

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

**“ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES DE
MELIACEAE SOBRE *Spodoptera frugiperda* E ANÁLISES
ESPECTROSCÓPICAS DO INSETO SOB A AÇÃO DA CEDRELONA”**

Sâmya Danielle Lima de Freitas*

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva

*** Fapesp**

**São Carlos - SP
2014**

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

F866ef Freitas, Sâmya Danielle Lima de.
Estudo fitoquímico e bioatividade de espécies de
Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* e análises
espectroscópicas do inseto sob a ação da cedrelona /
Sâmya Danielle Lima de Freitas. -- São Carlos : UFSCar,
2014.
220 p.
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.
1. Produtos naturais. 2. *Spodoptera frugiperda*. 3.
Meliaceae. 4. Cedrelona. 5. Metabolização. 6. Inseticidas. 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

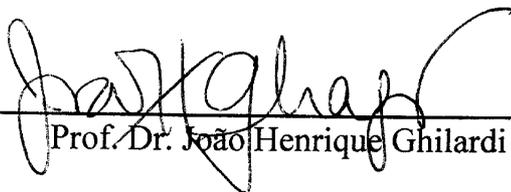
*Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de tese de Doutorado da candidata **Sâmya Danielle Lima de Freitas**, realizada em 23 de outubro de 2014:*



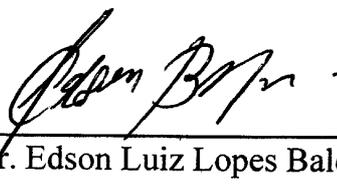
Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva



Prof. Dr. Paulo Henrique Gorgatti Zarbin



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago



Prof. Dr. Edson Luiz Lopes Baldin



Dr. João Oiano Neto

*Aos meus pais, Pedro Alves de Freitas
e Edilene Lima de Freitas por não
medirem esforços para minha formação
profissional, pelo amor incondicional e
apoio em todos os momentos.*

*Aos meus irmãos, Samara e Alisson,
por todo amor, pela confiança e
companheirismo.*

Com amor,

Agradecimentos

À Deus pela sua benção, por me dar força, sabedoria e por me fazer crer que tudo é possível quando lutamos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela confiança, ensinamentos, por ser exemplo de profissional e por transmitir com amor a química de produtos naturais;

Ao Prof. Dr. José Djair Vendramim e em especial, a Dra. Angelina Maria Marcomini Giongo com quem o trabalho foi desenvolvido diretamente durante seu doutoramento em parceria do INCT-Controle Biorracional de Insetos Pragas/UFSCar com o Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP);

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos (LaBioMMi) da UFSCar e um agradecimento especial, ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (Edinho) pela grande contribuição neste trabalho e por sempre estar de portas abertas para ajudar, pelos ensinamentos desde o mestrado, disponibilidade e idéias valiosas no decorrer deste trabalho. Também gostaria de agradecer imensamente as alunas de Doutorado Lívia M. Soman pelas análises do LTQ-Orbitrap e Marília A. Trapp pelas análises do MALDI/TOF-MS;

À equipe do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFSCar, ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira (Giba) pela colaboração no trabalho e em especial, ao aluno de Doutorado Elenilson Godoy Alves Filho pelas análises no RMN (600 MHz) e por sua disponibilidade e ajuda neste trabalho. Também gostaria de fazer um agradecimento especial à técnica Luciana Vizotto por sempre ser disponível em ajudar, seu carinho e amizade;

À Profa. Dra. Andréia Pereira Matos pela colaboração e em especial, a aluna de Iniciação Científica Ana Carolina Volante pela colaboração e ajuda nos ensaios com *S. frugiperda* no Laboratório de Insetos pertencente ao Departamento de Química da UFSCar;

Ao grupo LAFIB (Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica) da UFSCar, a Profa. Dra. Maria Rose Carlos e em especial, as alunas Márcia e Fábria pela colaboração nos testes enzimáticos com a enzima acetilcolinesterase;

Ao aluno Bruno Sacchetto Paulo durante sua Iniciação Científica, por toda ajuda e parceria no decorrer deste trabalho;

Ao Dr. Leonardo Toffano, pela ajuda nos isolamentos dos micro-organismos de *S. frugiperda* realizados neste trabalho, pelos ensinamentos e por sempre estar disponível em colaborar;

Aos professores do grupo de Produtos Naturais da UFSCar, Prof. Dr. João Batista Fernandes, Profa. Dra. Maria Fatima G. F. da Silva, Prof. Dr. Edson R. Filho e Prof.

Dr. Paulo Cezar Vieira, pelos ensinamentos durante minha pós-graduação, pelo exemplo que levarei por onde for e por toda contribuição na minha formação profissional;

Aos professores da banca, pela disponibilidade e pela grande contribuição na arguição da tese;

À “família” do Laboratório de Produtos Naturais UFSCar, pelas amizades construídas, troca de experiências, pela ótima convivência, risadas diárias e pela contribuição direta ou indireta para a conclusão deste trabalho, sentirei saudades!;

Aos amigos que ganhei pelo DQ-UFSCar durante meu mestrado e doutorado, pelo maravilhoso convívio diário;

À minha família, pela base familiar, incentivo, amor, apoio e compreensão em todos os momentos durante esta etapa. Vocês são minha vida e minha base para tudo!;

Aos meus grandes amigos desde a graduação, Márcia, Jozemir e Tancredo, pelo apoio em todos os momentos, pelo carinho e amizade. Amo vocês!;

Aos grandes amigos que tive o prazer de conhecer em São Carlos: Paulo Maia, Bárbara Sayuri, Tatiane Bondância, Alany Ribeiro, Murilo, Israel, Cristovam, Marsele, Marcela, Niculau, Titi, Suelem, Lorena, Washington e todos os demais... pelo ombro amigo, conselhos e companhia, levarei vocês sempre no meu coração;

Ao INCT- Controle Biorracional de Insetos Pragas, pelas parcerias;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida;

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

Muito Obrigada!

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μl	microlitro	
μm	micromolar	
δ	deslocamento químico	
Φ	diâmetro	
λ	comprimento de onda	
AChE	acetilcolinesterase	
ACN	acetonitrila	
AcOEt	acetato de etila	
APCI	atmospheric pressure chemical ionization	
BOD	biological oxygen demand	
CC	cromatografia em coluna	
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica	
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência	
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	
COSY	correlation spectroscopy	
CDCl_3	clorofórmio deuterado	
<i>d</i>	dubleto	
<i>dd</i>	duplo dubleto	
DMSO	dimetilsulfóxido	
$\text{DMSO-}d_6$	dimetilsulfóxido deuterado	
EtOH	etanol	
EM	espectrometria de massas	
ESI	Electrospray ionization	
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation	
HSQC	heteronuclear single quantum coherence	
Hz	hertz	
IE	Impacto eletrônico	
<i>J</i>	constante de acoplamento	
LC-MS/MS	liquid chromatography with spectrometry detection	tandem mass
LTQ	linear ion trap	
MALDI	matrix-assisted laser desorption / ionization	
MeOD	metanol deuterado	
MeOH	metanol	
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy	
RMN	ressonância magnética nuclear	
RMN ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio	
RMN ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono-13	
MHz	mega-hertz	
<i>m</i>	múltiplo	
<i>m/z</i>	relação massa/carga	
<i>s</i>	singleto	
<i>sl</i>	singleto largo	
<i>t</i>	tripleto	
TOF	<i>time of flight</i>	
UV-Vis	ultravioleta-visível	

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Massas obtidas do material vegetal e extratos de <i>T. pallida</i> , <i>To. ciliata</i> e <i>T. pallens</i>	25
TABELA 3.2	Massas obtidas de material vegetal e extrato do caule de <i>To. ciliata</i>	26
TABELA 3.3	Códigos das frações provenientes da partição líquido-líquido dos extratos EtOH de <i>T. pallida</i> , <i>To. ciliata</i> e <i>T. pallens</i>	29
TABELA 3.4	Dados de RMN ¹ H do limonoide cedrelona e comparação com a literatura.....	45
TABELA 3.5	Dados de RMN ¹³ C do limonoide cedrelona e comparação com a literatura.....	46
TABELA 3.6	Dados de RMN ¹ H de 13 e comparação com a literatura.....	49
TABELA 3.7	Dados de RMN ¹³ C de 13 e comparação com a literatura.....	50
TABELA 3.8	Dados de RMN ¹ H de 02 e comparação com a literatura.....	57
TABELA 3.9	Dados de RMN ¹ H de 17 e comparação com a literatura.....	60
TABELA 3.10	Dados de RMN ¹ H de 18 e comparação com a literatura.....	62
TABELA 3.11	Dados de RMN ¹ H de 03 e comparação com a literatura.....	66
TABELA 3.12	Dados de RMN ¹ H de 04 e comparação com a literatura.....	68
TABELA 3.13	Dados de RMN ¹ H de 05 e comparação com a literatura.....	71
TABELA 3.14	Dados de RMN ¹ H de 06 e comparação com a literatura.....	72
TABELA 3.15	Dados de RMN ¹³ C de 06	75
TABELA 3.16	Dados de RMN ¹ H de 07 e comparação com a literatura.....	79
TABELA 3.17	Dados de RMN ¹³ C de 07 e comparação com a literatura.....	80
TABELA 3.18	Dados de RMN ¹ H de 08 e comparação com a literatura.....	86
TABELA 3.19	Dados de RMN ¹³ C de 08 e comparação com a literatura.....	87
TABELA 3.20	Dados de RMN ¹ H de 14 e comparação com a literatura.....	93
TABELA 3.21	Dados de RMN ¹ H da substância 15	97
TABELA 3.22	Dados de RMN ¹ H de 16 e comparação com a literatura.....	100
TABELA 3.23	Dados de RMN ¹ H de 19 e comparação com a literatura.....	103
TABELA 3.24	Dados de RMN ¹³ C de 19 e comparação com a literatura.....	105
TABELA 4.1	Mortalidade e massa larval de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o 1º ínstar com dieta tratada superficialmente com extratos etanólicos de <i>T. pallens</i> , <i>T. pallida</i> e <i>To. ciliata</i> 1%, após 10 dias.....	111

TABELA 4.2	Médias da massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com frações de extrato etanólico de folhas e ramos de <i>T. pallida</i> a 1%, após 10 dias.....	112
TABELA 4.3	Médias da massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com frações de extrato etanólico de folhas, ramos e frutos de <i>To. ciliata</i> a 1%, após 10 dias.....	113
TABELA 4.4	Médias de massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações de extrato etanólico de ramos de <i>T. pallens</i> a 1%, após 10 dias.....	114
TABELA 4.5	Médias de massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações de extrato etanólico de folhas de <i>T. pallens</i> a 1%, após 10 dias.....	114
TABELA 4.6	Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com o flavonoide catequina 1% (10.000 ppm), após sete dias.....	115
TABELA 4.7	Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com um triglicerídeo a 1% (10.000 ppm), após sete dias.....	116
TABELA 4.8	Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com o triterpeno damaradienol a 1% (10.000 ppm), após sete dias.....	116
TABELA 4.9	Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com a cumarina escopoletina a 0,1% (1.000 ppm), após sete dias.....	117
TABELA 4.10	Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com extrato em hexano de caule de <i>To. ciliata</i> a 10.000 ppm, após 7 dias	118
TABELA 4.11	Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com cedrelona, após sete dias.....	119

TABELA 4.12	Médias da duração da fase larval, fase pupal e massa pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos a 1000 mg.Kg ⁻¹ de ramos e folhas de <i>T. pallens</i> , <i>T. pallida</i> e <i>To. ciliata</i>	121
TABELA 4.13	Mortalidade das fases larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos, a 1000 mg.Kg ⁻¹ , de ramos e folhas de <i>T. pallens</i> , <i>T. pallida</i> e <i>To. ciliata</i>	122
TABELA 4.14	Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com as frações de ramos de <i>T. pallens</i>	123
TABELA 4.15	Médias da mortalidade de fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com as frações de ramos de <i>T. pallens</i> , a 100 mg.kg ⁻¹	124
TABELA 4.16	Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com as frações das folhas de <i>T. pallens</i> , a 100 mg.kg ⁻¹	124
TABELA 4.17	Médias da mortalidade de fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com as frações das folhas de <i>T. pallens</i> , a 100 mg.kg ⁻¹	125
TABELA 4.18	Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com cedrelona em diferentes concentrações.....	126
TABELA 4.19	Médias da mortalidade de fase larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta artificial tratada com cedrelona em diferentes concentrações.....	126
TABELA 5.1	Dados de RMN ¹ H da uracila e comparação com a literatura.	157
TABELA 5.2	Áreas das bandas cromatográficas (extratos de fezes, extratos da lavagem dos tubos e extratos da dieta restante)..	174
TABELA 5.3	Valores teóricos e quantificados de cedrelona nos tratamentos (extratos de fezes, extratos da lavagem dos tubos e extratos da dieta restante).....	174
TABELA 5.4	Parâmetros nutricionais de lagartas de quarto instar de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona a 300 ppm após quatro dias.....	190
TABELA 6.1	Identificação a nível de gênero pela taxonomia aplicada dos isolados com a base de dados (MALDI Biotyper, versão 3.1) do equipamento.....	198

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	A) <i>Spodoptera frugiperda</i> ; B) Dano ocasionado na planta de milho; C) <i>Spodoptera frugiperda</i> dentro do cartucho do milho.....	1
FIGURA 1.2	Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i>	2
FIGURA 1.3	Estrutura do limonoide azadiractina.....	4
FIGURA 1.4	Sistema nervoso central do inseto.....	9
FIGURA 1.5	<i>Trichilia pallida</i> . Em destaque folhas compostas e frutos.....	15
FIGURA 1.6	Limonoides e flavonoides isolados de <i>T. pallida</i> os quais apresentaram efeito sobre <i>S. frugiperda</i> quando incorporados em dieta artificial (ROCHA, 2004).....	15
FIGURA 1.7	<i>Trichilia pallens</i> . Em destaque folhas e frutos (verdes e maduros).....	16
FIGURA 1.8	<i>Toona ciliata</i> . Em destaque árvore adulta, folhas, ramos, flores e frutos.....	17
FIGURA 1.9	Valores da concentração efetiva para cedrelona e cicloeucalenol isoladas de <i>To. ciliata</i> a 50 % de inibição do crescimento de <i>S. frugiperda</i>	18
FIGURA 3.1	Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato hexânico e cedrelona obtidos de <i>To. ciliata</i>	27
FIGURA 3.2	Cromatograma para a purificação de cedrelona no modo isocrático.....	27
FIGURA 3.3	Cromatograma da subfração FDEEFTPL 11-12.....	38
FIGURA 3.4	Cromatograma obtido da subfração FAEERTPL 24-25 resultante da fração acetato de etila dos ramos de <i>T. pallens</i>	40
FIGURA 3.5	Cromatograma da subfração FAEERTPL-42 no modo preparativo.....	41
FIGURA 3.6	Espectro de RMN ¹ H de 01 (400 MHz, CDCl ₃).....	44
FIGURA 3.7	Ampliação da região δ 7,50 a 6,00 ppm do espectro de RMN ¹ H da substância 01.....	44
FIGURA 3.8	Espectro de RMN ¹³ C de 01 (100 MHz, CDCl ₃).....	45
FIGURA 3.9	Espectro de RMN ¹ H da substância 13 (400 MHz, CDCl ₃)....	48
FIGURA 3.10	Ampliação da região δ 7,50 a 6,00 ppm do espectro de RMN ¹ H da substância 13	48
FIGURA 3.11	Ampliação da região δ 4,00 a 0 ppm do espectro de RMN ¹ H da substância 13	48

FIGURA 3.12	Espectro de RMN ^{13}C da substância 13 (100 MHz, CDCl_3)....	51
FIGURA 3.13	Ampliação da região de 7,00 a 6,00 ppm do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) de 13 , HSQC.....	54
FIGURA 3.14	Ampliação da região entre 3,8 a 0,8 ppm do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) de 13 , HSQC.....	54
FIGURA 3.15	Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, de 13 , (400 MHz, CDCl_3).....	55
FIGURA 3.16	Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, de 13 , (400 MHz, CDCl_3).....	55
FIGURA 3.17	Espectro de RMN ^1H da substância 02 (400 MHz, CD_3OD)...	58
FIGURA 3.18	Ampliação da região δ 6,90 a 5,80 do espectro de RMN ^1H da substância 02	58
FIGURA 3.19	Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância 02	58
FIGURA 3.20	Espectro de RMN ^1H da substância 17 (400 MHz, CD_3OD)...	60
FIGURA 3.21	Ampliação da região δ 6,55 a 5,70 do espectro de RMN ^1H da substância 17	61
FIGURA 3.22	Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância 17	61
FIGURA 3.23	Espectro de RMN ^1H da substância 18 (400 MHz, CD_3OD)...	63
FIGURA 3.24	Ampliação da região δ 6,55 a 5,70 do espectro de RMN ^1H da substância 18	63
FIGURA 3.25	Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância 18	63
FIGURA 3.26	Ampliação da região δ 7,40 a 6,00 do espectro de RMN ^1H da substância 03 (400 MHz, CD_3OD).....	65
FIGURA 3.27	Ampliação da região δ 5,40 a 3,30 (sinais referentes a unidade de açúcar) do espectro de RMN ^1H da substância 03 (400 MHz, CD_3OD).....	65
FIGURA 3.28	Ampliação da região δ 1,00 a 0,80 (sinal referente à metila da unidade de açúcar) do espectro de RMN ^1H da substância 03 (400 MHz, CD_3OD).....	65
FIGURA 3.29	Espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C , (HMBC), de 03 (400 MHz, CD_3OD).....	66
FIGURA 3.30	Espectro de RMN ^1H de 04 (400 MHz, CDCl_3).....	68
FIGURA 3.31	Ampliação da região δ 6,90 a 5,80 do espectro de RMN ^1H da substância 04	68
FIGURA 3.32	Espectro de RMN ^1H de 05 (400 MHz, CDCl_3).....	70

FIGURA 3.33	Ampliação da região δ 7,70 a 6,10 do espectro de RMN ^1H da substância 05	70
FIGURA 3.34	Espectros de g-NOE de 05 (400 MHz, CDCl_3).....	70
FIGURA 3.35	Espectro de RMN ^1H de 06 (400 MHz, CDCl_3).....	72
FIGURA 3.36	Ampliação da região δ 7,50 a 5,30 do espectro de RMN ^1H da substância 06	72
FIGURA 3.37	Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, (400 MHz, CDCl_3) da substância 06	73
FIGURA 3.38	Espectros de g-NOE, (^1H - ^1H), (400 MHz, CDCl_3) da substância 06	74
FIGURA 3.39	Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz CDCl_3) da substância 06	75
FIGURA 3.40	Espectro de RMN ^1H de 07 (400 MHz, CDCl_3).....	78
FIGURA 3.41	Ampliação da região de δ 5,4 a 2,9 do espectro de RMN ^1H de 07	78
FIGURA 3.42	Ampliação da região de δ 2,0-0 ppm do espectro de RMN ^1H de 07	78
FIGURA 3.43	Espectro de RMN ^{13}C de 07 (100 MHz, CDCl_3).....	81
FIGURA 3.44	Cromatograma obtido no CG-EM para 07	81
FIGURA 3.45	Espectro de massas (70 eV, IE) de 07	81
FIGURA 3.46	Espectro de correlação homonuclear ^1H - ^1H , (COSY), de 07 ..	82
FIGURA 3.47	Ampliação da região dos hidrogênios alifáticos do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQC, de 07	82
FIGURA 3.48	Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, de 07	83
FIGURA 3.49	Espectro de RMN ^1H de 08 (400 MHz, CDCl_3).....	84
FIGURA 3.50	Ampliação da região δ 4,80 a δ 3,10 ppm do espectro de RMN ^1H de 08	84
FIGURA 3.51	Ampliação da região δ 1,30 a δ 0 ppm do espectro de RMN ^1H de 08	85
FIGURA 3.52	Espectro de RMN ^{13}C de 08 (100 MHz, CDCl_3).....	85
FIGURA 3.53	Espectro de RMN ^1H da mistura dos esteróides, sitosterol (9), estigmasterol (10) e campesterol (11), (400 MHz, CDCl_3).....	89
FIGURA 3.54	Cromatograma obtido no CG-EM para os esteróides 9 , 10 e 11	89
FIGURA 3.55	Espectro de massas (70 eV, IE) do esteróide 09	89
FIGURA 3.56	Espectro de massas (70 eV, IE) do esteróide 10	90

FIGURA 3.57	Espectro de massas (70 eV, IE) do esteróide 11	90
FIGURA 3.58	Espectro de RMN ¹ H da substância 12 (400 MHz, CDCl ₃).....	91
FIGURA 3.59	Espectro de RMN de ¹ H da substância 14 (400 MHz, CDCl ₃).....	92
FIGURA 3.60	Ampliação da região δ 8,40 a 7,30 do espectro de RMN de ¹ H de 14 (400 MHz, CDCl ₃).....	93
FIGURA 3.61	Espectro de correlação heteronuclear (¹ H- ¹³ C), HSQC, de 14	94
FIGURA 3.62	Cromatograma obtido por CG-EM para a substância 14	95
FIGURA 3.63	Espectro de massas (70 eV, IE) da substância 14	95
FIGURA 3.64	Espectro de RMN ¹ H da substância 15 (400 MHz, CD ₃ OD)...	96
FIGURA 3.65	Ampliação da região 8,6 a 7,3 ppm do espectro de RMN ¹ H da substância 15	96
FIGURA 3.66	Ampliação do espectro de HSQC da substância 15	97
FIGURA 3.67	Ampliação do espectro de HMBC da substância 15	98
FIGURA 3.68	Espectro de fragmentação para a substância 15 . ESI/MS, modo positivo de ionização.....	99
FIGURA 3.69	Espectro de RMN ¹ H da substância 16 (400 MHz, CD ₃ OD)...	100
FIGURA 3.70	Ampliação da região δ 6,55 a 5,70 do espectro de RMN ¹ H da substância 16	101
FIGURA 3.71	Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ¹ H da substância 16	101
FIGURA 3.72	Espectro de correlação heteronuclear ¹ H- ¹³ C (HSQC) de 16 .	102
FIGURA 3.73	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H- ¹³ C (HMBC) de 16	102
FIGURA 3.74	Espectro de RMN ¹ H da substância 19 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	104
FIGURA 3.75	Ampliação da região 7,40 a 6,50 ppm do espectro de RMN ¹ H da substância 19 (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	104
FIGURA 3.76	Espectro de RMN C ¹³ (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) da substância 19	105
FIGURA 4.1	Bioensaio realizado em Placas de Elisa com <i>S. frugiperda</i>	108

FIGURA 4.2	Tubos de vidro utilizados no bioensaio e larvas recém-eclodidas de <i>S. frugiperda</i>	109
FIGURA 4.3	Substâncias isoladas de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>To. ciliata</i> , submetidas ao ensaio de bioatividade frente às lagartas de <i>S. frugiperda</i>	115
FIGURA 5.1	Comparação dos espectros de RMN ¹ H (D ₂ O e MeOD; 600 MHz) dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	142
FIGURA 5.2	Ampliação da região δH 2,5 a 0,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio].....	142
FIGURA 5.3	Ampliação região δH 4,5 a 2,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio].....	143
FIGURA 5.4	Ampliação da região δH 7,0 a 5,0 ppm comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio].....	143
FIGURA 5.5	Ampliação da região δH 9,0 a 7,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio].....	144
FIGURA 5.6	Comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona.....	145
FIGURA 5.7	Ampliação da região δH 1,8 a 0,7 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona.....	145
FIGURA 5.8	Ampliação da região δH 3,4 a 1,8 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona.....	146
FIGURA 5.9	Ampliação da região δH 4,2 a 3,4 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona.....	146

FIGURA 5.10	Ampliação da região δH 8,5 a 5,8 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 ^o , 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona.....	147
FIGURA 5.11	Ampliação do espectro de RMN 1H dos extratos das lagartas tratadas com o limonoide cedrelona em 7 dias de ensaio. (600 MHz, CD ₃ OD e D ₂ O).....	147
FIGURA 5.12	Comparação dos espectros de RMN 1H (D ₂ O e MeOD; 600 MHz) dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	148
FIGURA 5.13	Ampliação da região δH 3,0 a 0,8 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	149
FIGURA 5.14	Ampliação da região δH 5,5 a 3,5 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	149
FIGURA 5.15	Ampliação da região δH 9,0 a 5,8 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	150
FIGURA 5.16	Comparação dos espectros de RMN 1H (D ₂ O e MeOD; 600 MHz) dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio....	151
FIGURA 5.17	Ampliação da região δH 3,0 a 0,7 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	151
FIGURA 5.18	Ampliação da região δH 5,5 a 2,3 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	152
FIGURA 5.19	Ampliação da região δH 9,0 a 5,8 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7 ^o e 10 ^o dias de ensaio.....	152

FIGURA 5.20	Comparação dos espectros de RMN ¹ H) dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 3º dia de ensaio.....	153
FIGURA 5.21	Ampliação da região δH 8,5 a 5,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 3º dia de ensaio.....	154
FIGURA 5.22	Comparação dos espectros de RMN ¹ H (D ₂ O e MeOD; 600 MHz) das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 7º dia de ensaio.....	155
FIGURA 5.23	Ampliação da região δH 8,3 a 5,7 ppm da comparação dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 7º dia de ensaio.....	155
FIGURA 5.24	Ampliação do espectro de COSY na região de δH 4,30 a 0 ppm dos extratos das lagartas mortas em 7 dias de ensaio tratadas com cedrelona.....	157
FIGURA 5.25	Ampliação do espectro de COSY na região de δH 8,0 a 5,5 ppm das lagartas mortas em 7 dias de ensaio tratadas com cedrelona.....	158
FIGURA 5.26	Ampliação da região δ 7,50 a 6,00 ppm do espectro de RMN ¹ H da cedrelona (1).....	158
FIGURA 5.27	Espectro de correlação heteronuclear ¹ H- ¹³ C (HSQC), ampliação da região δ 8,0 a 6,00 ppm das lagartas mortas em 7 dias de ensaio tratadas com cedrelona.....	159
FIGURA 5.28	Comparação dos espectros de RMN ¹ H (D ₂ O e MeOD; 600 MHz) das lagartas tratadas com cedrelona vs controle durante o 10º dia de ensaio.....	160
FIGURA 5.29	Ampliação da região δH 8,5 a 5,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H das lagartas tratadas com cedrelona vs controle durante o 10º dia de ensaio.....	160
FIGURA 5.30	Comparação dos espectros de RMN ¹ H (D ₂ O e MeOD; 600 MHz) das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle ao 7º dia de ensaio.....	161
FIGURA 5.31	Ampliação da região δH 8,5 a 5,5 ppm da dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle ao 7º dia de ensaio.....	161

FIGURA 5.32	Comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle durante o 10 ^o dia de ensaio.....	162
FIGURA 5.33	Ampliação da região δH 9,0 a 5,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹ H dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle durante o 10 ^o dia de ensaio.....	162
FIGURA 5.34	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 na concentração de 10,0 ng/mL de cedrelona.....	163
FIGURA 5.35	Espectro de íons fragmentos para m/z 423,21484 referente a massa monoisotópica exata da cedrelona.....	164
FIGURA 5.36	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de hemolinfa do tratamento com cedrelona.....	165
FIGURA 5.37	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de hemolinfa do tratamento controle	166
FIGURA 5.38	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de intestino médio do tratamento com cedrelona.....	167
FIGURA 5.39	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de intestino médio do tratamento controle.....	167
FIGURA 5.40	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de fezes das lagartas alimentadas com cedrelona.....	168
FIGURA 5.41	Espectro de íons fragmentos para m/z 423,21484 extraído dos extratos das fezes com cedrelona.....	169
FIGURA 5.42	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21484 dos extratos das fezes das lagartas controle sem a presença de cedrelona.....	169
FIGURA 5.43	Espectro de íons fragmentos para m/z 425,21295 encontrado para uma massa próxima da cedrelona porém com massa monoisotópica distinta extraído dos extratos das fezes controle.....	170
FIGURA 5.44	Ampliação do espectro de íons fragmentos para m/z 425,21295 encontrado para uma massa próxima da cedrelona porém com massa monoisotópica distinta extraído dos extratos das fezes controle.....	170

FIGURA 5.45	Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 do padrão de referência.....	172
FIGURA 5.46	Curva de calibração por calibração externa de cedrelona.....	173
FIGURA 5.47	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos das fezes de cinco lagartas alimentadas com cedrelona.....	175
FIGURA 5.48	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos das fezes de cinco lagartas alimentadas com dieta controle sem a presença cedrelona...	176
FIGURA 5.49	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos da dieta enriquecida com cedrelona de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas).....	177
FIGURA 5.50	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos da dieta controle sem a presença de cedrelona de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas)..	178
FIGURA 5.51	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes à lavagem dos tubos os quais foram realizados o experimento de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas).....	179
FIGURA 5.52	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes à lavagem dos tubos os quais foram realizados o experimento controle sem a presença da cedrelona de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas).....	180
FIGURA 5.53	Estruturas derivadas do limonoide cedrelona com suas respectivas massas monoisotópicas exatas.....	182
FIGURA 5.54	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos das fezes de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com cedrelona.....	183
FIGURA 5.55	Espectro de íons fragmentos para m/z 423,2151 extraído da banda em 3.70 referente ao possível produto metabolizado..	183
FIGURA 5.56	Espectro de íons fragmentos para m/z 423,2151 extraído da banda em 4.84 eferente ao possível produto metabolizado...	184
FIGURA 5.57	Espectro de íons fragmentos para m/z 423,2151 extraído da banda em 6.98 referente ao limonoide cedrelona.....	184
FIGURA 5.58	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de intestino médio de três lagartas diferentes alimentadas com cedrelona.....	185

FIGURA 5.59	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de intestino médio de três lagartas diferentes controles.....	185
FIGURA 5.60	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de hemolinfa de três lagartas diferentes alimentadas com cedrelona (triplicatas biológicas)	186
FIGURA 5.61	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de hemolinfa de três lagartas diferentes alimentadas com dieta controle (triplicatas biológicas).....	187
FIGURA 5.62	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes a cabeça de três lagartas diferentes (triplicatas biológicas).....	188
FIGURA 5.63	Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes à cabeça de três lagartas diferentes alimentadas com dieta controle (triplicatas biológicas).....	188
FIGURA 6.1	<i>Enterococcus mundtii</i> isolados do trato digestivo de lagartas de quinto instar de <i>S. frugiperda</i>	196
FIGURA 6.2	Espectro de massas MALDI-TOF-MS do isolado AC2 de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com cedrelona.....	196
FIGURA 6.3	Espectro de massas MALDI-TOF-MS do isolado AC4 de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com cedrelona.....	197
FIGURA 6.4	Espectro de massas MALDI-TOF-MS do isolado AS2 de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta controle.....	197
FIGURA 6.5	Espectro de massas MALDI-TOF-MS do isolado AS4 de lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta controle.....	198
FIGURA 6.6	Identificação microbiana para as bactérias isoladas de <i>S. frugiperda</i> (<i>Enterococcus mundtii</i>).....	199
FIGURA 7.1	Mecanismo reacional envolvido na detecção da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.....	202
FIGURA 7.2	Substâncias isoladas e submetidas ao ensaio de inibição à AChE.....	205
FIGURA 7.3	Efeito das substâncias isoladas de <i>T. pallida</i> , <i>T. pallense</i> <i>T. ciliatana</i> inibição frente à enzima acetilcolinesterase a 100 μ M. (100% da atividade enzimática).....	206

