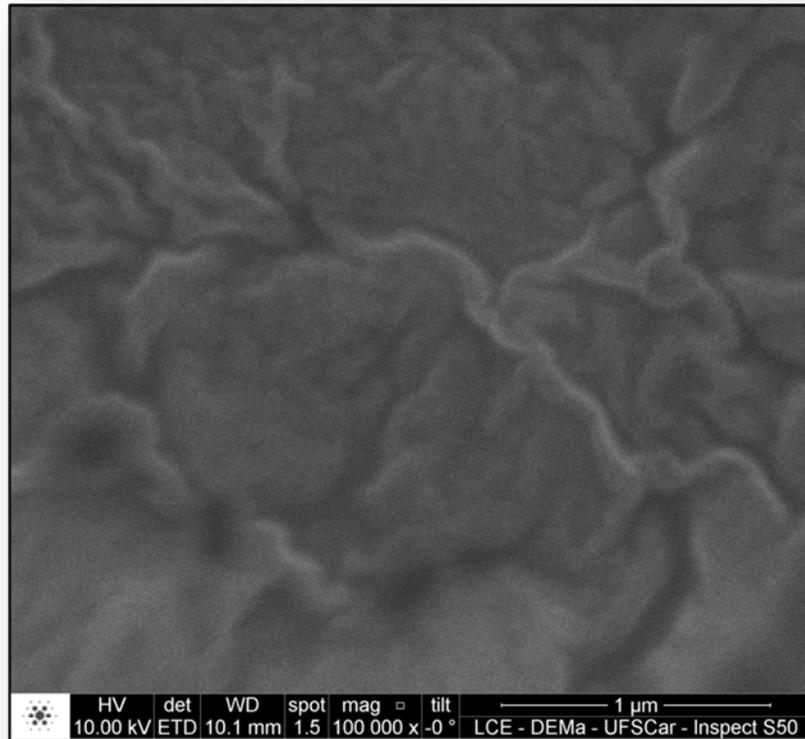


FIGURA 4.117 – Imagem de NSC 1,0 na forma líquida a 100.000 x.

Para as imagens obtidas na forma seca, como mostrada na FIGURA 4.118, já não existe a probabilidade de formação de um filme polimérico, pois a secagem da mesma foi previamente realizada sob circunstâncias controladas. Assim sendo, na maioria das vezes, a análise da morfologia se dá através destas imagens geradas.

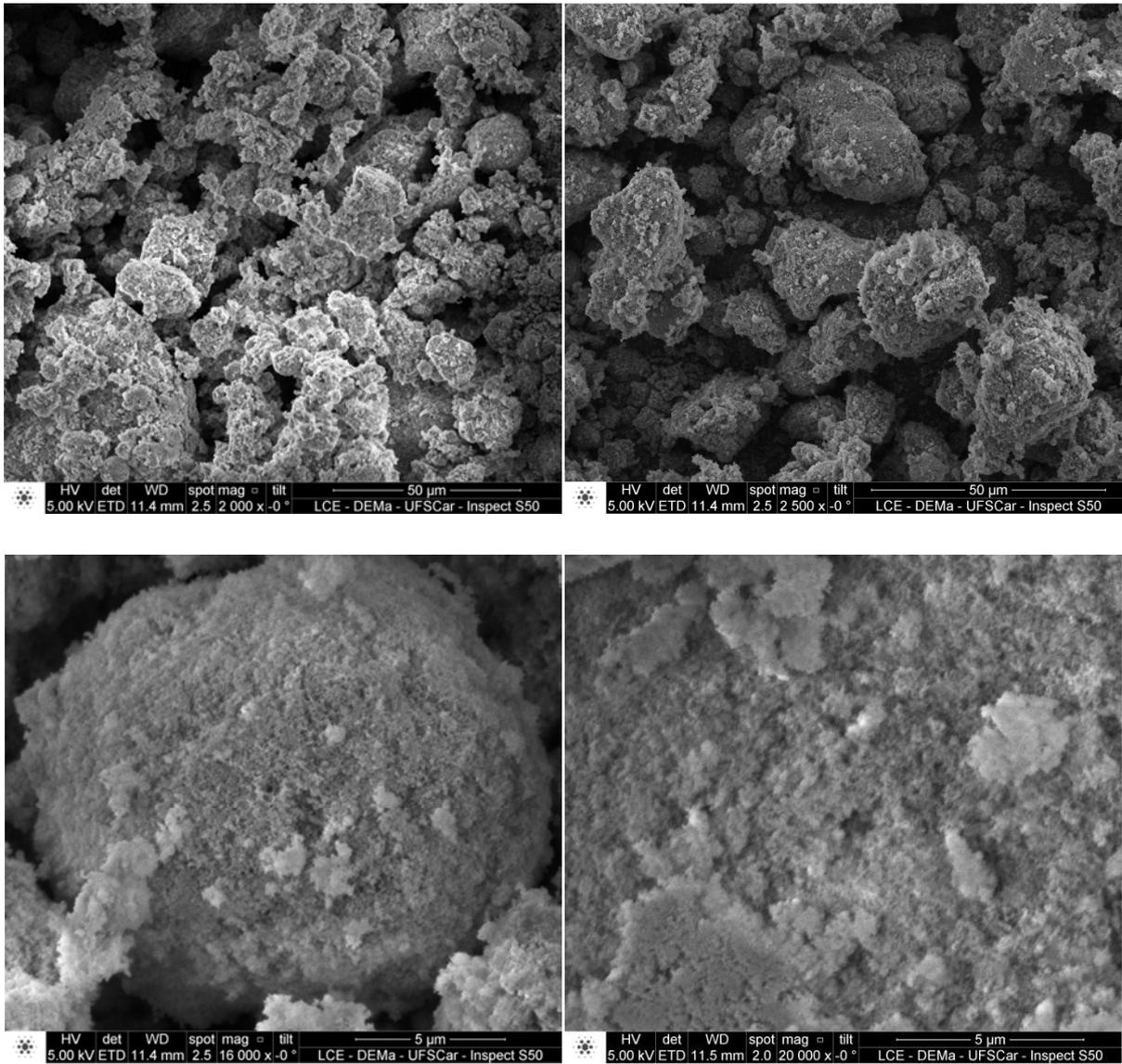


FIGURA 4.118 – Imagens de NSC 1,0 na forma seca a 2.000; 2.500; 16.000 e 20.000 x.

A partir das imagens referentes à formulação seca, vê-se a formação de micropartículas de tamanho variado. Essa partícula refere-se ao suporte de secagem em que as nanopartículas estão adsorvidas em toda a sua superfície.

4.2.4.3.2 – Nanocápsulas contendo crisofanol (NCC 200, NCC 400 e NCC 400 reduz.)

Para a avaliação morfológica desta formulação, foram também realizadas imagens das formulações nas formas líquidas e secas. Em relação às imagens obtidas da formulação NCC 200 na forma líquida (FIGURA 4.119), foi possível verificar a presença das nanocápsulas juntamente com a pré- formação do filme polimérico.

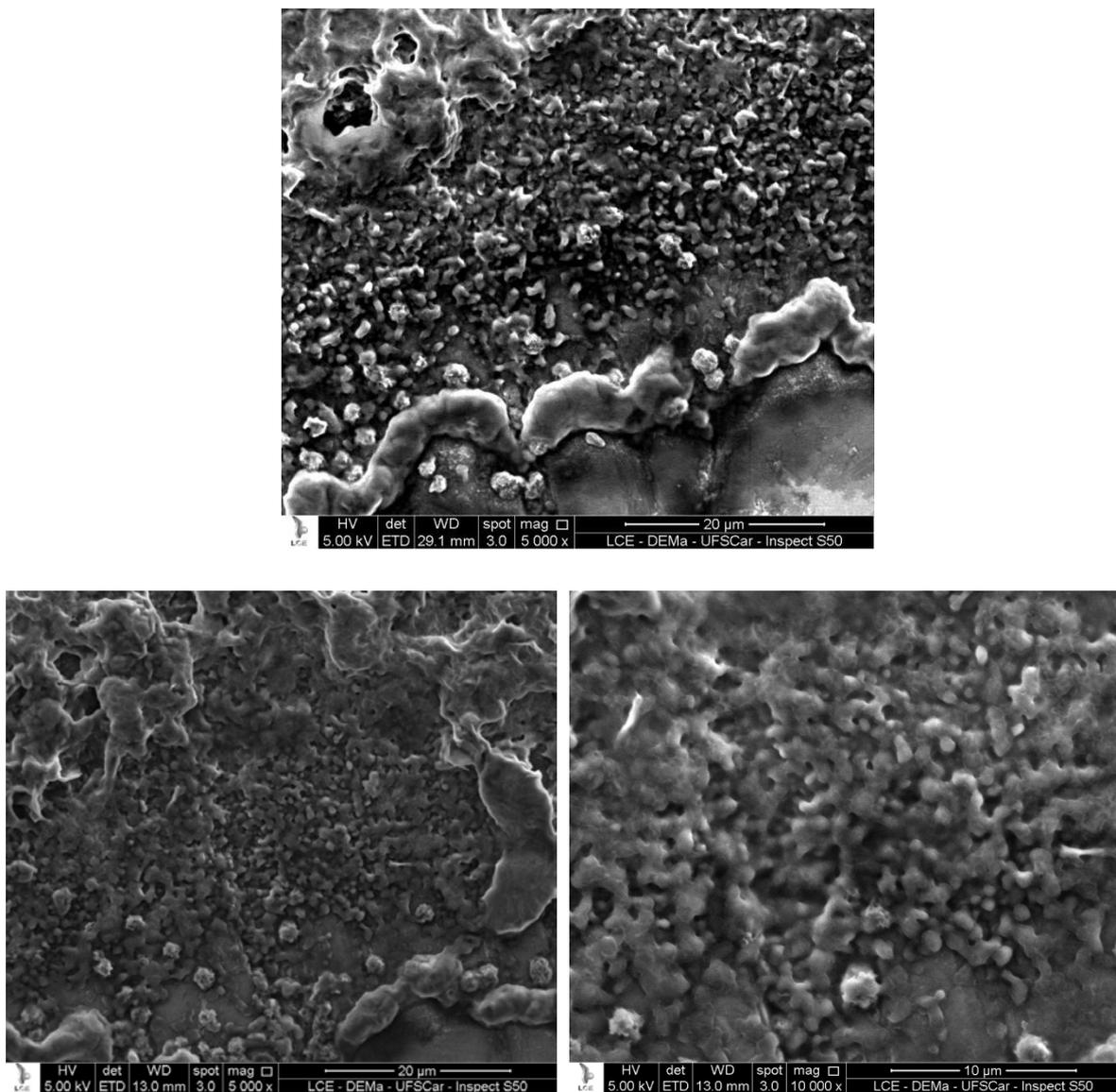


FIGURA 4.119 – Imagens de NCC 200 na forma líquida a 5.000 e 10.000 x.

Com relação às imagens obtidas na forma seca, as mesmas apresentaram melhor resultados na avaliação da morfologia, tanto em relação ao tamanho, quanto à sua forma, como mostrado na FIGURA 4.120.

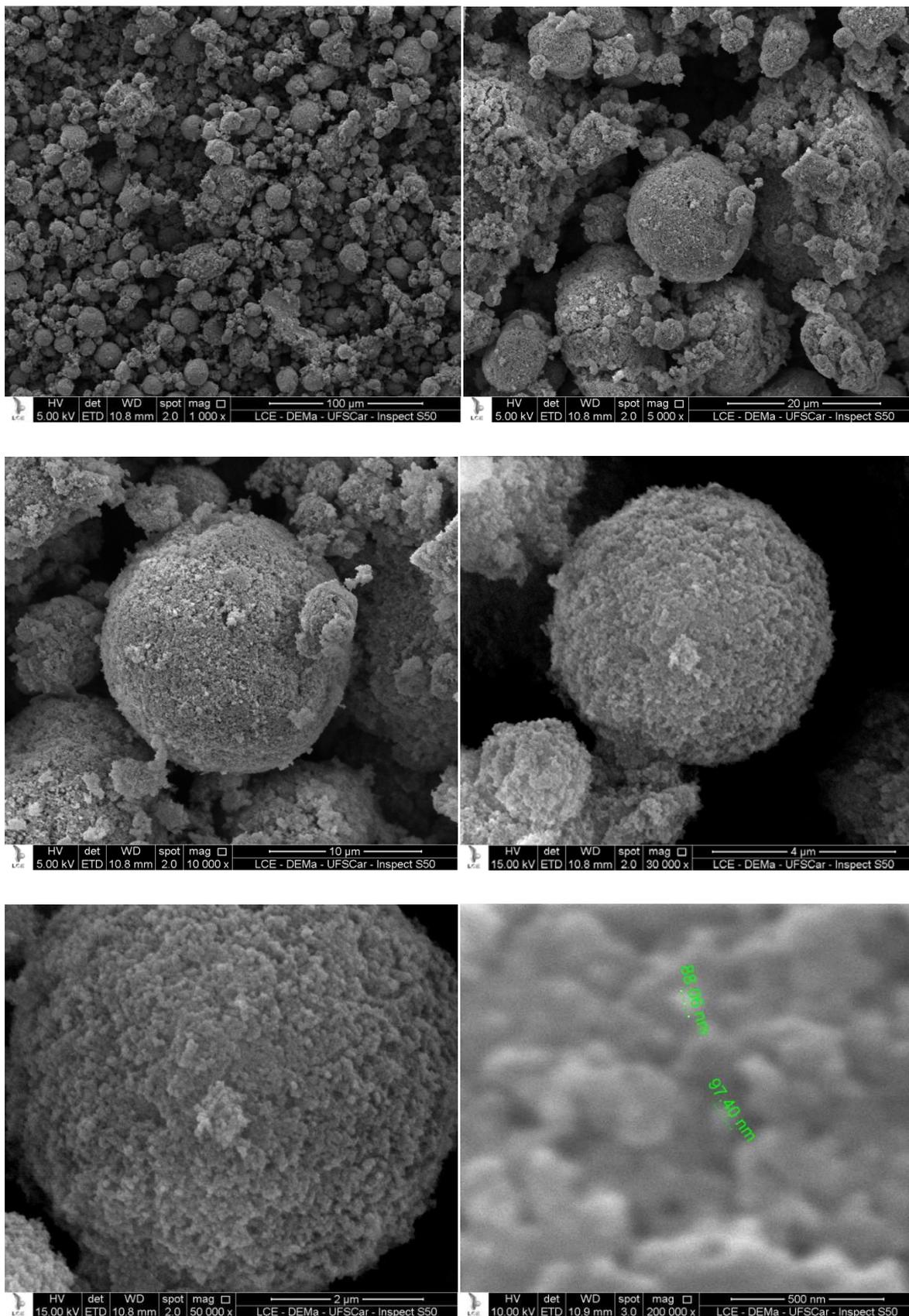


FIGURA 4.120 – Imagens de NCC 200 na forma seca a 1.000; 5.000; 10.000; 30.000; 50.000 e 200.000 x.

Uma possível tentativa de se obter melhor imagem na avaliação da morfologia das nanopartículas circunvizinhadas em toda a extensão do suporte de secagem e, principalmente quanto ao tamanho e forma, não foi alcançada (uma estimativa foi realizada, como mostrado na imagem). Assim, foram realizadas imagens em um aparelho com maior alcance de aproximação e resolução para avaliar melhor a morfologia. Com isso, foi possível obter imagens mostrando a real morfologia presente na superfície das micropartículas através da FIGURA 4.121.

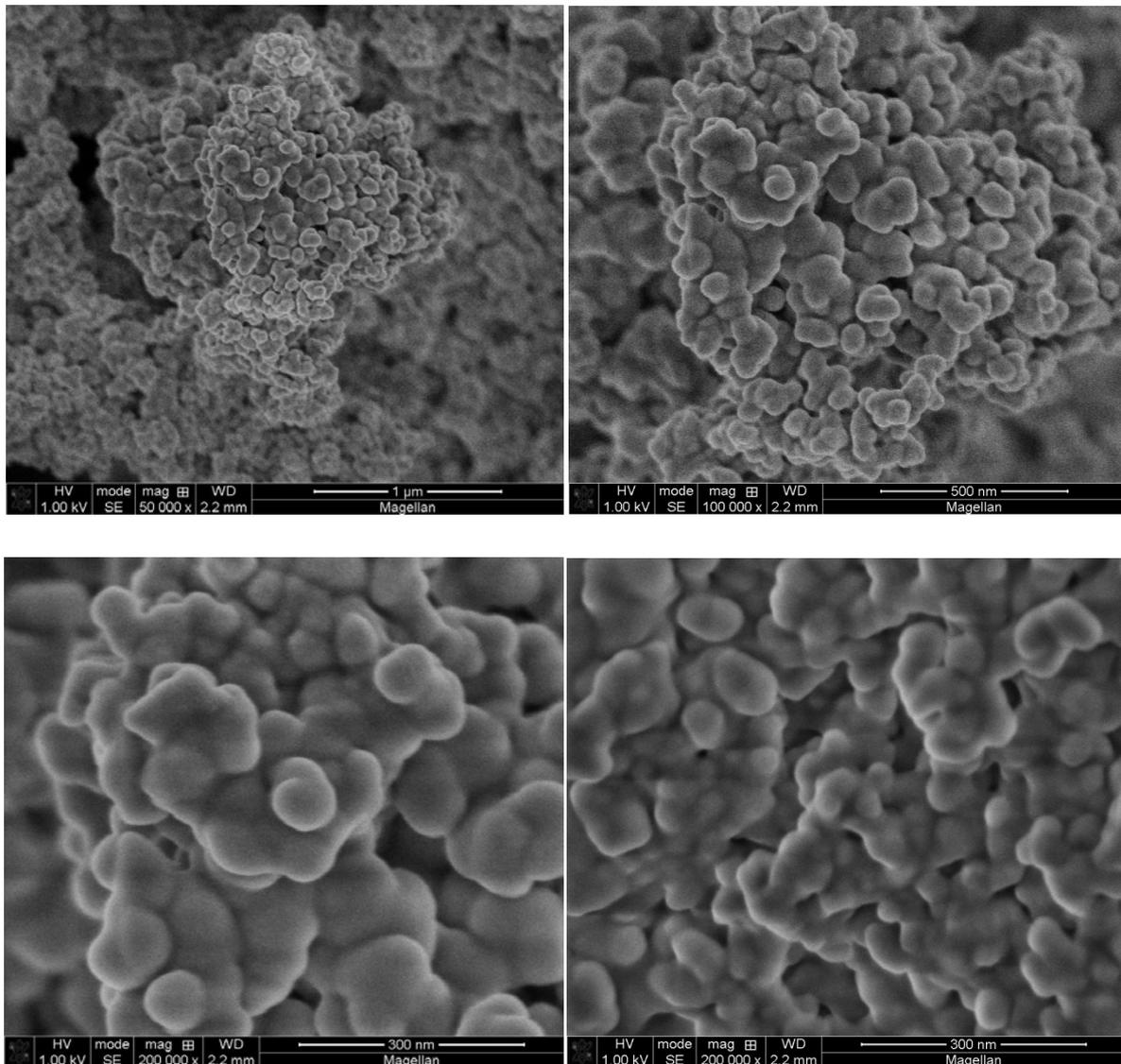


FIGURA 4.121 – Imagens de NCC 200 na forma seca a 50.000; 100.000 e 200.000 x.

A melhor resolução da imagem obtida na ampliação em 200.000 x mostra a possibilidade de realizar estimativas em relação ao tamanho das nanopartículas. Sendo assim, o tamanho estimado em torno de 80 nm mostra uma diminuição em seu tamanho, quando comparado à medição do tamanho de partículas na forma líquida. O motivo desta diminuição de tamanho se deve, principalmente, à alteração na organização estrutural durante o processo de secagem (nebulização), provavelmente sendo causada pela saída dos tensoativos e da água durante a secagem, que estavam dispersos na matriz polimérica, reduzindo assim o diâmetro das nanopartículas adsorvidas à superfície dos pós.

Para a avaliação morfológica da formulação NCC 400, foram novamente obtidos imagens nas duas formas. Para tanto, aqui será mostrado somente as imagens obtidas na forma líquida e seca (FIGURAS 4.122 e 4.123).

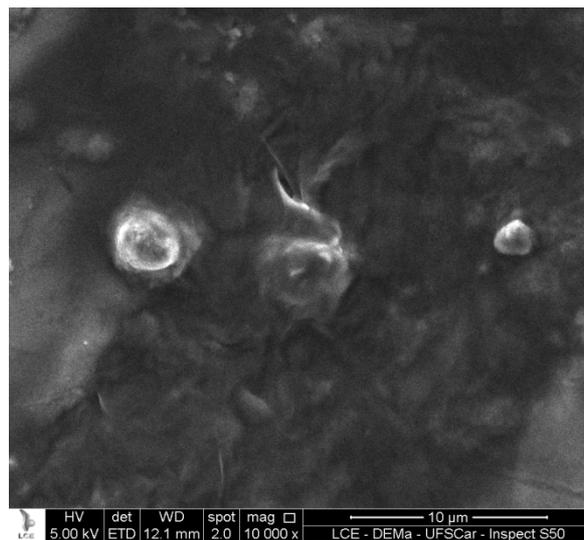


FIGURA 4.122 – Imagens de NCC 400 na forma líquida a 10.000 x.