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA 3.1	Metodologia de extração do limonoide cedrelona a partir do caule de <i>Toona ciliata</i>	26
FLUXOGRAMA 3.2	Partição líquido-líquido dos extratos EtOH brutos de <i>T. pallida</i> , <i>To. ciliata</i> e <i>T. pallens</i>	28
FLUXOGRAMA 3.3	Resumo do fracionamento da fração EHCTC do caule de <i>To. ciliata</i>	30
FLUXOGRAMA 3.4	Resumo do fracionamento da fração FAEERTC dos ramos de <i>To. ciliata</i>	31
FLUXOGRAMA 3.5	Resumo do fracionamento da fração FHEEFRTC dos frutos de <i>To. ciliata</i>	32
FLUXOGRAMA 3.6	Resumo do fracionamento da fração FAEEFTPD das folhas de <i>T. pallida</i>	33
FLUXOGRAMA 3.7	Resumo do fracionamento da fração FHEEFTPD das folhas de <i>T. pallida</i>	34
FLUXOGRAMA 3.8	Resumo do fracionamento da fração FDEERTPL das folhas de <i>T. pallens</i>	35
FLUXOGRAMA 3.9	Resumo do fracionamento da fração FHEERTPL das folhas de <i>T. pallens</i>	36
FLUXOGRAMA 3.10	Resumo do fracionamento da fração FDEEFTPL dos ramos de <i>T. pallens</i>	37
FLUXOGRAMA 3.11	Resumo do fracionamento da fração FAEERTPL dos ramos de <i>T. pallens</i> . * Substância isolada também a partir dos ramos de <i>To. ciliata</i>	39
FLUXOGRAMA 3.12	Resumo do fracionamento da fração FAEEFTPL das folhas de <i>T. pallens</i>	43

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 5.1	Procedimento experimental de extração das lagartas de <i>S. frugiperda</i> em primeiro instar larval para estudos via RMN.....	130
ESQUEMA 5.2	Experimento do metabolismo da cedrelona realizado com lagartas de <i>S. frugiperda</i> no 5º instar usando dieta enriquecida com o princípio ativo.....	132
ESQUEMA 5.3	Experimento de dissecação das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> no 5º instar e a coleta da hemolinfa, intestino médio e das fezes excretadas, com réplicas biológicas para cada tratamento.....	133
ESQUEMA 5.4	Extração da hemolinfa, intestino médio e das fezes para análises via Linear ion trap - Orbitrap(LTQ Orbitrap Velos™).....	134
ESQUEMA 5.5	Proposta de fragmentação para a cedrelona no modo positivo de ionização utilizando a fonte de ionização APCI...	164

RESUMO

“ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOATIVIDADE DE ESPÉCIES DE MELIACEAE SOBRE *Spodoptera frugiperda* E ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DO INSETO SOB A AÇÃO DA CEDRELONA” - *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) é uma das principais pragas da cultura do milho podendo seu dano levar à redução na produção agrícola. A utilização de inseticidas sintéticos tem sido o principal método de controle para o inseto, porém, seu uso indiscriminado tem alterado a seleção de populações, além dos prejuízos à saúde humana e ao meio ambiente. Desta forma, o estudo de plantas inseticidas como ferramenta promissora no controle de insetos pragas vem sendo estimulado. Bons resultados foram conseguidos anteriormente com extratos de *T. pallens*, *T. pallida* e *To. ciliata* sobre as larvas de *S. frugiperda*, porém não há estudos relacionados à metabolização pelo inseto das substâncias naturais provenientes destas espécies. Assim, os objetivos deste trabalho foram: isolar e identificar metabólitos secundários de *T. pallida*, *T. pallens* e *To. ciliata* para ensaiá-los e simultaneamente entender como são metabolizados pelas lagartas em diferentes estádios larvais. O estudo fitoquímico proporcionou o isolamento e identificação de esteroides sitosterol, estigmasterol e campesterol, os triterpenos damaradienol e 30-nor-metilenocicloartan-3 β -ol, limonoides cedrelona e 23-hidroxicedrelonelídeo, cumarinas siderina, escopoletina e 4-metóxi-5-metilcumarina, flavonoides catequina, epicatequina e galocatequina, 3-indol-carbaldeído, ácido protocatecuico, um nucleosídeo 5'-inosil e uma purina adenina. Os ensaios inseticidas por ingestão frente à *S. frugiperda* foram realizados com os extratos brutos, frações e substâncias puras e os melhores resultados foram provenientes das duas espécies de *Trichillia*, onde a fração dos ramos de *T. pallens* levou a 100% de mortalidade larval. O estudo químico da metabolização do inseto foi desenvolvido com o limonoide cedrelona, o qual se mostrou altamente ativo e promissor. Com isso, no intuito de buscar entender como o inseto metaboliza este princípio ativo algumas estratégias foram utilizadas para detectar cedrelona em larvas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide. O estudo das lagartas de 1º instar via Ressonância Magnética Nuclear (600 MHz) permitiu detectar cedrelona intacta nos extratos. As análises dos extratos das fezes de *S. frugiperda* no quinto instar alimentadas por 5 e 24 horas com dieta enriquecida em cedrelona via Espectrometria de Massas (LTQ-Orbitrap Velos), demonstraram que a via de metabolização da cedrelona leva um tempo maior para ser ativada, pois em 5 horas o limonoide foi excretado praticamente todo intacto nas fezes. Em 24 horas, o inseto metabolizou grande parte da cedrelona, sendo liberados nas fezes os produtos do metabolismo e uma pequena quantidade de cedrelona intacta, verificando valores abaixo de 500 ng quando foram quantificados. Na análise da atividade metabólica do inseto, observou-se aumento na taxa metabólica relativa e do custo metabólico após a ingestão do princípio ativo, o qual pode estar relacionado à tentativa de detoxificação do composto pelo inseto. O estudo da microbiota associada à *S. frugiperda* via MALDI-TOF/MS possibilitou a identificação segura dos micro-organismos isolados dos tratamentos com cedrelona e controle em nível de gênero *Enterococcus*, sendo a espécie *E. mundtii* identificada para todos os tratamentos. Esses micro-organismos podem estar associados na metabolização de cedrelona pelo inseto. Ainda neste trabalho foram realizados testes de inibição da enzima acetilcolinesterase na forma de *screening* para possíveis candidatos a inseticidas naturais, sendo o melhor resultado observado para a cedrelona.

ABSTRACT

" PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOACTIVITY OF MELIACEAE SPECIES ON *Spodoptera frugiperda* AND SPECTROSCOPIC ANALYSIS OF INSECT UNDER THE ACTION OF CEDRELONE " - *Spodoptera frugiperda* is a major pest of maize and its damage may lead to reduction of agricultural production. The use of synthetic insecticides has been the primary method of pest control, but their indiscriminate use has altered the selection of populations, as well as damage to human health and environment. Thus, the study of insecticidal plants as a promising tool to control of pest insects have been stimulated. Good results were obtained previously with extracts of *T. pallida*, *T. pallens* and *To. ciliata* on larvae of *S. frugiperda*, but there are no studies related to metabolization by the insect of natural substances derived from these species. Therefore the goals of this study were to isolate and identify secondary metabolites of *T. pallida*, *T. pallens* and *To. ciliata* to assay them, and to understand how these compounds are metabolized by caterpillars at different larval stages. The phytochemical study provided isolation and identification of steroids sitosterol, stigmasterol and campesterol, triterpenes dammaradienol and 30-nor-metilenocicloartan-3 β -ol, limonoids cedrelone and 23-hidrooxicedrelone, coumarins siderin, scopoletin and 4-methoxy-5- methylcoumarin, flavonoids catechin, epicatechin and gallocatechin, indole-3-carbaldehyde, protocatechuic acid, inosil 5'-nucleoside and a purine adenine. Insecticides tests of ingestion against *S. frugiperda* were performed with crude extracts, fractions and pure substances. The best results were obtained from two species of *Trichilia*, where the branches fraction of *T. pallens* led to 100% larval mortality. Chemical studies of the metabolism of the insect was developed with the limonoid cedrelone, which was highly active. Thus, in order to understand how insects metabolize this active principle, some strategies were used to detect cedrelone in *S. frugiperda* larvae fed with artificial diet containing this limonoid. The study of 1st instar larvae by Nuclear Magnetic Resonance (600 MHz) identified cedrelone intact in these extracts. The analysis of the extracts of the faeces of the fifth instar *S. frugiperda* fed at 5 and 24 hours with diet enriched in cedrelone by Mass Spectrometry (LTQ-Orbitrap Velos), demonstrated that the metabolization pathway of cedrelone takes a longer time to be activated, because in 5 hours the limonoid was almost totally excreted intact in the faeces. In 24 hours, the insect metabolized a high amount of cedrelone, the metabolic products were released in faeces and a small amount of intact cedrelone, observing values below 500 ng when it was quantified. In metabolic activity assays of the insect, we observed an increase in relative metabolic rate and metabolic cost after ingestion of the active ingredient, which may be related to the attempted detoxification of the compound by the insect. The study of the microbiota associated with *S. frugiperda* by MALDI-TOF/MS enabled the secure identification of micro-organisms isolated from treatments cedrelone and control at genus *Enterococcus*, and the specie *E. mundtii* was identified for all treatments. These micro-organisms seems to be associated with metabolism of cedrelone by the insect. Furthermore in this work it were carried out tests of inhibition of acetylcholinesterase enzyme in *screening* mode searching for potential candidates for natural insecticides, with the best results observed for cedrelone.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- <i>Spodoptera frugiperda</i>	1
1.2 - Produtos naturais: Alternativa no controle de insetos-pragas.....	3
1.3 -Mecanismo de ação dos inseticidas.....	5
1.4 - Resistências aos inseticidas	6
1.4.1- Redução na taxa de penetração do inseticida.....	7
1.4.2 - Resistência metabólica	7
1.4.3 - Alteração do sítio-alvo	8
1.4.3.1 - Acetilcolinesterase (AChE)	8
1.5 - Interações inseto-planta.....	9
1.6 - Simbiontes associados a insetos.....	10
1.7 - O gênero <i>Trichilia</i> e a bioatividade de <i>Trichilia spp.</i> sobre <i>S. frugiperda</i>	11
1.8 - <i>Trichilia pallida</i>	14
1.9 - <i>Trichilia pallens</i>	16
1.10 - <i>Toona ciliata</i>	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1- Objetivo geral.....	19
2.2 - Objetivos específicos.....	19
3. ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES DE <i>Trichilia pallida</i> , <i>T. pallens</i> e <i>Toona ciliata</i>	21
3.1 - Procedimentos Experimentais.....	21
3.1.1 – Material e Métodos.....	21
3.1.1.1 - Materiais Cromatográficos.....	21
3.1.1.2 - Solventes.....	22
3.1.1.3 - Reveladores.....	22
3.1.2 - Equipamentos.....	22
3.1.2.1 - Dispensor usado na extração.....	22
3.1.2.2 - Evaporadores Rotativos.....	22
3.1.2.3- Banho de ultrassom.....	22
3.1.2.4- Balança Analítica.....	22
3.1.2.5 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear.....	23
3.1.2.6 - Equipamento de CLAE.....	23
3.1.2.7 - Espectrômetros de Massas.....	23

3.1.2.8 - Freezer	23
3.1.3 - Material Botânico.....	24
3.1.3.1 - <i>Trichilia pallida</i>	24
3.1.3.2 - <i>Toona ciliata</i>	24
3.1.3.3 - <i>Trichilia pallens</i>	24
3.1.4 - Obtenção dos extratos etanólicos brutos das espécies de <i>T. pallida</i> , <i>To. ciliata</i> e <i>T. pallens</i>	24
3.1.5 - Extração e isolamento do limonoide cedrelona do caule de <i>Toona</i> <i>ciliata</i>	25
3.1.6- Fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias de <i>T.</i> <i>pallida</i> , <i>To. ciliata</i> e <i>T. pallens</i>	28
3.1.6.1 - Fracionamento do extrato hexânico do caule de <i>To. ciliata</i>	30
3.1.6.2 - Fracionamento da fração FAEERTC de <i>To. ciliata</i>	31
3.1.6.3 - Fracionamento da fração FDEEFRTC de <i>To. ciliata</i>	31
3.1.6.4 - Fracionamento da fração FAEEFTPD de <i>T. pallida</i>	32
3.1.6.5- Fracionamento da fração FHEEFTPD de <i>T. pallida</i>	33
3.1.6.6 - Fracionamento da fração FDEERTPL de <i>T. pallens</i>	34
3.1.6.7 - Fracionamento da fração FHEERTPL de <i>T. pallens</i>	35
3.1.6.8- Fracionamento da fração FDEEFTPL de <i>T. pallens</i>	36
3.1.6.9 - Fracionamento da fração FAEERTPL de <i>T. pallens</i>	38
3.1.6.10 - Fracionamento da fração FAEEFTPL de <i>T. pallens</i>	41
3.2 - Resultados e Discussões	43
3.2.1- Limonoides.....	43
3.2.1.1- Identificação estrutural da substância 01.....	43
3.2.1.2 - Identificação estrutural da substância 13.....	47
3.2.2- Flavonoides.....	56
3.2.2.1- Identificação estrutural da substância 02.....	56
3.2.2.2- Identificação estrutural da substância 17.....	59
3.2.2.3- Identificação estrutural da substância 18.....	61
3.2.2.4- Identificação estrutural da substância 03.....	64
3.2.3- Cumarinas.....	67
3.2.3.1- Identificação estrutural da substância 04.....	67
3.2.3.2- Identificação estrutural da substância 05.....	69
3.2.3.3- Identificação estrutural da substância 06.....	71

3.2.4 – Triterpenos.....	76
3.2.4.1- Identificação estrutural da substância 07.....	76
3.2.4.2- Identificação estrutural da substância 08.....	83
3.2.5- Esteroides.....	88
3.2.5.1- Identificação estrutural das substâncias 09, 10 e 11.....	88
3.2.6 – Triglicerideo.....	90
3.2.6.1- Identificação estrutural da substância 12.....	90
3.2.7 – Alcaloide.....	91
3.2.7.1- Identificação estrutural da Substância 14.....	91
3.2.8 – Purina.....	95
3.2.8- Identificação estrutural da substância 15.....	95
3.2.9- Nucleosideo.....	99
3.2.9.1- Identificação estrutural da substância 16.....	99
3.2.10 – Ácido fenólico.....	103
3.2.10.1- Identificação estrutural da substância 19.....	103
4 - ENSAIOS DE BIOATIVIDADE SOBRE AS LAGARTAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	107
4.1- Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em placas de Elisa.....	107
4.1.1 – Material e Métodos.....	107
4.1.2 – Metodologia.....	107
4.1.3 - Análise dos dados.....	108
4.2 - Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em tubos de vidro.....	109
4.3 - Resultados e Discussões.....	110
4.3.1- Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em placas de Elisa.....	110
4.3.2- Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em tubos de vidro.....	119
5 - ESTRATÉGIAS PARA DETECTAR CEDRELONA EM LAGARTAS DE <i>S. frugiperda</i> ALIMENTADAS COM DIETA ARTIFICIAL CONTENDO ESTE LIMONOIDE.....	129
5.1 - Uso da RMN na detecção de cedrelona em lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide.....	129

5.1.1 - Metodologia	129
5.2- Uso da EM na detecção de cedrelona em lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide.....	131
5.2.1 - Metodologia	131
5.2.1.1 - Amostras de <i>Spodoptera frugiperda</i>	131
5.2.1.2 - Preparo dos extratos das lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo o limonoide cedrelona para análises via LTQ Orbitrap Velos™	133
5.2.1.3 - Espectrômetro de Massas LTQ Orbitrap Velos™	134
5.2.1.4 - Método otimizado para as análises dos extratos obtidos das lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo o limonoide cedrelona via LTQ Orbitrap Velos™ no experimento de 5 horas de alimentação.....	135
5.2.1.5 - Detecção da cedrelona nos extratos obtidos das lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide via LTQ Orbitrap Velos™ no experimento de 5 horas de alimentação.....	136
5.2.1.6 - Desenvolvimento do Método de Quantificação da cedrelona nos extratos das fezes excretadas por <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com este limonoide - Preparo de Amostras e Otimização dos parâmetros via LTQ Orbitrap Velos™	136
5.2.1.6.1 - Obtenção da curva de calibração	137
5.2.1.6.2 - Preparo das amostras dos extratos de fezes das lagartas de <i>S. frugiperda</i> no 5º instar quando alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona para análises de quantificação.....	138
5.2.1.6.3 - Parâmetros das análises de quantificação dos extratos de fezes das lagartas de <i>S. frugiperda</i> no 5º instar quando alimentadas com cedrelona via LTQ Orbitrap Velos™.....	138
5.2.1.7 - Estudo da metabolização da cedrelona a partir dos extratos de hemolinfa, intestino médio, cabeça e fezes excretadas de lagartas de <i>S. frugiperda</i> no 5º instar larval quando alimentadas com cedrelona durante 24 horas - via LTQ Orbitrap Velos™.....	139
5.3 - Análise da atividade metabólica do inseto.....	140
5.3.1. Metodologia	140
5.4 - Resultados e Discussões - Uso da RMN na detecção de cedrelona em	

lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide.....	141
5.5 - Resultados e Discussões - Uso da EM na detecção de cedrelona em lagartas de <i>S. frugiperda</i> alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide.....	163
5.5.1 - Análise dos extratos de hemolinfa, intestino médio e fezes excretadas por <i>S. frugiperda</i> no experimento de 5 horas de alimentação.....	163
5.5.2 - Resultados alcançados no estudo da quantificação de cedrelona nos extratos das fezes excretadas por <i>S. frugiperda</i>	171
5.5.3 - Resultados alcançados na análise dos extratos de hemolinfa, intestino médio, cabeça e fezes das lagartas de 5º ínstar de <i>S. frugiperda</i> quando alimentadas com cedrelona em 24 horas via LTQ Orbitrap Velos™ para o estudo da metabolização.....	181
5.6 - Resultados alcançados na análise da atividade metabólica.....	189
6 - ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA À <i>S. frugiperda</i>	191
6.1 - Materiais e equipamentos.....	191
6.1.1 – Materiais	191
6.1.2 – Equipamentos.....	192
6.2 – Isolamento dos micro-organismos simbiossantes de <i>S. frugiperda</i>	192
6.3 – Análise dos isolados via MALDI-TOF/MS.....	193
6.4 - Caracterização morfológica dos isolados.....	193
6.4.1 – Metodologia.....	194
6.4.2 - Coloração de Gram para bactérias.....	194
6.5 - Resultados da análise via MALDI-TOF/MS dos micro-organismos isolados das lagartas de <i>S. frugiperda</i>	194
6.6 – Resultados da caracterização morfológica dos isolados.....	199
7. MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE.....	201
7.1 – Metodologia.....	202
7.1.1 – Reagentes.....	202
7.1.2 - Ensaio de inibição enzimática.....	203
7.2 - Resultados e Discussões.....	204
8 – CONCLUSÕES.....	207
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	209

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é considerada a principal praga da cultura do milho e ocorre anualmente em áreas tropicais e subtropicais. Desde 1797, este inseto é relatado como causador de injúrias em plantações de milho do sul dos Estados Unidos, México, Américas do Sul e Central (CARVALHO, 1970). Outras monoculturas como as do feijão, arroz, capinzais, cana-de-açúcar, trigo, aveia, cevada, alfafa, batata e hortaliças têm sido atacadas por esta praga polífaga (GALLO et al., 2002; YU, 2003). Na cultura do milho, os danos desta espécie consistem no ataque às folhas da planta raspando-as durante os 1º e 2º ínstar larvais. A partir do 3º ínstar a lagarta penetra no cartucho do milho, perfurando as folhas. O dano é variável em função da idade da planta e a redução máxima da produção é atingida quando a planta apresenta 8-10 folhas, ou seja, cerca de 40 dias após o plantio (CRUZ et al., 1982). É comum encontrar apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho devido ao canibalismo (FIGURA 1.1).



FIGURA 1.1. A) *Spodoptera frugiperda*; B) Dano ocasionado na planta de milho; C) *Spodoptera frugiperda* dentro do cartucho do milho. Fonte: (<http://www.opresenterural.com.br> e <http://www.castrolanda.coop.br>, 2014).

S. frugiperda caracteriza-se por apresentar um ciclo de vida composto por quatro fases (ovo-lagarta-adulto-adulto), FIGURA 1.2. Inicialmente, as mariposas fêmeas colocam cerca de 50 a 300 ovos em massa, durante a noite, sobre as folhas em camadas superpostas (CRUZ, 1995). Após três dias de incubação, eclodem as lagartas e a duração do período larval varia de 12 a 30 dias, geralmente com seis instares larvais. Os instares são diferenciados em alterações de proporções do corpo ou de números de segmentos (CROCOMO, 1983; CRUZ, 1995). Inicialmente, as lagartas são claras e posteriormente, tornam-se pardo-escuras, esverdeadas ou mesmo pretas. Ao término do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em crisálidas de coloração avermelhada, medindo cerca de 15 mm de comprimento (GALLO et al., 1988). Os adultos de *S. frugiperda* apresentam longevidade de aproximadamente 10 dias à temperatura de 25 °C, umidade relativa de 60 % e fotofase de 14 horas. O adulto é uma mariposa de coloração cinza-escura e 4 cm de envergadura. O período de duração das fases de ovo, de larva, de pupa e de adulto completa-se em torno de 3, 25, 11 e 12 dias, respectivamente (GALLO et al., 2002).

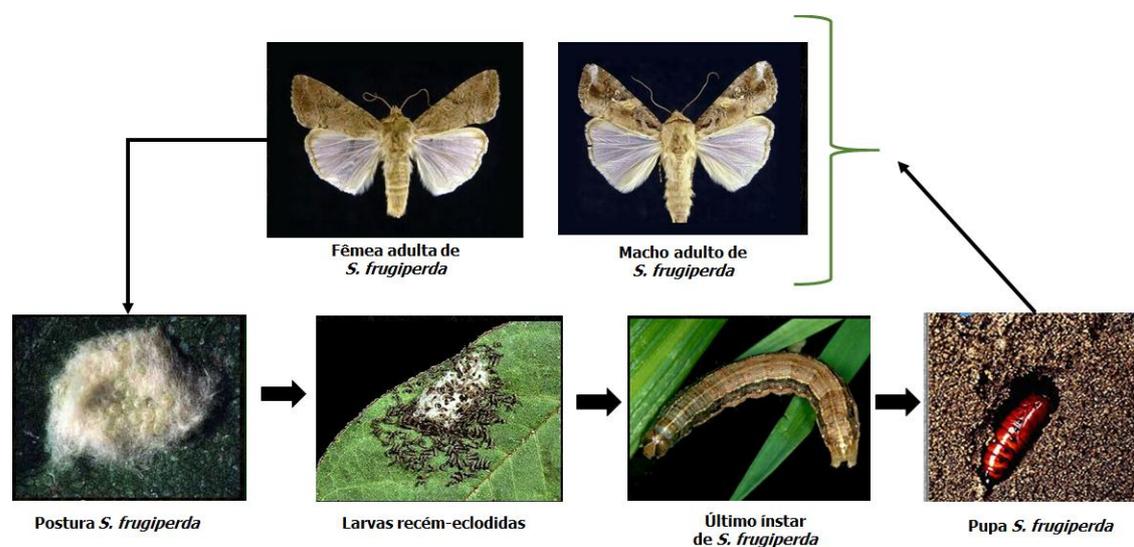


FIGURA 1.2: Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*. Fonte: (<http://www.pragasarroz.xpg.com.br>, 2014).

As dificuldades no controle desta praga têm aumentado, principalmente, com a adoção de cultivo do milho "safrinha" e com o plantio de milho durante o inverno em algumas localidades com infraestrutura de irrigação. Como *S. frugiperda* pode atacar o milho em qualquer época do ano, a frequência e a

intensidade de uso de inseticidas têm aumentado bastante nos últimos anos e fracassos no controle deste inseto com inseticidas tradicionais (piretróides, organofosforados e carbamatos) têm sido periodicamente relatados (YU, 1991; YU *et al.*, 2003; DIEZ-RODRIGUEZ e OMOTO, 2001; SUMAN *et al.*, 2010). A utilização de inseticidas sintéticos tem sido o principal método de controle de *S. frugiperda* em milho comercial, porém, seu uso indiscriminado e incorreto tem aumentado o número de aplicações e diminuído sua eficiência, principalmente devido à seleção de populações de insetos resistentes.

S. frugiperda é uma importante praga agrícola e estudos para entender sua biologia, as interações ecoquímicas e de identificação de genes e enzimas que estão envolvidas na metabolização de inseticidas pelo inseto têm sido realizados. Os esforços para entender sua biologia são limitados devido à ausência da sua informação genética até agora (KAKUMANI *et al.*, 2014). No entanto, os estudos que vem sendo desenvolvidos a nível biológico e químico podem beneficiar a humanidade, melhorando a produção de alimentos por meio do controle destas espécies de pragas.

1.2- Produtos naturais: Alternativa no controle de insetos-pragas

As pesquisas envolvendo plantas inseticidas evoluíram muito nas últimas décadas em todos os continentes. Espécies botânicas são tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas (NEWMAN *et al.*, 2003; ISMAN e GRIENEISEN, 2014). Essas plantas podem ser utilizadas diretamente no controle de insetos, através da aplicação de pós, óleos ou extratos brutos obtidos a partir de seus tecidos vegetais (BORGONI e VENDRAMIM, 2003; 2005). As células de plantas e os tecidos contêm barreiras bioquímicas que sintetizam substâncias tóxicas para o agente biológico ou que criam condições inibidoras para o desenvolvimento do inseto (MUÑOZ *et al.*, 2013). Atualmente, várias são as pesquisas envolvendo plantas inseticidas, com destaque para espécies da família Meliaceae, citando-se *Azadirachta indica*, comumente conhecida por nim (FORIM, 2010; CHAGAS *et al.*, 2010). Esta espécie vegetal tem sido bastante estudada, sendo verificados efeitos promissores no controle de várias pragas. O interesse por esta espécie deve-se à presença do limonoide azadiractina (FIGURA 1.3), cuja atividade sobre alguns insetos é comparável à dos melhores

inseticidas sintéticos encontrados no mercado (MARTINEZ, 2002). Atualmente, alguns inseticidas disponíveis no mercado, como o, Agrofite® (MAPA, 2014), Margosan-O® (VIEGAS JR., 2003) e o Azamax®, ambos contêm a azadiractina como componente principal. Os bons resultados verificados com o nim e a azadiractina têm estimulado pesquisas com outras espécies vegetais de Meliaceae (MATOS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; DEVAPPA et al., 2012; MUÑOZ et al., 2013).

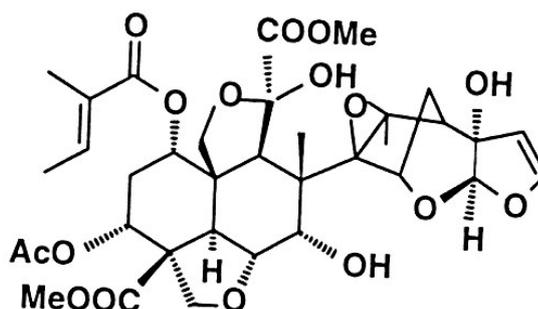


FIGURA 1.3: Estrutura do limonoide azadiractina.

Inseticidas são substâncias utilizadas para matar, atrair e repelir insetos, sendo sua descoberta, isolamento, síntese, avaliação toxicológica e de impacto ambiental um vasto tópico de pesquisas no mundo inteiro e tem se desenvolvido bastante nas últimas décadas (GODFREY, 1994). A literatura mostra a necessidade de se buscar novas substâncias que ofereçam o efetivo controle de pragas, oferecendo maior seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos com baixo impacto ambiental.

O uso de inseticidas consome, mundialmente, valores da ordem de bilhões de dólares na tentativa de controlar insetos. Os produtos naturais inseticidas foram muito utilizados até a década de 40, quando os produtos sintéticos passaram a ganhar espaço a partir da II Guerra Mundial, devido a pesquisas em produtos biocidas (VIEGAS Jr., 2003).

O interesse em aplicar metabólitos secundários de plantas no manejo integrado de pragas é crescente, já que estes podem reduzir o custo de produção da lavoura, os riscos ambientais e a dependência aos inseticidas sintéticos (SINGH et al., 1997). Outra razão para o interesse crescente em fitotoxinas é a ampla gama de novos sítios de ação nos organismos alvo. Mesmo que os produtos naturais não

sejam disponíveis para comercialização, eles podem indicar caminhos para a síntese de novos produtos (DUKE et al., 2000).

1.3- Mecanismo de ação dos inseticidas

Mecanismos de ação são processos bioquímicos pelos quais inseticidas interagem com o seu alvo, causando alterações em processos fisiológicos normais da praga alvo que se expressam na forma de toxicidade e incapacidade de sobrevivência. Atualmente, existem inseticidas que interagem com alvos específicos no sistema nervoso central (neurotóxicos), no processo bioquímico de síntese de quitina e no sistema endócrino (reguladores de crescimento), inseticidas que interferem no metabolismo, além de outros como os fagoderrentes.

Muitos insetos têm a capacidade de se alimentarem de plantas que contêm substâncias tóxicas, sem serem prejudicados utilizando, principalmente, mecanismos enzimáticos para inativação dos princípios ativos ou evitando os estágios e as partes da planta onde as substâncias estejam presentes em maior concentração (CORRÊA e SALGADO, 2011). Nestes casos, devem-se utilizar extratos com tais substâncias em maior concentração, inibindo a alimentação desses insetos ou prejudicando-os após a ingestão (COSTA et al., 2004). Há, também, os inseticidas que atuam como agente antialimentar, impedindo que os insetos iniciem a alimentação, causando morte por inanição. As substâncias que atuam por ingestão, penetram no organismo por via oral, que é uma forma específica de atuação, restrita a insetos herbívoros, apresentando pouca toxicidade a humanos (MENEZES, 2005).

Alguns mecanismos atuam em alguns órgãos ou moléculas alvo, dificultando o crescimento e o desenvolvimento, interferindo no metabolismo celular (MENEZES, 2005). Dependendo da concentração utilizada, alguns metabólitos podem reduzir a viabilidade de ovos, ninfas, larvas e pupas, interferindo sobre a reprodução dos insetos (COSTA et al., 2004). Outros mecanismos estão associados ao bloqueio da neurotransmissão. Algumas substâncias inseticidas agem rapidamente paralisando e matando os artrópodes por interromperem o transporte de íons sódio e potássio nas membranas de células nervosas, bloqueando a neurotransmissão ao longo do axônio e da sinapse (BOWMAN, 2006).

Quando os inseticidas reduzem a alimentação do inseto pela atuação nos quimiorreceptores são chamados fagodeterrentes, os quais não incluem as substâncias que reduzem a alimentação após ingestão e absorção por ação do sistema nervoso central e subletal (ISMAN et al., 1996). Existe a fagodeterrência primária, quando a substância afeta a alimentação agindo nos quimiorreceptores e a fagodeterrência secundária quando o inseto ingere o composto, causando efeitos tóxicos secundários como distúrbios hormonais/sistemas fisiológicos ou mesmo na inibição de enzimas digestivas (ISMAN, 2002). Há vários inseticidas naturais que atuam como fagodeterrentes, por exemplo, a azadiractina que atua pela ação dos quimiorreceptores, mas também causa efeitos secundários após a ingestão (MORDUE (LUNTZ) e BLACKWELL, 1993). A deterrência está associada a mecanismos sensoriais e causa redução do consumo de alimento, provocando deficiência nutricional. A falta de nutrientes, por sua vez, pode ocasionar atraso no desenvolvimento ou deformações, tornando a praga também mais suscetível ao ataque de inimigos naturais (MORDUE (LUNTZ) e NISBET, 2000).

A grande variedade de substâncias presentes na natureza continua sendo o enorme atrativo na área de controle de insetos, principalmente levando-se em consideração que apenas pequena parcela destas plantas foi investigada em seus mecanismos de ação específicos.

1.4 - Resistência aos inseticidas

A resistência é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a habilidade de uma população de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria sua morte. A resistência – dita fisiológica – é uma característica genética. Desse modo, populações de insetos, ácaros e outros artrópodes podem, naturalmente, apresentar uma proporção de indivíduos que tenham alelos que lhes confirmam resistência a um determinado produto químico. Formas resistentes podem surgir como resultado do uso persistente de pesticidas que matam indivíduos com alelos suscetíveis e não matam aqueles que possuam alelos resistentes (BRAGA e VALLE, 2007). Com isso, um determinado número de indivíduos possui características que permitem sua sobrevivência sob doses de inseticidas que normalmente levaria à morte. O inseticida não produz uma alteração genética, porém seu uso intenso e continuado, entretanto, pode selecionar

indivíduos resistentes a ele. Apesar dos vários estudos relatados sobre a resistência, o número de mecanismos envolvidos é bastante pequeno e inclui diminuição da taxa de penetração pela cutícula, detoxificação metabólica aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio-alvo. Todos esses mecanismos são inespecíficos e, geralmente, conferem resistência cruzada a outro inseticida estruturalmente relacionado (FERRARI, 1996; BRAGA e VALLE, 2007).

1.4.1- Redução na taxa de penetração do inseticida

Redução na taxa de penetração quando comparado com outros mecanismos é considerado de importância secundária por conferir um baixo nível de resistência (OPPENORTH, 1985; BRAGA e VALLE, 2007). Não obstante, em combinação com outros mecanismos, pode resultar em um incremento da resistência. A base bioquímica da redução na taxa de penetração de um inseticida não está clara, embora tenha sido proposto que a composição protéica do tegumento tenha papel relevante.

1.4.2 - Resistência metabólica

A resistência pode ser decorrente do aumento da capacidade de metabolização de inseticidas, que leva à formação de produtos menos tóxicos. O incremento do metabolismo pode ser o resultado de alteração, seja da enzima existente tornando-a mais eficaz na degradação dos inseticidas, seja dos mecanismos reguladores que aumentam a produção das enzimas já disponíveis em insetos suscetíveis, embora em quantidades muito pequenas (FERRARI, 1996; BROGDON et al., 1998; BRAGA e VALLE, 2007). As principais enzimas envolvidas em metabolismo de xenobióticos podem ser divididas em enzimas de Fase I e enzimas de Fase II. As enzimas de Fase I reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, introduzindo um grupo polar reativo na molécula, o que dá origem a substrato para as enzimas de Fase II. A detoxificação que contribui para a resistência a inseticidas é realizada por enzimas de Fase I, como as monooxigenases e esterases, ou de Fase II, caso das glutathione S-transferases (SCHOONHOVEN et al., 2005; BRAGA e VALLE, 2007; CHANINE e O'DONNELL, 2011).

1.4.3 - Alteração do sítio-alvo

A maioria dos inseticidas atua no sistema nervoso central em diferentes sítios alvo. A resistência de uma população de insetos pode ser decorrente de alteração desses sítios de forma a impedir ou dificultar a ligação com o inseticida (BRAGA e VALLE, 2007). Os principais sítios-alvo são a enzima acetilcolinesterase, os canais de sódio no qual a ligação com inseticidas os mantém na conformação aberta e, conseqüentemente, há propagação contínua do impulso nervoso, podendo levar o inseto à morte, além dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) em que os inseticidas impedem a entrada de íons cloro para o meio intracelular provocando a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração muscular, convulsões, paralisia e morte (CLARK et al., 1984; WARE, 2000).

1.4.3.1 - Acetilcolinesterase (AChE)

Acetilcolinesterase é o sítio-alvo de organofosforados e carbamatos (HEMINGWAY et al., 2000). O modo de ação de muitos pesticidas sintéticos, incluindo organofosforados e carbamatos, é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Ambos os tipos de inseticidas inibem esta enzima, causando a hiperestimulação dos neurônios, o que leva a espasmos musculares rápidos, convulsões e a morte do inseto (YU, 2008). Além destes grupos de inseticidas, uma variedade de compostos terpenoides também demonstrou inibir a AChE (HOUGHTON et al., 2006). Nestes casos, a resistência está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal – ou quase - do estímulo nervoso (FERRARI, 1996; FRENCH-CONSTANT et al., 1998; HEMINGWAY et al., 2000). Essa enzima é a responsável pela degradação de acetilcolina, neurotransmissor que, presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Em situação normal, após a cessação do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, sendo a acetilcolinesterase a enzima responsável (BRAGA e VALLE, 2007).

As enzimas colinesterases são encontradas em diversos tecidos e em todos os vertebrados e invertebrados. No sistema nervoso central dos insetos (FIGURA 1.2) constituído por cérebro, gânglios subesofagianos (constituído de

glândulas salivares) e cadeia nervosa ventral (glândulas torácicas e abdominais), as sinapses ocorrem através do neurotransmissor acetilcolina.

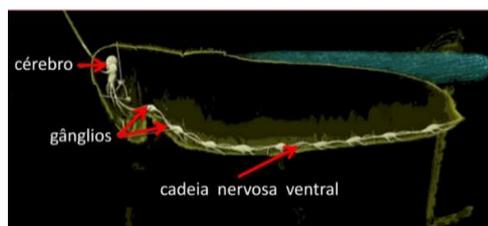


FIGURA 1.4. Sistema nervoso central do inseto. Fonte: (<http://marcosfilgueira.wikidot.com/sistema-nervoso-dos-insetos>, 2012).

1.5 - Interações inseto-planta

As plantas produzem uma variedade de compostos para se defenderem de herbívoros artrópodes (MAAG, 2014). Estes metabólitos podem funcionar como inibidores de alimentação, repelentes, ou toxinas (GATEHOUSE, 2002; HOWE e JANDER, 2008), servindo como defesas da planta. Uma parte destes metabólitos são atribuídos às suas interações com os herbívoros, assim, apresentam alguns mecanismos de defesa tais como rompimento do controle hormonal de processos de desenvolvimento, rompimento da membrana, inibição de transporte ou sinal de transdução e alterações metabólicas.

Os insetos vêm desenvolvendo diversos mecanismos de defesa diante do acervo de metabólitos secundários cada vez mais complexos, com isso, eles estão se especializando e desenvolvendo vias metabólicas alternativas como mecanismos específicos de defesa (ARNASON e BERNARDS, 2010).

Alguns dos mecanismos desenvolvidos pelos herbívoros adaptados são: excreção mais rápida das toxinas; evitar as defesas da planta alimentando-se apenas das partes da planta que contêm quantidades mínimas dos metabólitos; destoxificar os metabólitos vegetais através de vias metabólicas ou com a ajuda de micro-organismos endossimbióticos; tolerar os metabólitos; acumular e concentrar em partes específicas do corpo do inseto e assim, modificar esses metabólitos para o seu próprio benefício (OPTIZ & MULLER, 2009).

Os insetos fitófagos têm de lidar com essas defesas e, assim eles têm se especializado a uma família ou um gênero de plantas as quais apresentam compostos de defesa estruturalmente semelhante. Essas relações entre plantas e

seus insetos associados é chamada de “corrida química armamentista”, ou seja, uma reciprocidade de respostas seletivas às defesas (BERENBAUM, 2009). Porém, estas interações entre insetos especialistas e metabólitos secundários ainda não são muito bem compreendidas. Lepidópteros especialistas de plantas contendo glicosinolatos como a *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), a borboleta branca da couve, contornam a formação de isotiocianatos tóxicos com particulares adaptações bioquímicas. As lagartas dessa espécie possuem no intestino uma proteína específica (NSP) que reorienta a hidrólise de glicosinolatos para nitrilas que são menos tóxicas e são excretados com as fezes (WITTSTOCK et al., 2004; SCHRAMM et al., 2012).

A importância das classes dos metabólitos secundários para a escolha de plantas hospedeiras tem sido estabelecida para diversos grupos de lepidópteros, que se alimentam de um tipo específico de planta. Insetos específicos sequestram um tipo específico de metabólito, apesar da planta apresentar diversos tipos de classes de metabólitos secundários. Com o sequestro, estes insetos se tornam impalatáveis aos predadores, e assim, podem também ser utilizados para ação antimicrobiana, comunicação intra-específica ou metabolizados como feromônios sexuais (NISHIDA, 2002).

1.6 - Simbiontes associados a insetos

Os insetos são o maior grupo onde são encontrados micro-organismos simbiontes. A simbiose entre o inseto e o micro-organismo endossimbiótico contribui para a desintoxicação e/ou promove o desenvolvimento de resistência contra inseticidas no inseto (WERREN, 2012; KIKUCHI et al., 2012). Em muitos casos, endossimbiontes associados a insetos pragas podem agir na defesa indireta do inseto contra inimigos naturais, além de desempenharem importante função na evolução da herbivoria, em relação a sua função na detoxificação de metabólitos secundários produzidos pela planta hospedeira. A partir da habilidade demonstrada de metabolização de inseticidas, há relatos na literatura de que a microbiota intestinal se adapta à presença de metabólitos tóxicos da dieta, sendo bastante distinta entre indivíduos suscetíveis e resistentes.

A capacidade da microbiota associada a insetos em participar de processos de metabolização de compostos xenobióticos é relevante por dois

motivos: 1) a atuação da microbiota simbiote na degradação de compostos xenobióticos pode participar ativamente do processo de desenvolvimento de resistência a inseticidas; 2) trata-se de um nicho seletivo para o isolamento de microbiota capaz de degradar pesticidas, podendo ser utilizada diretamente na descontaminação de áreas de interesse, ou servir como fonte para o isolamento e identificação de enzimas que possam então ser exploradas para a mesma finalidade (ALMEIDA, 2013; DUA et al., 2002; ALCADE et al., 2006).

Alterações na composição da microbiota quando o hospedeiro é exposto a compostos tóxicos indica a possibilidade de que os micro-organismos associados sejam selecionados, apontando para a possibilidade de seleção de micro-organismos com capacidade de metabolização de tais compostos. Neste contexto, estudos relacionados têm despertado interesse na comunidade científica quanto à exploração de simbiotes associados a insetos para o desenvolvimento de novas estratégias de controle de insetos-pragas (ALMEIDA, 2013).

1.7 - O gênero *Trichilia* e a bioatividade de *Trichilia spp.* sobre *Spodoptera frugiperda*

O gênero *Trichilia* (Meliaceae) é composto por cerca de 419 espécies que são conhecidas por possuírem atividades biológicas e farmacológicas. Espécies deste gênero são exemplos de plantas inseticidas, as quais trazem a vantagem de serem bastante abundantes nas regiões tropicais da América (NAKATANI et al., 1981; PENNIGTON, 1981).

Trichilia, além de apresentar compostos com atividade inseticida conhecida (triquilinas), é um gênero que apresenta riqueza em limonoides de diversos tipos, como a heudebolina com anel C-seco, o qual foi isolado de *Trichilia heudelotii* (ADESIDA et al., 1973). Limonoides deste tipo são os mais ativos contra insetos. Além dos limonoides, outros tipos de substâncias têm sido isolados de espécies de *Trichilia* como esteroides, triterpenos do tipo cicloartano e tirucalano, protolimonoides e seus derivados glicosilados, sesquiterpenos, lignanas, γ -lactonas, cumarinas, ácidos ω -fenil alcanóicos e alcenóicos (MATOS, 2006; NEBO, 2010).

Diversos trabalhos comprovando a atividade inseticida de *Trichilia spp.* sobre *S. frugiperda* têm sido realizados. MIKOLAJCZAK e REED (1987) realizaram um dos primeiros trabalhos testando a atividade inseticida do gênero *Trichilia* sobre

S. frugiperda. Os extratos etanólicos testados de *T. pallida*, *T. connoroides*, *T. prieureana*, *T. roka* e *T. triphyllaria* causaram mortalidade igual ou superior a 80% das lagartas, sendo que apenas a última espécie não afetou a sobrevivência do inseto. ROEL (1998) avaliou a atividade inseticida de diversos extratos orgânicos de *T. pallida*, sendo a fração em acetato de etila considerada uma das mais eficientes. A avaliação de extratos orgânicos das folhas, ramos e frutos de *T. clausenii* e dos frutos de *T. catigua*, *T. elegans* foram avaliados sobre *S. frugiperda* e os extratos hexânico e metanólico de folhas e o hexânico de ramos da primeira espécie foram os mais eficientes, apresentando alta taxa de mortalidade larval superior a 60,0% (MATOS et al., 2006). Dentre os frutos, os melhores resultados foram apresentados pelos extratos hexânico e metanólico de *T. elegans*, com mortalidade larval de 100,0% (MATOS et al., 2009). ROCHA (2004) avaliou a bioatividade sobre *S. frugiperda* de extratos hexânico e metanólico de folhas e galhos, hexânico, diclorometânico e metanólico dos frutos de *T. pallida* e algumas das substâncias isoladas da espécie. Os extratos metanólico dos galhos e diclorometânico dos frutos foram os que apresentaram maiores mortalidades quando incorporados à dieta artificial, de 100 e 84 %, respectivamente. Os flavonoides quercetina e quercetrina isolados do extrato metanólico das folhas de *T. pallida* causaram mortalidades de 78 e 85%, respectivamente, a 100 ppm. Já os limonoides gedunina, 7-desacetilgedunina e limonina isolados do extrato diclorometânico dos frutos de *T. pallida*, foram bastante ativos, causando mortalidades de 69, 78 e 82%, respectivamente, a 100 ppm. NEBO et al. (2010) avaliaram a bioatividade de extratos orgânicos e dos constituintes químicos dos frutos de *T. clausenii* sobre *S. frugiperda* quando incorporados em dieta artificial, e os extratos metanólicos foram os que apresentaram a maior eficiência, com mortalidade de 64 %, enquanto o conjunto dos ácidos ω -fenil alcanóicos e alquenoicos isolados apresentaram 73,3 % de mortalidade.

Os extratos de algumas espécies de *Trichilia* foram avaliados sobre o substrato vegetal (folhas de milho). ROEL (2006) avaliou o efeito residual do extrato acetato de etila de *T. pallida* pulverizado na concentração de 2% em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação, e as suas folhas utilizadas na alimentação das lagartas de *S. frugiperda*. O extrato em acetato de etila de folhas (com ramos) de *T. pallida* apresentou mortalidade de 83,3% quando pulverizado em folhas de milho, apresentando atraso no desenvolvimento tanto em lagartas recém-eclodidas

como naquelas alimentadas a partir dos 10 dias de idade, sendo os efeitos mais pronunciados nas lagartas mais jovens. ROEL (2000b) avaliou o efeito de diferentes concentrações (massa/volume) do extrato acetato de etila de folhas e ramos de *T. pallida* em condições de laboratório usando folhas de milho imersas nessas soluções. Estes extratos impregnados em folhas de milho, causaram mortalidade larval de 100% em *S. frugiperda* em concentração igual ou superior a 0,05%. ROEL (2000a) também avaliou nas mesmas condições destas mesmas partes vegetais, os extratos acetônico e metanólico nas concentrações de 0,008 a 1% impregnados em folhas de milho, constatando-se, com base na mortalidade larval até os 10 dias, que os extratos acetônico de folhas e de ramos e o metanólico de ramos, apresentaram maior atividade que o metanólico de folhas.

Em relação às frações mais polares, VILLAR et al. (1990) comprovaram a redução significativa no dano causado à cultura do milho pela praga com aplicações de extratos aquosos de *T. americana* e *T. havanensis*. RODRÍGUEZ (1995) avaliou a bioatividade de extratos aquosos de meliáceas sobre lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta tratada. A maior eficiência foi obtida com extratos aquosos a 5% de caules e de folhas de *T. pallida*, que causaram 100% de mortalidade larval; a sobrevivência do inseto, entretanto, não foi afetada com os extratos a 1%. Avaliando o efeito de extratos aquosos adicionados à dieta artificial, na concentração de 1%, RODRÍGUEZ e VENDRAMIM (1996, 1997) não observaram efeito de folhas e caules (ramos) de quatro espécies de *Trichilia* (*T. elegans*, *T. claussenii*, *T. casaretti* e *T. catigua*) sobre a viabilidade larval de *S. frugiperda*. TORRECILLAS et al. (2001) confirmou a bioatividade do extrato aquoso de *T. pallida* quando o mesmo foi aplicado em folhas de milho oferecidas às lagartas. Foi avaliado o desenvolvimento e a sobrevivência de *S. frugiperda* criada em folhas de dois genótipos de milho (o padrão comercial C 901 e o resistente CMS 23) tratados com extratos aquosos (0,1 e 1%) de ramos da planta inseticida *T. pallida*. O extrato de ramos de *T. pallida* à concentração de 1% apresentou forte atividade inseticida, matando todas as lagartas de *S. frugiperda* nos dois genótipos antes que elas atingissem 10 dias de idade.

BORGONI et al. (2003) avaliaram a eficiência de extratos aquosos de ramos e folhas de seis espécies de *Trichilia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. claussenii*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*), em comparação com extrato aquoso de sementes de *Azadirachta indica* (nim) sobre *S. frugiperda* em condições de laboratório. Dentre

os extratos aquosos de folhas das seis espécies de *Trichilia* testadas a 5% (peso/volume), apenas o de *T. pallens* causou mortalidade das lagartas de *S. frugiperda*. Nesse tratamento, a mortalidade, no 5º dia, atingiu 98,7%, mesmo valor registrado com o extrato de sementes de nim, incluído no presente trabalho como padrão de eficiência. Dentre os extratos aquosos de ramos das seis espécies de *Trichilia* testados, o maior efeito foi obtido com *T. pallens* e *T. pallida*, cujos extratos causaram mortalidade de 48,9% e 39,5%, respectivamente, superando os valores obtidos com as demais espécies. No geral os extratos de ramos de *T. pallens*, ramos e folhas de *T. pallida*, embora menos eficientes, também reduziram a sobrevivência e o peso larval de *S. frugiperda*. BORGONI et al. (2005) avaliaram o efeito de extratos aquosos de ramos e folhas de seis espécies de *Trichilia* (*T. casaretti*, *T. catigua*, *T. clausseii*, *T. elegans*, *T. pallens* e *T. pallida*), sobre o desenvolvimento de *S. frugiperda* quando folhas de milho foram imersas em uma solução a 1% desses extratos e oferecidas a lagartas de primeiro ínstar. Os resultados indicaram que os extratos de ramos de *T. pallida* e de folhas de *T. pallens* foram os mais eficientes, dentre as seis espécies de *Trichilia* testadas, embora os extratos de folhas de *T. pallida*, *T. catigua*, *T. casaretti* e *T. elegans* e os extratos de ramos de *T. clausseii* e *T. pallens* também tenham afetado o desenvolvimento do inseto. Estes resultados vêm confirmando a bioatividade dos extratos de *T. pallida* e *T. pallens* sobre *S. frugiperda*.

1.8 - *Trichilia pallida*

Trichilia pallida Swartz é uma árvore ou arvoreta de 3-8 metros, popularmente conhecida como baga-de-morcego (SC), catiguá (SC/PR/SP), catiguá-graudo (PR), tauvá (PR) e amesca (MG). Ela é amplamente distribuída no Brasil desde a Amazônia até o Estado de Santa Catarina, contudo também ocorre no nordeste brasileiro e no Rio Grande do Sul. Floresce de janeiro a junho e apresenta frutos maduros a partir de maio (PATRÍCIO et. al., 2005).



FIGURA 1.5: *Trichilia pallida*. Em destaque folhas compostas e frutos. Fonte: (<http://picasaweb.google.com/investigaciongolfito/Meliaceae>, 2012).

Estudos quanto à bioatividade de extratos e compostos isolados de *T. pallida* (FIGURA 1.6) frente às lagartas de *S. frugiperda* comprovaram o potencial inseticida da espécie (RODRIGUEZ e VENDRAMIM, 1996a; 1997b; BORGONI e VENDRAMIM (2003; 2005); ROEL (1998; 2000a; 2000b; 2006; ROCHA, 2004). Porém, não se conhece o efeito tóxico destes extratos e substâncias puras sobre as larvas de *S. frugiperda*, assim como a metabolização pelo inseto.

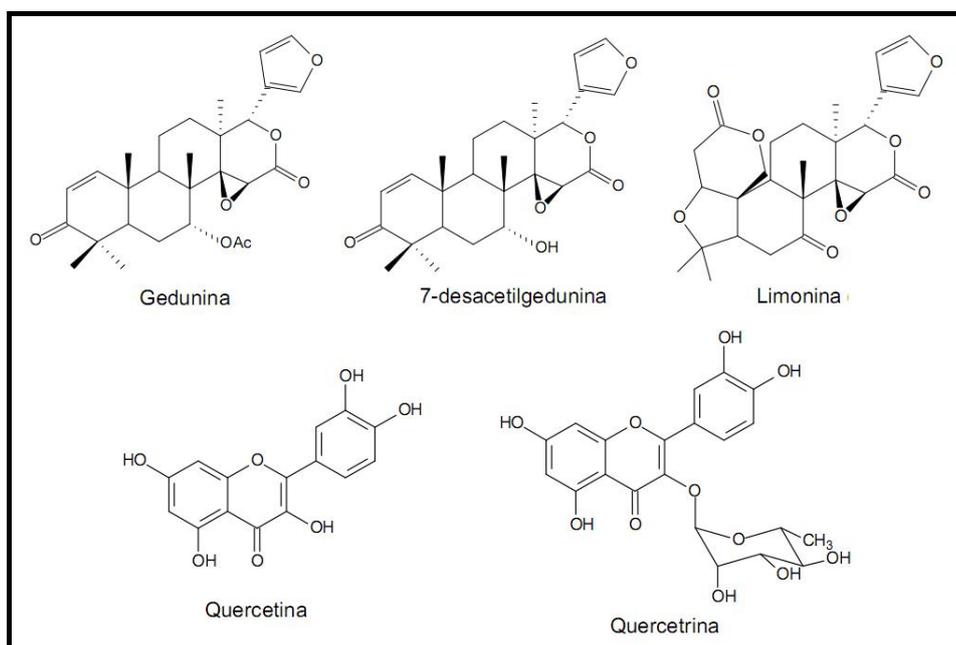


FIGURA 1.6. Limonoides e flavonoides isolados de *T. pallida* os quais apresentaram efeito sobre *S. frugiperda* quando incorporados em dieta artificial (ROCHA, 2004).

1.9 - *Trichilia pallens*

Trichilia pallens é uma árvore ou arvoreta de 3-6 metros. No Brasil sua distribuição geográfica ocorre nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Ela é conhecida popularmente como catiguá (PR), guaçá (PR), baga-de-morcego (SC), arco-de-peneira (SC/RS). Suas árvores florescem o ano todo (PATRÍCIO et. al., 2005).



FIGURA 1.7: *Trichilia pallens*. Em destaque folhas e frutos (verdes e maduros).
Fonte: (<http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars>, 2012).

Os princípios ativos de *T. pallens* responsáveis pela atividade em reduzir a sobrevivência e o peso larval de *S. frugiperda* não são conhecidos (BORGONI et. al., 2003; 2005). Esses dados sugerem que o isolamento e a identificação dos princípios ativos de *T. pallens* é extremamente relevante, uma vez que não há relatos na literatura para o estudo do perfil químico desta espécie.

1.10 - *Toona ciliata*

O cedro australiano (*Toona ciliata* M. Roemer) também pertence à família Meliaceae, sendo encontrado na Índia e Malásia até o Norte da Austrália. É uma árvore decídua, de grande porte, atingindo 20 m de altura e 1,2 m de circunferência nos plantios encontrados no Brasil (FIGURA 1.8). Possui folhas alternadas, pecioladas e paripenadas. O florescimento ocorre entre setembro e novembro e a frutificação ocorre entre janeiro e março. No Brasil, ela é frequentemente encontrada no sul da Bahia e em toda região sudeste (SOUZA et al., 2010).

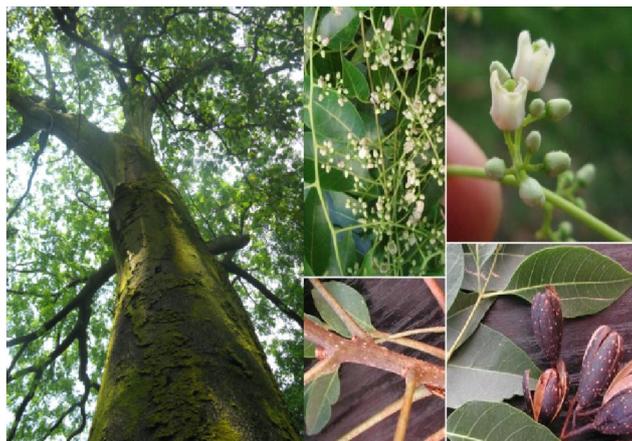


FIGURA 1.8 - *Toona ciliata*. Em destaque árvore adulta, folhas, ramos, flores e frutos. Fonte: (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Toona_ciliata; <http://www.saveourwaterwaysnow.com>, 2012).

SILVA et al. (1999) relataram testes de inibição do crescimento de larvas de *S. frugiperda* usando vários compostos de *To. ciliata* em dieta artificial. Neste trabalho, cedrelona, siderina, odoratol, gedunina, toonacilina, 11-desacetoxitoonacilina, 6 α -acetoxi-14 β -15 β -epoxiazadirona, β -sitosterol, α e β -amirina esterificados e um cicloartano foram avaliados, sendo o limonoide cedrelona e o triterpeno cicloeucalenol, os que apresentaram uma concentração eficaz para 50% de inibição do crescimento das larvas de *S. frugiperda* em 5,2 ppm e 7,7 ppm, respectivamente (FIGURA 1.9).

Vários trabalhos comprovaram as atividades inseticida, antialimentar e inibidora do crescimento de insetos pelo limonoide cedrelona. KOUL (1983) observou redução no crescimento de *Spodoptera litura* com cedrelona a 0,1%. KUBO et al. (1986) também observaram redução do crescimento dos lepidópteros *S. frugiperda*, *Heliothis zea* Boddie e *Pectinophora gossypiella* (Saunders) na presença da cedrelona. ARNASON et al. (1987) verificaram que os limonoides antotecol e cedrelona, de *Khaya anthotheca* (Welw.) C. DC. e de *To. ciliata*, respectivamente, causaram efeito pronunciado sobre o desenvolvimento de *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae), resultando em lagartas com menor massa em relação ao controle, prolongando a duração do estágio larval e aumentando a mortalidade. Neste mesmo trabalho, foi verificado a redução na eficiência de ingestão e digestão, sugerindo a interferência destes compostos no metabolismo do inseto. KOUL e ISMAN (1992) realizaram experimentos de análise nutricional com as lagartas

Peridroma saucia e *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) na presença de cedrelona por ingestão em dieta tratada, ação tópica e administração via ingestão. Com isso, os autores verificaram que tanto no teste de ingestão quanto na aplicação tópica, houve redução na conversão do alimento ingerido e na digestão, assim como foi observada a deterrência alimentar.

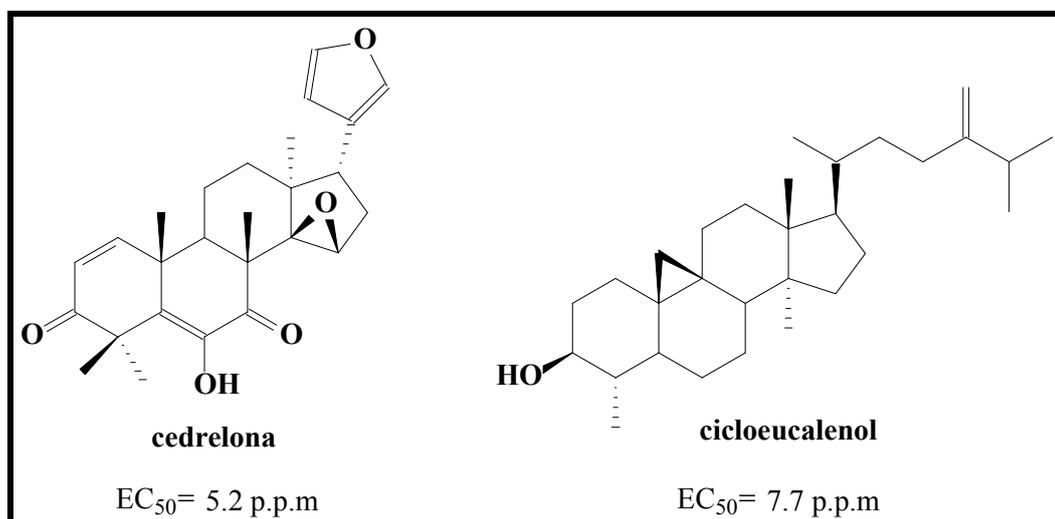


FIGURA 1.9: Valores da concentração efetiva para cedrelona e cicloeucaenol isoladas de *To. ciliata* a 50 % de inibição do crescimento de *S. frugiperda*.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral: Investigar a química e a bioatividade de espécies de Meliaceae e buscar entender o mecanismo de metabolização do limonoide cedrelona sobre *S. frugiperda* utilizando-se de técnicas espectroscópicas de alta resolução.

2.2 - Objetivos específicos:

- ✓ Isolar e identificar os compostos presentes nos extratos de folhas e ramos de *Trichilia pallida* e *T. pallens*; e ramos, folhas e frutos de *Toona ciliata*;
- ✓ Ensaar os extratos etanólicos, frações e substâncias isoladas sobre às lagartas de *S. frugiperda* por meio de incorporação em dieta artificial;
- ✓ Isolar em maior quantidade cedrelona de *To. ciliata*;
- ✓ Realizar o estudo químico via Ressonância Magnética Nuclear (600 MHz) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução acoplada à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das lagartas de *S. frugiperda* em diferentes estádios de desenvolvimento, visando entender o mecanismo de metabolização da cedrelona quando administrada em dieta artificial;
- ✓ Propor o papel da microbiota associada à *S. frugiperda* na presença de cedrelona e verificar sua contribuição no processo de metabolização;
- ✓ Avaliar a ação das substâncias isoladas na inibição da atividade da acetilcolinesterase utilizando o método colorimétrico de Ellman.

3 - ESTUDO FITOQUÍMICO DAS ESPÉCIES DE *Trichilia pallida*, *T. pallens* e *Toona ciliata*

Os procedimentos para o estudo fitoquímico deste trabalho como a preparação dos extratos vegetais, fracionamentos, isolamento e identificação estrutural das substâncias foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

3.1 - Procedimentos Experimentais

3.1.1 – Material e Métodos

3.1.1.1 - Materiais Cromatográficos

- ❖ Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando folhas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, com 0,2 mm de diâmetro (Merck®);

- ❖ Cromatografia por adsorção:
 - Cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária: Sílica gel 60, 70-230 mesh e 230-400 mesh, da Merck®;
 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - modo reverso: coluna Gemini C-18 [preparativa (10 µm, 25,0 x 1,0 cm) e analítica (10 µm; 25,0 x 0,46 cm)]; modo normal: coluna Shodex® (Asahipack GS-310 21 G/ álcool polivinílico/ 500 x 15 mm; 5 µm);
 - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando como fase estacionária: coluna DB-5® (95% Poli(dimetil siloxano) e 5% fenil-metil siloxano / 30m x 0,25 mm x 0,25 µm).
 - Cromatografia por exclusão: cromatografia em coluna, utilizando com fase estacionária: Sephadex LH-20 (hidroxipropilado, dextrano reticulado), da Amersham Pharmacia Biotech AB®.

3.1.1.2 - Solventes

- ❖ Solventes comerciais MERCK®, SINTH®, VETEC®, LABSYNTH® e solventes destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar;
- ❖ Solventes deuterados da MERCK® e ALDRICH®.

3.1.1.3 - Reveladores

- ❖ Câmara de luz UV ($\lambda=254$ nm e 365 nm);
- ❖ Solução de Vanilina em ácido sulfúrico a 5%.