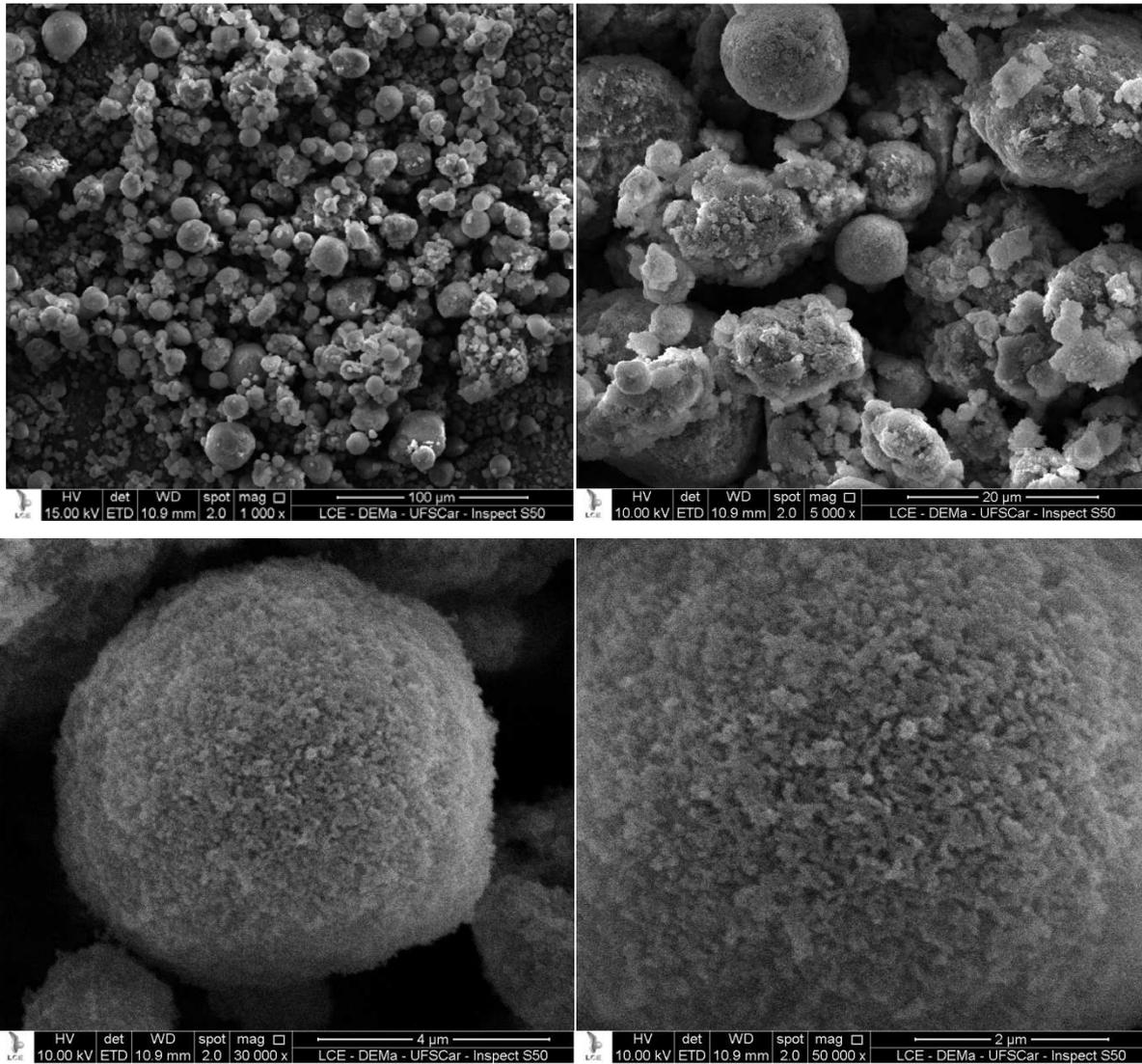


FIGURA 4.123 – Imagens de NCC 400 na forma seca a 1.000; 5.000; 30.000 e 50.000 x.

Foi realizada em conjunto com essas análises a avaliação da morfologia para a formulação referente à NCC 400 reduz. Para verificação da similaridade na morfologia apresentadas pelas formulações anteriores. A FIGURA 4.124 mostra as imagens obtidas para NCC 400 reduz., comprovando a semelhança entre estas formulações.

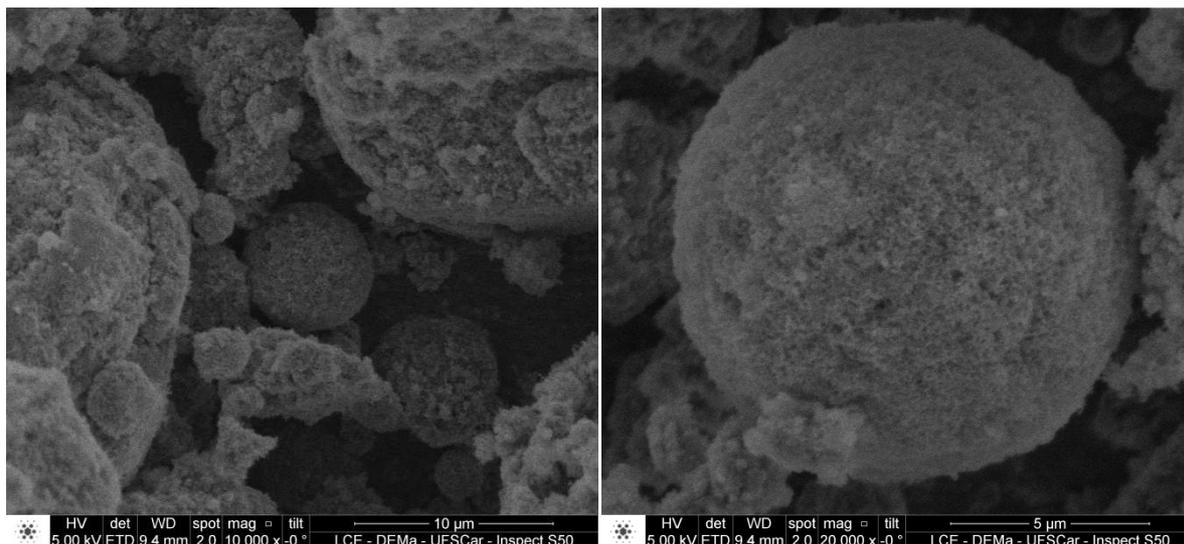


FIGURA 4.124 – Imagens de NCC 400 reduz. na forma seca a 10.000 e 20.000 x.

4.2.4.3.3 – Nanoesferas contendo menadiona (NSM 1,0)

Como foi descrito anteriormente, para as formulações envolvendo nanoesferas contendo menadiona, não foram alcançados valores satisfatórios em relação às taxas de recuperação e eficiência de encapsulação. Assim sendo, a avaliação da morfologia tornou-se importante parâmetro avaliado para verificar uma possível formulação instável pela forma apresentada pelas partículas ou mesmo a não formação de nanopartículas no sistema coloidal. A partir da FIGURA 4.125 foi possível verificar a presença das nanoesferas adsorvidas na matriz, mostrando que, somente a adequação dos ingredientes e suas respectivas quantidades devem ser modificadas na melhoria da mesma.

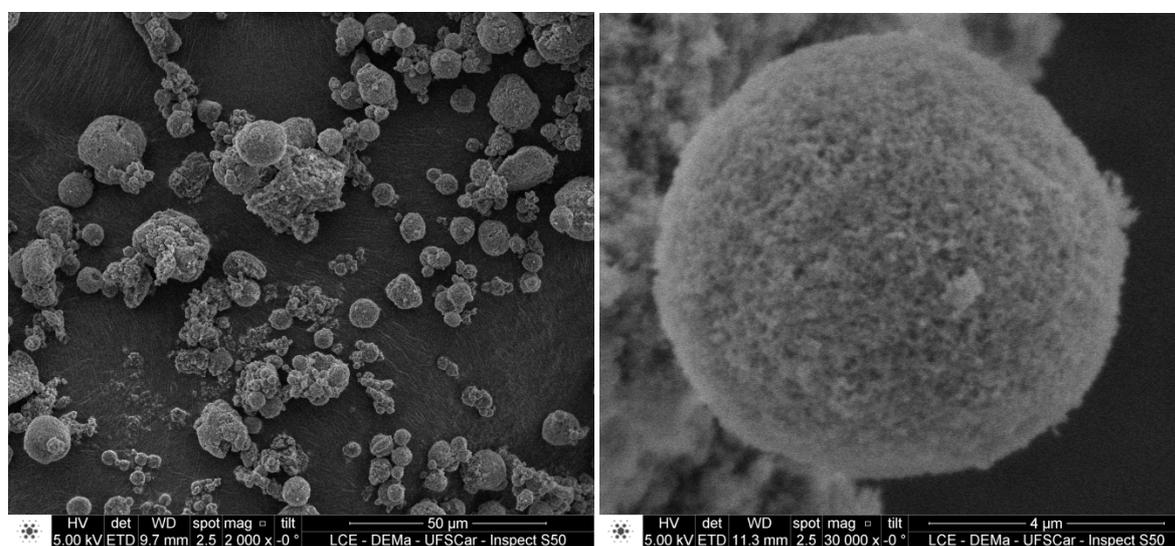
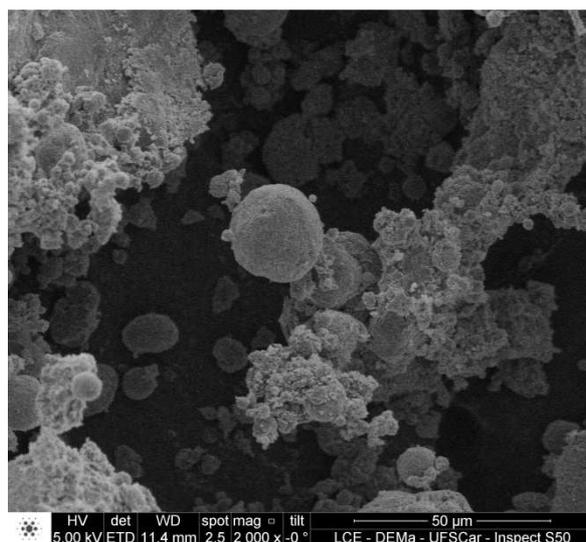


FIGURA 4.125 – Imagens de NSM 1,0 na forma seca a 2.000 e 30.000 x.

4.2.4.3.4 – Nanocápsulas contendo menadiona (NCM 200 e NCM 400)

Para a avaliação da morfologia destas últimas formulações foram realizadas imagens de ambas as formas: líquida e seca. Em relação à análise de NCM 200 na forma líquida, foram obtidas imagens importantes na melhor visualização da formação do filme polimérico, onde a primeira imagem mostra as etapas desta formação: a presença do filme polimérico no canto esquerdo, a pré-formação do filme e a presença das nanopartículas intactas no lado direito da imagem (FIGURA 4.126). As imagens referentes a esta mesma formulação na forma seca é mostrada através da FIGURA 4.127.

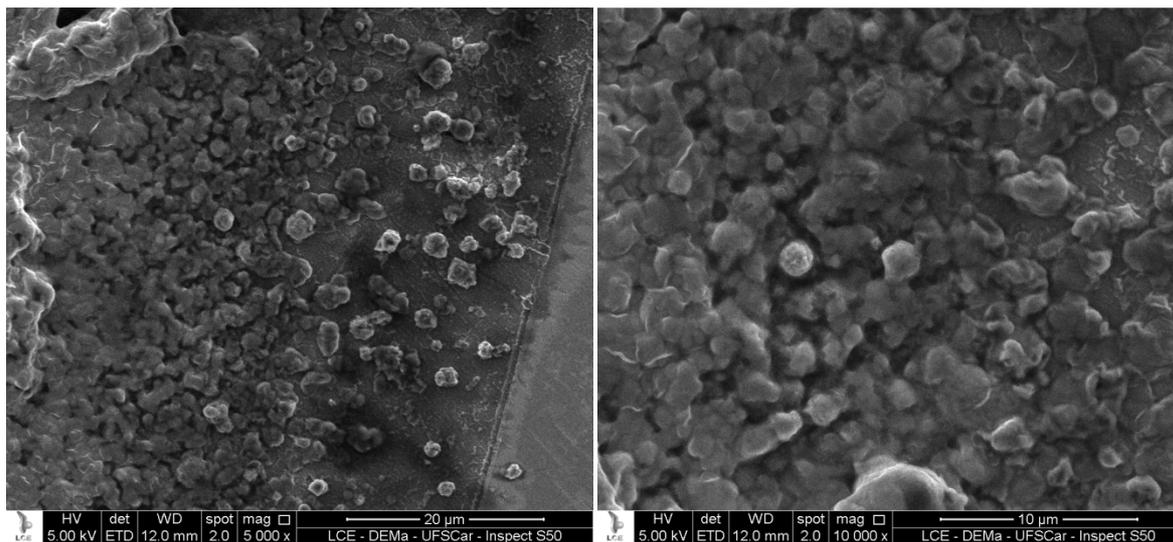


FIGURA 4.126 – Imagens de NCM 200 na forma líquida a 5.000 e 10.000 x.

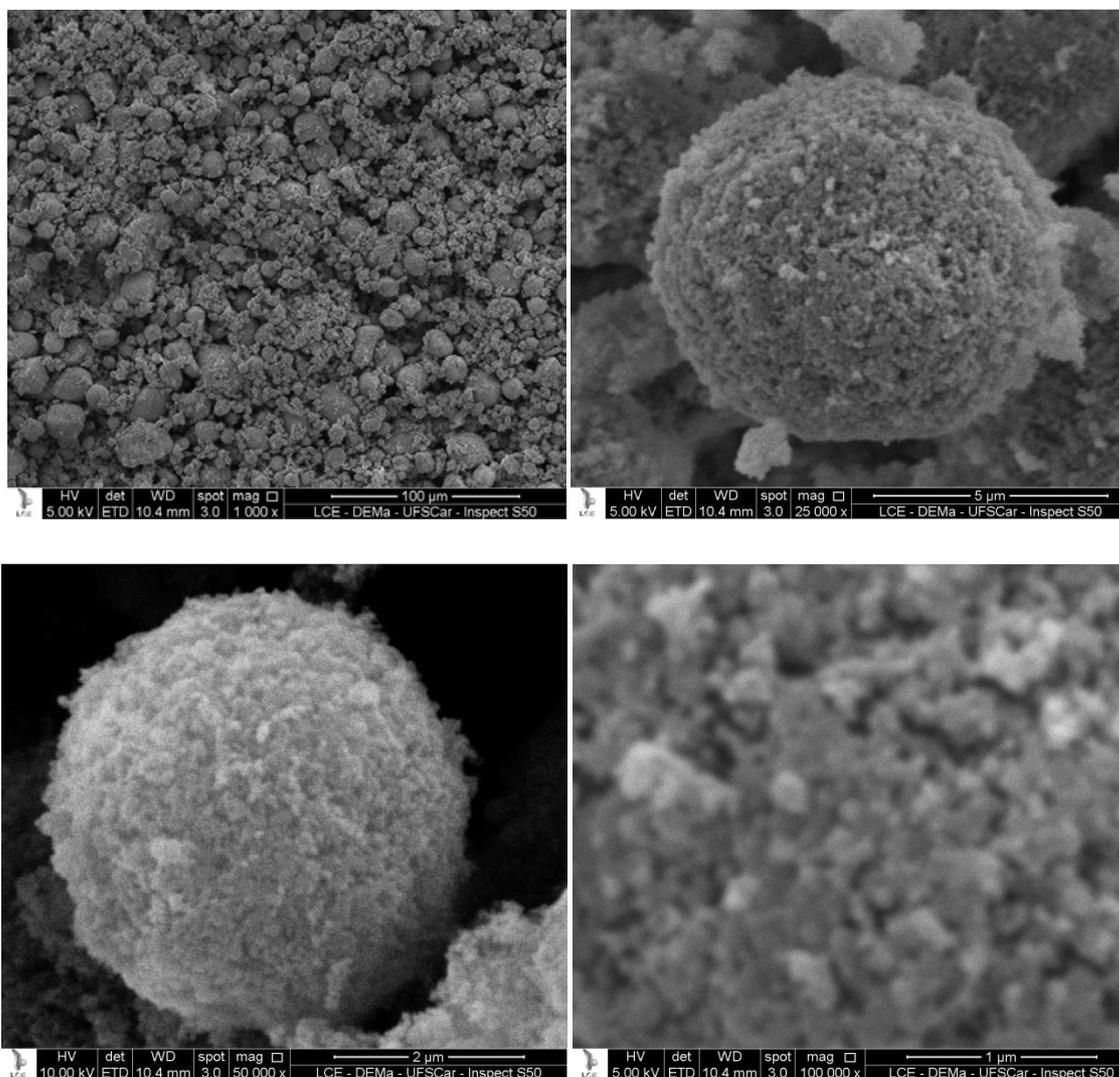


FIGURA 4.127 – Imagens de NCM 200 na forma seca a 1.000; 25.000; 50.000 e 100.000 x.

Para a formulação NCM 400, foram também obtidas imagens na forma líquida e sólida, como mostradas nas FIGURAS 4.128 e 4.129.

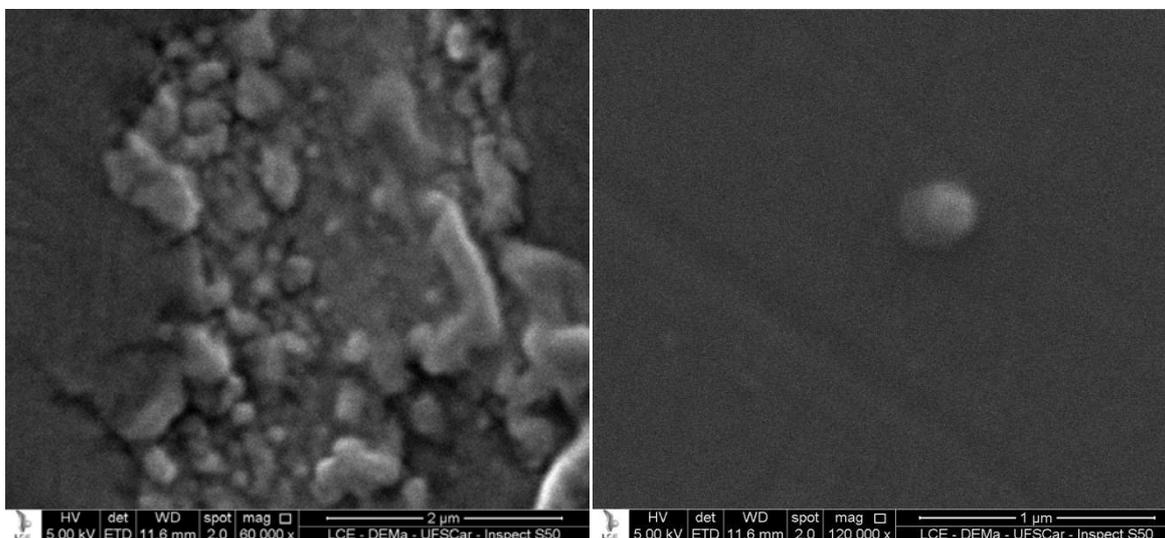


FIGURA 4.128 – Imagens de NCM 400 na forma líquida a 60.000 e 120.000 x.

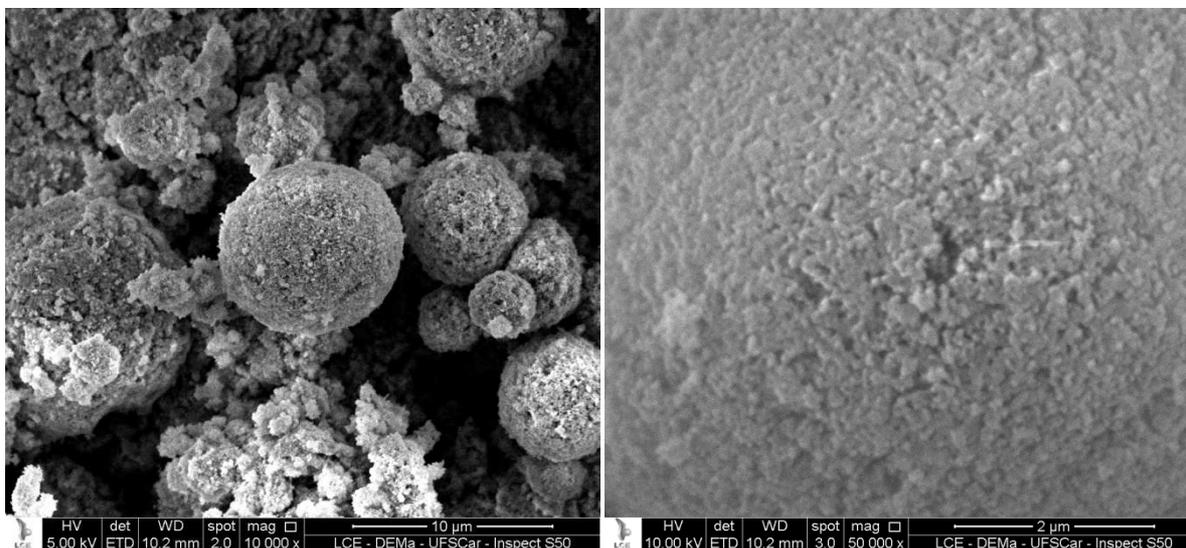


FIGURA 4.129 – Imagens de NCM 400 na forma seca a 10.000 e 50.000 x.