3.1.2 - Equipamentos

3.1.2.1 - Dispensor usado na extração

- ❖ Ultra-Turrax IKA® T25 basic.

3.1.2.2 - Evaporadores Rotativos

- ❖ BUCHI®, rotavapor R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5 °C;
- ❖ BUCHI®, rotavapor R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB®, modelo CFT-25 mantido a 5 °C.

3.1.2.3- Banho de ultrassom

- ❖ Unique Ind. Com. Prod. Elet. Ltda. Mod. Maxiclean.

3.1.2.4 - Balança Analítica

- ❖ Sartorius modelo BP210S.

3.1.2.5 - Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear

- ❖ Bruker® DRX 9,8 T (400 MHz para RMN ^1H e 100 MHz para RMN ^{13}C) - DQ/UFSCar;
- ❖ Bruker® modelo AVANCE III 14,1 T (600 MHz para RMN ^1H e 150 MHz para RMN ^{13}C) - DQ/UFSCar.

3.1.2.6 – Equipamento de CLAE

- ❖ SHIMADZU® SCL-10AV (condições analíticas e preparativas com válvula de reciclo), equipado com “alça de amostragem” de 200 μL e detector de UV-Vis Shimadzu SPD - 10AV;
- ❖ Agilent Technologies® modelo 1200 (condições analíticas), equipado com bomba quaternária (G1311A), auto-injetor (G1329A) e detector de Ultravioleta (G1314B).

3.1.2.7 - Espectrômetros de Massas

- ❖ CG-EM Shimadzu® QP 5000 – ionização por elétrons - DQ/UFSCar;
- ❖ MICROMASS® Quattro LC (triplo quadrupolo) equipado com uma fonte ESI/APCI “Z-spray” e gás de arraste argônio, utilizado em inserção direta e acoplado ao cromatógrafo líquido WATERS Alliance 2695 - LaBioMMi-DQ/UFScar;
- ❖ LC-MS/MS: HPLC Agilent Technologies® 1200 acoplado a um espectrômetro de massas com analisador triplo quadrupolo, modelo API 2000 (*Applied Biosystems* MDS SCIEX), equipado com uma fonte de ionização ESI/APCI.

3.1.2.8 - Freezer

- ❖ SANYO®, Ultra-low -86 °C, MDF-U53V.

3.1.3- Material Botânico

3.1.3.1 - *Trichilia pallida*

As folhas e ramos de *T. pallida* Swartz (ESA 81288) foram coletados na cidade de Piracicaba - SP em 29 de outubro de 2010, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP. A espécie foi identificada pelo Dr. Paulo César Borgoni e as exsiccatas depositadas no Herbário ESA da ESALQ/USP.

3.1.3.2 - *Toona ciliata*

Os frutos, folhas, e ramos de *To. ciliata* M. Roemer (ESA 78420) foram coletados na cidade de Piracicaba-SP em 29 de outubro de 2010, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP. A espécie foi identificada pelo Dr. Paulo César Borgoni e as exsiccatas depositadas no Herbário ESA da ESALQ/USP. Os frutos verdes foram adquiridos na mesma instituição em janeiro de 2011. O caule foi coletado na cidade de Garça-SP, em outubro de 2011.

3.1.3.3 - *Trichilia pallens*

As folhas e ramos de *T. pallens* C. DC. (ESA 81286) foram coletados na cidade de Sapopema-PR em abril de 2011. A espécie foi identificada pelo Dr. Paulo César Borgoni e as exsiccatas depositadas no Herbário ESA da ESALQ/USP.

3.1.4 - Obtenção dos extratos etanólicos brutos das espécies de *T. pallida*, *To. ciliata* e *T. pallens*

As partes vegetais (folhas, ramos e frutos) de *To. ciliata* e (folhas e ramos) das espécies *T. pallida* e *T. pallens* foram secadas em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 10 dias e posteriormente trituradas em moinho. O material seco e moído foi extraído em etanol em Ika Ultra Turrax (T 25) por 5 min., 20.000 rpm à temperatura ambiente em uma proporção de 3 extrações 1 litro a cada 200 g de massa vegetal. Os extratos etanólicos obtidos foram filtrados com funil simples com auxílio de papel de filtro e evaporado à secura sob vácuo em

evaporador rotativo. A seguir todos os extratos foram conservados em refrigerador para evitar degradação dos seus constituintes. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos a partir de cada uma delas estão descritas na TABELA 3.1.

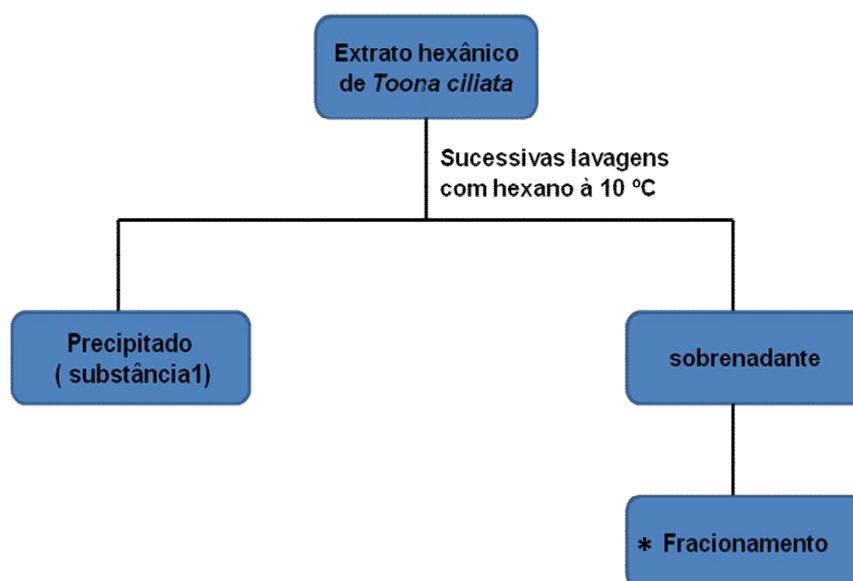
TABELA 3.1- Massas obtidas do material vegetal e extratos de *T. pallida*, *To. ciliata* e *T. pallens*

Planta	Parte vegetal/ massa (g)	Código do extrato EtOH	Massa do extrato EtOH (g)
<i>T. pallida</i>	Folhas / 694,0	EEFTPD	53,2
	Ramos / 378,0	EERTPD	29,1
<i>To. ciliata</i>	Folhas / 1.862	EEFTC	143,0
	Ramos / 1.482	EERTC	114,1
	Frutos / 412,0	EEFRTC	31,6
<i>T. pallens</i>	Folhas / 131,94	EEFTPL	41,92
	Ramos / 1130,5	EERTPL	131,0

3.1.5 - Extração e isolamento do limonoide cedrelona do caule de *Toona ciliata*

O caule da espécie *To. ciliata* foi secado em estufa de circulação a 40°C durante aproximadamente 10 dias e, posteriormente, trituradas em moinho de facas. O material seco e moído foi extraído em hexano utilizando um Ika Ultra Turrax (T 25) por 5 min., 20.000 rpm à temperatura ambiente em uma proporção de 3 extrações a cada 200 g de massa vegetal. O extrato hexânico obtido foi filtrado com funil simples com auxílio de papel de filtro e evaporado à secura sob vácuo em evaporador rotativo. Em seguida, o extrato foi submetido à sucessivas lavagens com hexano gelado para a separação dos cristais depositados no fundo do vidro até a eliminação parcial dos pigmentos e graxas (FLUXOGRAMA 3.1). A partir de análise por CCD e RMN ¹H constatou-se tratar do limonoide cedrelona.

O sobrenadante desta lavagem dos cristais foi submetido a cromatografia em coluna e em seguida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em modo preparativo (FIGURA 3.2), a fim de se isolar o limonoide cedrelona residual e outras substâncias de interesse. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos a partir de cada uma delas estão descritas na TABELA 3.2.

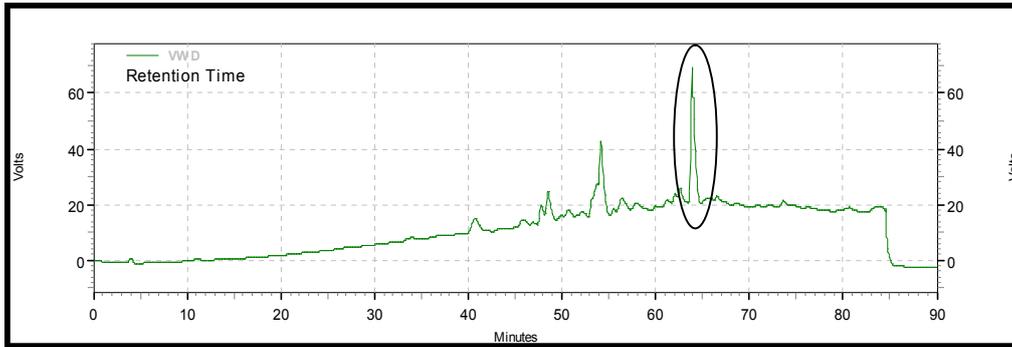


FLUXOGRAMA 3.1- Metodologia de extração do limonoide cedrelona a partir do caule de *Toona ciliata*. * Condições cromatográficas (FLUXOGRAMA 3.3).

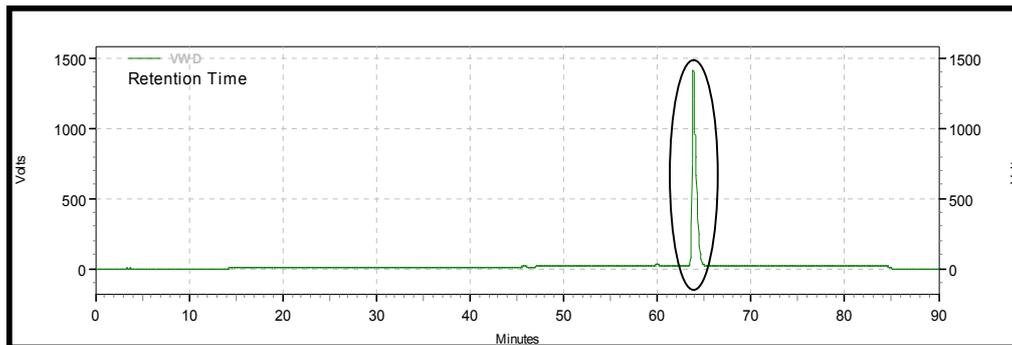
TABELA 3.2 - Massas obtidas de material vegetal e extrato do caule de *To. ciliata*.

Planta	Parte vegetal/ massa (g)	Código do extrato EtOH	Massa do extrato EtOH (g)
<i>To. ciliata</i>	360	EHCTC	21

O extrato hexânico do caule de *To. ciliata* e o limonoide cedrelona proveniente dele foram submetidos à análise via CLAE em modo analítico a fim de se comparar os cromatogramas nas mesmas condições e verificar a presença da cedrelona. Os cromatogramas comparativos podem ser observados na FIGURA 3.1.



a) Cromatograma do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* (EHCTC).



b) Cromatograma da cedrelona obtida a partir de EHCTC.

FIGURA 3.1- Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato hexânico e cedrelona obtidos de *To. ciliata*. a) e b). Cromatogramas obtidos em condições analíticas: Coluna C-18 Phenomenex-Luna® (150 x 4,6 nm, 5 µm); fase móvel: H₂O:ACN:MeOH (90-5-5% condições iniciais - 10-45-45% até 50 min - 0-50-50 até 70 min. - 100% MeOH por 20 min.); vazão: 1mL/min.; detecção UV- 262 nm.

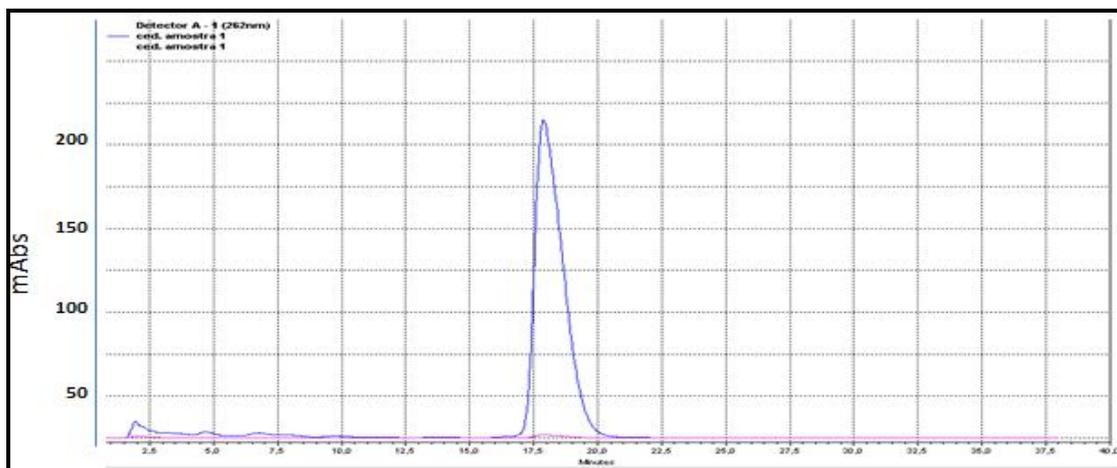


FIGURA 3.2 - Cromatograma para a purificação de cedrelona no modo isocrático. Condições preparativas: fase reversa coluna Luna® C-18 (10 µm, 25,0 x 1,0 cm); fase móvel: 1 H₂O: 9 MeOH (modo isocrático); vazão: 4.5 mL/min.; Detecção de UV- 262 nm.

3.1.6 - Fracionamento dos extratos e isolamento das substâncias de *T. pallida*, *To. ciliata* e *T. pallens*

Todos os extratos etanólicos brutos obtidos das espécies de *T. pallida* (folhas e ramos), *To. ciliata* (folhas, ramos e frutos) e *T. pallens* (folhas e ramos) foram submetidos à partição líquido – líquido. A metodologia empregada baseou-se no preparo de uma solução hidroalcoólica do extrato EtOH utilizando uma solução de Metanol/H₂O (1:3) e numa extração utilizando-se uma série de solventes com gradiente crescente de polaridade, como segue: hexano, diclorometano e acetato de etila. Com isso, obteve-se 4 frações de cada extrato (FLUXOGRAMA 3.2).



* *T. pallida* (folhas e ramos); *Toona ciliata* (folhas, ramos e frutos) e *T. pallens* (folhas e ramos).

FLUXOGRAMA 3.2 - Partição líquido-líquido dos extratos EtOH brutos de *T. pallida*, *To. ciliata* e *T. pallens*.

Após a partição, as frações foram concentradas em evaporador rotativo até a eliminação dos solventes. Todas as frações foram ensaiadas frente *S. frugiperda* para avaliação da sua atividade e também tiveram o seu perfil cromatográfico caracterizado por cromatografia em camada delgada (CCD) e por RMN de ¹H permitindo uma análise das frações a serem trabalhadas. A seguir todas as frações foram conservadas em freezer para evitar degradação. A identificação das frações resultantes da partição líquido-líquido podem ser observadas na TABELA 3.3.

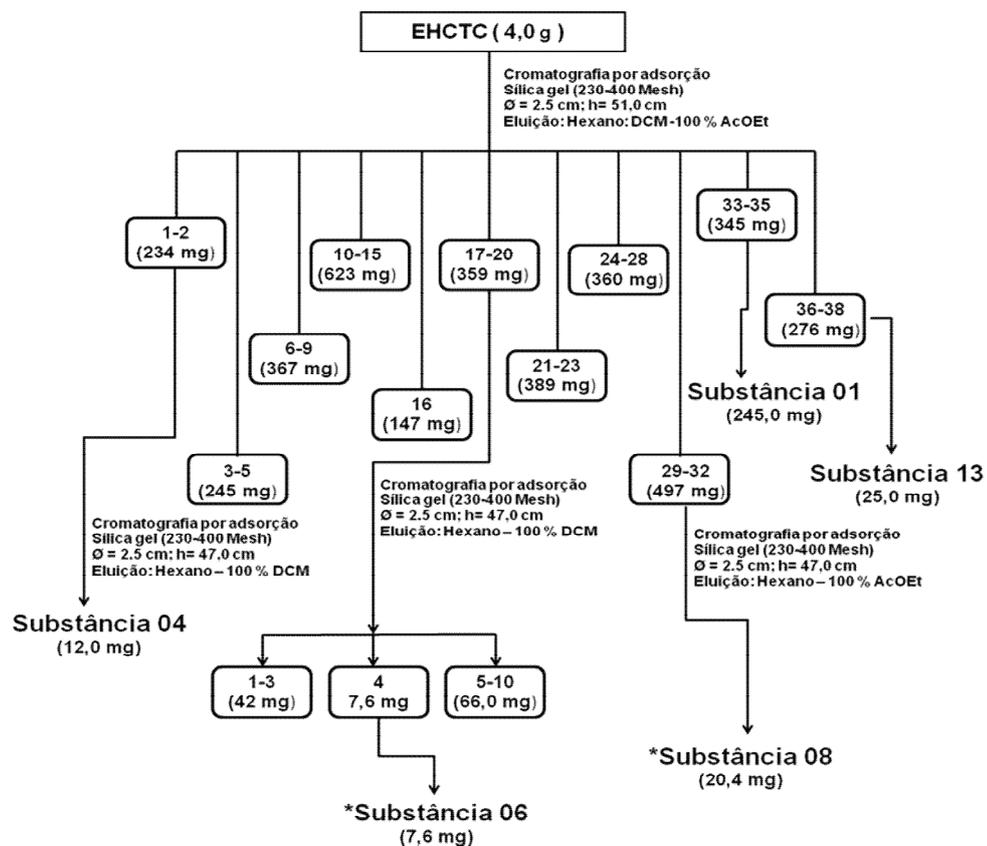
A partir da obtenção de espectros de RMN de ¹H de todas as frações obtidas e dos resultados de bioatividade frente à *S. frugiperda*, aquelas ativas foram escolhidas para purificação e algumas foram selecionadas pela presença de sinais relacionados às substâncias de interesse, como de metabólitos secundários do tipo limonoides e flavonoides, os quais segundo a literatura atuam como potenciais inseticidas frente à *S. frugiperda*.

TABELA 3.3 - Códigos das frações provenientes da partição líquido-líquido dos extratos EtOH de *T. pallida*, *To. ciliata* e *T. pallens*.

Planta	Orgão da planta	Frações	Códigos
<i>Trichilia pallida</i>	Folhas	hexânica	FHEEFTPD
		Diclorometânica	FDEEFTPD
		Acetato de etila	FAEEFTPD
		Hidroalcóolica (residual)	FREEFTPD
	Ramos	hexânica	FHEERTPD
		Diclorometânica	FDEERTPD
		Acetato de etila	FAEERTPD
		Hidroalcóolica (residual)	FREERTPD
<i>Toona ciliata</i>	Frutos	hexânica	FHEEFRTC
		Diclorometânica	FDEEFRTC
		Acetato de etila	FAEEFRTC
		Hidroalcóolica (residual)	FREEFRTC
	Folhas	hexânica	FHEEFOTC
		Diclorometânica	FDEEFOTC
		Acetato de etila	FAEEFOTC
		Hidroalcóolica (residual)	FREEFOTC
Ramos	hexânica	FHEERTC	
	Diclorometânica	FDEERTC	
	Acetato de etila	FAEERTC	
	Hidroalcóolica (residual)	FREERTC	
<i>Trichilia pallens</i>	Folhas	hexânica	FHEEFTPL
		Diclorometânica	FDEEFTPL
		Acetato de etila	FAEEFTPL
		Hidroalcóolica (residual)	FREEFTPL
	Ramos	hexânica	FHEERTPL
		Diclorometânica	FDEERTPL
		Acetato de etila	FAEERTPL
		Hidroalcóolica (residual)	FREERTPL

3.1.6.1 - Fracionamento do extrato hexânico do caule de *To. ciliata*

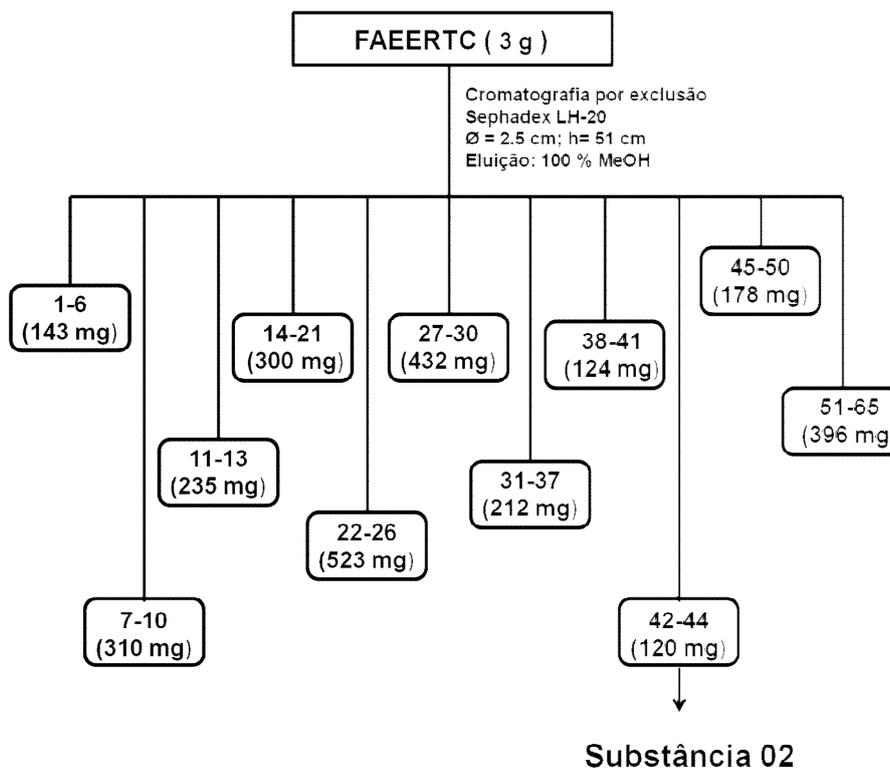
O sobrenadante obtido a partir da extração do limonoide cedrelona proveniente do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* (EHCTC) foi submetido a sucessivos fracionamentos cromatográficos utilizando sílica gel como fase estacionária e modo de eluição gradiente de acordo com o FLUXOGRAMA 3.3. Este extrato proporcionou o isolamento de cinco substâncias, os limonóides cedrelona (**1**) e 23-hidrooxicedrelonelídeo (**13**), as cumarinas siderina (**4**) e 4-metóxi-5-metilcumarina (**6**) e um triterpeno do tipo cicloartano 24-metilenocicloartanol (**8**).



FLUXOGRAMA 3.3 - Resumo do fracionamento da fração EHCTC do caule de *To. ciliata*.

3.1.6.2 - Fracionamento da fração FAEERTC de *To. ciliata*

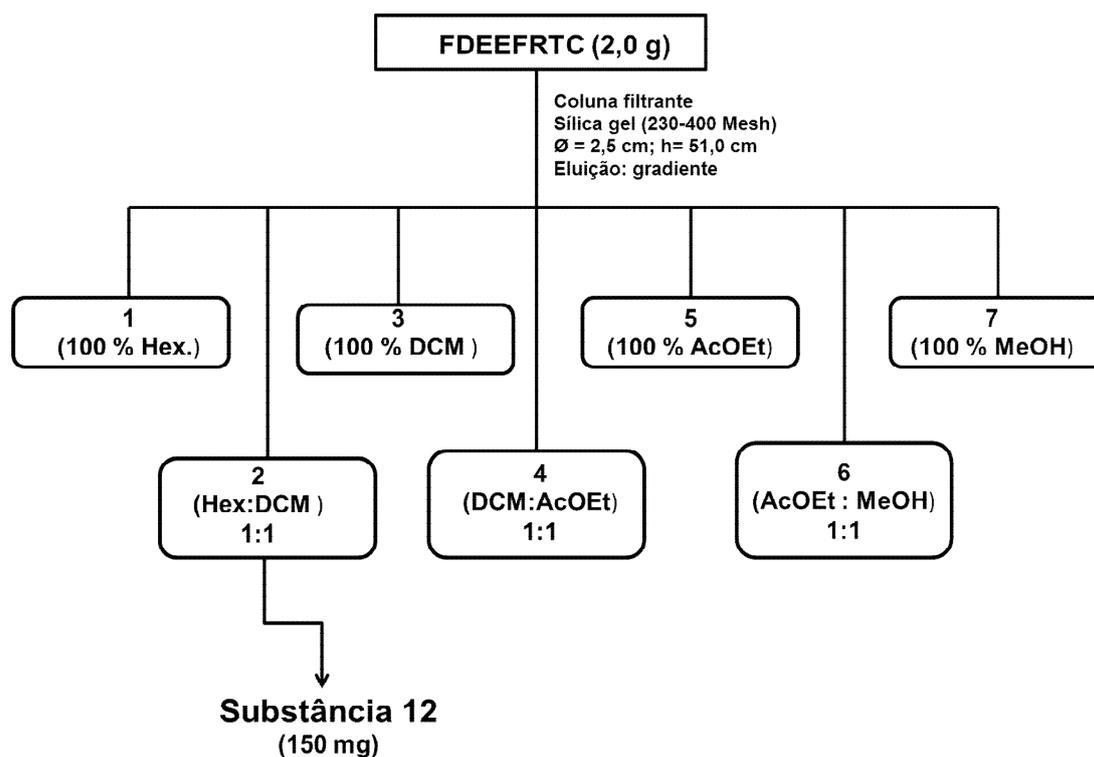
A fração acetato de etila dos ramos de *To. ciliata* foi fracionada de acordo com o FLUXOGRAMA 3.4. Esta fração proporcionou o isolamento e identificação do flavonoide do tipo flavanol, a catequina (**2**).



FLUXOGRAMA 3.4 - Resumo do fracionamento da fração **FAEERTC** dos ramos de *To. ciliata*.

3.1.6.3 - Fracionamento da fração FDEEFRTC de *To. ciliata*

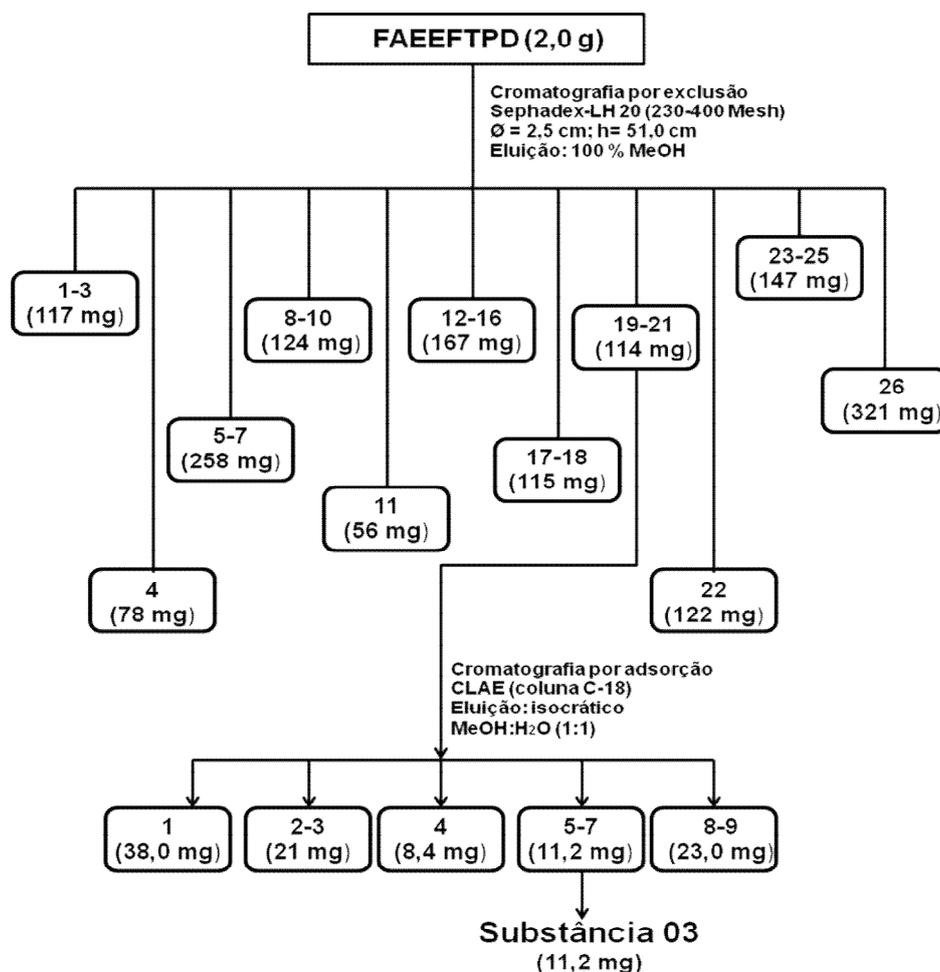
A fração diclorometânica dos frutos de *To. ciliata* foi submetida à coluna cromatográfica utilizando como eluentes, solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), sucessivamente, resultando em suas respectivas frações, como pode ser observado no FLUXOGRAMA 3.5. Desta fração foi obtido o triglicerídeo (**12**), o qual se apresentou majoritário.



FLUXOGRAMA 3.5 - Resumo do fracionamento da fração **FHEEFRTC** dos frutos de *To. ciliata*.

3.1.6.4 - Fracionamento da fração **FAEEFTP** de *T. pallida*

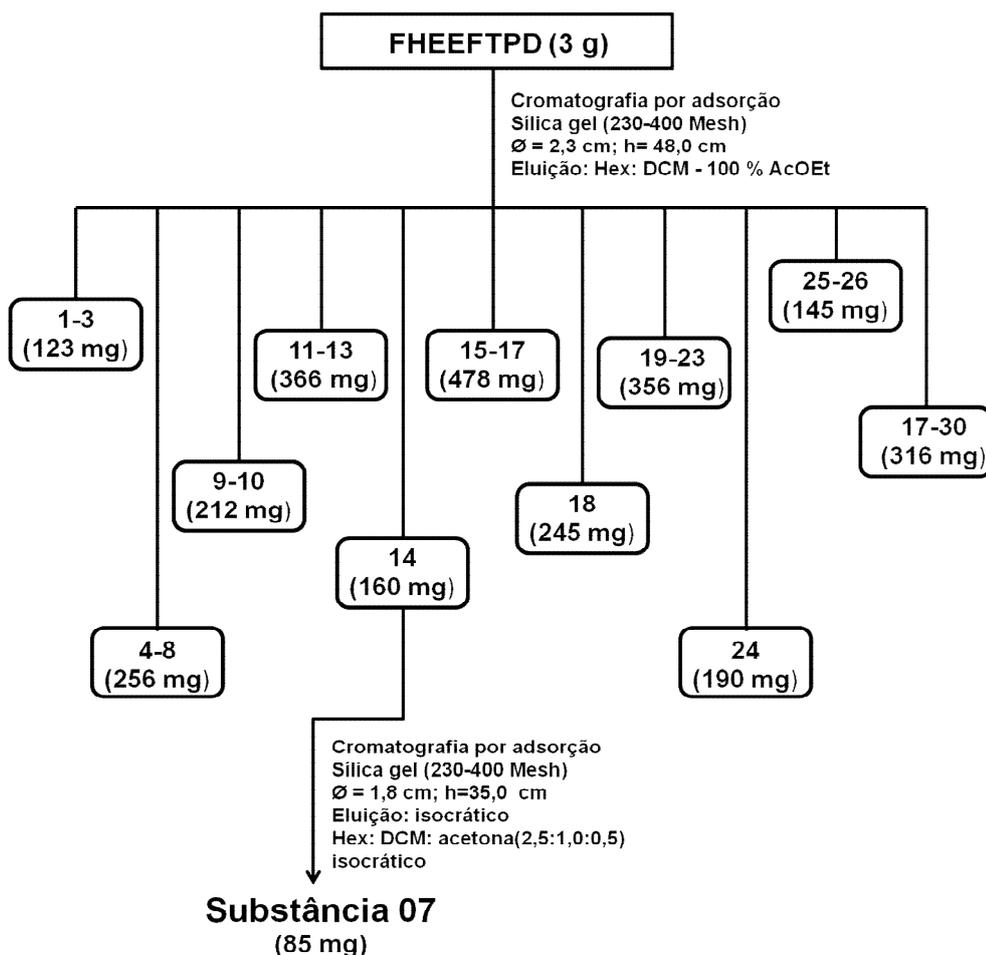
A fração AcOEt das folhas de *T. pallida* foi submetida à cromatografia por exclusão utilizando Sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando como fase estacionária C-18 (fase reversa). Os fracionamentos realizados estão apresentados no FLUXOGRAMA 3.6. Esta fração proporcionou o isolamento do flavonoide, Quercetina-3- β -O-raminosídeo (**3**).