4.2.4.4 – Estudo da cinética de liberação “in vitro”

Em relação ao estudo de cinética de liberação “*in vitro*” das nanopartículas, foi considerado como o resultado dos ensaios biológicos, já que a incorporação do ativo em dieta sólida (ensaio inseticida) e meio de cultura sólido (ensaio fungicida), torna difícil a mimetização do ambiente em que será realizado o estudo da cinética de liberação, levando em consideração que este estudo se realiza em meio aquoso e não em material sólido. Assim sendo, todas as formulações foram submetidas aos ensaios biológicos para a realização da investigação em relação à cinética de liberação.

4.3 – ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1 – Atividade inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*

4.3.1.1 – *Picramnia bahiensis*

4.3.1.1.1 – Extratos brutos

Os extratos brutos de *P. bahiensis* foram enviados ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), na UNESP – Rio Claro, sob cuidados do Prof. Dr. Odair Correa Bueno, para realização e avaliação de experimento inseticida contra operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Para os extratos das folhas de *P. bahiensis*, a maior atividade se deu no extrato metanólico, que apresentou mortalidade de 50% em 4 dias, seguido do extrato diclorometânico (mortalidade de 50% em 8 dias), sendo o extrato hexânico muito semelhante com o controle da dieta pura, não mostrando atividade significativa. A FIGURA 4.130 contém o gráfico de sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, juntamente com a TABELA 4.28 com os dados estatísticos do experimento.

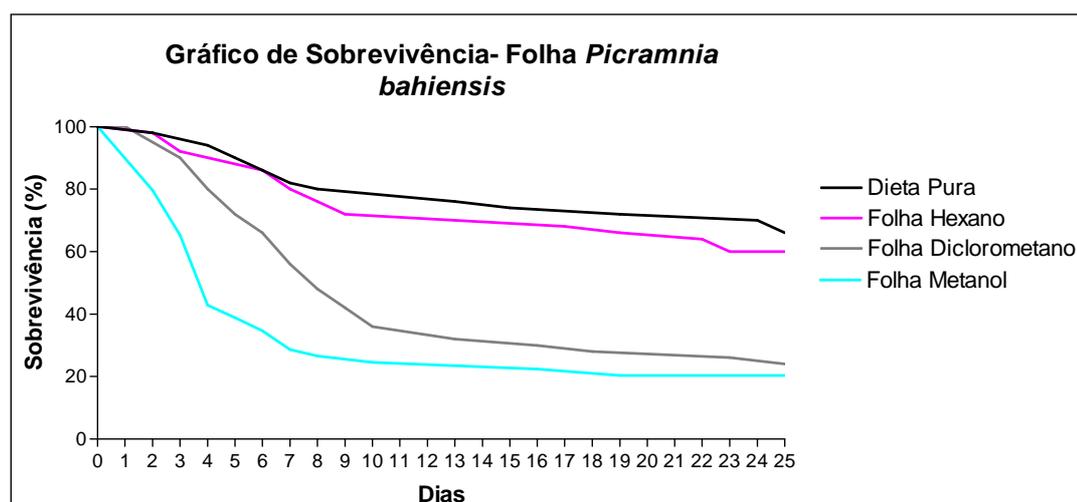


FIGURA 4.130 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de *P. bahiensis*.

TABELA 4.28 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de *P. bahiensis*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	14	20	20	24	26	28	34	>25 a
Folha Hexano	0	2	8	14	24	28	30	32	34	40	>25 a
Folha Diclorometano	0	0	10	34	52	64	68	70	72	74	8 b
Folha Metanol	2	22	36	66	74	76	76	78	80	80	4 b

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

Para os extratos do caule de *P. bahiensis*, o extrato com maior potencial inseticida foi observado no diclorometânico, seguido do metanólico, sendo o hexânico muito próximo em relação ao controle da dieta pura não mostrando atividade significativa. Em comparação com os extratos metanólico e diclorometânico, tem-se a verificação de um maior potencial para o extrato metanólico, porém este último mostrou ser menos ativo quando analisado pelas porcentagens da mortalidade acumuladas em relação aos dias do experimento (mortalidade de 50% de operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 5 dias para o extrato diclorometânico e 6 dias para metanólico). Abaixo é mostrada a FIGURA 4.131 referente ao gráfico de sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, juntamente com a TABELA 4.29 com os dados estatísticos do experimento para os extratos do caule de *P. bahiensis*.

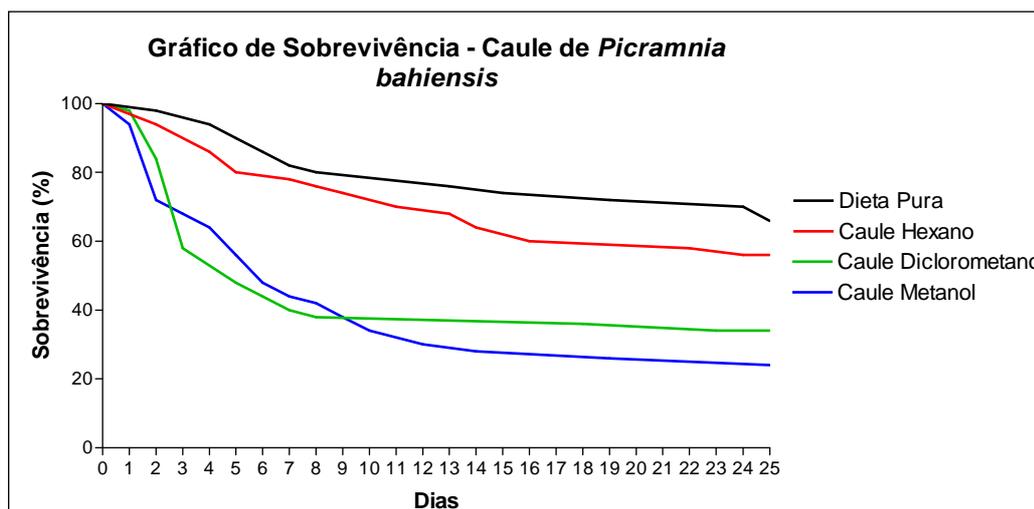


FIGURA 4.131 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de *P. bahiensis*.

TABELA 4.29 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de *P. bahiensis*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	14	20	20	24	26	28	34	>25 ^a
Caule Hexano	0	6	6	20	24	26	36	40	40	44	>25 ^a
Caule Diclorometano	2	16	42	70	76	76	76	76	78	80	5 ^b
Caule Metanol	6	28	32	52	58	66	72	72	74	76	6 ^b

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

Para os extratos das raízes de *P. bahiensis*, foi verificada uma maior atividade para o extrato H+D (mortalidade de 50% em 4 dias), seguido do metanólico (mortalidade de 50% em 4,5 dias). Abaixo é mostrada a FIGURA 4.132 relativa ao

gráfico de sobrevivência das operárias de *A. sexdens rubropilosa*, juntamente com a TABELA 4.30 com os dados estatísticos do experimento para os extratos do caule de *P. bahiensis*.

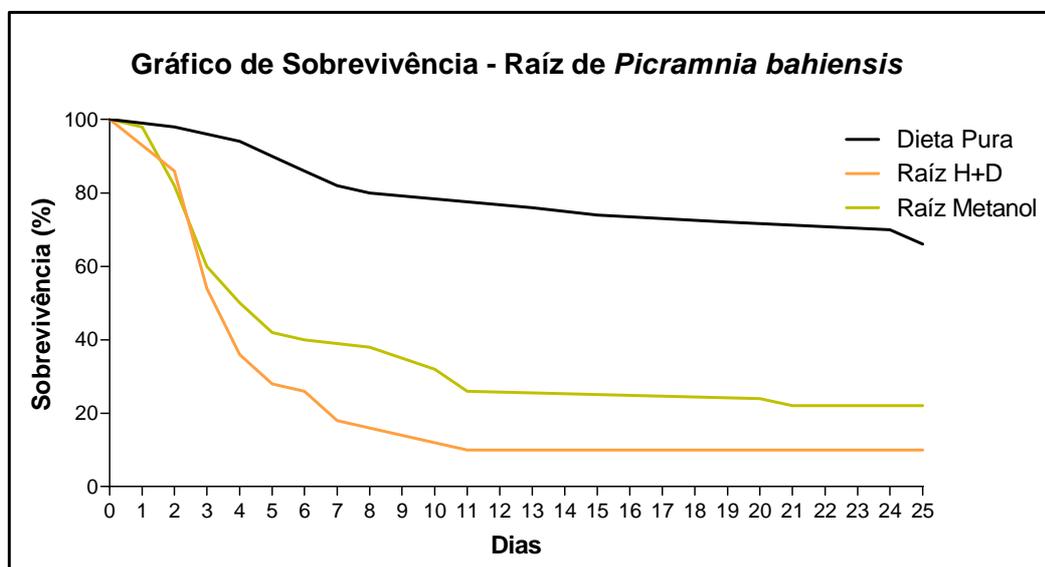


FIGURA 4.132 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das raízes de *P. bahiensis*.

TABELA 4.30 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das raízes de *P. bahiensis*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	14	20	20	24	26	28	34	>25 ^a
Raiz Hexano+Diclorometano	0	14	46	74	82	86	90	90	90	90	4 ^b
Raiz Metanol	2	18	40	60	62	68	74	74	78	80	4,5 ^b

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

Tendo em vista todos os ensaios inseticidas realizados com os diversos extratos de *P. bahiensis*, a maior atividade apresentada pelo extrato hexânico + diclorometânico das raízes, com mortalidade de 50% das operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 4 dias, além de manter o nível de mortalidade em torno de 90%, na qual este fator é de extrema importância no controle efetivo das formigas-cortadeiras, foi alvo de um estudo fitoquímico biomonitorado para a busca dos compostos responsáveis pela atividade inseticida.

4.3.1.1.2 – Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de *P. bahiensis*

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico (H+D) das raízes de *P. bahiensis* forneceu oito frações, além de duas referentes à limpeza. Em relação à avaliação da atividade inseticida das mesmas, somente foram enviadas as três primeiras frações (H+D/01, H+D/02 e H+D/03), já que para a realização deste ensaio há a necessidade de 25 mg de cada fração, sendo este o fator limitante para o envio de todas as frações obtidas. As três primeiras frações foram submetidas ao ensaio inseticida, sendo que a maior atividade biológica foi verificado no grupo H+D/03, possuindo assim potencial atividade inseticida, cuja mortalidade de 50% em 3 dias, seguido do grupo H+D/02 (5 dias) e finalmente com menor potencial o grupo H+D/01 (7 dias), como mostrado através da FIGURA 4.133 e TABELA 4.31.

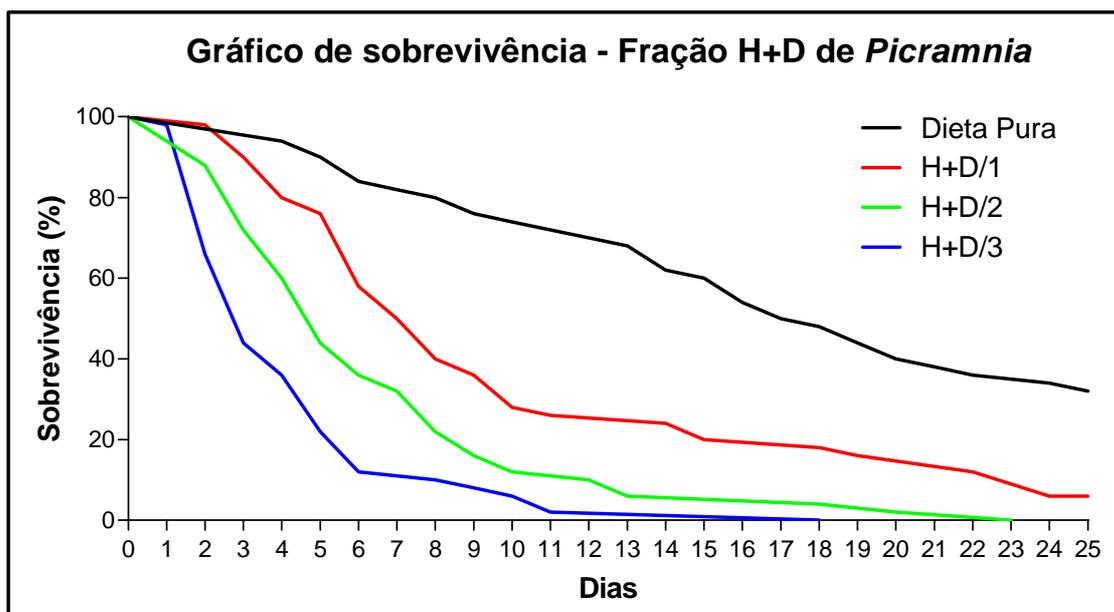


FIGURA 4.133 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial das frações obtidas do fracionamento cromatográfico das raízes de *P. bahiensis*.

TABELA 4.31 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico das raízes de *P. bahiensis*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia											Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25		
Controle Dieta Pura	0	0	0	16	20	26	38	50	62	68	68	17,5a
H+D/01	0	2	10	42	60	72	76	80	82	94	94	7b
H+D/02	0	12	28	64	78	88	94	94	98	100	100	5b
H+D/03	2	34	56	88	90	94	98	98	100	100	100	3b

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

A partir dos resultados descritos acima, foi verificado que a atividade se manteve nas três primeiras frações, sendo que as mesmas foram alvo de estudos com objetivo de isolar e identificar os compostos bioativos presentes nas respectivas frações.

4.3.1.1.3 – Substância 8 proveniente da fração H+D/01 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de P. bahiensis

Para o composto **8**, inicialmente foi utilizado 10 mg do mesmo para a avaliação do teste biológico. Assim, a incorporação do composto na dieta pura durou somente até o oitavo dia do experimento, sendo que a partir deste dia as formigas foram alimentadas somente com dieta pura. Apesar deste fato, o resultado foi considerado válido já que no último dia de incorporação do composto (8º dia) a mortalidade já era de 82%. Assim, a obtenção do valor de mortalidade em 50% foi avaliado. Contudo, ao analisar a fração na qual o composto estava contido via CG/EM, mostrou a presença de outros compostos presentes, tais como ftalato e ácidos e ésteres de cadeia longa, todos minoritariamente. A presença destes últimos compostos poderia resultar em um falso positivo na avaliação do composto, já que trabalho realizado por MORINI (1995) mostrou que alguns ácidos e ésteres de cadeia longa resultaram em um efeito tóxico significativo. A FIGURA 4.134 e TABELA 4.32 mostram o resultado obtido para a fração contendo o composto **8**, onde foi verificado a mortalidade de 50% de operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 3 dias de experimento.

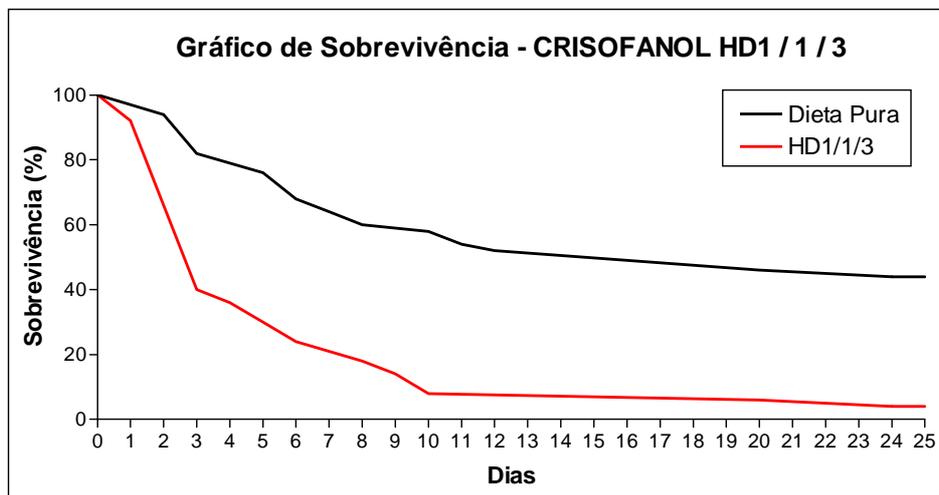


FIGURA 4.134 - Curva de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da fração H+D/01/01/03.

TABELA 4.32 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com a fração H+D/01/01/03

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	6	18	32	40	42	48	48	54	56	20a
H+D/01/01/03	8	34	60	76	82	92	92	92	94	96	3b

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

Para a reavaliação da atividade inseticida deste composto, foi realizada uma purificação, com base em análises via HPLC e CG/EM. Assim sendo, foi realizado o ensaio nos mesmos protocolos feitos anteriormente, porém agora sem a alimentação com a dieta pura, encerrando o bioensaio no décimo dia de experimento, já que para confirmação da atividade, o mesmo deveria ser ativo até o oitavo dia de experimento. Assim, para este ensaio realizado, foi verificada a prolongação da atividade, com a verificação da mortalidade de 50% de operárias de *A. sexdens rubropilosa* no quinto dia de experimento, diferentemente do anterior, no terceiro dia de experimento. O resultado deste bioensaio é mostrado através da FIGURA 4.135 e TABELA 4.33.

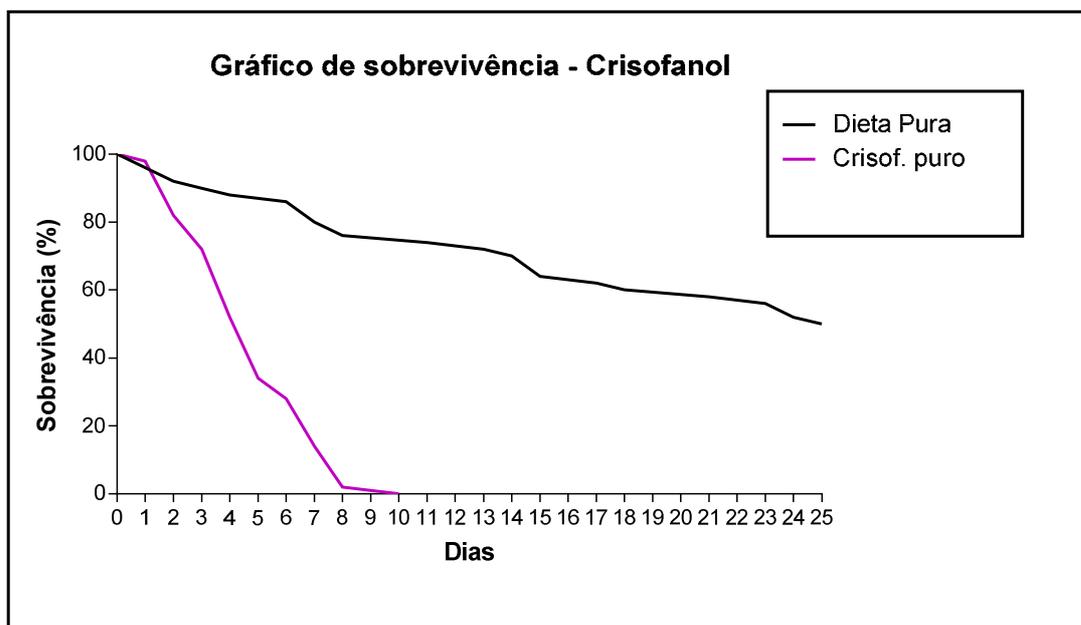


FIGURA 4.135 - Curva de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial da substância **8**.

TABELA 4.33 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o composto **8**

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	8	10	14	24	24	30	38	42	50	25 a
Crisofanol	2	18	28	72	98	100	100	100	100	100	5 b

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

Em relação ao estudo da fração H+D/01, o isolamento e identificação do composto majoritário presente nesta fração, a substância **8** mostrou atividade inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, sendo que este composto, ao isolar uma maior quantidade, foi submetido ao processo de nanoencapsulamento para avaliar a eficácia, através deste processo, no controle desta praga.

4.3.1.1.4 – Frações H+D/02 e H+D/03 obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de *P. bahiensis*

Em relação à avaliação inseticida dos compostos presentes nas frações ativas, H+D/02 e H+D/03, não foi possível pela baixa quantidade dos compostos identificados em mistura necessária para a execução do ensaio. Porém, a determinação do perfil químico dos compostos presentes, mostra que, provavelmente, estes compostos são os possíveis ativos. Um estudo futuro no isolamento dos mesmos em maiores quantidades é de extrema valia no que diz respeito à identificação dos compostos responsáveis por esta atividade em potencial, vista na avaliação original das suas respectivas frações.