FLUXOGRAMA 3.6- Resumo do fracionamento da fração **FAEEFTPD** das folhas de *T. pallida*.

3.1.6.5- Fracionamento da fração **FHEEFTPD** de *T. pallida*

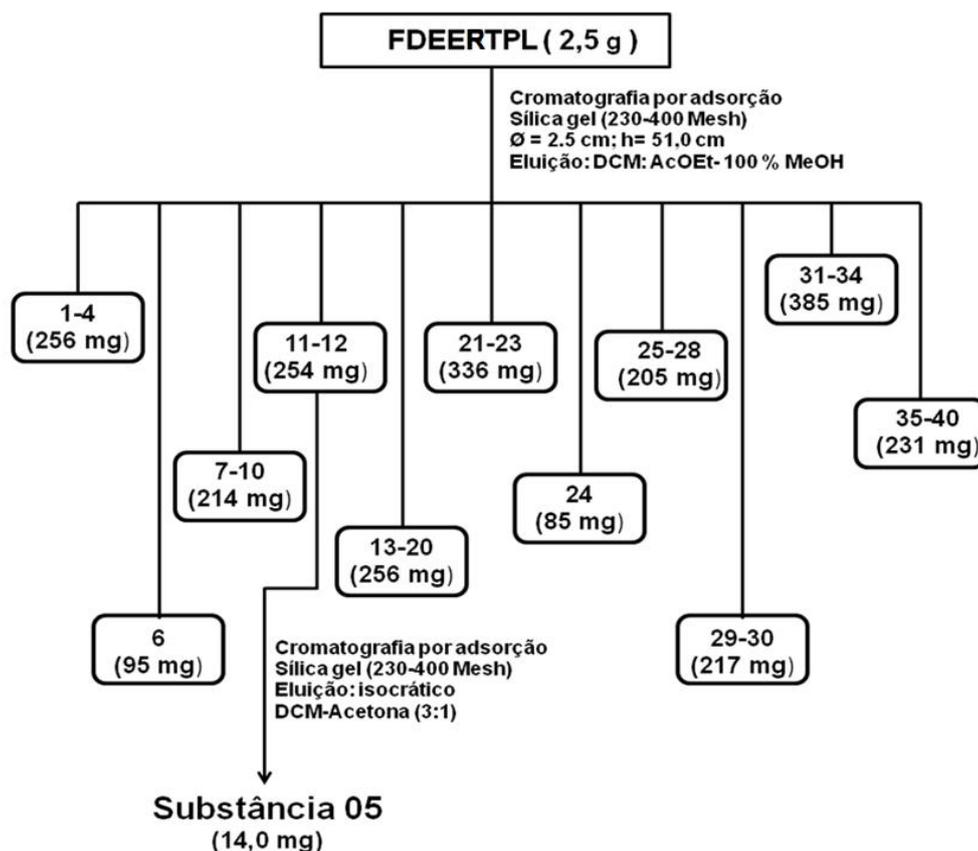
A fração hexânica das folhas de *T. pallida* foi submetida à cromatografia por adsorção utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) de acordo com o FLUXOGRAMA 3.7. Esta fração proporcionou o isolamento de um triterpeno do tipo damarano, damaradienol (**7**).



FLUXOGRAMA 3.7 - Resumo do fracionamento da fração **FHEEFTPD** das folhas de *T. pallida*. Condições de eluição gradiente: 9:1 / 7:3 / 1: 1/ 3: 7 (Hex.: DCM) – 100% DCM – 9: 1/ 6:4 / 1:1 (DCM : AcOEt) – 100% AcOEt.

3.1.6.6 - Fracionamento da fração **FDEERTPL** de *T. pallens*

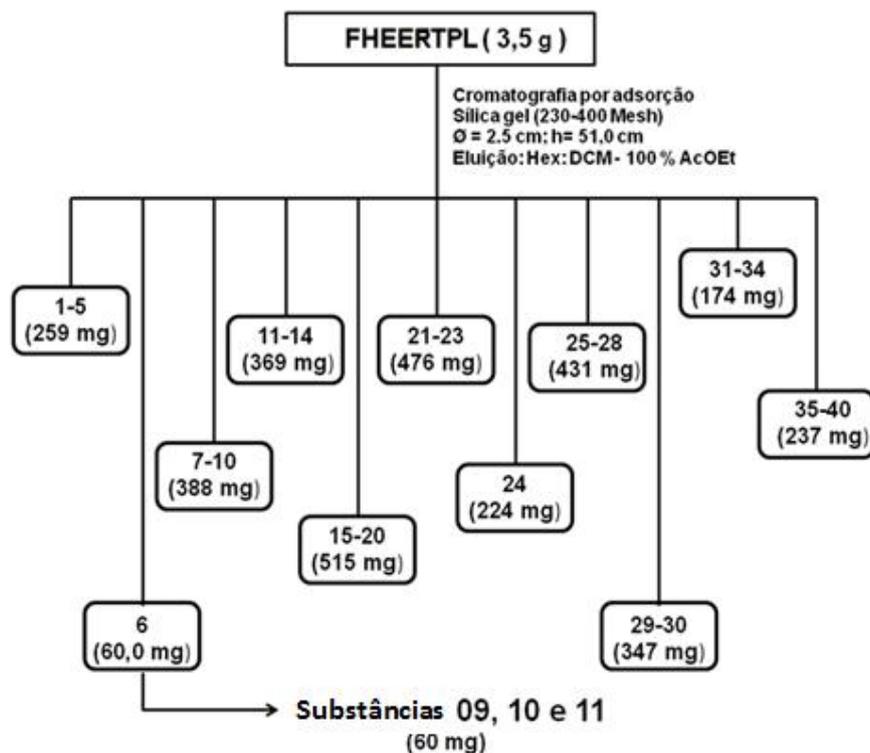
A fração diclorometânica dos ramos de *T. pallens* foi submetida à cromatografia por adsorção utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (diclorometano, acetato de etila e metanol) de acordo com o FLUXOGRAMA 3.8. Esta fração proporcionou o isolamento da cumarina escopoletina (**5**) em forma de cristais.



FLUXOGRAMA 3.8 - Resumo do fracionamento da fração **FDEERTPL** das folhas de *T. pallens*. Condições de eluição gradiente: 9:1 / 7:3 / 1:1 / 3:7 (DCM.: AcOEt) – 100% AcOEt – 9:1 / 6:4 / 1:1 (AcOEt : MeOH) – 100% MeOH.

3.1.6.7 - Fracionamento da fração **FHEERTPL** de *T. pallens*

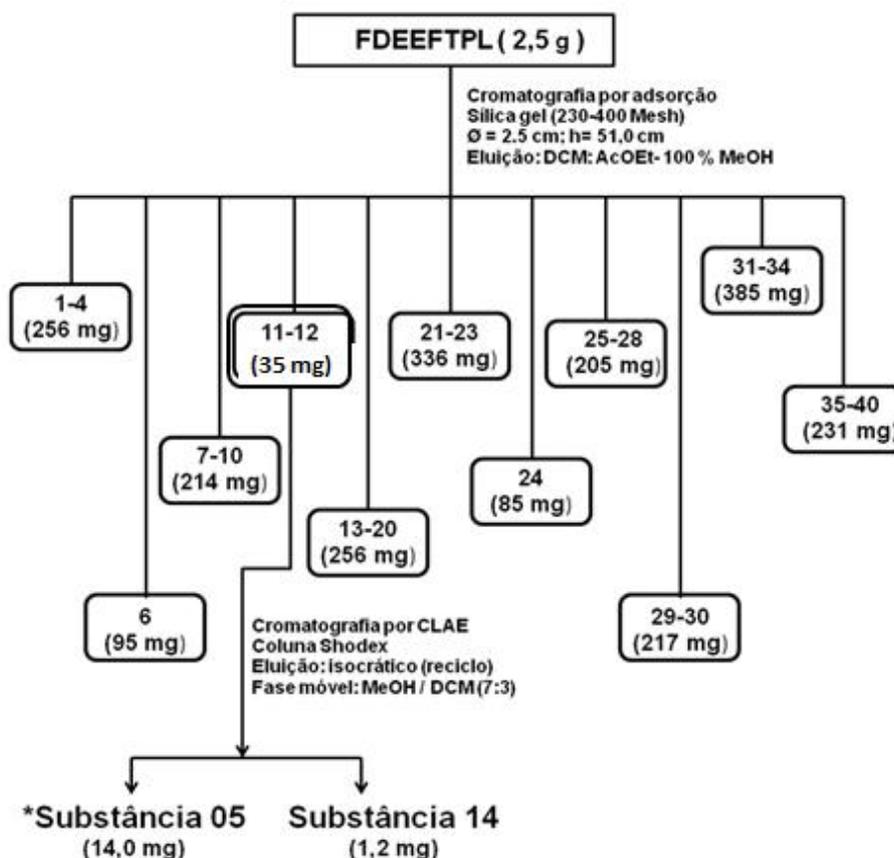
A fração hexânica dos ramos de *T. pallens* foi submetida à cromatografia por adsorção utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila) de acordo com o FLUXOGRAMA 3.9. Esta fração proporcionou o isolamento da mistura dos esteróides sitosterol (**09**), estigmasterol (**10**) e campesterol (**11**).



FLUXOGRAMA 3.9 - Resumo do fracionamento da fração **FHEERTPL** das folhas de *T. pallens*. Condições de eluição gradiente: 9:1 / 7:3 / 1: 1/ 3: 7 (Hex.: DCM) – 100% DCM – 9: 1/ 6:4 / 1:1 (DCM : AcOEt) – 100% AcOEt.

3.1.6.8- Fracionamento da fração **FDEEFTPL** de *T. pallens*

A fração diclorometânica das folhas de *T. pallens* foi submetida à cromatografia por adsorção utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel um gradiente de solventes em ordem crescente de polaridade (diclorometano, acetato de etila e metanol), e posteriormente, algumas subfrações foram submetidas à outros fracionamentos, de acordo com o FLUXOGRAMA 3.10.



FLUXOGRAMA 3.10 - Resumo do fracionamento da fração FDEEFTPL dos ramos de *T. pallens*. Condições de eluição gradiente: 9:1 / 7:3 / 1: 1/ 3: 7 (DCM.: AcOEt) – 100% AcOEt – 9: 1/ 6:4 / 1:1 (AcOEt : MeOH) – 100% MeOH.

A subfração FDEEFTPL 11-12 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a mesma proporcionou o isolamento da cumarina escopoletina (**05**) em forma de cristais e do alcalóide indólico (**14**) (3-indol-carbaldeído). A separação foi realizada com eluição isocrática (modo reciclo) utilizando como fase estacionária a coluna Shodex® e como fase móvel uma solução de metanol e diclorometano (7:3). As substâncias foram monitoradas na região do ultravioleta nos comprimentos de onda $\lambda = 254 \text{ nm}$ e $\lambda = 365 \text{ nm}$ e podem ser observadas a partir do cromatograma da FIGURA 3.3. A substância (**05**) apresentou absorção em ambos os comprimentos de onda e a substância (**14**) em $\lambda = 254 \text{ nm}$.

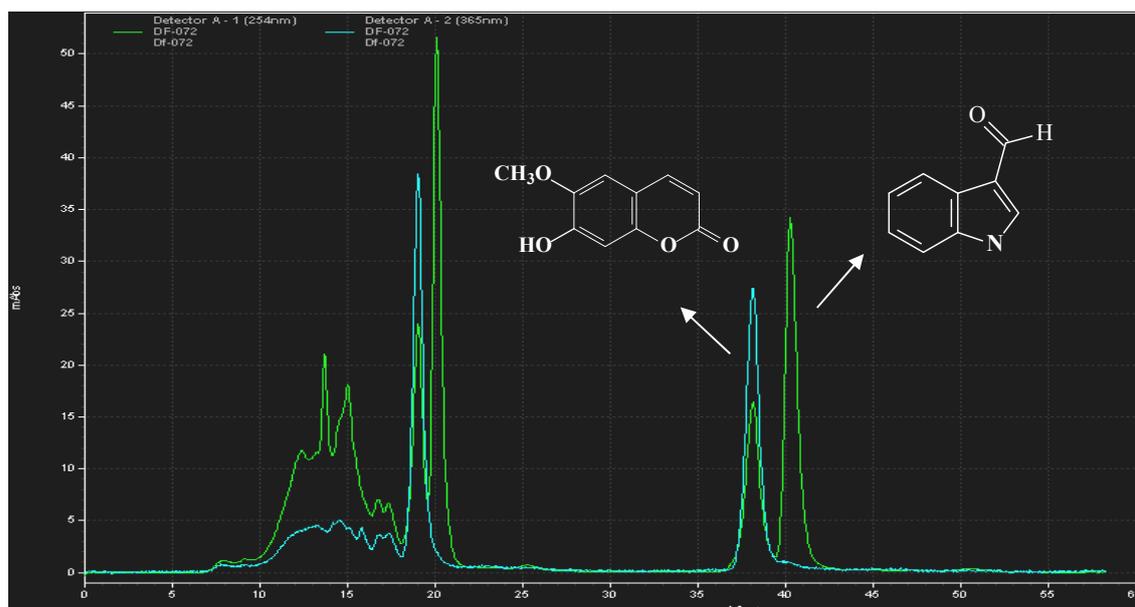
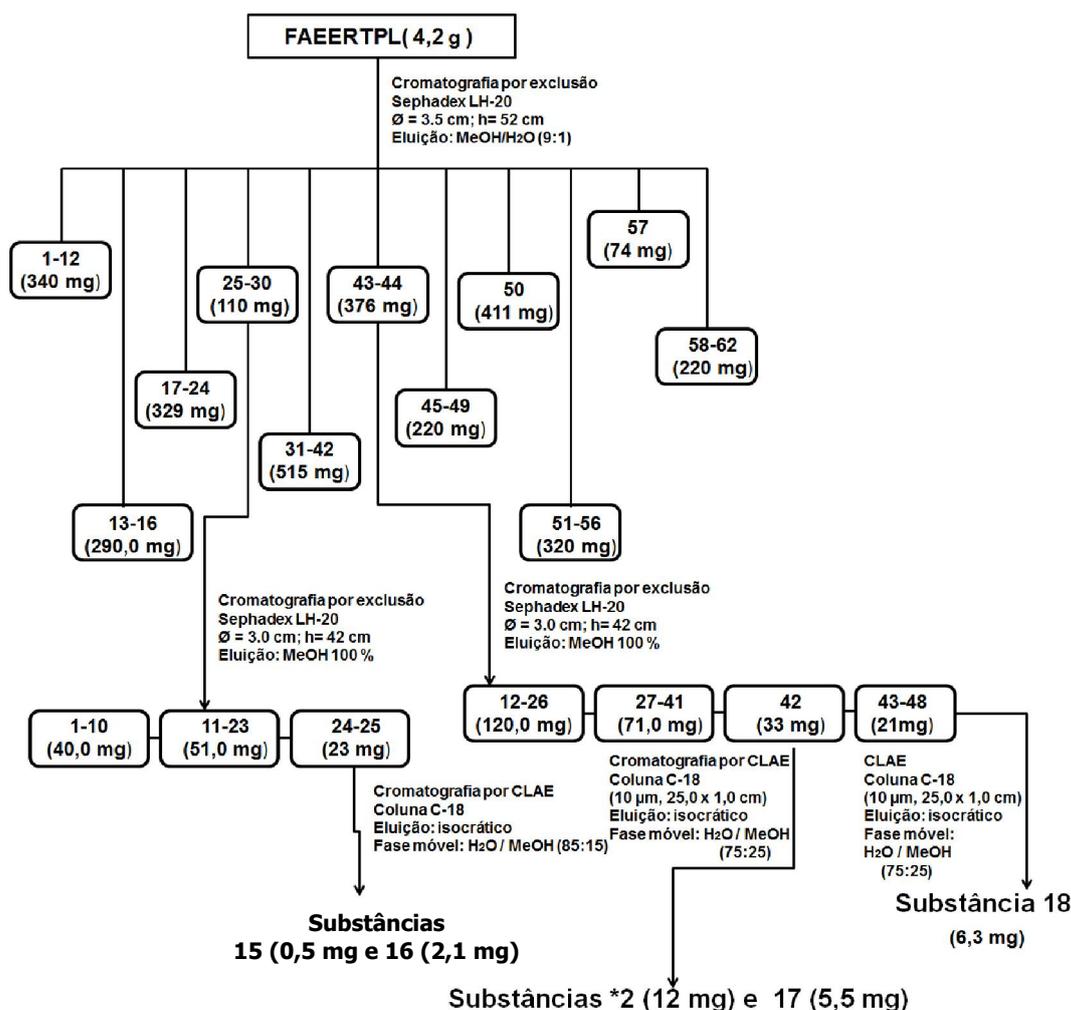


FIGURA 3.3 - Cromatograma da subfração FDEEFTPL 11-12. Condições CLAE: coluna Shodex Asahipak® Gs-310 21 G 7202003 (500 x 15 mm; 5 μ m); modo reciclo; fase móvel: 70% Metanol: Diclorometano 30% (modo isocrático); vazão: 5,8 mL/min.; detecção UV- 254 (em verde) e 365 nm (em azul). Cromatograma com setas e estruturas dos compostos **05** e **14**, evidenciando a separação por uso de reciclo.

3.1.6.9 - Fracionamento da fração FAEERTPL de *T. pallens*

A fração acetato de etila dos ramos de *T. pallens* foi submetida à cromatografia por exclusão utilizando com fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel uma solução de metanol e água (9:1). Em seguida, algumas subfrações resultantes foram submetidas à outros fracionamentos. O fracionamento está esquematizado no FLUXOGRAMA 3.11.



FLUXOGRAMA 3.11- Resumo do fracionamento da fração FAEERTPL dos ramos de *T. pallens*. * Substância isolada também a partir dos ramos de *To. ciliata*.

A subfração FAEERTPL 24-25 foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a mesma proporcionou a identificação estrutural da purina adenina (**15**) e do 5'-inosil nucleotídeo (**16**). Utilizando-se a mesma metodologia analítica a separação cromatográfica foi realizada por CLAE em modo preparativo com eluição isocrática utilizando como fase estacionária uma coluna C-18 e como fase móvel uma solução de água e metanol (85:15). As substâncias foram monitoradas na região do ultravioleta nos comprimentos de onda $\lambda = 220 \text{ nm}$ e $\lambda = 254 \text{ nm}$ e podem ser observadas a partir do cromatograma FIGURA 3.4. As substâncias **15** e **16** apresentaram absorção em ambos os comprimentos de onda.

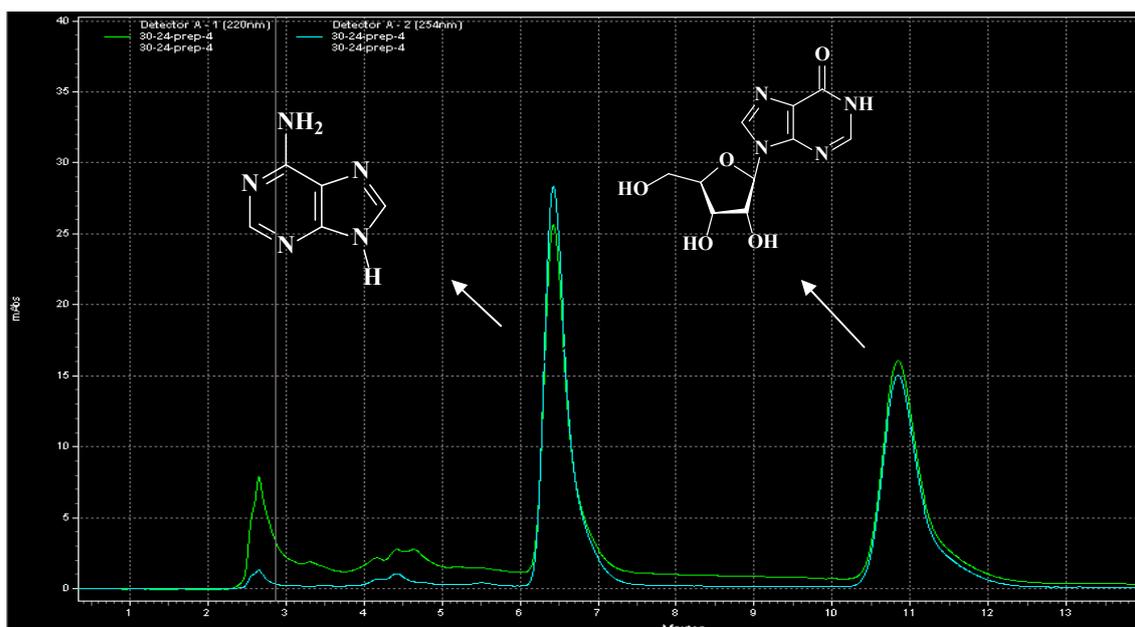


FIGURA 3.4 - Cromatograma obtido da subfração FAEERTPL 24-25 resultante da fração acetato de etila dos ramos de *T. pallens*. Condições CLAE no modo preparativo: Coluna C-18 Phenomenex-Luna® (25,0 x 1,0 cm; 10 μ m); fase móvel: 85% H₂O: 15% MeOH (modo isocrático); vazão: 4,8 mL/min.; detecção UV- 220 nm (em verde) e 254 nm (azul). *Condições analíticas: coluna C-18 Phenomenex-Luna® (25,0 x 0,46 cm; 10 μ m) e vazão: 1mL/min).

De acordo com o FLUXOGRAMA 3.11, a subfração FAEERTPL 42 foi submetida ao CLAE e a mesma proporcionou o isolamento e identificação de dois flavonoides do tipo flavanol, a catequina (**2**), a qual já havia sido isolada a partir dos ramos de *To. ciliata*, e a epicatequina (**17**). A separação cromatográfica foi realizada com eluição isocrática em CLAE preparativo utilizando a mesma metodologia do modo analítico realizado e assim, utilizou-se como fase estacionária uma coluna C-18 e como fase móvel uma solução de metanol e água (25:75). As substâncias foram monitoradas na região do ultravioleta nos comprimentos de onda $\lambda = 220$ nm e $\lambda = 254$ nm e podem ser observadas a partir do cromatograma FIGURA 3.5. Ambos os flavanóis absorveram no comprimento de onda de 220 nm.

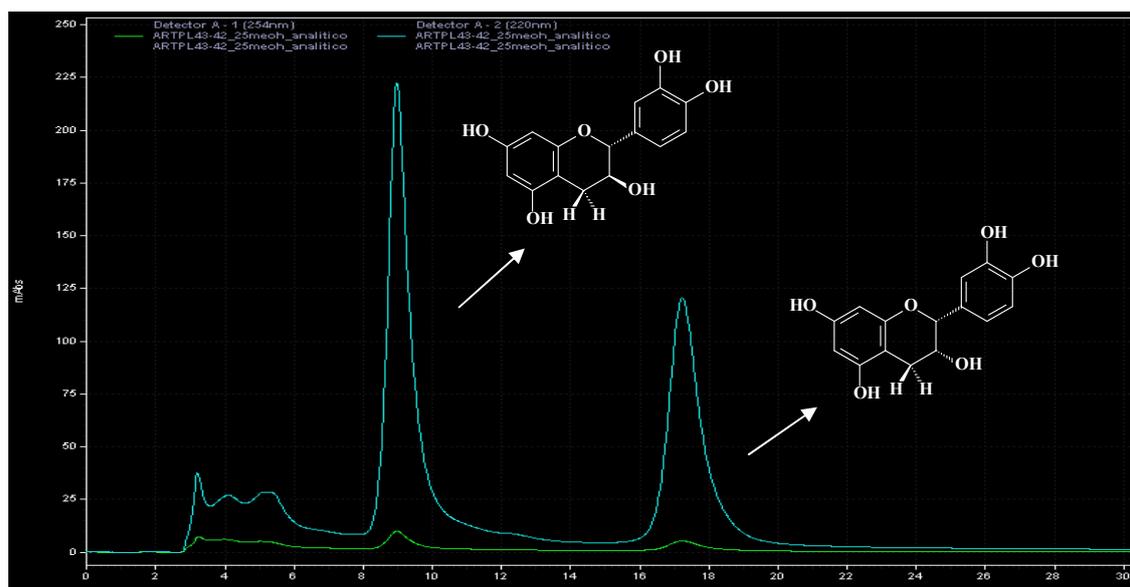
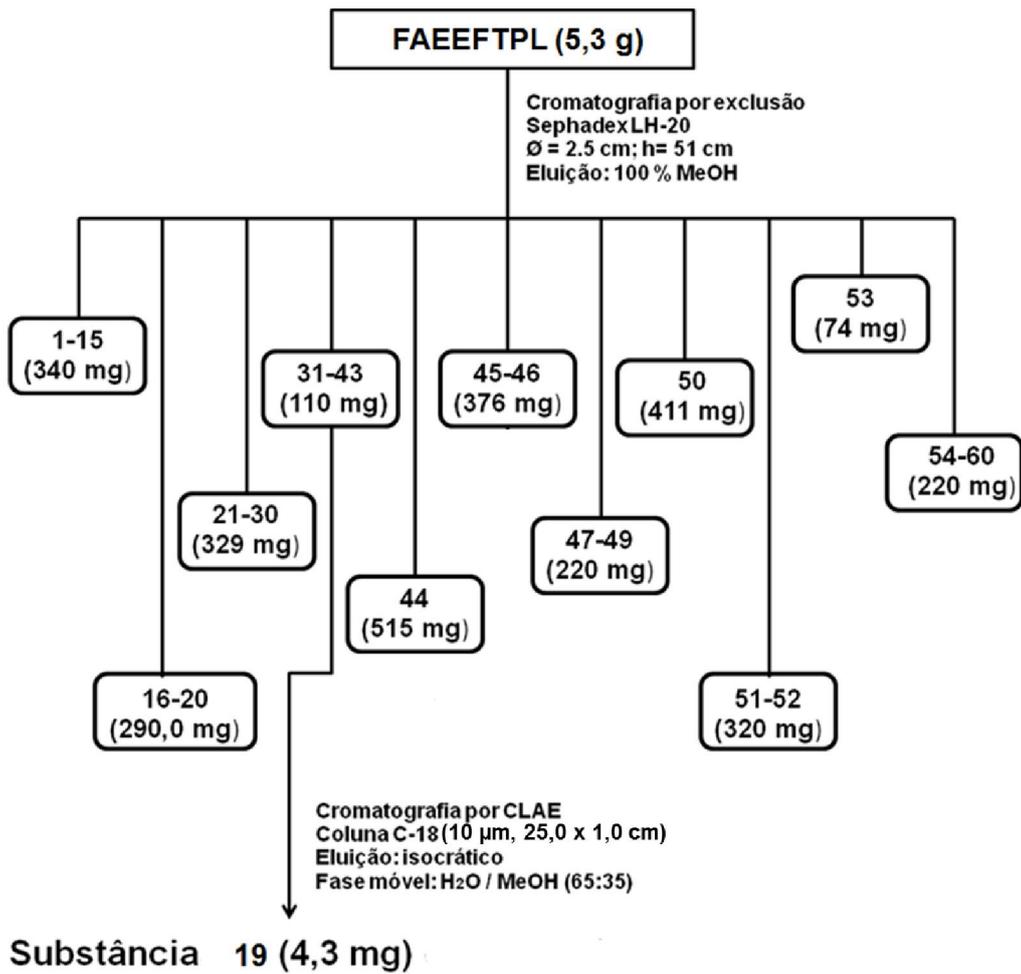


FIGURA 3.5 - Cromatograma da subfração FAEERTPL 42 no modo preparativo. Condições CLAE: Coluna C-18 Phenomenex-Luna® (25,0 x 1,0 cm; 10 μ m); fase móvel: 75% H₂O: 25% MeOH (modo isocrático); vazão: 4,8 mL/min.; detecção UV-220 nm (em azul) e 254 nm (verde). *Condições analíticas: coluna C-18 Phenomenex-Luna® (25,0 x 0,46 cm, 10 μ m) e vazão: 1mL/min.).

Utilizando-se a mesma metodologia analítica aplicada anteriormente, foi realizada a separação cromatográfica da subfração FAEERTPL 43-44 por CLAE preparativo, resultando em 3 frações, as quais foram analisadas por RMN ¹H. Destas frações, foi possível a identificação estrutural do flavanol galocatequina (**18**).

3.1.6.10 - Fracionamento da fração FAEERTPL de *T. pallens*

A fração acetato de etila das folhas de *T. pallens* foi submetida à cromatografia de exclusão utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e como fase móvel uma solução de metanol e diclorometano (7:3) em eluição isocrática. Em seguida, algumas subfrações resultantes foram submetidas à outros fracionamentos. O fracionamento foi esquematizado como mostra o FLUXOGRAMA 3.12. As subfrações foram submetidas a fracionamentos via CLAE, proporcionando o isolamento e identificação do ácido protocatecuico (**19**).



FLUXOGRAMA 3.12 - Resumo do fracionamento da fração FAEEFTPL das folhas de *T. pallens*.

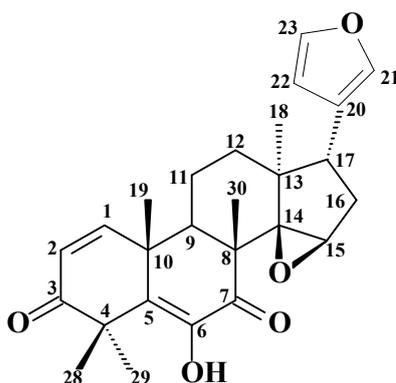
3.2 - Resultados e Discussões

O estudo fitoquímico das espécies *To. ciliata*, *T. pallida* e *T. pallens* permitiu o isolamento e identificação estrutural de 19 metabólitos secundários pertencentes a diferentes classes. As caracterizações estruturais estão descritas abaixo.

3.2.1- Limonoides

3.2.1.1- Identificação estrutural da substância 01

A substância **01** é um limonoide conhecido como cedrelona o qual foi isolado do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , assim como também através da comparação com dados da literatura (LUO et al., 2000).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.6) observou-se a presença de cinco singletos em δ 0,75; 1,12; 1,29; 1,49 e 1,57 atribuídos a cinco grupamentos metílicos. Os sinais em δ 7,35 (*t*, $J=1,6$ Hz), δ 7,13 (*m*) e δ 6,17 (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios pertencentes ao anel furano, H-23, H-21 e H-22, respectivamente. Um singlete em δ 3,78 foi atribuído ao H-15 do grupo epóxido localizado entre C-14/C-15 e o singlete em δ 6,44 foi atribuído à hidroxila do grupo diosfenol no C-6. Observou-se também sinais de dupletos em δ 6,89 (*d*, $J=10$ Hz) e δ 6,09 (*d*, $J=10$ Hz) referentes aos hidrogênios H-1 e H-2, respectivamente. Ainda

foram observados sinais de hidrogênios alifáticos em δ 2,74 (1H, *dd*, $J=6,4$; 10 Hz), δ 2,66 (1H, *dd*, $J= 9,8$; 3,8), δ 2,30 (*m*), δ 2,08 (*m*), δ 1,92 (*m*) e δ 1,85 (*m*) atribuídos aos hidrogênios H-17, H-9, H-16 β , H-12, H-16 α e H-11, respectivamente, TABELA 3.4.

A partir da análise do espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.8) foi observada a presença de 26 átomos de carbono. Observaram-se sinais de carbonos carbonílicos em δ 203,5 atribuído ao carbono C-3 e em δ 197,9 (valor de deslocamento químico característico de grupamento diosfenol) atribuído ao carbono C-7. Os sinais observados em δ 69,8 e δ 55,0 foram atribuídos aos carbonos do epóxido C-14 e C-15, respectivamente. Os sinais em δ 152,3 e δ 127,2 foram atribuídos aos carbonos insaturados C-1 e C-2, respectivamente, TABELA 3.5.

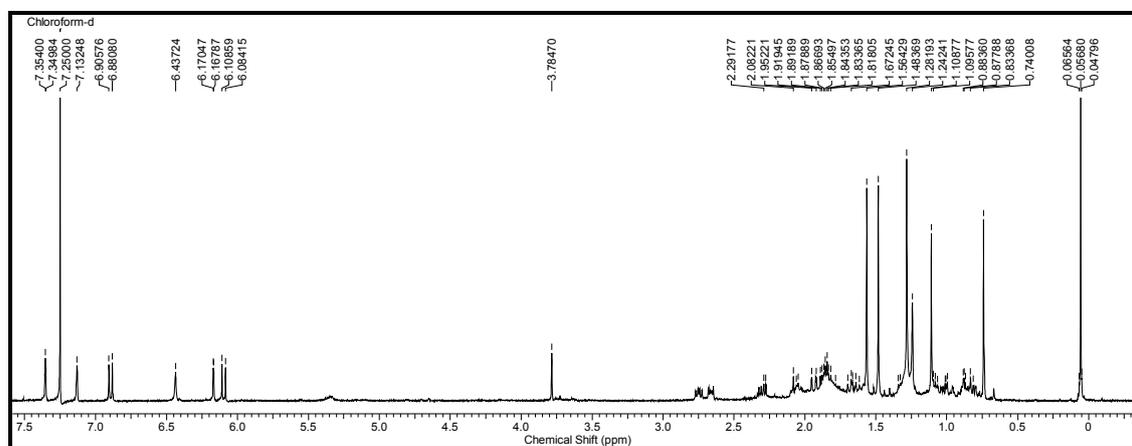


FIGURA 3.6- Espectro de RMN ^1H de **01** (400 MHz, CDCl_3).

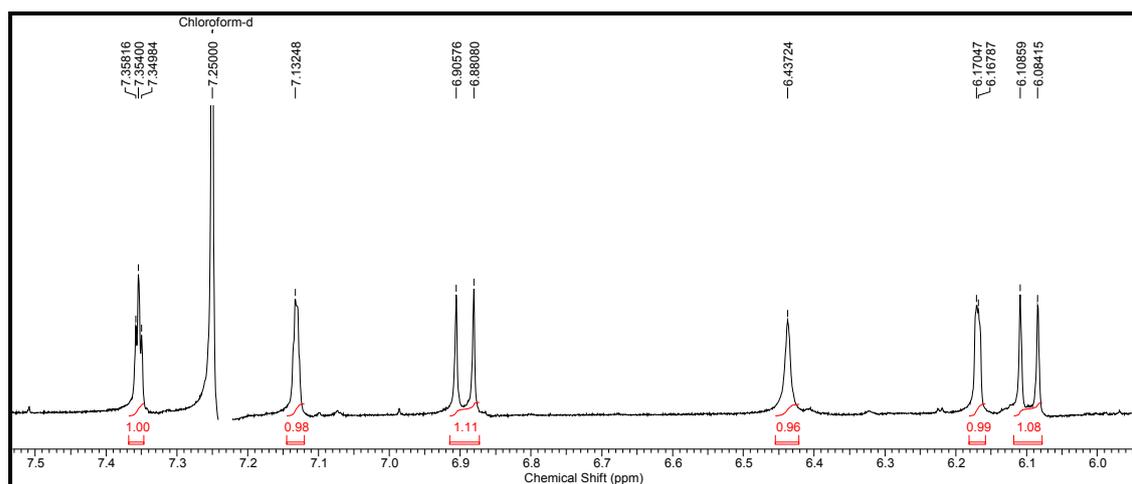


FIGURA 3.7 - Ampliação da região δ 7,50 a 6,00 ppm do espectro de RMN ^1H da substância **01**.

TABELA 3.4 - Dados de RMN ^1H do limonoide cedrelona e comparação com a literatura.

^1H	SUBSTÂNCIA 01 (400 MHz, CDCl_3)	LUO et al., 2000 (400 MHz, CDCl_3)
	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
1	6,89 (1H, <i>d</i> , $J=10$)	6,86 (1H, <i>d</i> , $J=9,8$)
2	6,09 (1H, <i>d</i> , $J = 10$)	6,09 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$)
9	2,66 (2H, <i>dd</i> , $J = 9,8; 3,8$)	-
11	1,85 (2H, <i>m</i>)	-
12	2,08 (2H, <i>m</i>)	-
15	3,78 (1H, <i>s</i>)	3,74 (1H, <i>s</i>)
16 α	1,92 (1H, <i>m</i>)	-
16 β	2,30 (1H, <i>m</i>)	-
17	2,74 (1H, <i>dd</i> , $J = 6,4; 10$ Hz)	-
18	0,75 (3H, <i>s</i>)	0,69 (3H, <i>s</i>)
19	1,12 (3H, <i>s</i>)	1,06 (3H, <i>s</i>)
21	7,13 (1H, <i>m</i>)	7,09 (1H, <i>m</i>)
22	6,17(1H, <i>m</i>)	6,12(1H, <i>m</i>)
23	7,35 (1H, <i>t</i> , $J=1,6$)	7,31 (1H, <i>t</i> , $J=1,5$)
28	1,49 (3H, <i>s</i>)	1,43 (3H, <i>s</i>)
29	1,57 (3H, <i>s</i>)	1,51 (3H, <i>s</i>)
30	1,29 (3H, <i>s</i>)	1,23 (3H, <i>s</i>)
OH	6,44 (1H, <i>s</i>)	6,46 (1H, <i>s</i>)

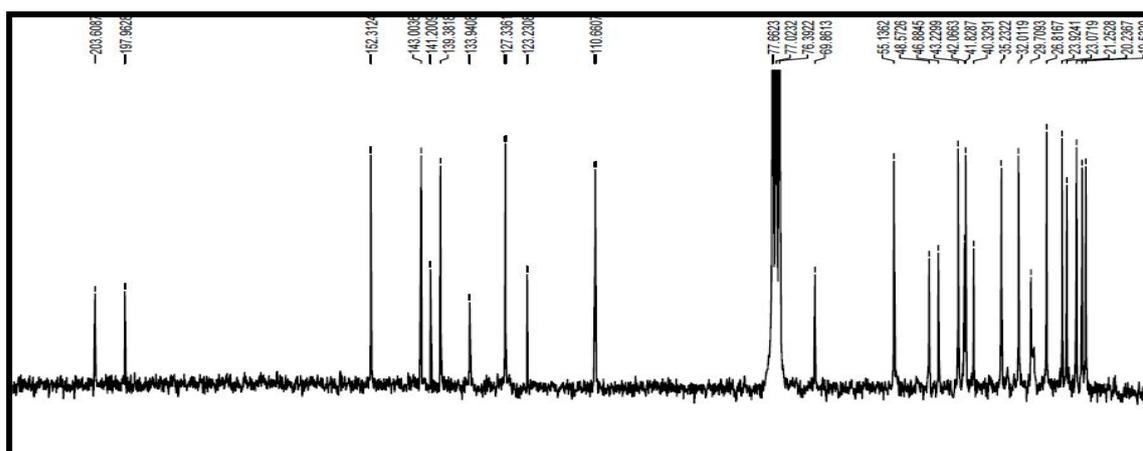
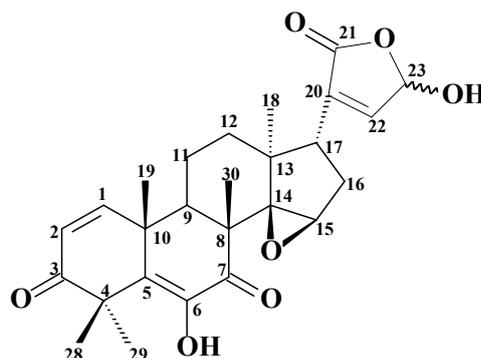
FIGURA 3.8 - Espectro de RMN ^{13}C de 01 (100 MHz, CDCl_3).

TABELA 3.5 - Dados de RMN ^{13}C do limonoide cedrelona e comparação com a literatura.

^{13}C	SUBSTÂNCIA 01	LUO et al., 2000
	(100 MHz, CDCl_3)	(100 MHz, CDCl_3)
	δ	δ
1	152,3	152,2
2	127,2	127,2
3	203,5	203,3
4	48,5	48,5
5	133,8	133,9
6	141,2	141,2
7	197,9	197,8
8	46,8	46,8
9	43,6	43,2
10	40,2	40,2
11	19,2	19,4
12	35,1	35,1
13	42,0	41,9
14	69,8	69,7
15	55,0	55,0
16	31,9	31,9
17	41,7	41,7
18	23,8	23,8
19	20,1	20,1
20	123,2	123,2
21	139,3	139,3
22	110,6	110,6
23	142,9	142,9
28	26,7	26,7
29	21,8	21,2
30	23,0	22,9

3.2.1.2 - Identificação estrutural da substância 13

A substância **13** é um limonoide conhecido como 23-hidroxicedrelonelídeo o qual foi isolado do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* e teve sua estrutura identificada através de experimentos de RMN ^1H , HSQC, HMBC e RMN ^{13}C e por comparação com dados da literatura (AGOSTINHO, 1996; LUO et al., 2000).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.9 e FIGURA 3.11) observou-se a presença de sinais na região de hidrogênios alifáticos em δ 0,80 (*t*, 3H) 1,10 (*s*, 3H); 1,28 (*s*, 3H); 1,49 (*s*, 3H) e 1,57 (*s*, 3H) atribuídos as metilas 18, 30, 19, 29 e 28, respectivamente. Ainda na região dos hidrogênios alifáticos, foram observados sinais para metilênicos diasterotópicos e metínicos em δ 2,69 (1H, *m*, 1H), 2,63 (1H, *dd*, $J=10,0$; 1,6 Hz), 2,41 (*m*), 2,30 (*m*, 1H), 2,04 (*m*, 1H), 1,83 (*m*, 2H) e 1,68 (*m*, 1H) atribuídos aos hidrogênios H-17, H-9, H-12 β , H-16 α , H-16 β , H-11 e H-12 α , respectivamente.

Os sinais dos prótons observados em δ 6,82 (*sl*) e 6,12 (*m*), são característicos do anel γ -hidroxibutirolactona e foram atribuídos ao H-22 e H-23, respectivamente (FIGURA 3.10). Observou-se também no espectro de RMN ^1H um singleto em δ 3,77 (*s*, 1H) atribuído ao H-15 do grupo epóxido localizado entre C-14/C-15 e o singleto em δ 6,41 (*s*, 1H) foi atribuído à hidroxila do grupo diosfenol no C-6. Observou-se também sinais de doubletos em δ 6,91 (*d*, $J=10$ Hz) e 6,12 (*m*, $J=10,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H-1 e H-2, respectivamente, característicos do sistema 1-en-2-ona do anel A do limonoide do tipo apo-eufol.

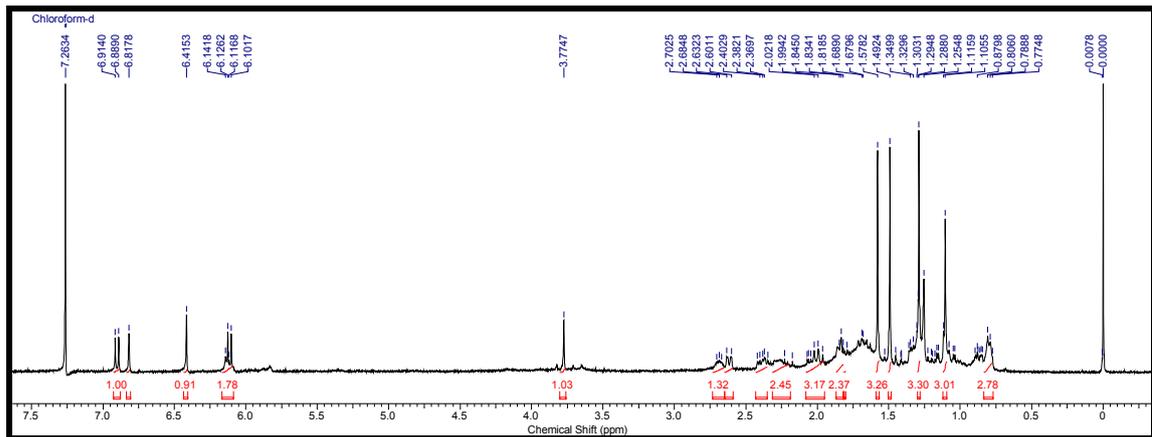


FIGURA 3.9 - Espectro de RMN ¹H da substância **13** (400 MHz, CDCl₃).

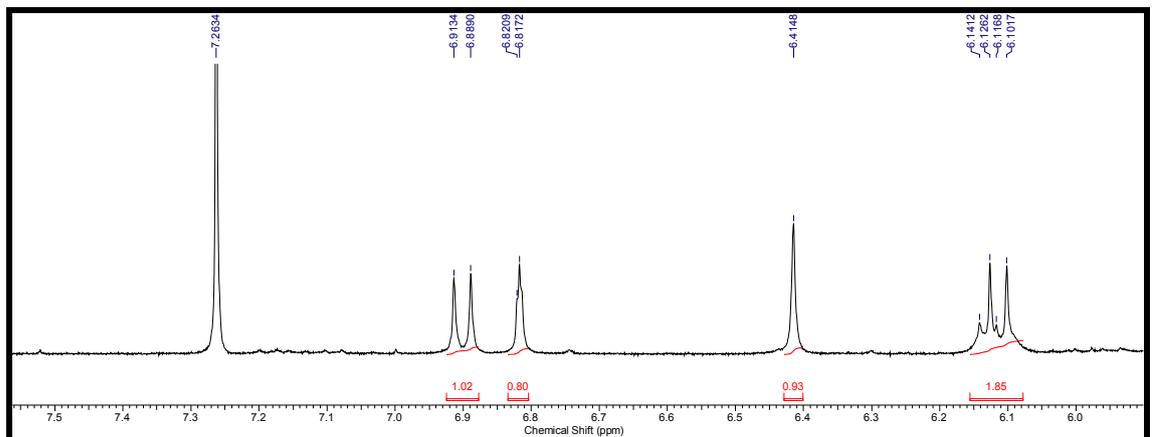


FIGURA 3.10- Ampliação da região δ 7,50 a 6,00 ppm do espectro de RMN ¹H da substância **13**.

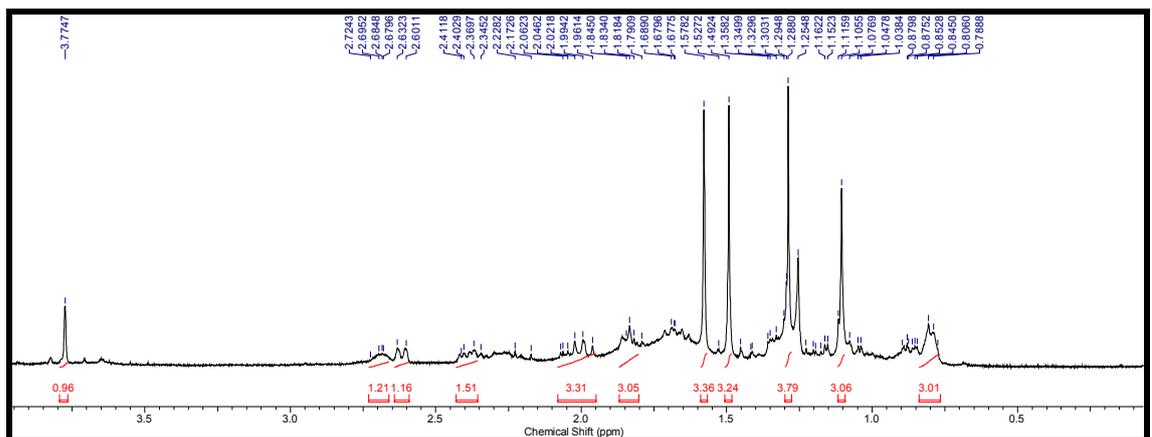


FIGURA 3.11 - Ampliação da região δ 4,00 a 0 ppm do espectro de RMN ¹H da substância **13**.

TABELA 3.6 - Dados de RMN ^1H de **13** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 13 (400 MHz, CDCl_3)	AGOSTINHO, 1996 (200 MHz, CDCl_3 com traços de DMSO-d_6)
^1H	δ, J (Hz)	δ, J (Hz)
1	6,91 (1H, <i>d</i> , $J=10,0$)	6,80 (<i>d</i> , $J=9,9$)
2 / 23	6,12 (2H, <i>m</i> , $J = 10,0$)	5,99/6,09 (<i>d</i> , $J=9,9$)
9	2,63 (2H, <i>dl</i>)	-
11	1,83 (2H, <i>m</i>)	-
12α	1,68 (1H, <i>m</i>)	-
12β	2,41 (1H, <i>m</i>)	-
15	3,77 (1H, <i>s</i>)	3,65 (<i>s</i>)
16α	2,30 (1H, <i>m</i>)	-
16β	2,04 (1H, <i>m</i>)	-
17	2,69 (1H, <i>m</i>)	-
18	0,80 (3H, <i>t</i>)	0,71/0,66 (<i>t</i>)
19	1,28 (3H, <i>s</i>)	1,16 (3H, <i>s</i>)
22	6,82 (1H, <i>sl</i>)	6,95 (<i>sl</i>)
28	1,49 (3H, <i>s</i>)	1,46 (<i>s</i>)
29	1,57 (3H, <i>s</i>)	1,37 (<i>s</i>)
30	1,10 (3H, <i>s</i>)	0,98 (<i>s</i>)
OH	6,41 (1H, <i>sl</i>)	6,60 (<i>s</i>)

A partir da análise do RMN ^{13}C foi observado a presença de 26 átomos de carbono. Observaram-se sinais de carbonos carbonílicos em δ 203,6 atribuído ao C-3 e em δ 197,9 (valor de deslocamento químico característico de grupamento diosfenol) atribuído ao C-7. Os sinais observados em δ 69,8 e 54,6 foram atribuídos aos carbonos do epóxido C-14 e C-15, respectivamente. Os sinais em δ 152,3 e 127,3 foram atribuídos aos carbonos insaturados C-1 e C-2, respectivamente, do anel A do limonoide. Observou-se também sinais referentes ao anel γ -hidroxibutirolactona, em δ 96,4 característico de carbono hemiacetálico atribuído ao C-23 e em δ 146,0 e 171,7 referentes aos C-22 e C-21, respectivamente. Todos os sinais podem ser observados no espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.12).

TABELA 3.7 - Dados de RMN ^{13}C de **13** e comparação com a literatura.

^{13}C	SUBSTÂNCIA 13 (100 MHz, CD_3Cl)	AGOSTINHO, 1996 (100 MHz, CD_3Cl)
	δ	δ
1	152,3	152,2
2	127,3	126,5
3	203,6	203,3
4	48,5	47,9
5	134,2	132,9
6	141,1	141,0
7	197,9	197,1
8	46,7	46,3
9	43,2	42,5
10	40,3	39,6
11	19,4	18,9
12	35,0	34,5
13	42,0	42,5
14	69,8	69,2
15	54,6	54,1
16	31,7	31,1
17	42,2	41,5
18	22,7	22,5
19	23,9	23,4
20	137,0	136,9
21	171,7	171,1/171,4
22	146,0	146,7
23	96,4	96,9
28	26,7	26,2
29	21,2	20,6
30	20,1	19,5

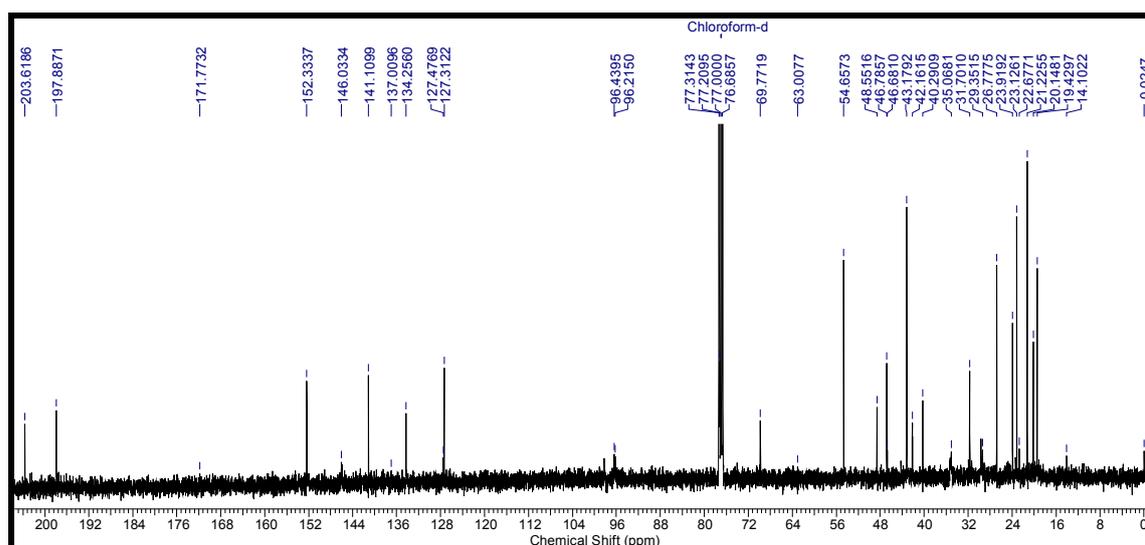


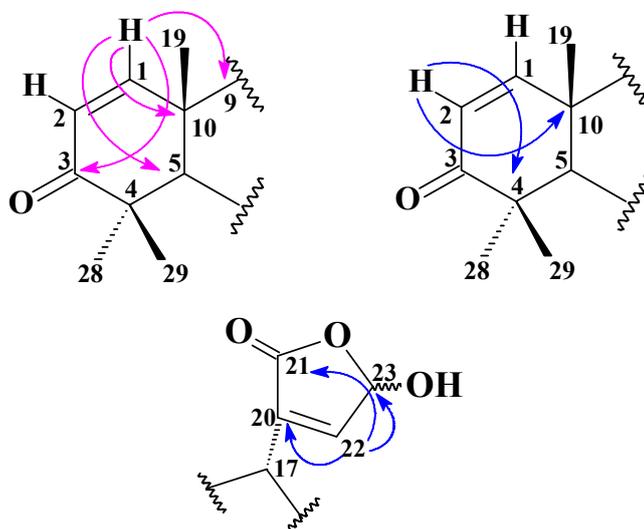
FIGURA 3.12- Espectro de RMN ^{13}C da substância 13 (100 MHz, CDCl_3).

No espectro heteronuclear HSQC (FIGURAS 3.13 e 3.14) é observado correlações a 1J dos sinais em δ 6,91 (H-1) e em 6,12 (H-2) com os carbonos em δ 152,3 (C-1) e 127,3 (C-2), respectivamente, confirmando o sistema do anel A de um limonoide do tipo apo-eufol. Também foram observados correlações dos sinais em δ 6,82 (H-22) e 6,12 (H-23) com os carbonos em δ 146,0 (C-22) e 96,4 (C-23), os quais confirmam a presença do anel γ -hidroxitirolactona. Observou-se a correlação do sinal em δ 3,77 (H-15) com o sinal em δ 54,6, confirmando a presença do epóxido em C-14/C-15 na molécula. Ainda é possível observar as correlações dos hidrogênios metilênicos e metínicos em δ 2,69 (H-17) com o carbono em δ 42,2 (C-17), em δ 2,63 (H-9) com δ 43,2 (H-9), em δ 2,41/1,68 (H-12 α /12 β) com δ 35,0 (C-12), δ 2,30/2,04 (H-16 α /16 β) com δ 31,7 (C-16) e δ 1,83 (H-11) com δ 19,4 (C-11).

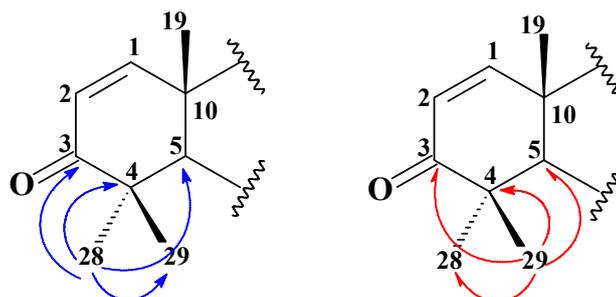
Ainda no mapa de correlações HSQC foi observado as correlações a 1J dos sinais dos grupos metílicos presentes na molécula, assim, é possível visualizar a correlação do sinal em δ 1,57 (H-28) com o carbono em δ 26,7 (C-28), em δ 1,49 (H-29) com δ 21,2 (C-29), em δ 1,28 (H-19) com δ 23,9 (C-19), em δ 1,10 (H-30) com o δ 20,1 (C-30) e δ 0,80 (H-18) com δ 22,7 (C-18).

A partir da análise do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) HMBC, FIGURAS 3.15 e 3.16, foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ 6,91 (H-1) a duas ligações (2J) com o carbono em δ 40,3 (C-10) e a 3J com os sinais em δ 203,6 (C-3), 134,2 (C-5) e 43,2 (C-9). O multipletto em δ 6,12 (H-2/H-23) apresentou correlações referentes ao H-2 a 3J com os carbonos em δ 48,5 (C-4) e

40,3 (C-10) e o sinal referente à H-22 a 2J com os carbonos em δ 137,0 e 96,4, atribuídos aos C-20 e C-23, respectivamente, e a 3J com o carbono em δ 171,7 atribuído ao C-21 confirmando assim a estrutura em questão, já que no espectro de RMN ^{13}C foi difícil a visualização do C-21, devido a resolução do espectro.

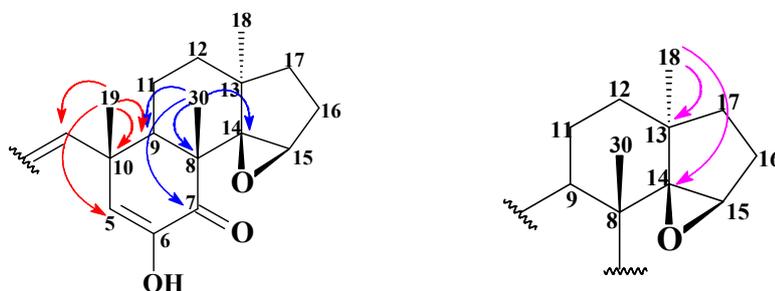


Ainda no HMBC foi possível visualizar as correlações das metilas presentes no anel A, Me-28 (δ 1,57) mostrou uma correlação a duas ligações (2J) com o carbono em δ 48,5 (C-4) e a três ligações (3J) com os sinais em δ 134,2 (C-5), 203,6 (C-3) e 21,2 (C-29). Já para a Me-29 em δ 1,49 foi visualizado uma correlação a 2J com o carbono em δ 48,5 (C-4) e a 3J com os sinais em δ 134,2 (C-5), 203,6 (C-3) e 26,7 (C-28).

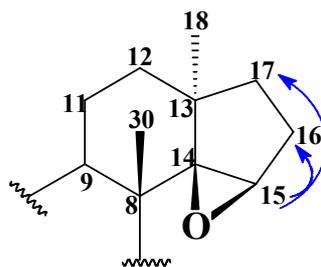


Também foram observados no mapa de contorno HMBC as correlações para as demais metilas presentes na molécula, a Me-19 em δ 1,28 a duas ligações (2J) com o carbono em δ 40,3 (C-10) e a 3J com os sinais em δ 43,2 (C-9), 134,2 (C-5) e 152,3 (C-1). O sinal referente a Me-30 (δ 1,10) apresentou uma

correlação a 2J com o carbono em δ 46,7, atribuído ao C-8, e a 3J com os sinais em δ 197,9 (C-7), 43,2 (C-9) e 69,8 (C-14). Os prótons da metila C-18 em δ 0,80 apresentaram uma correlação a 2J com o carbono em δ 42,0, atribuído ao C-13 e a 3J com o sinal em δ 69,8 (C-14).



Ainda na análise do HMBC foi possível observar as correlações do hidrogênio em δ 3,77 (H-15) a 2J com o carbono em δ 31,7 (C-16) e a 3J com o sinal em δ 42,2 (C-17).



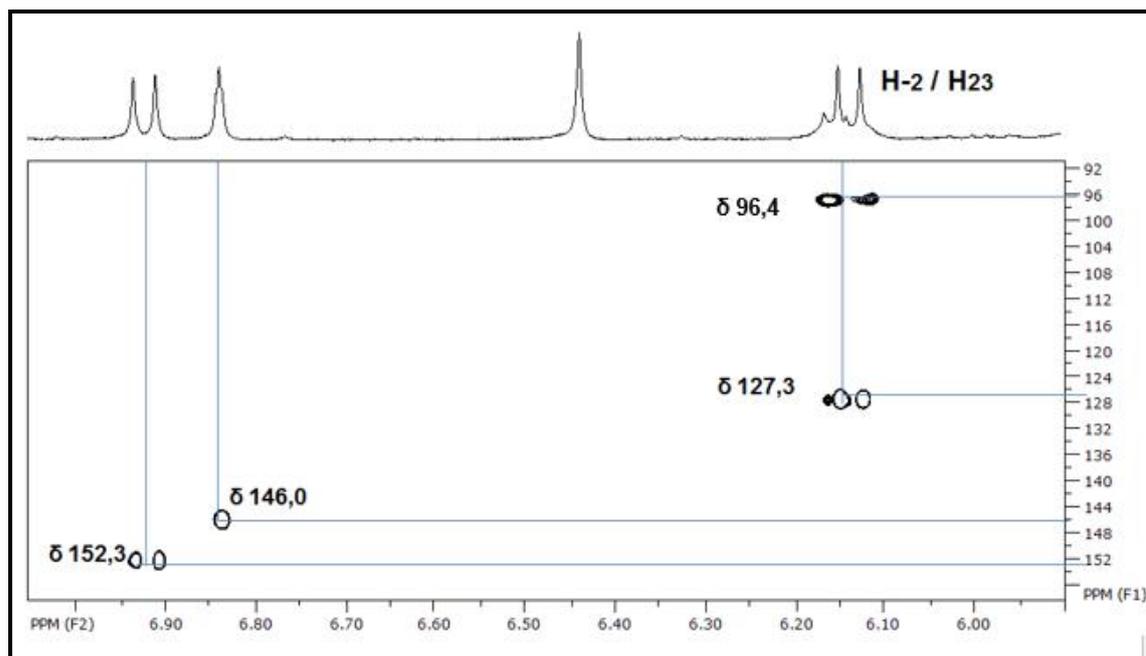


FIGURA 3.13 - Ampliação da região de 7,00 a 6,00 ppm do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) de **13**, HSQC, (400 MHz, CDCl_3).