4.3.1.2 – *T. schomburgkianum*

4.3.1.2.1 – Extratos brutos

Todos os extratos brutos de *T. schomburgkianum* também foram enviados ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), na UNESP – Rio Claro, para realização e avaliação de experimento inseticida contra operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Para os extratos obtidos do caule, verificou-se que o diclorometânico foi o mais ativo, com 50 % de mortalidade das operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 4 dias, sendo que o extrato metanólico teve 50% de mortalidade em 6 dias. Para o extrato hexânico, este não apresentou atividade significativa em relação ao controle (dieta pura) com base nos dados estatísticos, já que apresentou mortalidade de 50% em 8 dias. Abaixo são mostradas a FIGURA 4.136 e TABELA 4.34 referentes às atividades inseticidas dos extratos brutos provenientes do caule de *T. schomburgkianum*.

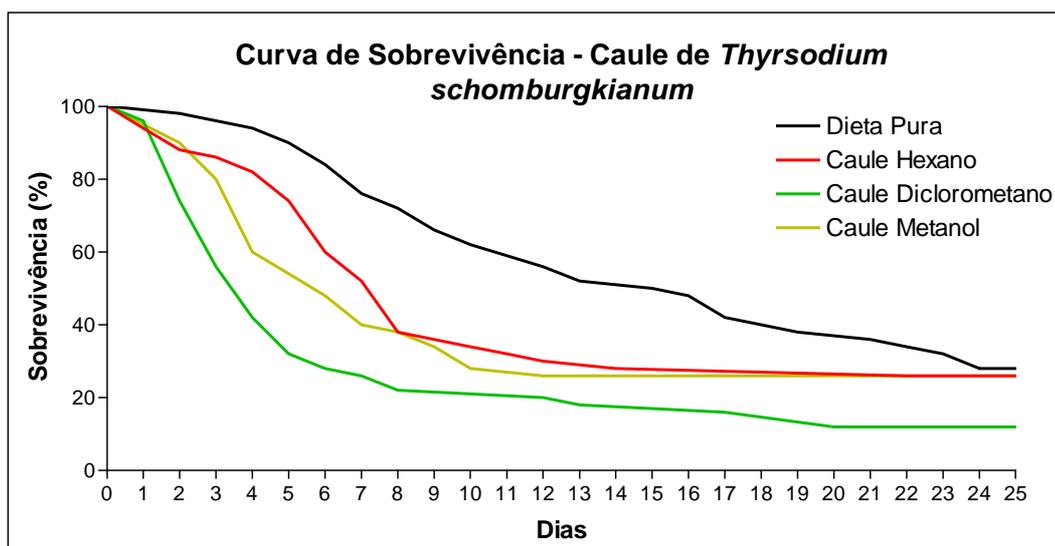


FIGURA 4.136 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de *T. schomburgkianum*.

TABELA 4.34 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos do caule de *T. schomburgkianum*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	16	28	38	48	58	64	72	16a
Caule Hexano	6	12	14	40	62	66	72	72	72	72	8a
Caule Diclorometano	4	26	44	72	78	78	82	84	88	88	4b
Caule Metanol	0	10	20	52	62	72	74	74	74	74	6b

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

Para os extratos obtidos das folhas, verificou-se a maior atividade inseticida no metanólico, com mortalidade de 50% em 5 dias. Em comparação com o controle (dieta pura), os extratos hexânico e diclorometânico não apresentaram

atividades significativas. A curva de sobrevivência dos extratos das folhas, juntamente com os dados estatísticos é mostrada na FIGURA 4.137 e TABELA 4.35.

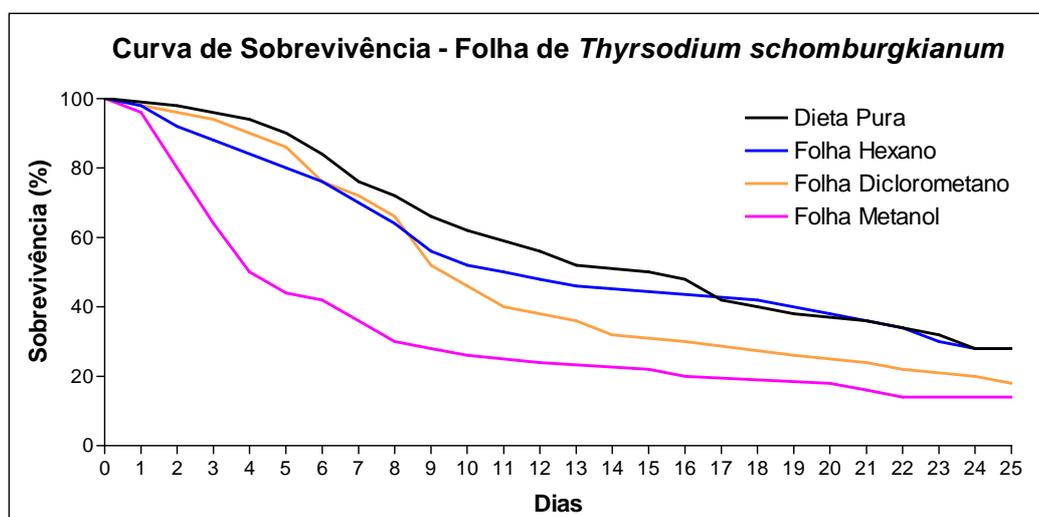


FIGURA 4.137 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de *T. schomburgkianum*.

TABELA 4.35 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com extratos das folhas de *T. schomburgkianum*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	2	2	16	28	38	48	58	64	72	16a
Caule Hexano	2	8	12	24	36	48	54	54	64	72	11,5a
Caule Diclorometano	0	4	6	24	34	54	68	70	76	82	10a
Caule Metanol	4	20	36	58	70	74	76	80	84	86	5b

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

A partir dos resultados obtidos para todos os extratos originários de *T. schomburgkianum*, a maior atividade inseticida foi vista no extrato diclorometânico do caule, com mortalidade de 50% das operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 4 dias de experimento. Assim sendo este extrato foi alvo também de estudos na busca de compostos responsáveis por tal atividade.

4.3.1.2.2 – Frações obtidas a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

O extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum* foi submetido à partição, originando a partição em hexano e diclorometânica. O estudo fitoquímico foi iniciado pela partição TSPH, sendo que a maioria das frações obtidas do fracionamento cromatográfico desta partição (que continham maior massa para a avaliação) foi submetida ao ensaio inseticida, como mostrado na FIGURA 4.138 e TABELA 4.36.

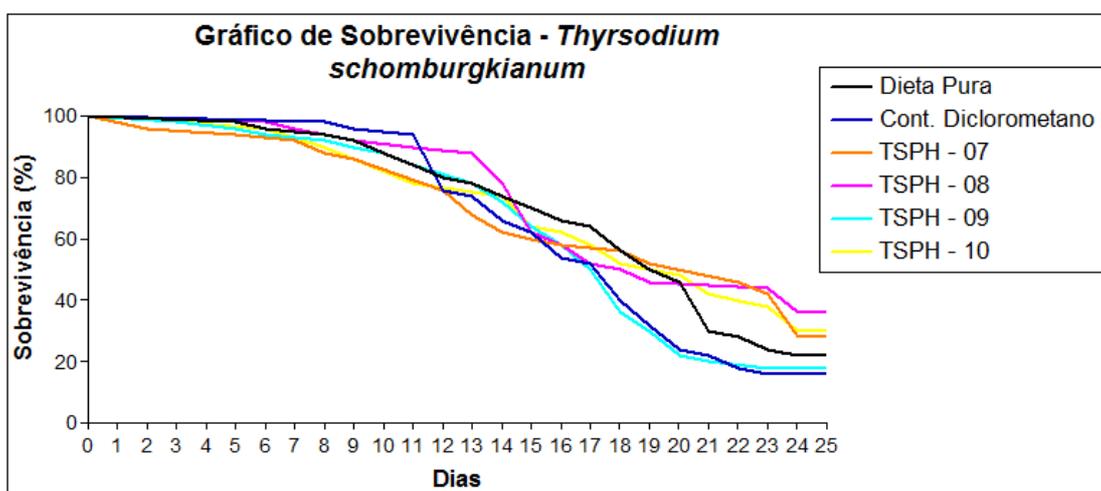
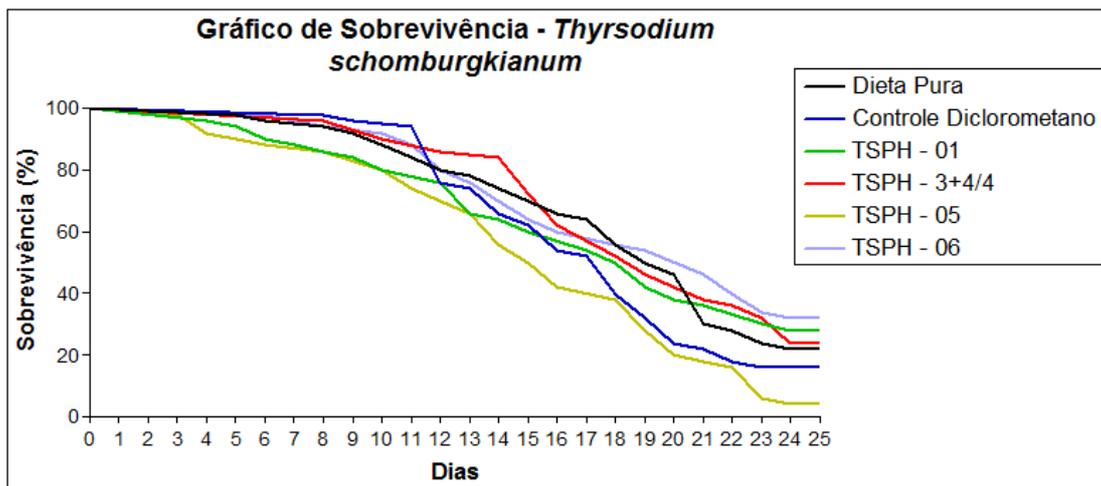


FIGURA 4.138 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPH do caule de *T. schomburgkianum*.

TABELA 4.36 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPH do caule de *T. schomburgkianum*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	4	6	12	26	36	70	78	19,5a
Controle DCM	0	0	0	0	2	4	34	48	78	84	18a
TSPH/01	0	0	0	10	14	20	36	46	64	72	18a
TSPH/03+04/04	0	0	0	0	4	10	16	34	58	72	19a
TSPH/05	0	0	2	12	14	20	44	58	82	96	15,5a
TSPH/06	0	0	0	2	6	8	30	40	54	68	21a
TSPH/07	0	4	4	6	12	14	38	42	48	72	22a
TSPH/08	0	0	0	2	6	8	22	48	54	64	18,5a
TSPH/09	0	0	2	6	8	12	28	50	80	82	17a
TSPH/10	0	0	2	4	10	14	26	42	58	70	19,5a

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

A partir dos resultados obtidos, foi verificado que nenhuma das frações avaliadas apresentava a atividade vista no extrato de origem, sendo assim foram enviadas as frações de maior massa, referentes ao fracionamento cromatográfico da partição TSPD, para a avaliação da atividade inseticida, como mostrado na FIGURA 4.139 e TABELA 4.37.

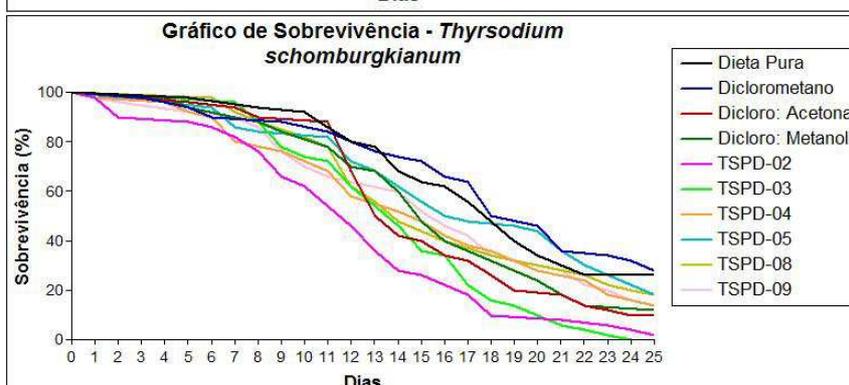
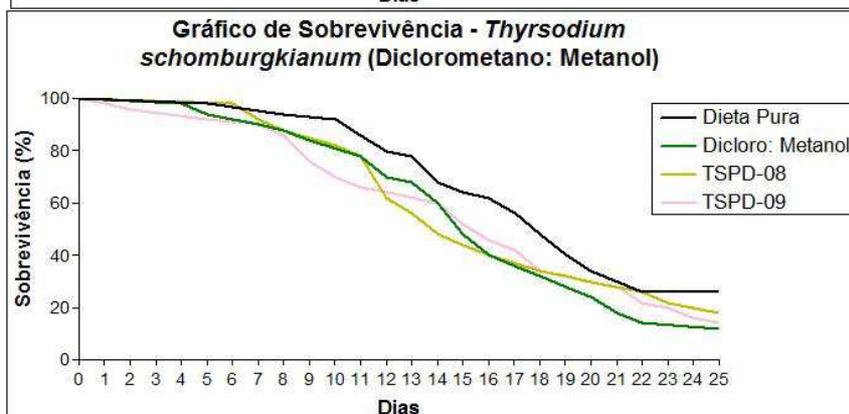
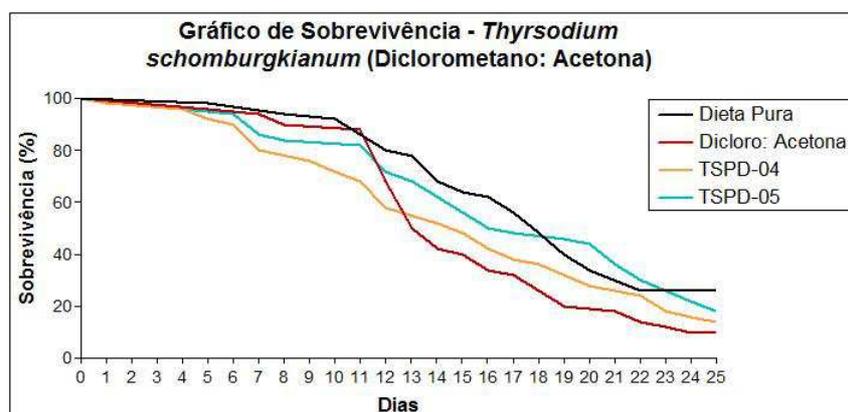
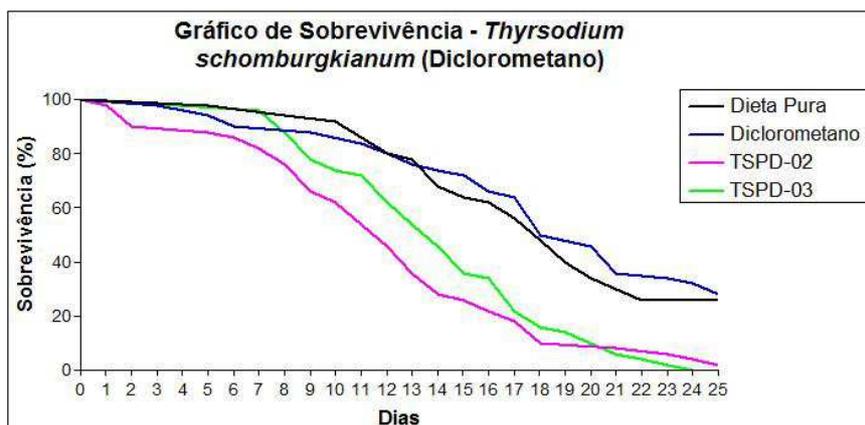


FIGURA 4.139 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPD do caule de *T. schomburgkianum*.

TABELA 4.37 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as frações obtidas do fracionamento cromatográfico de TSPD do caule de *T. schomburgkianum*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	2	6	8	32	44	66	74	18 a
Controle DCM	0	0	2	10	10	12	26	36	64	72	19 a
Controle DCM:acetona	0	0	0	4	10	10	58	68	82	90	13,5 b
Controle DCM:MeOH	0	0	0	6	12	16	40	64	82	88	15 b
TSPD/02	2	10	10	14	24	38	72	82	92	98	12 b
TSPD/03	0	0	0	0	12	26	54	78	94	100	14 b
TSPD/04	2	2	2	10	20	28	48	62	72	86	15 a
TSPD/05	0	2	2	6	16	16	38	56	64	82	16 a
TSPD/08	0	0	0	2	12	18	52	60	70	82	14 a
TSPD/09	2	4	4	8	14	30	40	58	72	86	16 a

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

Como foram verificadas, em todas as frações obtidas em ambas às partições não foi verificada nenhuma atividade inseticida, todas as frações analisadas se comportaram muito semelhantes aos controles surgiram diversas dúvidas e hipóteses sobre esse problema enfrentado no que diz respeito à perda da atividade. A realização dos ensaios utilizando solventes como suporte de solubilização das frações para melhor incorporação, já que todas apresentavam dificuldades de transferência pelo aspecto “melado”, observados em muitos extratos, não demonstrou ser uma hipótese da perda da atividade, já que a presença deles causaria uma maior mortalidade. Porém dois fatores foram levantados, o fator de

sinergismo perdido no momento da partição como fonte principal do desaparecimento da atividade ou pela avaliação de somente algumas frações, porém esta teve uma baixa probabilidade de ter ocasionado tal fato já que se houvesse um composto ou mais presente em uma fração de baixa quantidade de massa, o mesmo deveria ocasionar uma atividade muito alta. Avaliando tal fato, foi novamente enviado o extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum* original, juntamente com as partições em hexano e diclorometano para uma reavaliação do teste. Vale ressaltar que as partições não foram enviadas inicialmente para a avaliação inseticida, pois, como a duração do teste se dá em torno de um mês, não seria viável a espera de cada teste para então realizar o fracionamento cromatográfico em razão do tempo, e sabendo que neste extrato foi apresentado uma atividade inseticida, foi realizado o fracionamento cromatográfico de cada partição para então serem submetidos a teste. A FIGURA 4.140 e TABELA 4.38 mostram os resultados obtidos para avaliação da atividade no extrato original e em suas respectivas partições.

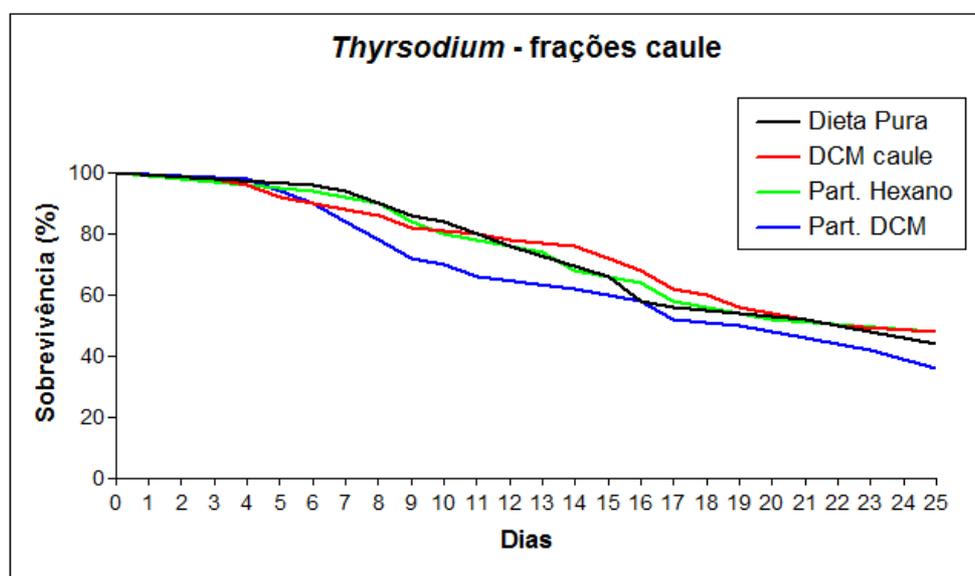


FIGURA 4.140 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o extrato original diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum* e suas respectivas partições.

TABELA 4.38 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o extrato original diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum* e suas respectivas partições

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	4	10	16	24	44	48	56	22,5a
Extrato Caule DCM	0	0	2	8	14	18	24	38	48	52	22a
Partição hexânica	0	0	0	6	10	20	32	42	48	52	25a
Partição diclorometânica	0	0	0	10	22	30	38	48	54	64	21a

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

Com base nos resultados obtidos, a hipótese mais provável deste resultado contraditório, o fato da ocorrência de sinergismo, foi descartada já que o extrato novamente enviado não apresentou a atividade antes mostrada, sendo que foi seguido o mesmo protocolo anteriormente realizados para este ensaio. Uma possível explicação para este fato foi a degradação do extrato por algum fator externo, tal como o tempo de armazenagem, porém análises através de RMN de ^1H provaram que não ocorreu nenhum tipo de degradação. Assim sendo, para este caso específico, não foram comprovadas as causas deste fato. Apesar disto, foi dada continuidade no estudo fitoquímico visando, principalmente o estudo quimiosistemático da mesma, já que não há relatos na literatura em relação às substâncias presentes nesta espécie. Assim, foram enviadas outras frações e substância para a avaliação da atividade inseticida.