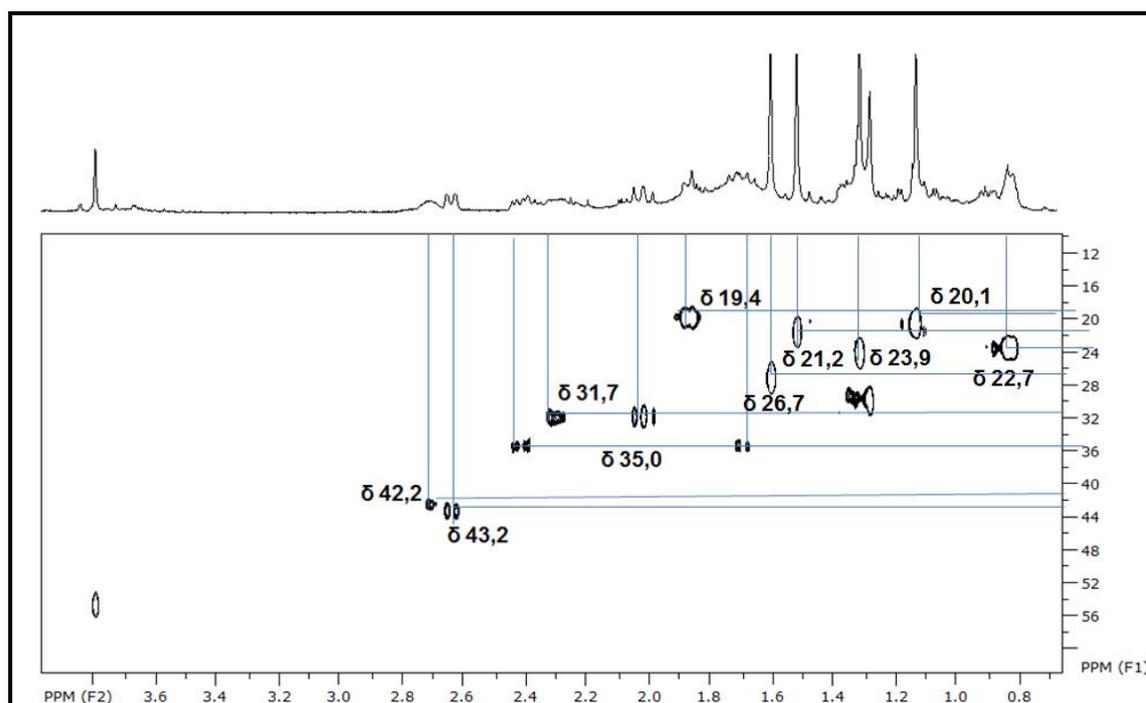


FIGURA 3.14- Ampliação da região entre 3,8 a 0,8 ppm do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) de **13**, HSQC, (400 MHz, CDCl_3).

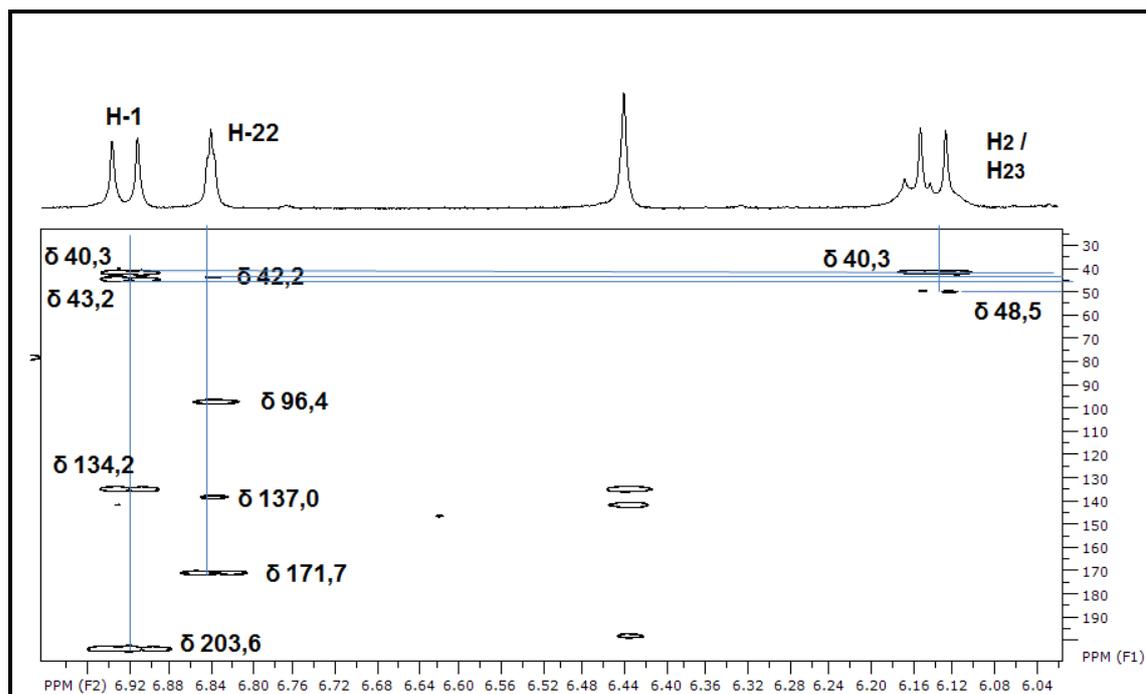


FIGURA 3.15- Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, de **13**, (400 MHz, CDCl_3).

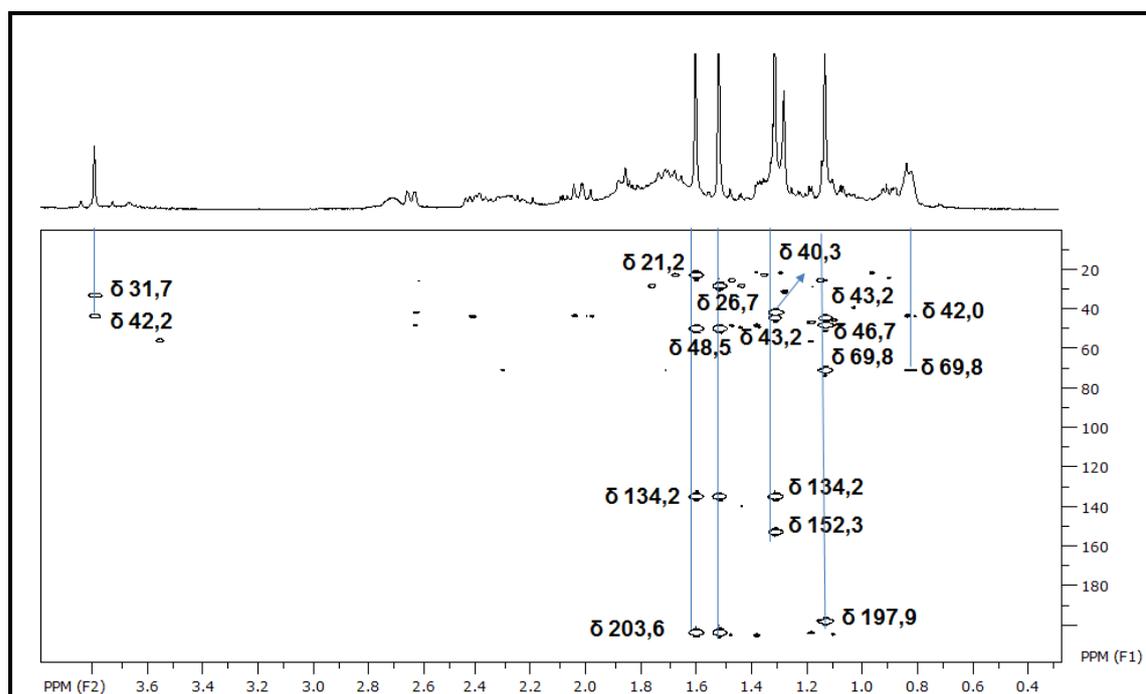
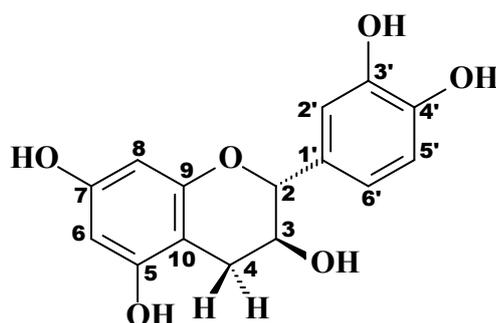


FIGURA 3.16- Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, de **13**, (400 MHz, CDCl_3).

3.2.2- Flavonoides

3.2.2.1- Identificação estrutural da substância 02

A substância **02** é um flavonoide e foi isolado da fração acetato de etila (FAEERTC) proveniente do extrato etanólico dos ramos de *To. ciliata* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H e ^{13}C , assim como também através da comparação com dados da literatura (LÔBO et al., 2008).



Analisando o espectro de RMN ^1H de **02** (FIGURA 3.17) pode-se observar sinais na região de aromáticos em δ 6,83 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz) relativo ao H-2', em δ 6,74 (1H, *d*, $J=8,0$ Hz) correspondente ao H-5', e um sinal em δ 6,71 (1H, *dd*, $J= 8,0; 2,4$ Hz) relativo ao H-6', todos estes relativos aos hidrogênios do anel B do esqueleto do flavonoide e podem ser visualizados na expansão na FIGURA 3.18. Ainda foi possível observar sinais na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos, em δ 5,93 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz) e δ 5,86 (1H, *d*, $J=2,4$ Hz), os quais foram atribuídos aos H-6 e H-8, respectivamente, caracterizando o padrão de substituição do anel A, indicando que as posições C-5 e C-7 estão substituídas por hidroxilas.

Os sinais em δ 4,56 (1H, *d*, $J=7,6$ Hz), δ 3,98 (1H, *ddd*, $J=8,2, 7,6$ e $5,4$ Hz), δ 2,84 (1H, *dd*, $J=16,2$ e $5,4$ Hz) e δ 2,50 (1H, *dd*, $J=16,2$ e $8,2$ Hz) foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios H-2, H-3, H-4 α e H-4 β (FIGURA 3.19) do anel C do flavonoide, caracterizando-o do tipo flavanol, com ausência de dupla ligação entre C-2 e C-3.

A configuração 2,3 *trans* foi determinada pela constante de acoplamento ($J = 8,2$ Hz) observada entre os hidrogênios H-3 e H-4 β pseudo-diaxial. O hidrogênio H-4 α em δ 2,84 (1H, *dd*, $J = 16,2$ e 5,4 Hz) apresentou uma constante de acoplamento de $J = 16,2$ Hz referente ao acoplamento geminal com H-4 β e uma constante de $J = 5,4$ Hz referente ao acoplamento pseudo axial-equatorial entre os hidrogênios H-4 α e H-3, já o H-4 β em δ 2,50 (1H, *dd*, $J = 16,2$ e 8,2 Hz) apresentou além do acoplamento geminal ($J = 16,2$ Hz) e um acoplamento pseudo diaxial ($J = 8,2$ Hz) com o H-3, com constante alta, o qual caracteriza a *trans*-catequina.

Catequinas podem existir como dois isômeros *trans*-catequina e *cis*-epicatequina, dependendo da estereoquímica configuracional dos grupos hidroxila. A *trans*-catequina ocorre em duas formas estereoisoméricas que podem ser diferenciadas pelo desvio da luz plano-polarizada, denominado $[\alpha]_D$. O $[\alpha]_D$ determinado para a *trans*-catequina (**02**) foi de 0°, portanto, trata-se de uma mistura racêmica, a *trans*-(±)-catequina.

TABELA 3.8 - Dados de RMN ^1H de **02** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 02 (400 MHz, CD ₃ OD)	LÔBO et al., 2008 (300 MHz, CD ₃ OD)
H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
2	4,56 (1H, <i>d</i> , $J = 7,6$)	4,57 (<i>d</i> , $J = 7,5$ Hz)
3	3,98 (1H, <i>ddd</i> , $J = 8,2; 7,6; 5,4$)	3,97 (<i>m</i>)
4 α	δ 2,84 (1H, <i>dd</i> , $J = 16,2$ e 5,4 Hz)	2,85 (<i>dd</i> , $J = 16,1$ e 5,5 Hz)
4 β	δ 2,50 (1H, <i>dd</i> , $J = 16,2$ e 8,2 Hz)	2,51 (<i>dd</i> , $J = 16,1$ e 8,2 Hz)
6	5,93 (1H, <i>d</i> , $J = 2,4$)	5,93 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
8	5,84 (1H, <i>d</i> , $J = 2,4$)	5,85 (<i>d</i> , $J = 2,2$ Hz)
2'	6,83 (1H, <i>d</i> , $J = 2,4$)	6,83 (<i>d</i> , $J = 1,8$ Hz)
5'	6,74 (1H, <i>d</i> , $J = 8,0$)	6,76 (<i>d</i> , $J = 8,1$ Hz)
6'	6,71 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,0; 2,4$)	6,71 (<i>dd</i> , $J = 8,1$ e 1,8 Hz)

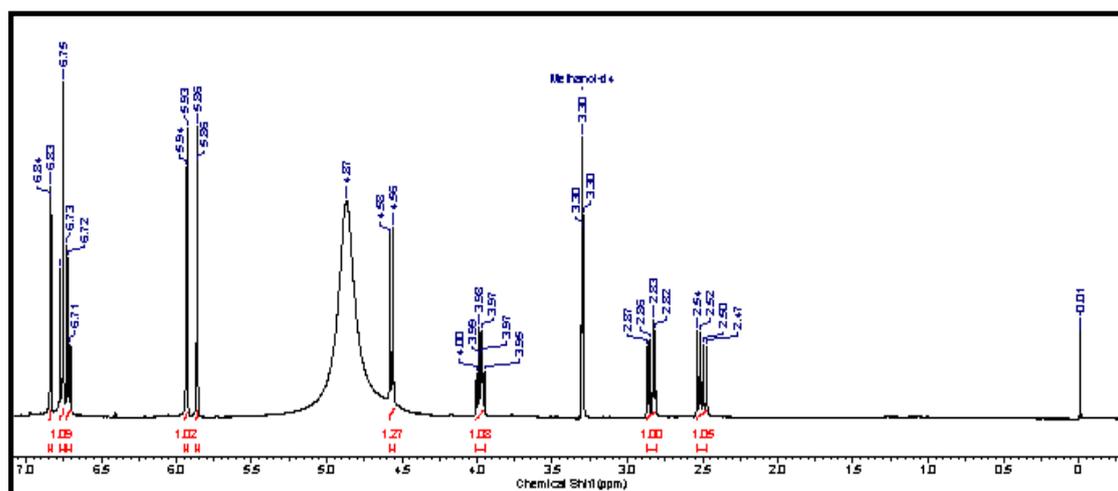


FIGURA 3.17- Espectro de RMN ^1H da substância **02** (400 MHz, CD_3OD).

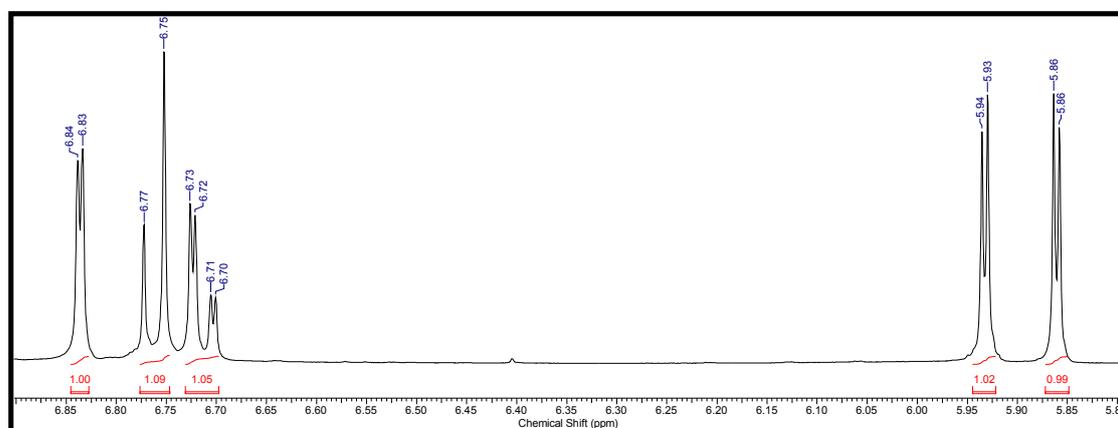


FIGURA 3.18- Ampliação da região δ 6,90 a 5,80 do espectro de RMN ^1H da substância **02**.

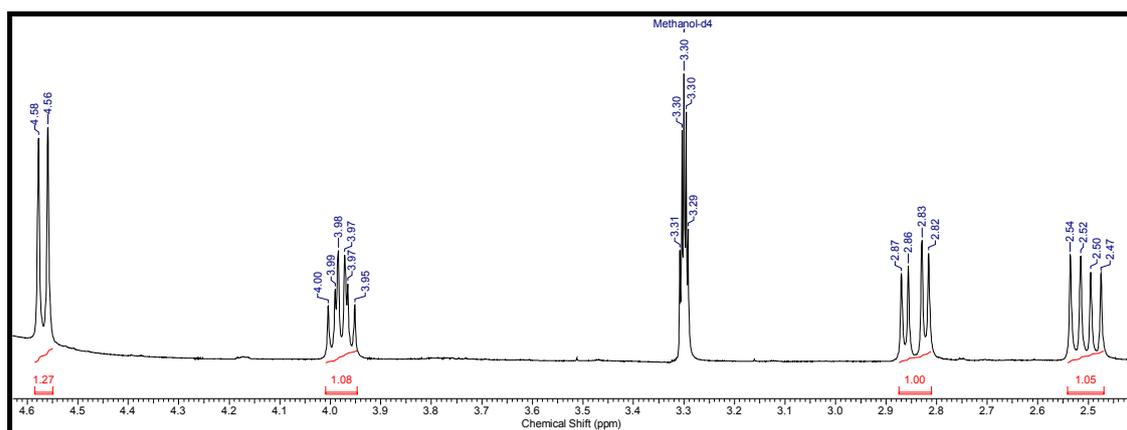
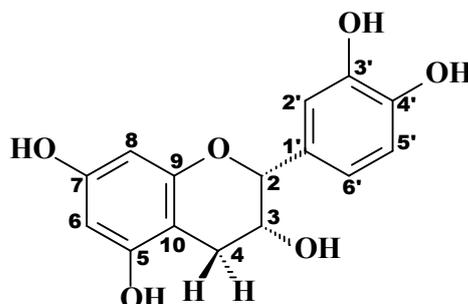


FIGURA 3.19 - Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância **02**.

3.2.2.2- Identificação estrutural da substância 17

A substância **17** é um flavonoide e foi isolado da fração acetato de etila (FAEERTC) proveniente do extrato etanólico dos ramos de *T. pallens* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H e por comparação com dados da literatura (LÔBO et al., 2008).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURAS 3.20, 3.21 e 3.22) observou-se sinais na região de aromáticos em δ 6,97 (1H, *d*, $J=2,0$ Hz) relativo ao hidrogênio H-2', em δ 6,76 (1H, *d*, $J=8,5$ Hz) correspondente ao H-5', e em δ 6,80 (1H, *dd*, $J= 8,0; 2,0$ Hz) relativo ao H-6', todos estes caracterizam o anel B do esqueleto do flavonoide e podem ser visualizados na expansão na FIGURA 3.21. Ainda foi possível observar sinais na região de deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos em δ 5,94 (1H, *d*, $J=2,52$ Hz) e 5,91 (1H, *d*, $J= 2,52$ Hz), os quais foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, caracterizando o padrão de substituição do anel A, indicando que as posições C-5 e C-7 estão substituídas por hidroxilas.

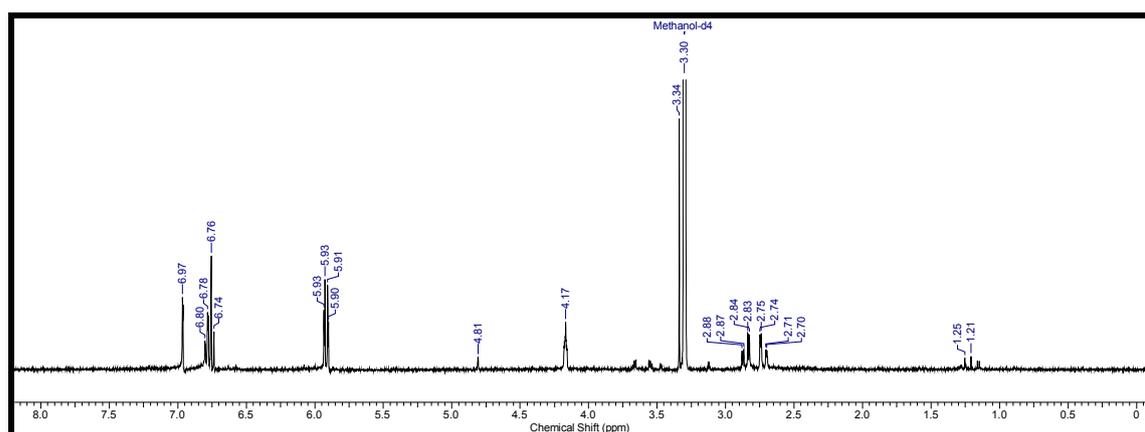
Os sinais em δ 4,82 (1H, *s*), 4,17 (1H, *m*), 2,88 (1H, *dd*, $J= 16,5; 4,5$) e 2,75 (1H, *dd*, $J=16,5; 3,0$) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2, H-3, H-4 α e H-4 β (FIGURA 3.22) do anel C do flavonoide, caracterizando-o do tipo flavanol, com ausência de ligação dupla entre C-2 e C-3.

As substâncias **02** e **17** foram isoladas por CLAE provenientes de uma mesma fração, como descrito anteriormente. Os dados espectrais de RMN destas substâncias são bem similares, destacando-se apenas pequenas diferenças tanto no deslocamento químico como no padrão de acoplamento, principalmente com relação aos hidrogênios alifáticos (TABELA 3.9). Para a substância **17**, H-2 e H-3 revelaram singletos largos em δ 4,82 e 4,17, respectivamente, e H-4 β mostrou-se um duplo

duplete em δ 2,72 com $J= 16,5$ e $3,0$ Hz referente aos acoplamentos geminal com H-4 α e pseudo axial-equatorial com H-3 com uma constante pequena, respectivamente. Na substância **02**, ao contrário do que é observado em **17**, observou-se um acoplamento entre H-4 β e H-3 pseudo diaxial com constante alta que foi atribuída a estrutura da catequina, tudo isso em consequência da mudança da estereoquímica do carbono C-3 (OH- α). Assim, com base em dados espectrais de RMN ^1H e comparações com a literatura, a substância em questão foi caracterizada para a epicatequina.

TABELA 3.9 - Dados de RMN ^1H de **17** e comparação com a literatura.

H	SUBSTÂNCIA epicatequina (400 MHz, CD ₃ OD)	LÔBO et al., 2008 (300 MHz, CD ₃ OD)
	δ, J (Hz)	δ, J (Hz)
2	4,82 (1H, <i>sl</i>)	4,82 (1H, <i>sl</i>)
3	4,17 (1H, <i>m</i>)	4,17 (1H, <i>sl</i>)
4 α	2,88 (1H, <i>dd</i> , $J=16,5; 4,5$)	2,85 (1H, <i>dd</i> , $J = 16,8; 4,5$ Hz)
4 β	2,75 (1H, <i>dd</i> , $J=16,5; 3,0$)	2,72 (1H, <i>dd</i> , $J=16,8; 2,4$)
6	5,94 (1H, <i>d</i> , $J=2,52$)	5,93 (1H, <i>d</i> , $J= 1,8$ Hz)
8	5,91 (1H, <i>d</i> , $J=2,52$)	5,91 (1H, <i>d</i> , $J= 1,8$ Hz)
2'	6,97 (1H, <i>d</i> , $J= 2,0$ Hz)	6,97 (1H, <i>d</i> , $J= 1,2$ Hz)
5'	6,76 (1H, <i>d</i> , $J= 8,5$ Hz)	6,75 (1H, <i>d</i> , $J= 8,1$ Hz)
6'	6,80 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,0; 2,0$ Hz)	6,79 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,1; 1,2$ Hz)

FIGURA 3.20 - Espectro de RMN ^1H da substância **17** (400 MHz, CD₃OD).

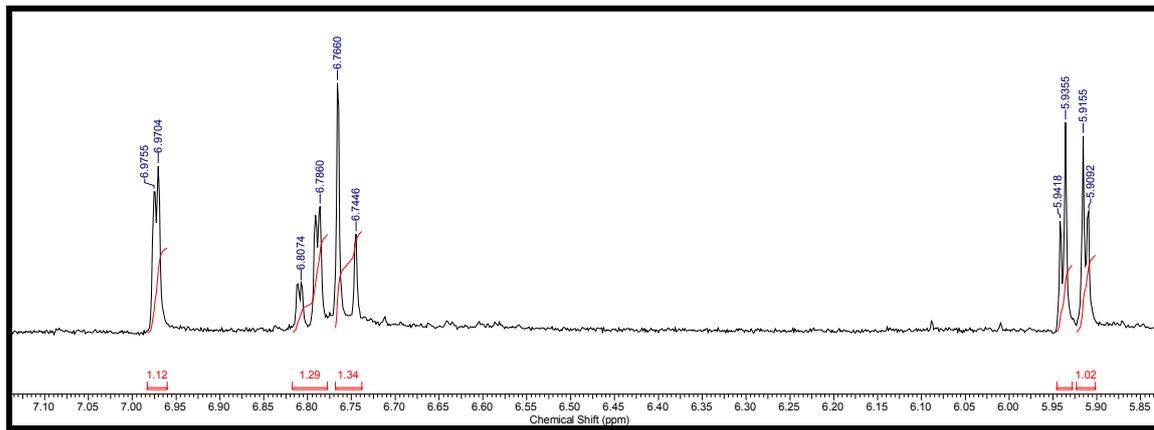


FIGURA 3.21- Ampliação da região δ 6,55 a 5,70 do espectro de RMN ^1H da substância **17**.

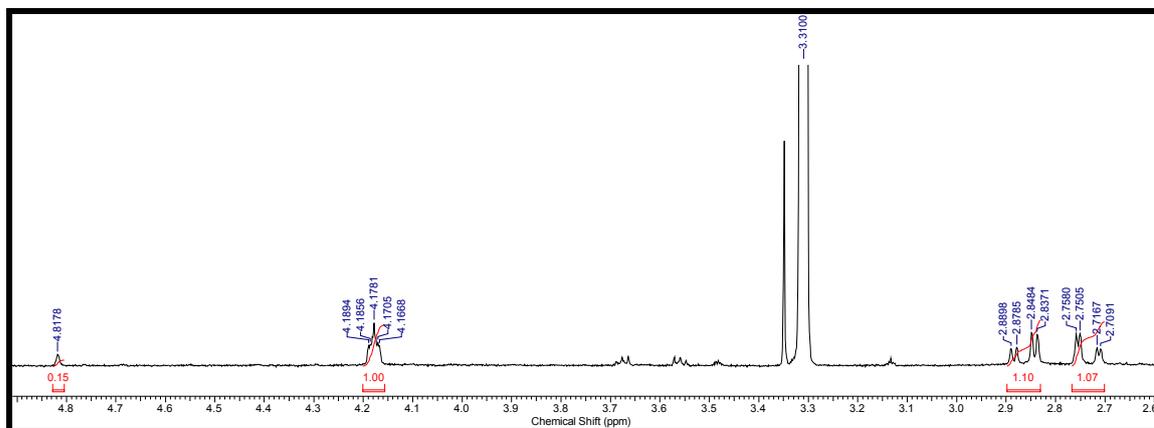
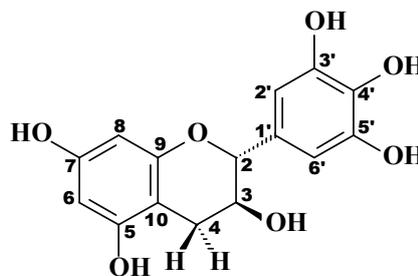


FIGURA 3.22- Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância **17**.

3.2.2.3- Identificação estrutural da substância **18**

A substância **18** é um flavonoide e foi isolado da fração acetato de etila proveniente do extrato etanólico dos ramos de *Trichilia pallens* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H e também por comparação com dados da literatura (DAVIS et al., 1996).



Analisando o espectro de RMN ^1H de **18** (FIGURAS 3.23, 3.24 e 3.25) observou-se um sinal na região de aromáticos em δ 6,39 (2H, s) relativo aos hidrogênios H-2' e H-6', caracterizando o padrão de substituição do anel B, devido à equivalência química dos hidrogênios H-2' e H-6' e, conseqüentemente, apresentou o mesmo deslocamento químico. Ainda foi possível observar na região de hidrogênios aromáticos um dubleto em δ 5,91 (1H, *d*, $J=2,52$ Hz) correspondente ao H-6 o qual acopla com um sinal em δ 5,85 (1H, *d*, $J=2,52$ Hz) relativo ao hidrogênio H-8, caracterizando o padrão de substituição do anel A (FIGURA 3.24). Os sinais em δ 4,52 (1H, *d*, $J=7,0$ Hz), 3,97 (1H, *ddd*, $J=7,2, 7,52$ e $5,52$ Hz), 2,82 (1H, *dd*, $J=16,3$ e $5,52$ Hz) e 2,51 (1H, *dd*, $J=16,3$ e $7,52$ Hz) foram atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-2, H-3, H-4 α e H-4 β (FIGURA 3.25) do anel C do flavonoide, caracterizando um flavonoide do tipo flavanol, com ausência de ligação dupla entre C-2 e C-3.

A configuração 2,3 *trans* foi determinada pela constante de acoplamento pseudo diaxial ($J=7,6$ Hz) entre os hidrogênios H-2 e H-3. O hidrogênio H-4 α em δ 2,82 apresentou $J=16,3$ Hz referente ao acoplamento geminal com H-4 β e $J=5,52$ Hz caracterizando acoplamento pseudo equatorial-axial entre os hidrogênios H-4 α e H-3. O H-4 β em δ 2,51 apresentou além do acoplamento geminal ($J=16,3$ Hz), um acoplamento ($J=7,52$ Hz) com o H-3, atribuído ao acoplamento pseudo diaxial. Estes dados corroboram com a literatura para o flavonoide galocatequina, (TABELA 3.10).

TABELA 3.10: Dados de RMN ^1H de **18** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 18 (400 MHz, CD ₃ OD)	DAVIS et al., 1996 (300 MHz, Acetona- <i>d</i>)
H	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
2	4,53 (1H, <i>d</i> , $J=7,6$)	4,51 (1H, <i>d</i> , $J=7,4$)
3	3,98 (1H, <i>ddd</i> , $J=7,6; 7,2; 5,52$)	3,97 (1H, <i>ddd</i> , $J=8,2; 7,4; 5,5$)
4 α	2,83 (1H, <i>dd</i> , $J=16,3; 5,52$)	2,87 (1H, $J=16,1; 5,5$)
4 β	2,52 (1H, <i>dd</i> , $J=16,3; 7,52$)	2,52 (1H, $J=16,1; 8,2$)
6	5,92 (1H, <i>d</i> , $J=2,52$)	6,01 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)
8	5,86 (1H, <i>d</i> , $J=2,52$)	5,87 (1H, <i>d</i> , $J=2,3$)
2' e 6'	6,40 (2H, s)	6,45 (2H, s)

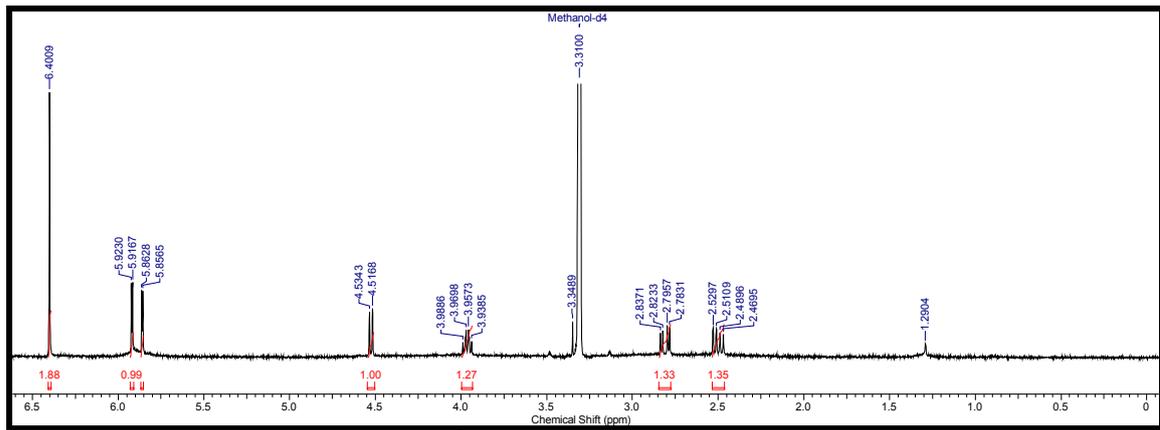


FIGURA 3.23- Espectro de RMN ^1H da substância **18** (400 MHz, CD_3OD).