4.3.1.2.3 – Substância **19** proveniente da fração TSPH/02/02+03/02 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

A substância **19**, presente majoritariamente na fração TSPH/02, foi submetida ao ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, já que a fração de origem não foi ensaiada em testes anteriores, sendo este uma possível verificação da atividade em questão, como mostrado na FIGURA 4.141 e TABELA 4.39.

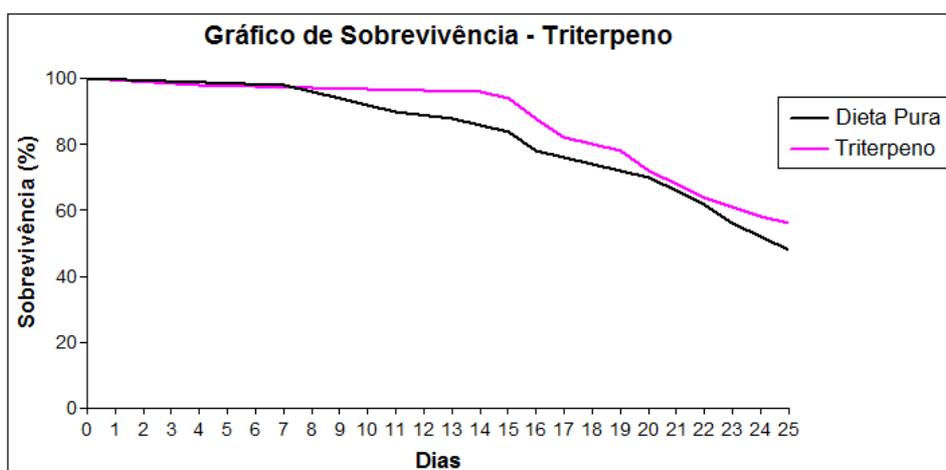


FIGURA 4.141 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com a substância **19** proveniente do extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*.

Tabela 4.39 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com a substância **19** proveniente do extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	0	0	2	8	14	22	34	52	25a
Composto (19)	0	0	0	2	2	2	4	18	32	44	>25a

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

A partir dos resultados mostrados acima, foi verificado que a substância **19** não apresentou atividade inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, porém um fato curioso foi a verificação de uma maior mortalidade do controle da dieta pura em relação ao próprio composto em questão.

Apesar de ter sido obtido alguns compostos, somente poucos foram submetidos ao teste inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Assim, com a impossibilidade de efetuar o mesmo processo para outros compostos pela pouca quantidade existente, fez com que houvesse a ampliação de outros estudos em paralelo no ensaio com uma variedade de compostos com o mesmo esqueleto carbônico de **8** ou com estrutura similar a serem testados.

4.3.1.3 – Compostos naturais comerciais

Foram obtidos compostos tanto das classes das antraquinonas (alizarina, 2-metil-antraquinona, antraquinona), quanto das naftoquinonas (menadiona e 1,4-naftoquinona), disponíveis comercialmente e cedidos gentilmente pelo Dr. Warley de Souza Borges, para uma avaliação da ação inseticida. A FIGURA 4.142 e TABELA 4.40 mostram os resultados obtidos para estes compostos.

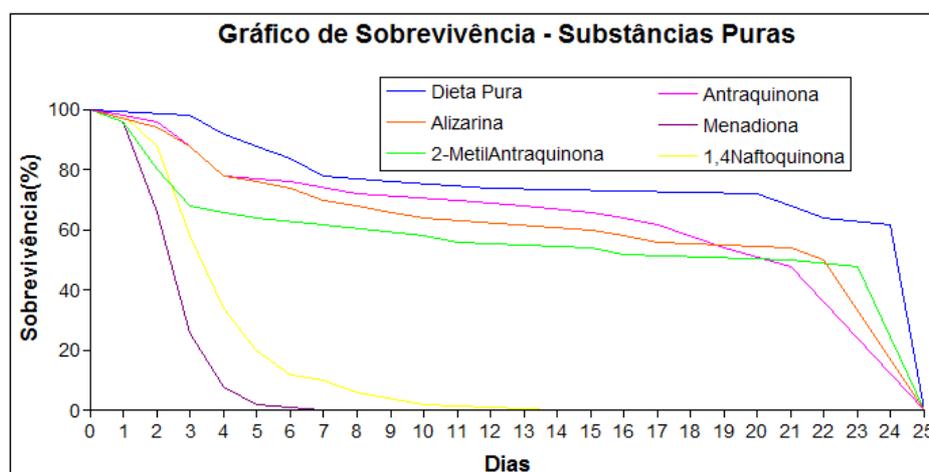


FIGURA 4.142 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias comerciais.

TABELA 4.40 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as substâncias comerciais

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle Dieta Pura	0	0	2	16	22	24	26	26	32	40	25 a
Alizarina	0	6	12	26	32	36	36	44	46	50	22 b
2-Metilantraquinona	4	20	32	36	38	42	44	48	50	52	21 b
Antraquinona	2	4	12	24	28	28	32	38	52	52	21 b
Menadiona	4	34	74	98	100	100	100	100	100	100	3 b
1,4-Naftoquinona	2	12	42	88	94	98	100	100	100	100	4 b

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

Para os compostos testados, dois compostos mostraram atividade inseticida, menadiona, que mostrou mortalidade de 50% de operárias de *A. sexdens rubropilosa* no 3º dia de experimento e o composto 1,4-naftoquinona (mortalidade de 50% no 4º dia de experimento). Apesar de esses compostos serem de classes diferentes dos estudados, estes mereceram atenção no que se refere ao controle de formigas-cortadeiras, assim o composto menadiona foi escolhido para submetê-lo ao processo de encapsulamento.

Ao analisar os resultados obtidos dos compostos alizarina, 2-metilantraquinona e antraquinona em relação ao composto **8**, nenhum dos testados mostrou atividade inseticida, assemelhando suas curvas com a da dieta pura. Um fato importante na discussão da relação estrutura-atividade, já que **8** mostrou ser ativo com mortalidade de 50% das operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 5 dias de experimento. As estruturas são mostradas na FIGURA 4.143.

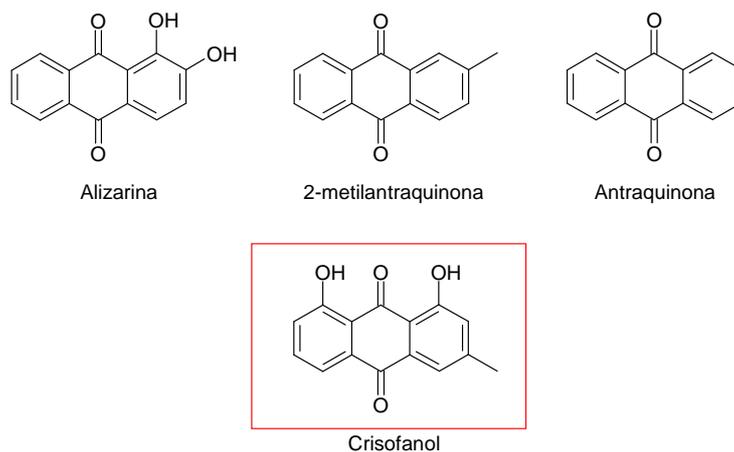


FIGURA 4.143 – Estruturas dos compostos testados no ensaio inseticida frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Numa análise prévia em relação à estrutura-atividade, foi possível notar que a presença e o posicionamento da metila, juntamente com o posicionamento das hidroxilas queladas à carbonila são fatores para o aumento da atividade, já que a presença de duas hidroxilas em orto visto no composto alizarina não gerou atividade.

4.3.1.4 – Nanopartículas

Em relação à avaliação do potencial inseticida dos compostos encapsulados, foram realizados testes preliminares para uma possível mudança no protocolo do ensaio frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Como foi mostrado no item 3.3.2, um dos procedimentos envolvidos na metodologia deste ensaio engloba a esterilização de todo o material envolvido através do uso da autoclave. Era de se esperar que, a uma temperatura de 120 °C e 1 atm durante 20 minutos as nanopartículas iriam se romper, provavelmente o polímero sofreria decomposição. Assim, foram realizados ensaios para a avaliação em relação à introdução e incorporação das nanopartículas na dieta, realizando ensaios na forma líquida autoclavada, líquida não autoclavada e seca não autoclavada. Em relação aos dois primeiros testes, os resultados mostraram que, ao autoclavar as nanopartículas e posterior incorporação à dieta, ao solidificar, apresentava pontos em um aspecto muito semelhante à borracha, o que muito provavelmente veio do

polímero rompido. Com base nas observações realizadas nesses testes, foi optado em avaliar a atividade inseticida utilizando nanopartículas em sua forma seca não autoclavada.

4.3.1.4.1 – Componentes pertencentes às formulações

Em relação à avaliação da atividade dos componentes presentes nas formulações, a fim de evitar um resultado equivocado, foram realizados testes inseticidas submetendo os mesmos para a avaliação de toxicidade frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa responsável pela realização dos ensaios inseticidas comprovaram que os componentes: Tween® 80 e Span® 60 não foram ativos, com curvas de sobrevivência semelhantes à dieta pura. Assim sendo, dois componentes poderiam teoricamente produzir uma atividade inseticida, sendo esses o aerosil, utilizado como suporte de secagem das nanopartículas, e o óleo utilizado em nanocápsulas, benzoato de benzila. Com relação ao aerosil, ele foi submetido ao ensaio na mesma concentração em que se encontrava nas nanopartículas secas, sendo que este composto não resultou em uma atividade inseticida, mantendo sua curva muito próxima ao controle, como mostrado na FIGURA 4.144 e TABELA 4.41. Utilizando a mesma concentração de benzoato de benzila que se encontra em nanocápsulas contendo 400 µL, este foi ativo com mortalidade de 50% de operárias em 2 dias de experimento. A FIGURA 4.145 e TABELA 4.42 mostram os resultados para este componente.

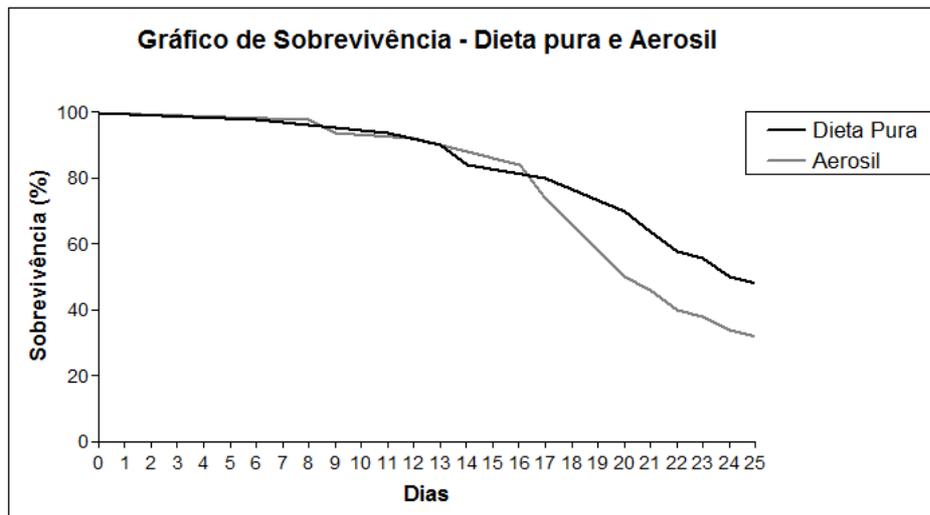


FIGURA 4.144 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente aerosil.

TABELA 4.41 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente aerosil

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	16	20	36	52	24,5 a
Aerosil	0	0	0	0	2	6	12	26	54	68	21 a

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

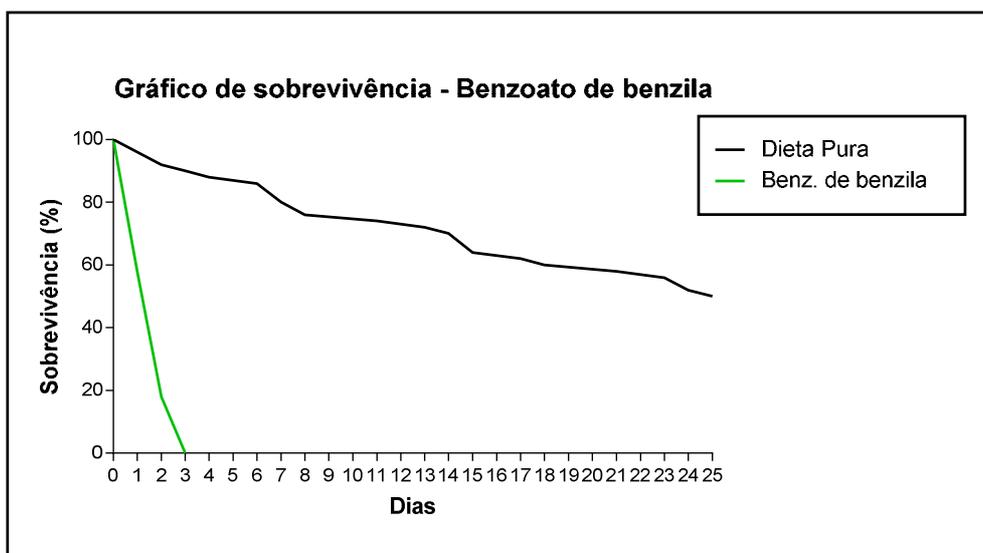


FIGURA 4.145 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente benzoato de benzila.

TABELA 4.42 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com o componente benzoato de benzila

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	8	10	14	24	24	30	38	42	50	25a
Benzoato de benzila	42	82	100	100	100	100	100	100	100	100	2b

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

Com este resultado, houve a necessidade de avaliar e determinar a concentração que o benzoato de benzila não seria mais ativo. Assim, foram realizados novos testes utilizando sucessivas diminuições da concentração, como mostra a FIGURA 4.146 e TABELA 4.43.

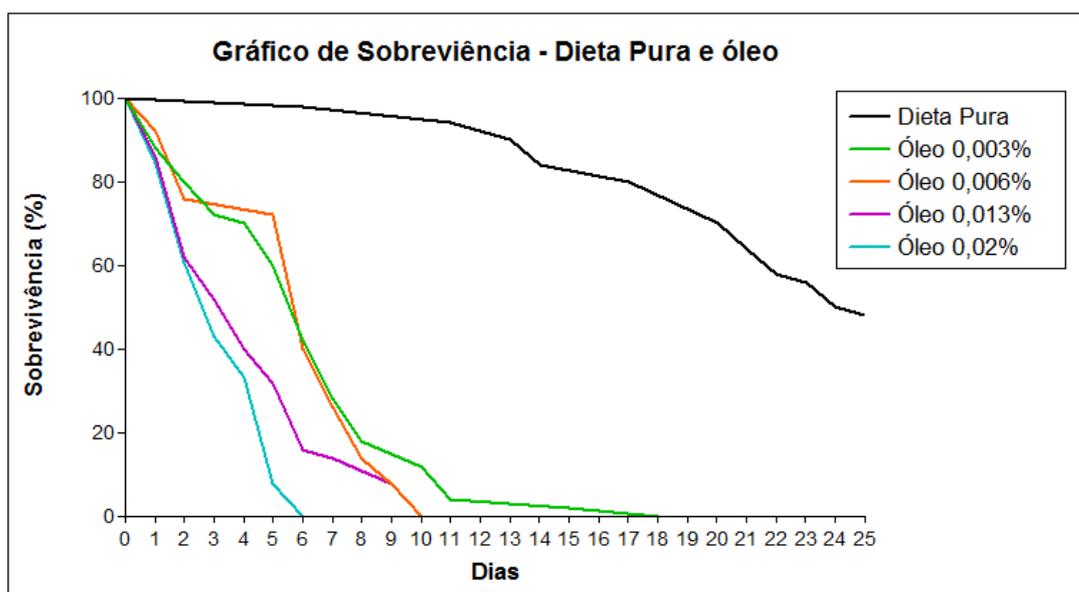


FIGURA 4.146 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com sucessivas diminuições na concentração de benzoato de benzila.

TABELA 4.43 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com sucessivas diminuições na concentração de benzoato de benzila

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	16	20	36	52	24,5a
Óleo 0,003%	12	20	28	58	82	88	96	98	100	100	6b
Óleo 0,006%	8	24	24	60	86	100	100	100	100	100	6b
Óleo 0,013%	14	38	48	86	88	100	100	100	100	100	4b
Óleo 0,02%	16	40	58	100	100	100	100	100	100	100	3,0b

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

Os resultados apresentados acima indicam que, mesmo em concentrações muito baixas, o óleo ainda apresentou uma atividade inseticida na menor concentração causando mortalidade de 50% das operárias de *A. sexdens rubropilosa* em 6 dias. Sendo assim, foram avaliadas as nanocápsulas vazias (NC

vazias 200 e 400) contendo 200 e 400 µL e comparando este resultado com o primeiro ensaio realizado com o benzoato de benzila na mesma concentração da formulação mais concentrada, ou seja, NC vazias 400, mostrado pela FIGURA 4.147 e TABELA 4.44.

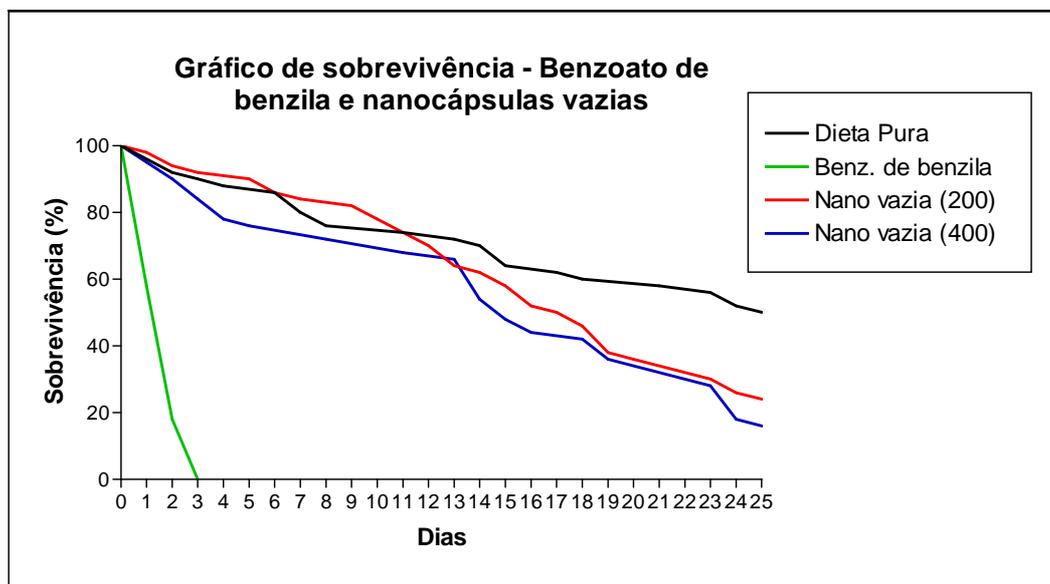


FIGURA 4.147 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas vazias e benzoato de benzila.

TABELA 4.44 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas vazias e benzoato de benzila

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	8	10	14	24	24	30	38	42	50	25 a
Benzoato de benzila	42	82	100	100	100	100	100	100	100	100	2 b
Nano. vazia (óleo 200)	2	6	8	14	16	22	38	50	64	76	17 b
Nano. vazia (óleo 400)	0	10	16	24	28	28	46	56	64	84	15 b

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

Com base nos resultados obtidos, este ensaio se tornou muito importante no que diz respeito a duas observações principais. A primeira foi a verificação e comprovação que o óleo em sua forma nanoencapsulada teve a sua atividade diminuída drasticamente, sendo que até o décimo quarto dia se assemelhou muito ao controle. Após este período, um aumento na atividade de ambas as formulações com relação ao controle mostrou que este retardamento na atividade foi responsável pela liberação controlada, uma das características mais importantes e vantajosas do uso desta técnica, aliada à cinética de liberação na dieta pura, sendo esta a segunda observação.

A partir dos resultados até aqui apresentados, foram realizados os estudos de avaliações das nanopartículas contendo os compostos bioativos, submetendo-os aos ensaios inseticidas para a obtenção de dados sobre a liberação controlada, aliada ao retardamento na atividade e ao estudo de cinética de liberação dos ativos.

4.3.1.4.2 – Nanopartículas contendo crisofanol

Em relação ao ensaio inseticida utilizando nanoesferas contendo crisofanol, a formulação NSC 1,0, por apresentar melhores resultados, foi submetida ao teste frente às operárias de *A. sexdens rubropilosa* na mesma concentração que o composto livre já mostrado anteriormente. A FIGURA 4.148 e TABELA 4.45 mostra a avaliação das nanoesferas contendo crisofanol.

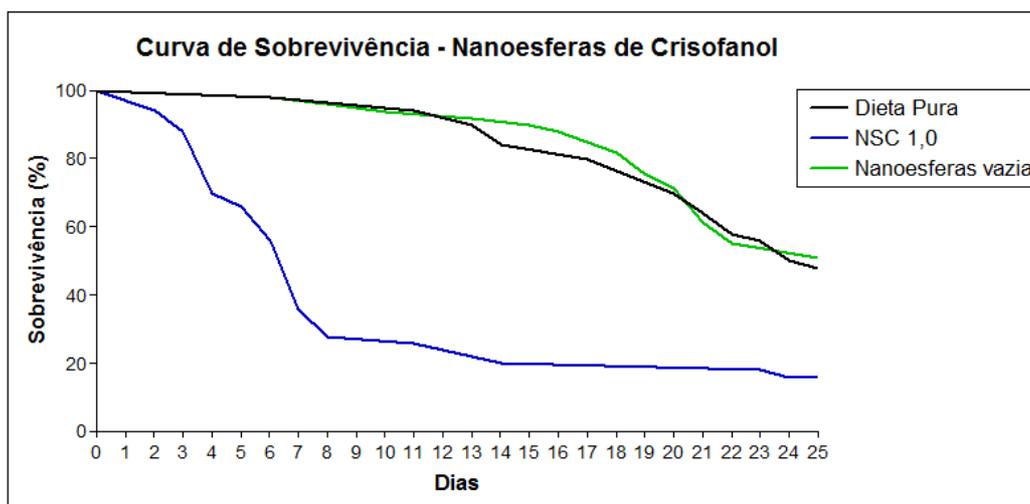


FIGURA 4.148 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo crisofanol.

TABELA 4.45 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo crisofanol

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	16	20	36	52	24,5a
NSC 1,0	0	6	12	44	72	72	80	80	80	84	7b
NS vazias	0	0	0	4	6	8	10	17	40	50	25a

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

Ao comparar com as nanoesferas vazias (NS vazias), era de se esperar a semelhança nos resultados com a dieta, já que nenhum componente ativo presente nas nanoesferas. A comparação entre o resultado já mostrado do composto livre e NSC 1,0, mostrou que resultados satisfatórios foram obtidos, sendo o principal, o retardamento da atividade em 2 dias. Como foi discutido no item 1.3, um composto eficaz deve não ser reconhecido imediatamente pela formiga e essas

características e outras já citadas foram verificadas e confirmadas através do resultado com nanoesferas contendo crisofanol. Em relação ao ensaio inseticida utilizando nanocápsulas contendo crisofanol, foram somente avaliadas as formulações correspondentes às formulações NCC 400 e NCC 200. A FIGURA 4.149 e TABELA 4.46 mostram os resultados obtidos para as duas formulações.

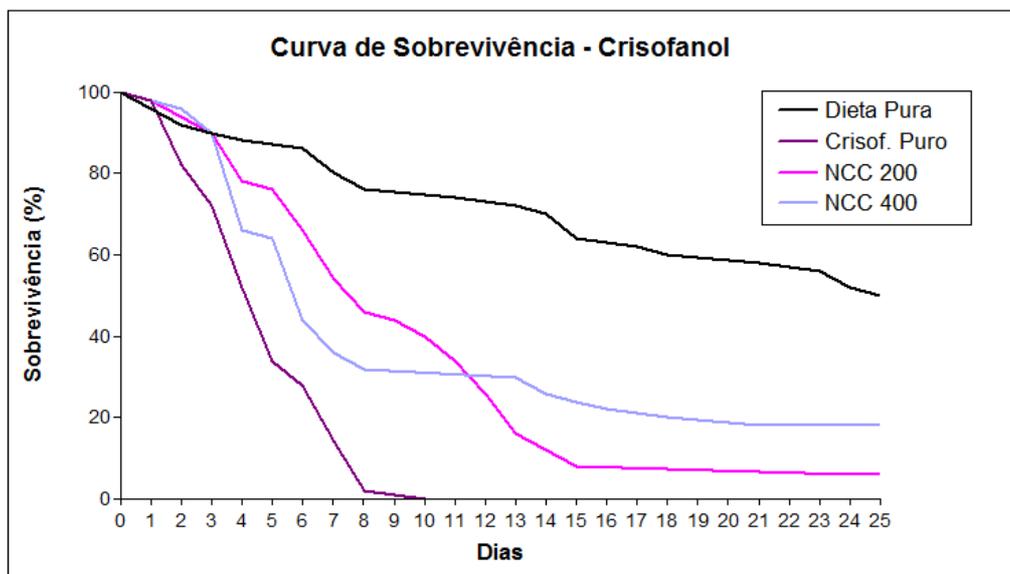


FIGURA 4.149 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo crisofanol.

TABELA 4.46 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo crisofanol

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	8	10	14	24	24	30	38	42	50	25a
Crisofanol puro	2	18	28	72	98	100	100	100	100	100	5b
NCC 400	0	4	10	56	68	68	74	78	82	82	6b
NCC 200	2	6	10	34	54	60	88	92	92	94	8b

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

Com base nos resultados obtidos, a formulação NCC 400 retardou a atividade em um dia, diferentemente da formulação NCC 200, onde a atividade foi retardada em 3 dias. Este fato se mostra interessante no que diz respeito à carga do composto presente no interior das nanocápsulas. Com base na cinética de liberação, quanto maior a quantidade do composto retido no núcleo das partículas, muito provavelmente a estabilidade do sistema diminui por comportar um volume muito grande de composto, além da presença do óleo. Sendo assim, a liberação ocorre mais rápida e, conseqüentemente, uma maior cinética de liberação e redução do tempo de prolongamento da atividade. O contrário foi verificado na análise da formulação NCC 200, onde a diminuição da cinética de liberação levou a uma liberação mais lenta ocasionando um aumento na atividade final, com mortalidade de 94% no último dia de experimento, em comparação com 82% ocasionado pela outra formulação mais concentrada.

Por fim, ao comparar o resultado obtido para NSC 1,0 com os obtidos pra NCC 200 e NCC 400, a princípio a liberação da formulação NCC 400 mostrou ser mais rápida e, conseqüentemente, possuir um menor valor na mortalidade de 50% de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com base em uma análise geral da curva de sobrevivência. Porém, ao realizar a análise pontualmente, até o décimo dia de experimento, principalmente na comparação das mortalidades no oitavo dia de experimento, o retardamento da atividade se dá em todas as formulações em relação ao composto livre, contudo a maior porcentagem de mortalidade se deu nas nanoesferas (72%) em relação às nanocápsulas NCC 200 e NCC 400 (54% e 68%, respectivamente). Este fato demonstra que as nanoesferas, por não possuir um núcleo, constituídas basicamente de uma matriz entrelaçada, possuem uma estabilidade menor em relação às nanocápsulas e, portanto, sua liberação se deu mais rápida.

4.3.1.4.3 – Nanopartículas contendo menadiona

Em relação ao ensaio inseticida utilizando nanoesferas contendo menadiona, como foi descrita anteriormente, nenhuma das formulações realizadas apresentaram uma boa taxa de recuperação e eficiência de encapsulação, mesmo

assim todas foram submetidas ao ensaio para comprovar que a ação esperada somente se daria através da liberação do ativo, contudo para essa etapa não será discutida, somente mostrado o resultado através da FIGURA 4.150 e TABELA 4.47.

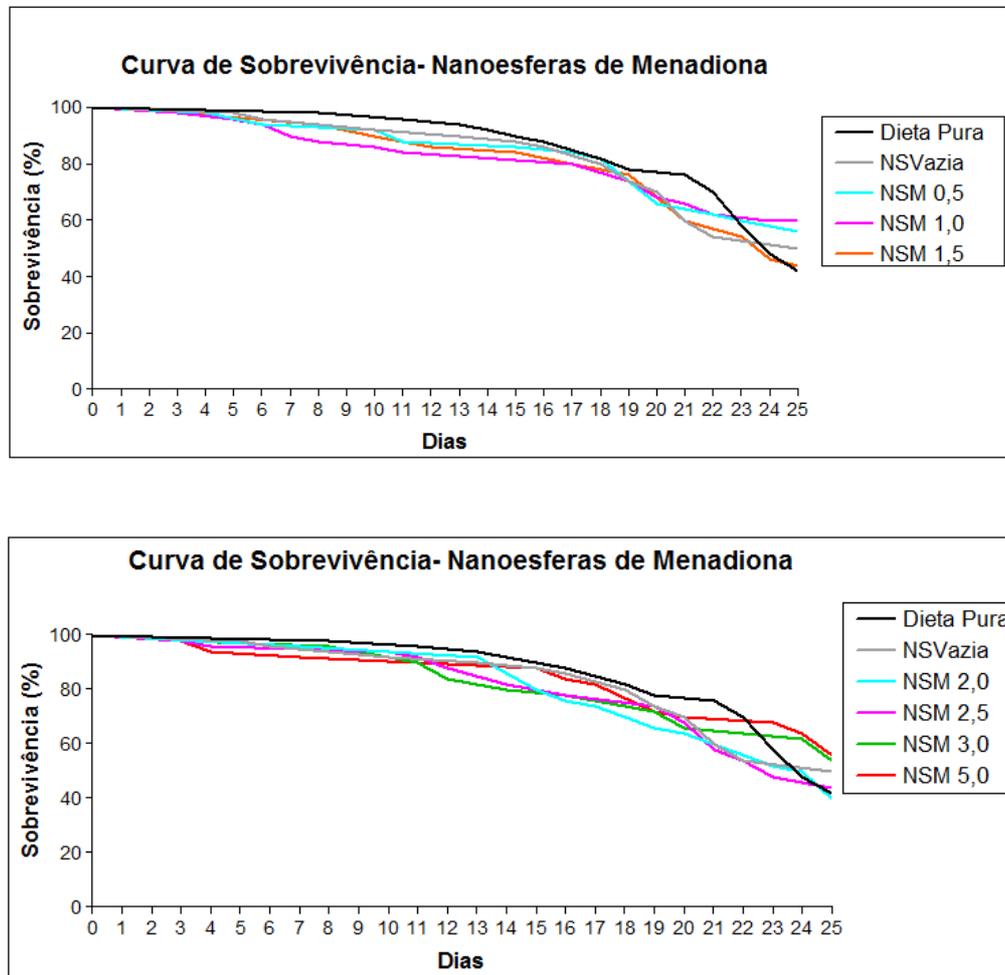


FIGURA 4.150 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo menadiona.

TABELA 4.47 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanoesferas contendo menadiona

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	0	2	2	8	12	24	60	24a
NSVazia	0	0	0	4	6	8	10	17	40	50	25a
NSM 0,5	0	0	16	22	22	24	28	32	42	52	25a
NSM 1,0	0	0	2	6	12	14	16	18	32	38	>25a
NSM 1,5	0	0	2	2	6	10	14	20	40	56	24a
NSM 2,0	0	0	0	0	4	6	8	26	36	60	24a
NSM 2,5	0	0	2	4	4	6	18	22	42	56	23a
NSM 3,0	0	0	2	2	4	8	20	22	36	46	>25a
NSM 5,0	0	0	2	6	8	8	10	18	30	44	>25a

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

Em relação ao ensaio inseticida utilizando nanocápsulas contendo menadiona, foram avaliadas as formulações NCM 200, NCM 400, NCM; 200 reduz., NCM 400 reduz., NCM 200 reduz. + óleo (esta última formulação foi somente testada para avaliar o comportamento da cinética de liberação ao reduzir pela metade a concentração de NCM 200 reduz.). As formulações descritas como NCM 200 reduz. 30 mL e NCM 400 reduz. 30 mL foram realizadas da mesma forma que os experimentos feitos com NCM 200 reduz. e NCM 400 reduz., porém com a adição do dobro de volume de dieta pura para avaliação do comportamento do ativo em um ambiente com volume dobrado em relação à cinética de liberação. A FIGURA 4.151 e TABELA 4.48 mostram os resultados obtidos para as duas formulações NCM 200 e NCM 400.

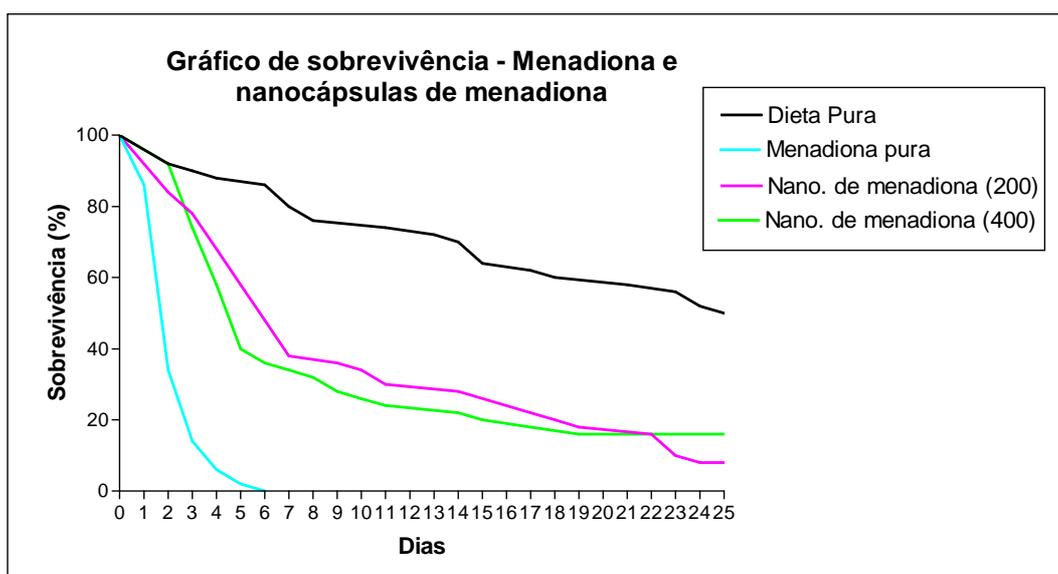


FIGURA 4.151 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo menadiona.

TABELA 4.48 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com nanocápsulas contendo menadiona

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	8	10	14	24	24	30	38	42	50	25a
Menadiona	4	34	74	98	100	100	100	100	100	100	3b
NCM 200	0	16	22	52	62	66	72	78	82	92	6b
NCM 400	0	8	26	64	68	74	78	82	84	84	5b

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

O maior prolongamento na atividade foi atribuído pela maior estabilidade do sistema das nanocápsulas, já que os resultados mostraram que a presença do composto menadiona no interior das mesmas foram 83,2% (NCM 200)

e 75,0% (NCM 400). A menor quantidade do composto favorece uma liberação mais lenta e gradativa, vistas a partir das inclinações da curva de sobrevivência. Apesar das baixas taxas de compostos presentes em seu interior, a atividade em potencial do ativo mostrou ser um fator predominante nos resultados finais do experimento, em termos de eficácia no controle das formigas-cortadeiras, a formulação NCM 200 (com 83,2% de ativo) mostrou melhor resultado com apenas 18% de sobrevivência das operárias. Para as demais formulações: NCM 200 reduz., NCM 400 reduz., NCM 200 reduz. + óleo, NCM 200 reduz. 30 mL e NCM 200 reduz. 30 mL, os resultados são mostrados através da FIGURA 4.152 e TABELA 4.49.

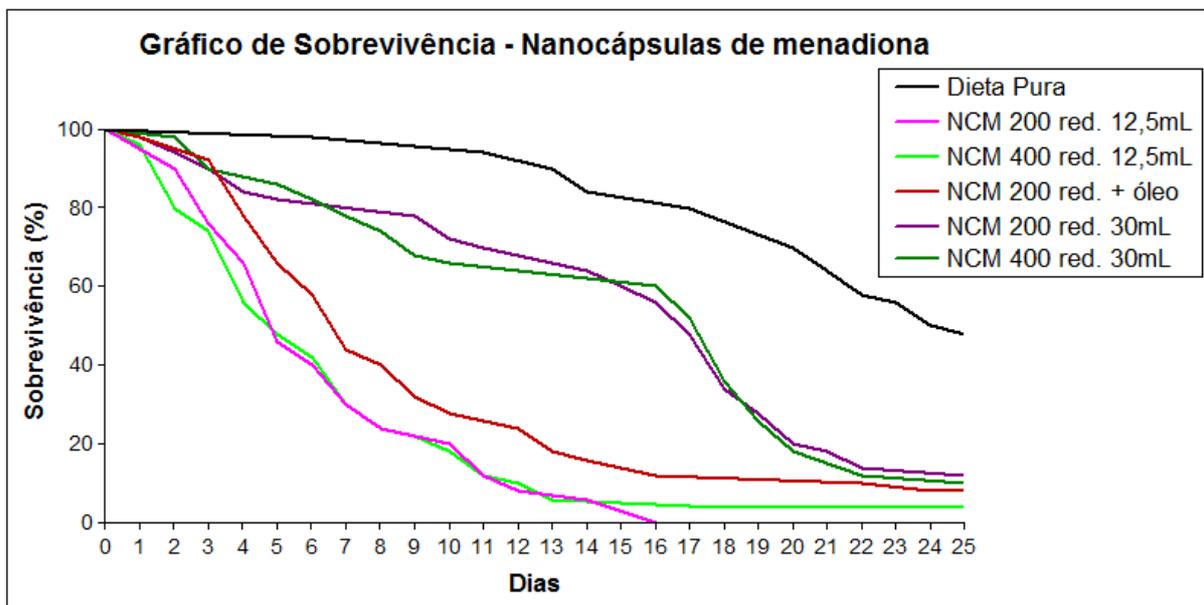


FIGURA 4.152 - Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as demais nanocápsulas contendo menadiona.

TABELA 4.49 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com as demais nanocápsulas contendo menadiona

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	2	2	16	20	36	52	24,5a
NCM 200 reduz.	0	10	24	60	76	80	94	100	100	100	5b
NCM 400 reduz.	4	20	26	58	76	82	96	96	98	98	5b
NCM 200 reduz. + 100µL óleo	2	2	8	42	60	72	84	88	88	94	7b
NCM 200 reduz. 30mL	2	6	10	18	18	28	36	52	82	88	17b
NCM 400 reduz. 30mL	0	2	10	18	26	34	36	48	82	90	18b

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

Com a redução na concentração das nanocápsulas (NCM 200 reduz. e NCM 400 reduz.), apesar da verificação de 50% da mortalidade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* manter no quinto dia de experimento, igualando à NCM 400, a menor taxa de composto ativo no interior das mesmas fez com que a inclinação da curva de sobrevivência diminuísse, em comparação com às formulações sem alteração. Aqui também pode ser verificado que o potencial do composto influenciou em muito no que diz respeito à capacidade de distinção das formulações, onde em todas as formulações a taxa de mortalidade no final de cada experimento se manteve em torno de 90%. Outro fator importante foi a análise detalhada dos resultados obtidos quando houve o aumento da dieta pura na qual as nanocápsulas foram incorporadas. Com o aumento em duas vezes do volume, as nanopartículas agora se dispersaram sobre a dieta, tendo um retardamento na atividade em mais de 3 vezes. Isso faz com que haja uma maior possibilidade de estudo em relação ao prolongamento desejado, em curto, a médio ou em longo prazo alterando somente o volume em que elas se encontram, já que para este caso, este prolongamento na ação se deu somente em um intervalo intermediário do experimento, onde no final foi atingido o valor de mortalidade vista em todas as formulações.

4.3.2 – Atividade fungicida frente ao fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*

4.3.2.1 – *Picramnia bahiensis*

4.3.2.1.1 – Extratos brutos

Os extratos brutos de *P. bahiensis* não foram testados, pois no momento da obtenção dos mesmos e fracionamento dos extratos bioativos frente ao ensaio inseticida, o teste para avaliação do potencial fungicida frente ao fungo simbionte *L. gongylophorus* estava em fase de teste já que estava sendo implementado no próprio Departamento de Química, no Laboratório de Bioensaios.

4.3.2.1.2 – Substância **8** proveniente da fração H+D/01 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato hexânico+diclorometânico das raízes de *P. bahiensis*

Este composto foi avaliado frente à inibição do crescimento micelial, porém seu potencial se mostrou baixo, inibindo somente 21% do crescimento micelial, como mostrado na FIGURA 4.153 e TABELA 4.50.

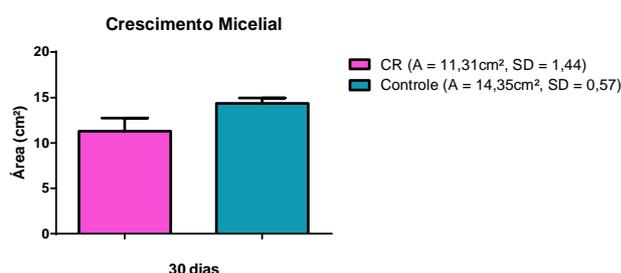


FIGURA 4.153 – Ensaio fungicida da substância **8** frente à inibição do crescimento micelial.

TABELA 4.50 – Dados sobre o ensaio fungicida da substância **8** frente à inibição do crescimento micelial

	Crisofanol	Controle
1	10,06	13,45
2	10,06	14,24
3	12,56	14,37
4	12,56	14,78
5	0	14,92
Média	11,31	14,35
DP	1,44	0,57
DPR	12,75	4,01
Inibição	21%	

4.3.2.2 – *Thyrsodium schomburgkianum*

4.3.2.2.1 – *Extratos brutos*

Para esta planta foram realizados ensaios avaliando todos os extratos brutos (FIGURA 4.154 e TABELA 4.51). Dentre os extratos avaliados, o extrato metanólico do caule (ETSCM) foi o mais ativo, inibindo 85% o crescimento micelial, seguido pelo extrato diclorometânico das folhas (ETSFD) com 58% e o extrato diclorometânico do caule (ETSCD) com 50%, sendo que os demais extratos inibiram menos que 50% o crescimento micelial. Em geral, os mesmos apresentaram uma boa atividade para este ensaio no que diz respeito à busca de compostos capazes de ter ação fungicida frente ao fungo simbiote *L. gongylophorus*. Vale ressaltar que não foi iniciado o trabalho com o extrato metanólico do caule de *T. schomburgkianum*, já que estes resultados foram obtidos muito após o início do trabalho com esta planta, porém estes resultados demonstraram muito promissores para este tipo de ação.

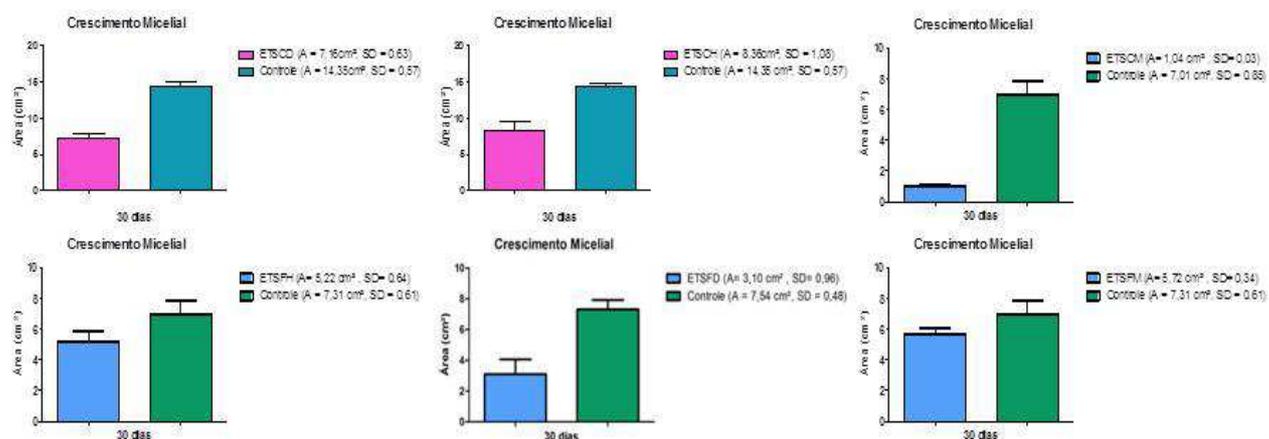


FIGURA 4.154 – Ensaio fungicida dos extratos brutos obtidos de *T. schomburgkianum*.

TABELA 4.51 – Dados sobre o ensaio fungicida dos extratos brutos obtidos de *T. schomburgkianum* frente à inibição do crescimento micelial

	ETSCH	ETSCD	ETSCM	ETSFH	ETSFD	ETSFM	Controle
1	9,72	8,03	1,02	4,52	2,89	5,30	8,04
2	8,34	7,06	1,02	4,82	2,27	5,72	7,54
3	8,34	7,06	1,05	5,72	4,15	5,72	7,07
4	7,00	6,51	1,05	5,80	0	6,15	6,60
5	0	0	1,09	0	0	0	0
Média	8,36	7,16	1,04	5,22	3,10	5,72	7,31
DP	1,08	0,63	0,03	0,64	0,96	0,34	0,62
DPR	12,98	8,85	2,90	12,31	30,90	6,04	8,46
Inibição	42%	50%	85%	29%	58%	22%	

4.3.2.2.2 – Substância **17** proveniente da fração TSPH/02/02+03/02 a partir do fracionamento cromatográfico do extrato diclorometânico do caule de *T. schomburgkianum*

O composto 3 β -hidróxiglutin-5-eno, isolado da partição hexânica do caule de *T. schomburgkianum*, foi submetido ao ensaio frente à atividade fungicida (FIGURA 4.155 e TABELA 4.52) e os resultados mostraram que, especificamente para este composto da classe dos triterpenos do tipo oleanano, não houve atividade significativa, sendo verificada somente uma inibição do crescimento micelial de 11%. Assim sendo, até este presente momento não foi identificado o composto ou mesmo o conjunto dos mesmos responsáveis pela atividade gerada pelo ensaio do extrato.

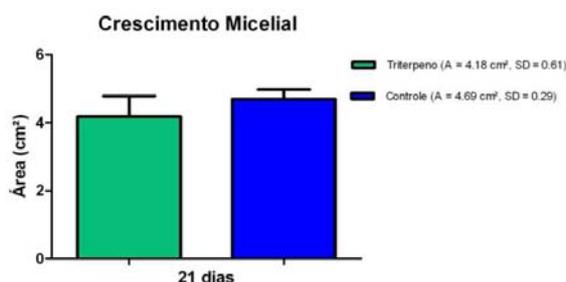


FIGURA 4.155 – Ensaio fungicida da substância **17** frente à inibição do crescimento micelial.

TABELA 4.52 – Dados sobre o ensaio fungicida da substância **17** frente à inibição do crescimento micelial

	3 β -hidróxiglutin-5-eno	Controle
1	4,75	4,91
2	3,66	4,91
3	4,52	4,37
4	4,60	4,91
5	3,40	4,37
Média	4,18	4,69
DP	0,61	0,29
DPR	14,62	6,23
Inibição	11%	

4.3.2.3 – Compostos naturais comerciais

Os compostos naturais comerciais alizarina, 2-metilantraquinona, antraquinona, menadiona e 1,4-naftoquinona foram também ensaiados frente à inibição do crescimento micelial (FIGURA 4.156 e TABELA 4.53) e os resultados indicam que os compostos mais ativos foram de esqueleto naftoquinônico (similar aos resultados inseticidas) em relação aos compostos com esqueleto antraquinônico. Estes resultados, principalmente a ação fungicida da menadiona, indicam a possibilidade de obter um controle natural frente às formigas-cortadeiras, associando esta ação fungicida com o crisofanol que apresenta ação inseticida, já descrita anteriormente, sendo esses resultados também motivadores para o estudo realizado com os mesmos no processo de nanoencapsulamento.

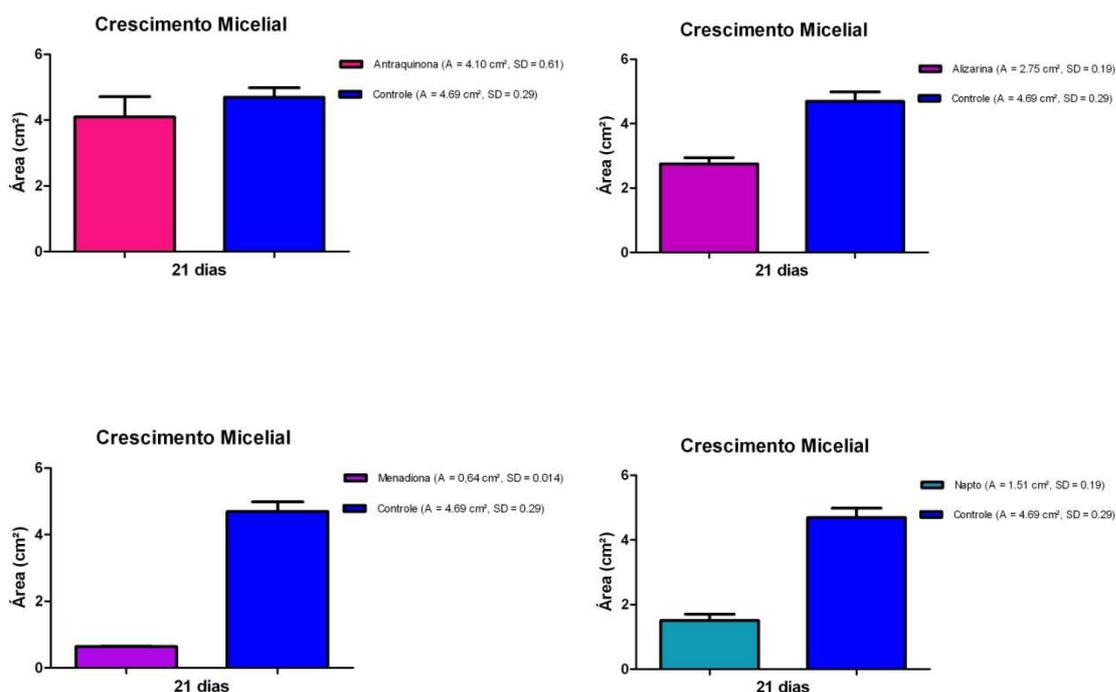


FIGURA 4.156 – Ensaio fungicida dos compostos naturais comerciais frente à inibição do crescimento micelial.

TABELA 4.53 – Dados sobre o ensaio fungicida dos compostos naturais comerciais frente à inibição do crescimento micelial

	Antraquinona	Alizarina	1,4 - naftoquinona	Menadiona	Controle
1	4,99	2,83	1,37	0,66	4,91
2	4,37	2,72	1,54	0,64	4,91
3	3,73	2,95	1,37	0,64	4,37
4	4,01	2,43	1,77	0,64	4,91
5	3,40	2,83	*	*	4,37
Média	4,10	2,75	1,51	0,64	4,69
DP	0,61	0,19	0,19	0,014	0,29
DPR	14,93	7,22	12,5	2,22	6,23
Inibição	13%	41%	68%	86%	

4.3.2.4 – Nanopartículas

Pela alta demanda dos ensaios fungicidas realizados no próprio Departamento de Química, e a conclusão da produção das nanopartículas muito recentemente, não foi possível realizar o ensaio de todas as formulações de nanopartículas mostradas anteriormente. Os mesmos já estão sendo realizados para a avaliação do processo de nanoencapsulamento em relação ao comportamento na liberação controlada dos compostos ativos e deverão fazer parte de artigo científico.

4.3.3 – Atividade fungicida frente à *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob colaboração da Profa. Dra.

Eugénia Pinto e do Dr. Luís Vale Silva. Para tanto, foram avaliados alguns extratos e frações, juntamente com as nanopartículas desenvolvidas neste período.

4.3.3.1 – Extratos e frações de *P. bahiensis* e *T. schomburgkianum*

O ensaio do extrato bruto em diclorometano das folhas de *T. schomburgkianum* apresentou concentração mínima inibitória acima de 256 µg/mL, assim como as subfrações de *P. bahiensis*, onde as concentrações mínimas inibitórias foram situadas acima de 128 µg/mL, mostrando assim que estes não possuíam atividade antifúngica significativa (TABELA 4.54).

TABELA 4.54 – Resultados do ensaio antifúngico do extrato de *T. schomburgkianum* e frações de *P. bahiensis*

Compostos	Concentração mínima inibitória (µg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. rubrum</i>
Extrato em DCM das folhas de <i>T. schomburgkianum</i>	>256	>256	>256
Fração HD/03/03 de <i>P. bahiensis</i>	>128	>128	>128
Fração HD/05 de <i>P. bahiensis</i>	>128	>128	>128

4.3.3.2 – Nanopartículas contendo crisofanol e alizarina

Para o ensaio das nanoesferas de ambos os compostos, foram escolhidos algumas formulações para a avaliação da ação fungicida. Para tanto, foi realizado o teste utilizando nanoesferas e nanocápsulas vazias, juntamente com o óleo (TABELA 4.55).

TABELA 4.55 – Resultados do ensaio antifúngico de nanopartículas vazias

Nanopartículas	Concentração mínima inibitória (µg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. rubrum</i>
Nanoesferas vazias	>100	>100	>100
Nanocápsulas vazias	>100	>100	25
Benzoato de benzila	>100	>100	25

A partir da avaliação das nanopartículas vazias, deu início à avaliação dos compostos livres crisofanol e alizarina, juntamente com suas respectivas formulações (TABELA 4.56). A concentração dos compostos encapsulados não permitiu uma melhor detecção para avaliar a encapsulação com o aumento da atividade, principalmente no caso do crisofanol. No caso dos ensaios frente a *T. rubrum* utilizando as nanocápsulas, ambas foram detectadas atividade (atividade inibitória abaixo ou igual a 1,85 µg/mL para alizarina e 7,99 µg/mL para crisofanol). Como foi verificada uma atividade do benzoato de benzila (utilizado na formulação) e também das nanocápsulas vazias, ou seja, sem nenhuma diferença entre elas, não foi possível confirmar a atividade dos ativos e o estudo em relação ao processo de encapsulamento e a atividade, não podendo afirmar com exatidão que a atividade estava relacionada somente com o processo da encapsulação.

TABELA 4.56 – Resultados do ensaio antifúngico de crisofanol e alizarina e suas respectivas formulações

Nanopartículas	Concentração mínima inibitória (µg/mL)		
	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. rubrum</i>
Crisofanol	>128	>128	>128
Nanoesferas de 0,2 mg de crisofanol + tampão a pH 5	>0,89	>0,89	>0,89
Nanocápsulas contendo crisofanol	>15,97	>15,97	≤7,99
Alizarina	64	>256	4
Nanoesferas de 0,6 mg de alizarina+ tampão a pH 5	>2,94	>2,94	2,94
Nanocápsulas contendo alizarina	>3,70	>3,70	≤1,85

5 - CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Picramnia bahiensis* levou ao isolamento de ácidos e ésteres graxos de cadeias longas, esteróides, antraquinonas de diferentes tipos (1-16). O isolamento e elucidação estrutural de **11** e **12**, nunca antes relatados na literatura, juntamente com **15** e **16**, nunca antes descritos no gênero *Picramnia*, forneceu uma maior contribuição para a quimiosistemática deste gênero para a confirmação de seu posicionamento na família Picramniaceae. Esses compostos possivelmente são os responsáveis pela atividade inseticida frente às formigas-cortadeiras e que abre uma perspectiva de futuros estudos na busca de maior quantidade e avaliação da atividade individual, contribuindo assim em muito na busca de compostos naturais inseticidas para o controle eficaz e específico dessa praga.

O estudo fitoquímico de *T. schomburgkianum* levou ao isolamento e identificação 9 substâncias, sendo elas esteróides, uma grande variedade de terpenos e um flavonóide, sendo que alguns foram isolados pela primeira vez na Família Anacardiaceae. Além disso, esta parte do presente trabalho contribuiu em relação à informação quimiosistemática desta espécie, nunca antes relatada em revistas especializadas na área.

Durante o processo de isolamento e identificação dos compostos das duas espécies estudadas foi gerado um desafio em relação a obter conhecimento e aprendizado de novas técnicas muito promissoras atualmente na área, tal como a Espectrometria de Massas acoplada a Cromatografia Gasosa e Líquida, onde o uso dessas ferramentas, não somente como usuário, mas principalmente como conhecedor da técnica foi de grande importância na formação acadêmica.

Para o controle de formigas-cortadeiras, foram obtidos resultados promissores de compostos bioativos naturais isolados neste trabalho (substância **8**) e comerciais. Suas ações inseticidas frente à *Atta sexdens rubropilosa* e fungicida frente ao seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*, indicam um avanço no desenvolvimento e a eficácia do uso de produtos naturais como fonte alternativa o controle do ninho de formigas-cortadeiras.

O uso indiscriminado de iscas tóxicas contendo princípios ativos sintéticos maléficos aos mamíferos e ao meio ambiente leva a busca de métodos alternativos para o controle de formigas-cortadeiras. Em relação a novas metodologias de aplicação de compostos naturais bioativos como forma eficaz e associado às ideias do manejo integrado de pragas, existem poucos estudos e grande número de estudos relacionados à busca e isolamento dos mesmos. O presente trabalho serviu como um exemplo, principalmente para as indústrias, para corrigir um pensamento errôneo e quebrar barreiras sobre a impossibilidade ou mesmo dificuldade da falta de substitutos para os atuais métodos, principalmente usando iscas contendo os compostos sintéticos.

Os resultados aqui apresentados, principalmente no desenvolvimento de formulação inseticida e fungicida através do processo de nanoencapsulamento para o controle de formigas-cortadeiras, mostraram ser significativos e sugerem ampliar o desenvolvimento de novas tecnologias através de maiores investimentos, tanto de empresas, quanto do governo nesta promissora área em que diversos grupos de pesquisas estão empenhados nas descobertas de um controle eficaz capaz de substituir aquele usando iscas tóxicas à base de sulfluramida e fipronil, que deverão em breve ser banidas do mercado.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S. & FESSI, H. "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations". *Adv. Drug Deliv. Rev.* **58**: 1688-1713, 2006.
- ABRAF, Associação Brasileira de Produtores de Áreas Plantadas. "Anuário estatístico da ABRAF 2012: ano base 2011". Brasília, 2012, 150p.
- ACKACHA, M.A.; POLÉC-PAWLAK, K. & JAROSZ, M. "Identification of anthraquinone coloring matters in natural red dyestuffs by high performance liquid chromatography with ultraviolet and electrospray mass spectrometric detection". *J. Sep. Sci.* **26**: 1028-1034, 2003.
- ADAMS, R.P. "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy". New York Allured Publishing. 1995, 469p.
- AGETA, H.; ARAI, Y.; SUZUKI, H.; KIYOTANI, T. & KITABAYASHI, M. "NMR spectra of triterpenoids. III. Oleanenes and migrated oleanenes". *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 198-203, 1995.
- ALMEIDA, R.N.A.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; SIMOTE, S.Y.; BUENO, O.C.; HEBLING, 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* **2:2**: 1-8, 2007.
- ANDRADE, K.V.S.A. & RODAL, M.J.N. "Fisionomia e estrutura de um remanescente de floresta estacional semidecidual de terras baixas no nordeste do Brasil". *Revista Brasil. Bot.* **27**: 463-474, 2004.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. "Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.
- ARAÚJO, M.S.; LÚCIA, T.M.C.D. & SOUZA, D.J. "Estratégias alternativas de controle de formigas-cortadeiras". *Bahia Agric.*, **6**: 71-74, 2003.
- ASSIMOPOULOU, A.N. & PAPAGEORGIOU, V.P. "GC-MS analysis of penta- and tetra-cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia". *Biomed. Chromatogr.* **19**: 285-311, 2005.
- BACCI, JR. M.; SIQUEIRA, C.G.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. & HEBLING, M.J.A. "Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus* the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*". *Appl. and Envir. Microb.*, **64**: 4820-4822, 1998.
- BALDERRAMA, L.; BRACA, A.; GARCIA, E.; MELGAREJO, M.; PIZZA, C. & DE TOMMASI, N. "Triterpenes and anthraquinones from *Picramnia sellowii* Planchon in Hook (Simaroubaceae)". *Biochem. Syst. Ecol.* **29**: 331-333, 2001.
- BEI, D.; MENG, J. & YOUAN, B.B.C. "Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises". *Nanomedicine* **5**: 1385-1399, 2010.

- BERNARDI, A.; ZILBERSTEIN, A.C.C.V.; JAGER, E.; CAMPOS, M.M.; MORRONE, F.B.; CALIXTO, J.B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. & BATTASTINI, A.M.O. "Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats". *Brit. J. Pharmacol.* **158**: 1104-1111, 2009.
- BIDLINGMEYER, B.A. "Practical HPLC Methodology and Applications". John Wiley & Sons, Inc., New York. 1992, 452p.
- BOARETTO, M.A. & FORTI, M.C. "Perspectivas no controle de formigas-cortadeiras". *Série Técnica, IPEF* **11**: 31-46, 1997.
- BREITMAIER, E.; HAAS, G. & VOELTER, W. "Atlas of Carbon-13 NMR Data, Vol. 1-3". 1979, 150p.
- BREITMAIER, E. "Structure Elucidation by NMR in Organic Chemistry". Wiley, New York, 1993, 265p.
- BRIGGER, I.; DUBERNET, C. & COUVREUR, P. "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis". *Adv. Drug Del. Rev.* **54**: 631-651, 2002.
- BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L. & RIBEIRO, M.L. "Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão". *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente* **13**: 129-143, 2003.
- BUENO, F.C.; GODOY, M.P.; 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.
- BUENO, O.C.; BERALDO, M.J.A.H.; SILVA, O.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B. & VIEIRA, P.C. "Toxic effect of plants on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus". In: Meer, R.K.V.; Jaffe, K. and Cedeno, A. *Applied Myrmecology, A World Perspective*. Westview Press, 1989.
- BUENO, O.C.; MORINI, M.S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. & SILVA, O.A. "Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais". *An. Soc. Entomol. Bras.* **26**: 107-113, 1997.
- BÜRKI, K.; JEON, I.; ARPAGAU, C. & BETZ, G. "New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer". *Intern. J. Pharm.* **408**: 248-256, 2011.
- CAMACHO-FRIAS, E. & FOUCAULT, A. "Solvent systems in centrifugal partition chromatography". *Analisis* **24**: 159-167, 1996.
- CAO, X.L.; TIAN, Y.; ZHANG, T.Y., LI, X. & ITO Y. "Separation and purification of isoflavones from *Pueraria lobata* by high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A.* **855**: 709-713, 1999.
- CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F. & BEZERRA, F.B. "Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* Miers (Lecythidaceae)". *Quim. Nova* **21**: 740-743, 1998.

- CAZAL, C.M.; BATALHÃO, J.R.; DOMINGUES, V.C.; BUENO, O.C.; RODRIGUES Fo, E.; FORIM, M.R.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C. & FERNANDES, J.B. "High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*". *J. Chromatogr. A.* **1216**: 4290-4294, 2009.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard, second edition M38-A2". Wayne: Clinical and Laboratory standards Institute; 2008.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). "Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard, third edition M27-A3". Wayne: Clinical and Laboratory standards Institute; 2008.
- CONWAY, W.D. "Countercurrent chromatography: Apparatus, theory and applications". VCH Publishers: New York, 1990, 475p.
- CORRÊA, S.J.; DAVID, J.P. & DAVID, J.M. "Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae". *Quím. Nova*, **29**: 1287-1300, 2006.
- COURTOIS, E.A.; BARALOTO, C.; PAINE, C.E.T.; PETRONELLI, P.; BLANDINIERES, P.A.; STIEN, D.; HÖUEL, E.; BESSIÈRE, J.M. & CHAVE, J. "Differences in volatile terpene composition between the bark and leaves of tropical tree species". *Phytochemistry* **82**: 81-88, 2012.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P. & VAUTHIER, C. "Nanocapsules technology: A review". *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **19**: 99-134, 2002.
- CREWS, P.; RODRÍGUES, J. & JASPARS, M. "Organic Structure Analysis". Oxford University Press. 1998, 552p.
- CRONQUIST, A.J. "An integrated system of classification of flowering plants". Columbia Univ. Press, NY. 1262. p.1981.
- CRONQUIST, A.J. "The evolution and classification of flowering plants". 2nd. ed. The New York Botanical Garden, Bronx, New York. 1988.
- DA CUNHA, L.V.F.C. & ALBUQUERQUE, U.P. "Quantitative ethnobotany in na Atlantic forest fragment of nottheastern-implications to conservation". *Environ. Monit. Assess.* **114**: 1-25, 2006.
- DANIELSEN, K.; AKSNES, D.W. & FRANCIS, G.W. "NMR study of some anthraquinones from rhubarb". *Magn. Reson. Chem.* **30**: 359-360, 1992.
- DELLA-LÚCIA, T.M.C. "Leaf-cutting ant control in Brazil: state of the ant. Mirmecologia Tropical". *Anais do IV Internacional Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia*. Ilhéus, Bahia, 147-151, 1997.
- DERKSEN, G.C.H.; NIEDERLÄNDER, H.A.G. & VAN BEEK, T.A. "Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection". *J Chromatogr. A.* **978**: 119-127, 2002.

- DERKSEN, G.C.H.; VAN BEEK, T.A.; DE GROOT, A. & CAPELLE, A. "High-performance liquid chromatography method for the analysis of anthraquinone glycosides and aglycones in madder root (*Rubia tinctorum* L.)". *J. Chromatogr. A* **816**: 277-281, 1998.
- DIAS, M.O.; HAMERSKI, L. & PINTO, A.C. "Separação semipreparativa de α e β amirinapor Cromatografia Líquida de Alta Eficiência". *Quím. Nova* **34**: 704-706, 2011.
- DIAS, M.O.; HAMERSKI, L. & PINTO, A.C. "Separação semipreparativa de α e β amirinapor Cromatografia Líquida de Alta Eficiência". *Quím. Nova* **34**: S1-S6, 2011.
- DIAZ, F.; CHAI, H.B.; MI, Q.; SU, B.N.; VIGO, J.S.; GRAHAM, J.G.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTTO, J.M.; SWANSON, S.M. & KINGHORN, A.D. "Anthrone and oxanthrone C-glycosides from *Picramnia latifolia* collected in Peru". *J. Nat. Prod.* **67**: 352-356, 2004.
- DOMINGUES, G.S.; GUTERRES, S.S.; BECK, R.C.R. & POHMANN, A.R. "Micropartículas nanorevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: Preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica". *Quim. Nova* **31**: 1966-1972, 2008.
- FADINI, M.A.M.; LEMOS, W.P.; PALLINI, A.; VENZON, M. & MOURÃO, S.A. "Herbivoria de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) induz defesa direta em morangueiro?" *Neotrop. Entomol.* **33**: 293-297, 2004.
- FERNÁNDEZ, F.C. "Introducción a las hormigas de la región Neotropical". Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt, 2003, 424p.
- FERNANDO E.S. & QUINN, C.J. "Picramniaceae, a new family, and recircumscription of Simaroubaceae". *Taxon*, **44**: 177-181, 1995.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F. & DEVISSAGUET, J.P. "Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanoparticules". *Centre National de la Recherche Scientifique* – França. Patente Francesa EP0274961-A1, 1988.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N. & BENITA, S. "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement". *Intern. J. Pharm.* **55**: R1-R4, 1989.
- FIESER, L.F. & FIESER, M. "Reagents for Organic Synthesis. John Wiley & Sons Inc., 10, 1967-2006.
- FOELKEL, E. "Manejo integrado de formigas-cortadeiras em Pinus e a certificação florestal". Monografia de especialização. Programa de Pós-graduação Lato Sensu em Gestão e Manejo Ambiental em Sistemas Agrícolas, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras 2009.
- FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; WEHRLI, E. & PUGLISI, G. "Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs". *Biomaterials* **17**: 751-758, 1996.

- GONZÁLEZ, A.G.; FERRO, E.A. & RAVELO, A.G. "Triterpenes from *Maytenus horrida*". *Phytochemistry* **26**: 2785-2788, 1987.
- HAINES, B.L. "Element and energy flows through colonies of the leaf-cutting ant, *Atta colombica*, in Panama". *Biotropica*. **10**: 270-277, 1978.
- HARBORNE, J.B. "Phytochemical methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis". Chapman & Hall Ltda, 2nd ed. London. 1988, 288p.
- HERNANDEZ-MEDEL, M.D.R.; LOPEZ-MARQUEZ, O.; SANTILLAN, R. & TRIGOS, A. "Mayoside, an oxanthrone from *Picramnia hirsute*". *Phytochemistry* **43**: 279-281, 1996.
- HERNANDEZ-MEDEL, M.D.R.; GARCIA-SALMONES, I.; SANTILLAN, R. & TRIGOS, A. "An anthrone from *Picramnia antidesma*". *Phytochemistry* **49**: 2599-2601, 1998.
- HERNANDEZ-MEDEL, M.D.R.; RAMIREZ-CORZAS, C.O.; RIVERA-DOMINGUEZ, N.; RAMIREZ-MENDEZ, J.; SANTILLAN, R. & ROJAS-LIMA, S. "Diastereomeric C-glycosyloxanthrones from *Picramnia antidesma*". *Phytochemistry* **50**: 1379-1383, 1999.
- IGOLY, O.J.; GRAY, I.A. "Friedelanone and other triterpenoids from *Hymenocardia acida*". *Int. J. Phys. Sci.* **3**: 156-158, 2008.
- ITO, Y. "Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*. **1065**: 145-168, 2005.
- ITO, Y. & CONWAY, W. D. "High-Speed Countercurrent Chromatography". A Wiley-Interscience Publication. 1995, 454p.
- JIN, W.; WANG, Y.F.; GE, R. L.; SHI, H.M.; JIA, C.Q. & TU, P.F. "Simultaneous analysis of multiple bioactive constituents in *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. by high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 2351-2360, 2007.
- KARBAN, R. & BALDWIN, I.T. "Induced responses to herbivory". Chicago: University of Chicago Press., 1997, 330p.
- KATAVIC, P.L.; BUTLER, M.S.; QUINN, R.J.; FORSTER, P.I. & GUYMER, G.P. "Tropane alkaloids from *Darlingia darlingiana*". *Phytochemistry* **52**: 529-531, 1999.
- KELLY, M.A.; VESTLING, M.M.; FENSELAU, C.C. & SMITH, P.B. "Electrospray analysis of proteins: A comparison of positive-ion and negative-ion mass spectra at high and low pH". *J. Mass Spectrom.* **27**: 1143-1147, 1992.
- LEITE, A.C.; CABRAL, E.C.; SANTOS, D.A.P.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. & SILVA, M.F.G.F. "Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografia em contracorrente". *Quím. Nov.* **28**: 983-985, 2005.
- LIU, R.; LI, A. & SUN, A. "Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill. by high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*. **1052**: 217-221, 2004.

- MA, X.F.; TU, P.F.; CHEN, Y.J.; ZHANG, T.Y.; WEI, Y. & ITO, Y. "Preparative isolation and purification of two isoflavones from *Astragalus membranaceus* Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao by high-speed counter-current chromatography". *J. Chromatogr. A*. **992**: 193-197, 2003.
- MAI, L.P.; GUÉRITTE, F.; DUMONTET, V.; TRI, M.V.; HILL, B.; THOISON, O.; GUÉNARD, D. & SÉVENET, T. "Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*". *J. Nat. Prod.* **64**: 1162-1168, 2001.
- MARINHO, C.G.S.; RIBEIRO, M.M.R.; DELLA-LUCIA, T.M.C. & GUEDES, R.N.C. "Aggressive response of pestant species to β -eudesmol (Hymenoptera: Formicidae)". *Sociobiology*, **47**: 445-454, 2006.
- MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. "Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis". *J. Chromatogr. A*. **1112**: 181-194, 2006.
- MARTELANC, M.; VOVKI, I. & SIMONOVSKA, B. "Separation and identification of some common isomeric plant triterpenoids by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*. **1216**: 6662-6670, 2009.
- McLAFFERTY, F.W. & TURECEK, F. "Interpretation of Mass Spectra". USB-University Science Books, Mill Valley, 1993, 371p.
- MITCHELL, J.D. & DALY, D.C. "A revision of *Thyrsodium* (Anacardiaceae)". *Brittonia* **45**: 115-129, 1993.
- MIYASHIRA, C.H. "Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista". Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia, Departamento de Botânica, Instituto de Biociências – USP. 2007.
- MOHANRAJ, V.J. & CHEN, Y. "Nanoparticles – A review". *Trop. J. Pharm. Res.* **5**: 561-573, 2006.
- MONTEIRO, M.R. "Interação inseto-planta: aspectos químicos envolvidos no fenômeno de galhas em *Picramnia bahiensis* Simaroubaceae e no uso de *Canavalia ensiformis* Leguminosae no controle de formigas-cortadeiras". Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar. 1994.
- MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H. & ELAISSARI, A. "Polymer-based nanocapsules for drug delivery". *Intern. J. Pharm.* **385**: 113-142, 2010.
- MORINI, M.S.C. "Toxicidade de extratos orgânicos da semente do gergelim (*Sesamum indicum*) sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)". Tese de Doutorado. Instituto de Biociência, UNESP-Rio Claro, 1995, 183p.
- MOTULSKY, M.D.H. "Intuitive Biostatistics". Oxford Univers. Press: New York. 1995, 386p.

- MOUNTINHO, P. "Impactos biogeoquímicos das saúvas sobre o desenvolvimento de florestas na Amazônia". In: *Encontro de Mirmecologia*. Anais, 12, p.60-63, São Leopoldo, RS, 1995.
- NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; ANDRADE, A.P.P.; BOARETTO, M.A.C. & WILCKEN, C.F. "Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae)". *Sociobiology* **44**: 413-431, 2004.
- NAKANISHI, K. "One-dimensional and Two-dimensional NMR Spectra by Modern Pulse Techniques". University Science Books. Mill Valley. 1990, 234p.
- OGIHARA, K.; NISHIZATO, S.; ISHIGAKI, M.; HIGA, M.; YOGI, S. "Triterpenoids and phytosteroids from the leaves of *Cynanchum liukuense*". *Bull. Fac. Sci.* **70**: 83-92, 2000.
- OHTSUBO, T.; TSUDA, S. & TSUJI, K. "A study of the physical strength of fenitrothion microcapsules". *Polymer*, **32**: 2395-2399, 1991.
- OLIVEIRA, H.G.; LACERDA, F.G.; MARINHO, C.G.S. & LÚCIA, T.M.C.D. "Atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* por plantas de eucalipto atacadas previamente ou não por *Thyrinteina arnobia*". *Pesq. Agropec. Bras.*, **39**: 285-287, 2004.
- PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. & BENTO, J.M.S. "Controle biológico no Brasil – Parasitóides e predadores". 1a. ed. Editora Manole Ltda São Paulo, 2002, 635p.
- PHIFER, S.S.; LEE, D.; SEO, E.K.; KIM, N.C.; GRAF, T.N.; KROLL, D.J.; NAVARRO, H.A.; IZYDORE, R.A.; JUMNEZ, F.; GARCIA, R.; ROSE, W.C.; FAIRCHILD, C.R.; WILD, R.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; OBERLIES, N.H.; WALL, M.E. & WANI, M.C. "Alvaradoins E-N, antitumor and cytotoxic anthracenone C-glycosides from the leaves of *Alvaradoa haitiensis*". *J. Nat. Prod.* **70**: 954-961, 2007.
- PIO CORRÊA, M. "Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas". Vol. 1, Ministério da Agricultura-IBDF, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, 224p.
- QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H. & DOELKER, E. "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers". *Drug Develop. Ind. Pharm.* **24**: 1113-1128, 1998.
- RAFAËLLY, L.; HÉRON, S.; NOWIK, W. & TCHAPLA, A. "Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes". *Dyes and Pigments* **77**: 191-203, 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. & MELO, L.F.C. "Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos". *Quím. Nova* **27**: 771-780, 2004.

- RODRIGUES Fo., E. "Estudo fitoquímico de *Picramnia riedeli* e *Picramnia bahiensis*: Uma contribuição à quimiosistemática da família Simaroubaceae". Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar. 1989.
- RODRIGUEZ-GAMBOA, T. "Estudo químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoea batatas* em associação ao controle de formigas-cortadeiras *Atta sexdens* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*". Dissertação de doutorado. Programa de Pós-graduação em química da UFSCar. 2001.
- RODRIGUEZ-GAMBOA, T.; Fernandes, J.B.; Rodrigues Fo., E.; Silva, M.F.G.F. da; Vieira, P.C. & Castro C. O. "Two New Anthrones and One Oxanthrone from *Picramnia teapensis*". *Phytochemistry*, **51**: 583-586, 1999.
- RODRIGUEZ-GAMBOA, T.; VICTOR, S.R.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES FO., E.; DA SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. & CASTRO C. O. "Anthrone and oxanthrone C,O-diglycosides from *Picramnia teapensis*". *Phytochemistry*, **55**: 837-841, 2000.
- RODRIGUEZ-GAMBOA, T.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES FO., E.; DA SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; BARRIOS Ch., M.; CASTRO-CASTILLO, O.; VICTOR, S.R.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. & HEBLING. M.J.A. "Triterpene Benzoates from the Bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae)". *J. Brazil. Chem. Soc.*, **12**: 386-390, 2001.
- SANTOS, R.N.; SILVA, M.G.V. & FILHO, R.B. "Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae)". *Quím. Nova* **31**: 1979-1981, 2008.
- SARNAT, E.; SAUREZ, A. & FISHER, B. "Introduced ants": AntWeb v.4.148. The California Academy of Sciences. Disponível em <http://www.antweb.org/introduced.jsp>. Acessado em 25/03/2013.
- 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.
- SCOTT, R.P.W. "Liquid Chromatography for the Analyst". Marcel Dekker, Inc. New York. 1994, 328p.
- SEAMAN, D. "Trends in the formulation of pesticides – An overview". *Pestic. Sci.* **29**: 437-449, 1990.
- SHIOJIMA, K.; ARAI, Y.; MASUDA, K.; TAKASE, Y.; AGETA, T. & AGETA, H. "Mass spectra of pentacyclic triterpenoids". *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 1683-1690, 1992.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. & KIEMLE, D. "Spectrometric Identification of Organic Compounds". 7ª ed., Wiley, 2005.
- SOLIS, P.N.; RAVELO, A.G.; GONZALEZ, A.G.; GUPTA, M.P. & PHILLIPSON, J.D. "Bioactive anthraquinone glycosides from *Picramnia antidesma* ssp. *fessonia*". *Phytochemistry* **38**: 477-480, 1995.
- SONG, R.; LIN, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; XU, L.; DONG, H. & TIAN, Y. "Profiling the metabolic differences of anthraquinone derivatives using liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry with data-dependent acquisition". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**: 537-547, 2009.
- STRADLING, D.J. "An introduction to the fungus growing ants. Attini". In: HUXLEY, C.R.; CUTLER, D.F. (eds), *Ant-plant interactions*. Oxford: Oxford University Press, p. 15-18, 1991.
- STRADLING, D.J. & POWELL, R.J. "Fungiculture and the choice of substrates by attine ants". In: *Biology and Evolution of Social Insects*. BILLEN, J. (Eds), Leuven (Belgium), Leuven University Press, p. 133-143. 1992.
- TEIXEIRA, M.; ALONSO, M.J.; PINTO, M.M.M. & BARBOSA, C.M. "Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone". *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59**: 491-500, 2005.
- TIETZE, L.F.; GERICKE, K.M. & SCHUBERTH, I. "Synthesis of highly functionalized anthraquinones and evaluation of their antitumor activity". *Eur. J. Org. Chem.* **27**: 4563-4577, 2007.
- VALDAMERI, G.; HERRERIAS, T.; CARNIERI, E.G.S.; CADENA, S.M.S.C.; MARTINEZ, G.R. & ROCHA, M.E.M. "Importance of the core structure of flavones in promoting inhibition of the mitochondrial respiratory chain". *Chem.-Biol. Interact.* **188**: 52-58, 2010.
- VALE-SILVA, L.A.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. & PINTO, E. "Antifungal activity of the essential oil of *Thymus x viciosoi* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species". *Planta Med.* **76**: 1-7, 2010.
- VANDENDOOL, H. & KRATZ, P.D. "A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography". *J. Chromatogr.* **11**: 463-471, 1963.
- VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DÖRR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V. & RIVEROS, J.M. "Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em língua portuguesa". *Quím. Nova* **34**: 1875-1887, 2011.
- VIEIRA, I.J.C. "Uma Contribuição a Química da Família Simaroubaceae". Tese doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar. 1995.
- VIEIRA, I.J.C.; LIÃO, L.M.; VELOZO, E.S.; DAVID, V.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES J.B. & RODRIGUES Fo., E. "Isolamento de Produtos Naturais por Cromatografia de Gotas em Contracorrente". *Química Nova*, **19**: 21-23, 1996.
- VOGL, O.; QIN, M. & MITCHELL, J.D. "Oriental lacquers. 7. Botany and chemistry of Japanese lacquer and the beauty of the final art objects". *Cellul. Chem. Technol.*, **29**: 273-286, 1995
- VOGL, O & MITCHELL, J.D. "Oriental lacquer. 11. Botany and chemistry of the active components of poisonous Anacardiaceae". *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, **33**: 1581-1599, 1996.

- YANG, F.Q. & ITO Y. "pH-zone-refining counter-current chromatography of lappaconitine from *Aconitum sinomontanum* Nakai: I. Separation of prepurified extract". *J. Chromatogr. A.* **923**: 281-285, 2001.
- YANG, F.Q.; ZHANG, T.Y.; ZHANG, R. & ITO, Y. "Application of analytical and preparative high-speed counter-current chromatography for separation of alkaloids from *Coptis chinensis* Franch". *J. Chromatogr. A.* **829**: 137-141, 1998.
- WEHRLI, F.W. & WIRTHLIN, T. "Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra". Heyden, London, 1976, 310p.
- WOLF, F.J. "Separation methods in organic chemistry and biochemistry". Academic Press, NY. 1965, 237p.
- ZAIA, J. "Mass spectrometry of oligosaccharides". *Mass Spectrom. Rev.* **23**: 161-227, 2004.
- ZANETTI, R.; DIAS, N.; REIS, M.; SOUZA-SILVA, A. & MOURA, M.A. "Eficiência de iscas granuladas (Sulfloramida 0,3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)". *Ciênc. Agrotec.* **28**: 878-882, 2004.
- ZILI, Z.; SFAR, S. & FESSI, H. "Preparation and characterization of poly- ξ -caprolactone nanoparticles containing griseofulvin". *Intern. J. Pharm.* **294**: 261-267, 2005.