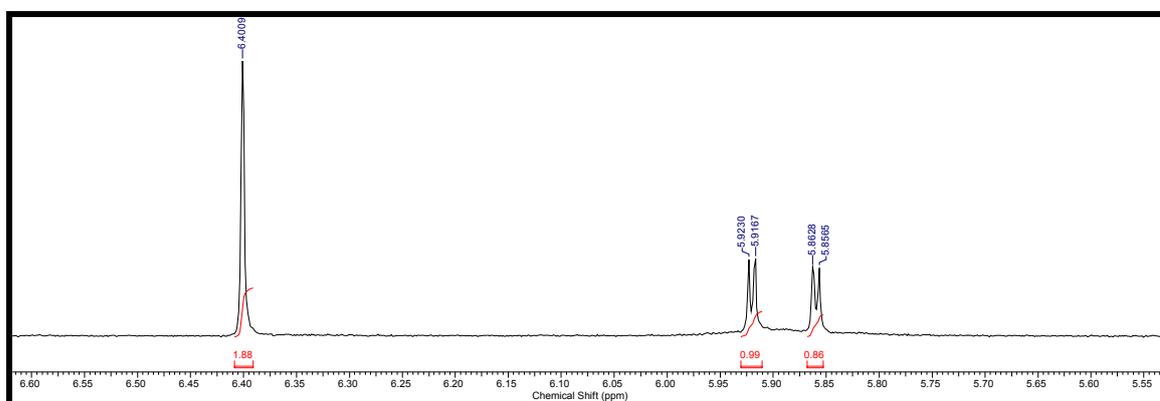


FIGURA 3.24- Ampliação da região δ 6,55 a 5,70 do espectro de RMN ^1H da substância **18**.

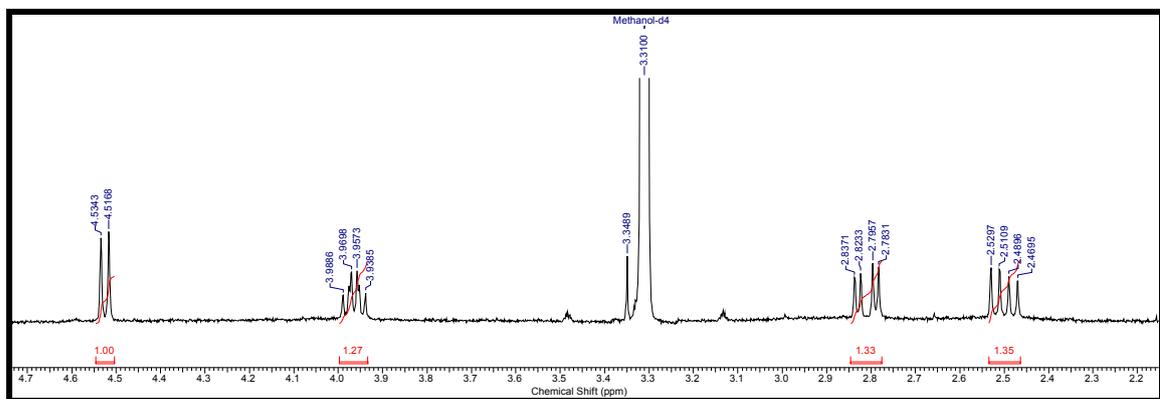
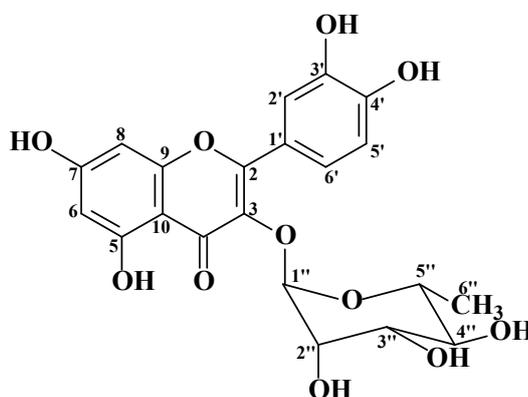


FIGURA 3.25- Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância **18**.

3.2.2.4- Identificação estrutural da substância 03

A substância **03** é um flavonoide glicosilado e foi isolado da fração acetato de etila (FAEEFTP) proveniente do extrato etanólico das folhas de *Trichilia pallida* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H , HMBC e também por comparação com dados da literatura (DANIELI et. al., 1972).



A partir do espectro de RMN de ^1H (FIGURA 3.26) foi possível observar sinais de hidrogênios aromáticos característicos de flavonoide, um dubleto em δ 7,32 (d , $J=2,0$ Hz) acoplando com um duplo dubleto em δ 7,29 (d , $J= 8,0$ e $2,0$ Hz) e por sua vez acoplando com um dubleto largo em δ 6,91 (d , $J=8,0$ Hz), sendo estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-5', respectivamente. Foram observados dois sinais de dubletos em δ 6,26 (d , $J=2,0$ Hz) e δ 6,12 (d , $J=2,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente, caracterizando o padrão de substituição do anel A.

Foram observados no espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.27) a presença de sinais entre δ 5,3 a 3,1 evidenciando um flavonoide glicosilado. Sinais em δ 4,22 (dd , $J= 3,5$ e $1,4$ Hz), δ 3,75 (dd , $J= 9,0$ e $3,5$ Hz), δ 3,41 (m) e δ 3,33 (dl , $J=9,4$ Hz) indicam a presença de uma unidade de açúcar. O sinal em δ 0,94 (d , $J=5,8$), FIGURA 3.28, é característico de grupamento metila de uma unidade de ramnose e o sinal em δ 5,32 (d , $J=1,4$) é característico de hidrogênio anomérico o qual foi atribuído ao H-1'', e este por sua vez apresentou constante de acoplamento pequena devido ao seu acoplamento diequatorial com o H-2''.

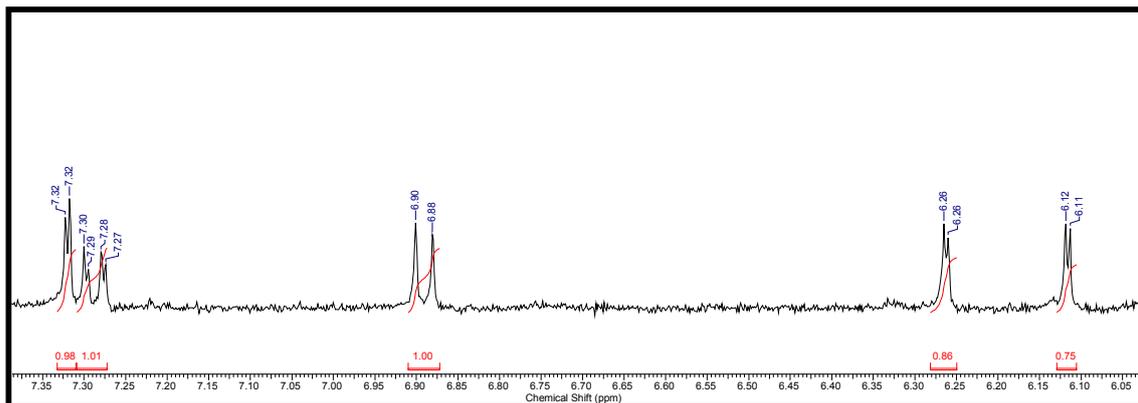


FIGURA 3.26 - Ampliação da região δ 7,40 a 6,00 do espectro de RMN ^1H da substância **03** (400 MHz, CD_3OD).

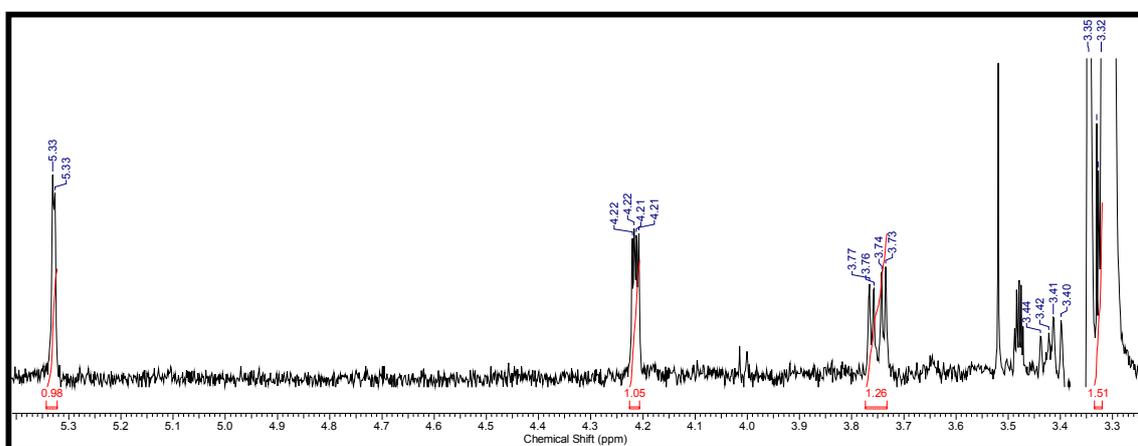


FIGURA 3.27 - Ampliação da região δ 5,40 a 3,30 (sinais referentes a unidade de açúcar) do espectro de RMN ^1H da substância **03** (400 MHz, CD_3OD).

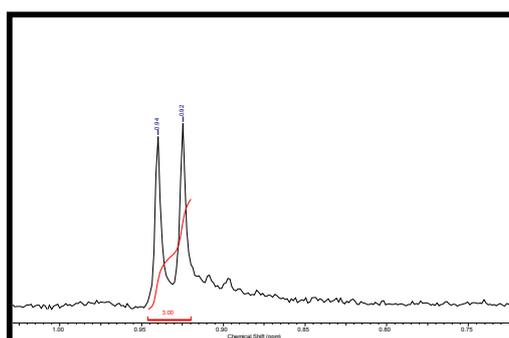


FIGURA 3.28 - Ampliação da região δ 1,00 a 0,80 (sinal referente à metila da unidade de açúcar) do espectro de RMN ^1H da substância **03** (400 MHz, CD_3OD).

Para se determinar a posição na qual o glicosídeo está ligado na aglicona, utilizou-se a correlação no espectro de HMBC (FIGURA 3.29) do hidrogênio anomérico em δ 5,32 com um carbono em δ_C 136,6 que foi atribuído ao C-3 do anel C da flavona. Os dados de RMN ^1H são apresentados na TABELA 3.11. Esses dados estão de acordo com a literatura para a Quercetina-3- β -O-raminosídeo.

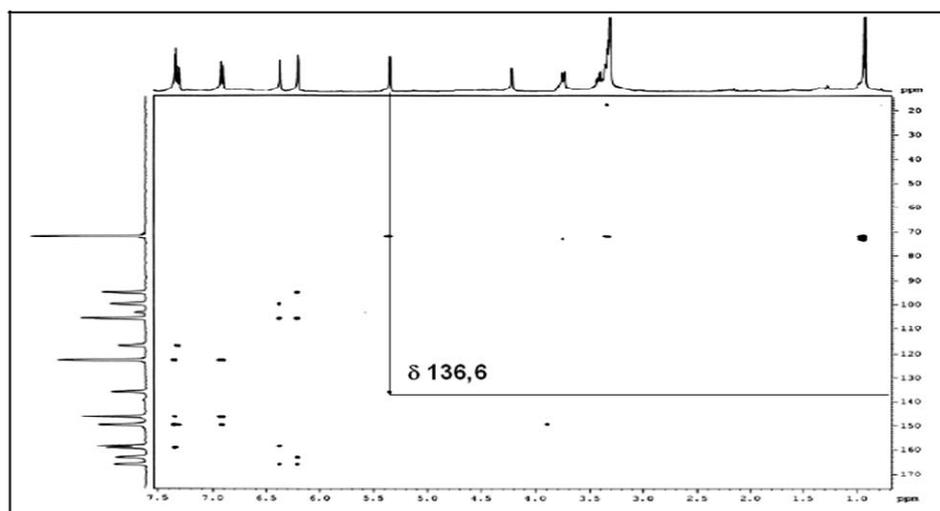


FIGURA 3.29 - Espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C , (HMBC), de **03** (400 MHz, CD_3OD).

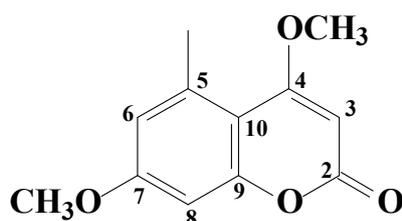
TABELA 3.11- Dados de RMN ^1H de **03** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 03 (400 MHz, CD_3OD)	BRACA et al., 2003 (400 MHz, CD_3OD)
H	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
6	6,12 (<i>d</i> , J=2,0 Hz)	6,2 (<i>d</i> , J=2,2 Hz)
8	6,26 (<i>d</i> , J=2,0 Hz)	6,37 (<i>d</i> , J=2,2 Hz)
2'	7,32 (<i>d</i> , J=2,0 Hz)	7,34 (<i>d</i> , J=2,0 Hz)
5'	6,91 (<i>d</i> , J=8,0 Hz)	6,91(<i>d</i> , J=8,4 Hz)
6'	7,29 (<i>d</i> , J= 8,0 e 2,0 Hz)	7,29 (<i>d</i> , J= 8,0 e 2,0 Hz)
1''	5,32 (<i>d</i> , J=1,4)	5,35 (<i>d</i> , J=1,7)
2''	4,22 (<i>dd</i> , J= 3,5 e 1,4 Hz)	4,21 (<i>dd</i> , J= 3,3 e 1,7 Hz)
3''	3,75 (<i>dd</i> , J= 9,0 e 3,5 Hz)	3,74 (<i>dd</i> , J= 9,3 e 3,3 Hz)
4''	3,33 (<i>dl</i> , J=9,4 Hz)	3,30 (<i>dd</i> , J=9,5 e 6,1 Hz)
5''	3,41 (<i>m</i>)	3,40 (<i>dd</i> , J= 9,5 e 9,3 Hz)
6''	0,91 (<i>d</i> , J=5,8 Hz)	0,94 (<i>d</i> , J=6,1 Hz)

3.2.3- Cumarinas

3.2.3.1- Identificação estrutural da substância 04

A substância 04 é uma cumarina simples e foi isolada do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H e por comparação com dados da literatura (NAGASAMPAGI et al.,1975).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.31) foi possível observar dois sinais referentes a hidrogênios aromáticos correspondentes aos H-6 (δ 6,65, *d*, $J= 0,9$ Hz) e H-8 (δ 6,59, *d*, $J= 0,9$ Hz) semelhante aos da cumarina siderina isolada anteriormente por NAGASAMPAGI et al. (1975) de *Cedrela toona* (sinonímia de *Toona ciliata*), os quais apresentam um acoplamento *meta*. O singlete em δ 5,52 foi atribuído ao hidrogênio H-3 do anel lactônico. Já os singletos em δ 3,92 e 3,82 (FIGURA 3.30) são referentes ao hidrogênios das metoxilas ligadas aos carbonos C-4 e C-7, respectivamente. Observou-se também a presença do sinal de metila em δ 2,59 (s) presente no C-5. Assim, a estrutura **04** foi identificada como a cumarina siderina.

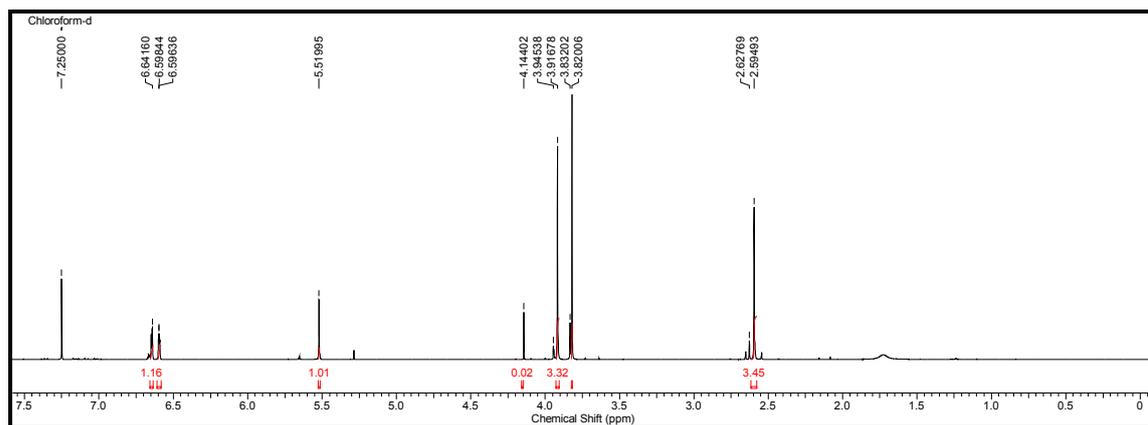


FIGURA 3.30- Espectro de RMN ^1H de **04** (400 MHz, CDCl_3).

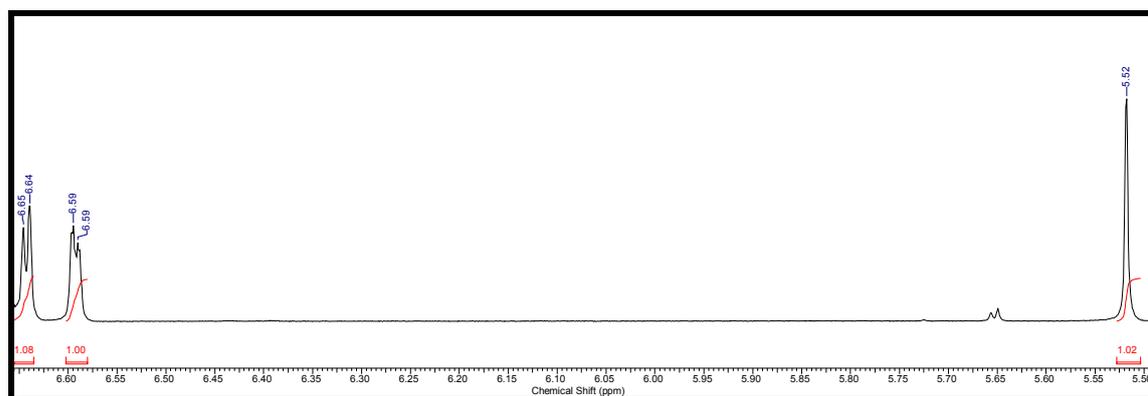


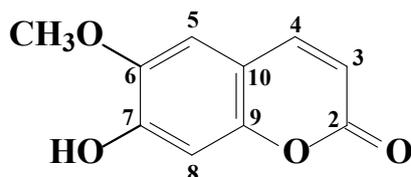
FIGURA 3.31 - Ampliação da região δ 6,90 a 5,80 do espectro de RMN ^1H da substância **04**.

TABELA 3.12 - Dados de RMN ^1H de **04** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 04 (400 MHz, CDCl_3)	NAGASAMPAGI et al., 1975 (80 MHz, CDCl_3)
^1H	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
3	5,52 (1H, s)	5,53 (1H, s)
6	6,65 (1H, d, J= 0,9 Hz)	6,64 (m)
8	6,59 (1H, d, J=0,9 Hz)	6,64 (m)
OCH₃	3,92 (3H, s)	3,94 (3H, s)
OCH₃	3,82 (3H, s)	3,94 (3H, s)
CH₃	2,59 (3H, s)	2,60 (3H, s)

3.2.3.2- Identificação estrutural da substância 05

A substância **05** é uma cumarina simples e foi isolada na forma de cristais da fração diclorometânica (FDEERTPL) proveniente do extrato etanólico dos ramos e folhas de *T. pallens* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H , *g*-NOE (1D) e por comparação com dados da literatura (MAFEZOLI, 2001).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURAS 3.32 e 3.33) foi possível observar sinais referentes a hidrogênios aromáticos característicos de esqueleto cumarínico em δ 7,60 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz) e δ 6,27 (1H, *d*, $J=9,6$ Hz), referentes aos H-4 e H-3 do anel lactônico, respectivamente. Ainda na região de aromáticos, foram observados sinais em δ 6,92 (1H, *s*) e δ 6,85 (1H, *s*) os quais foram associados aos hidrogênios H-8 e H-5, respectivamente, correlacionados em *para*. Também foi observado um sinal em δ 3,95 (3H, *s*) característico de metoxila.

A partir da análise do espectro de RMN ^1H e segundo dados da literatura existem duas possibilidades estruturais: a escopoletina ou o seu isômero isoescopoletina. E assim, foi realizado o experimento de *g*-NOE (1D), para verificar qual seria a cumarina em questão.

Os experimentos de *g*-NOE (1D) (FIGURA 3.34) confirmam que se trata da cumarina escopoletina. Quando o sinal do hidrogênio em δ 6,85 (H-5) foi irradiado, foi possível observar um incremento no sinal da metoxila (δ 3,95) e do hidrogênio em δ 7,60 (H-4), o que indicou a ligação da metoxila à C-6. Quando o sinal do hidrogênio em δ 6,92 (H-8) foi irradiado, não foi observado nenhum incremento de sinal, logo a hidroxila foi confirmada na posição C-7.

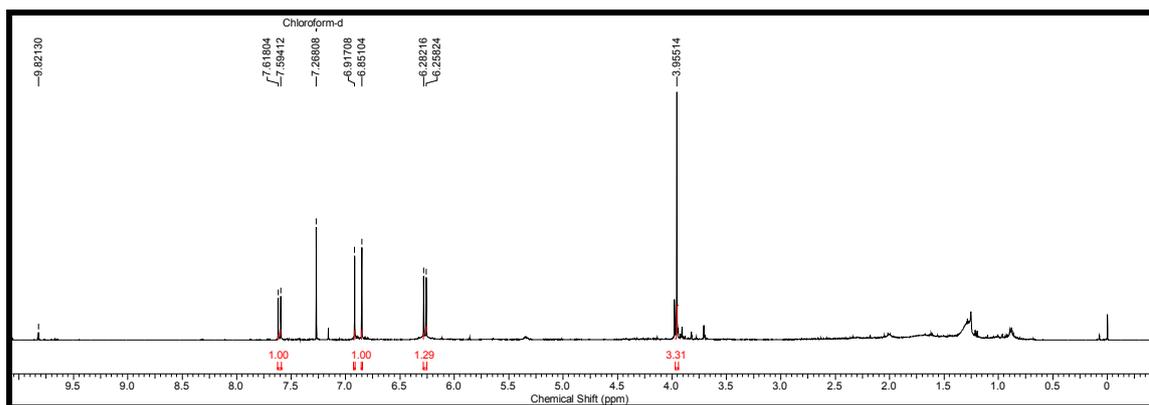


FIGURA 3.32- Espectro de RMN ^1H de **05** (400 MHz, CDCl_3).

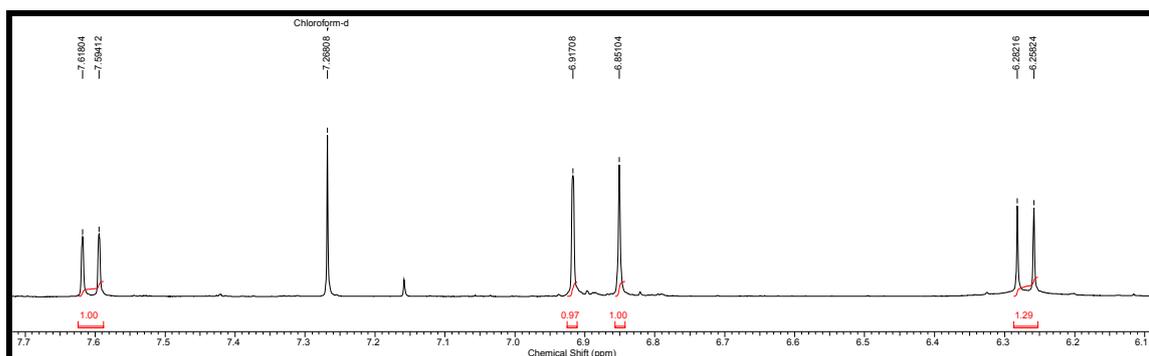


FIGURA 3.33 - Ampliação da região δ 7,70 a 6,10 do espectro de RMN ^1H da substância **05**.

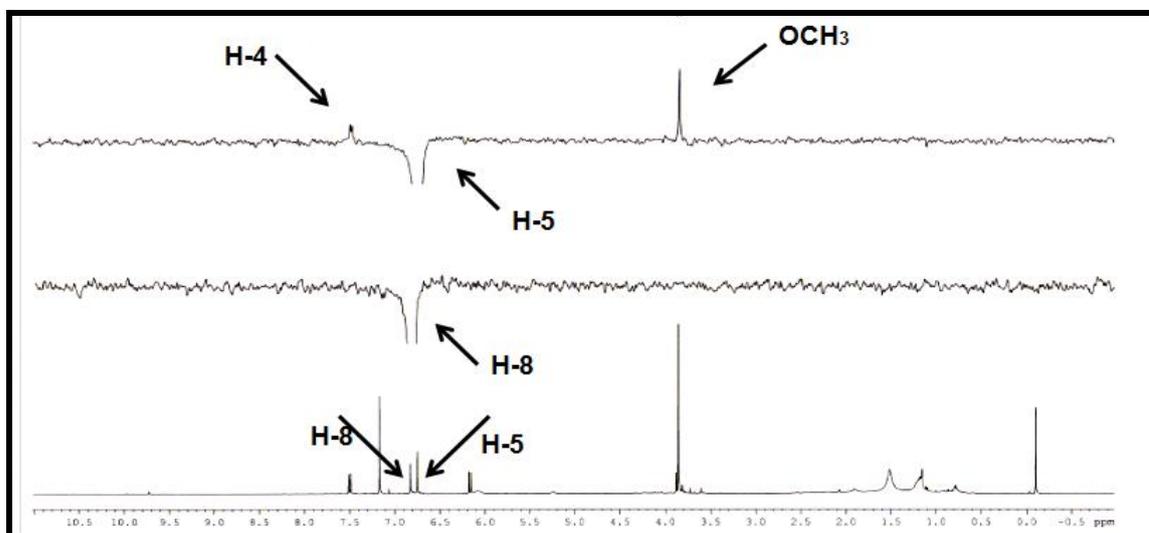


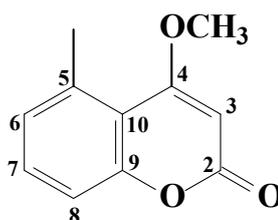
FIGURA 3.34- Espectros de *g*-NOE de **05** (400 MHz, CDCl_3).

TABELA 3.13- Dados de RMN ^1H de **05** e comparação com a literatura.

^1H	SUBSTÂNCIA 05 (400 MHz, CDCl_3)	MAFEZOLI, 2001 (400 MHz, CDCl_3)
	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
3	6,27 (1H, <i>d</i> , $J=9,6$ Hz)	6,28 (1H, <i>d</i> , $J=9,5$ Hz)
4	7,60 (1H, <i>d</i> , $J=9,6$ Hz)	7,61 (1H, <i>d</i> , $J=9,5$ Hz)
5	6,85 (1H, <i>s</i>)	6,84 (1H, <i>s</i>)
8	6,92 (1H, <i>s</i>)	6,91 (1H, <i>s</i>)
OCH₃	3,95 (3H, <i>s</i>)	3,95 (3H, <i>s</i>)
OH	-	6,22 (1H, <i>s</i>)

3.2.3.3- Identificação estrutural da substância **06**

A substância **06** foi isolada do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* e teve sua estrutura determinada baseado em experimentos uni e bidimensionais de RMN ^1H e ^{13}C , HMBC e *g*-NOE (^1H - ^1H), assim como também através da comparação com dados da literatura (WAIGH et al., 1991; BOHLMANN et al., 1977). Assim, trata-se de uma cumarina simples, sem oxigenação no C-7, o que não é comum em plantas de acordo com o que é proposto pela biossíntese. Porém esta cumarina (4-metóxi-5-metilcumarina) foi descrita em plantas da família Euphorbiaceae (WAIGH et al., 1991). Esta substância é relatada pela primeira vez em Meliaceae.



Analisando o espectro de RMN ^1H de **06** (FIGURAS 3.35 e 3.36) é possível observar sinais na região de aromáticos em δ 7,37 (1H, *t*, $J=7,9$ Hz), δ 7,17 (1H, *dl*, $J=7,7$ Hz) e δ 7,03 (1H, *dl*, $J=7,3$ Hz) referentes aos hidrogênios H-7, H-8 e H-6, respectivamente. O singlete em δ 5,66 foi atribuído ao hidrogênio H-3 do anel lactônico. Também foram observados no espectro de RMN ^1H sinais de singletos em δ 3,95 (*s*, 3H) referente a presença de uma metoxila na posição C-4 e em δ 2,67 (*s*, 3H) referente ao grupamento metila na posição C-5. Com base nestes dados e

segundo comparação com a literatura (WAIGH et al., 1991; BOHLMANN et al., 1977), todos os sinais de hidrogênios foram coerentemente atribuídos.

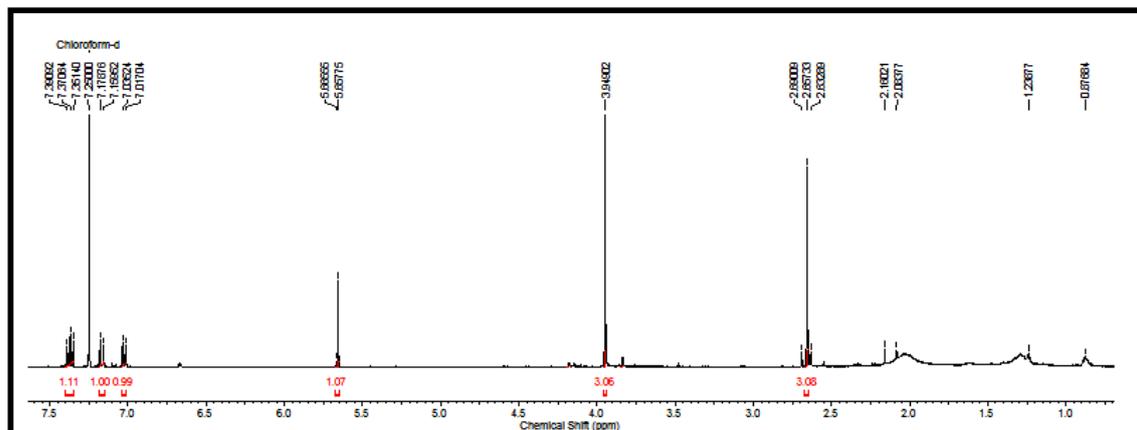


FIGURA 3.35- Espectro de RMN ^1H de **06** (400 MHz, CDCl_3).

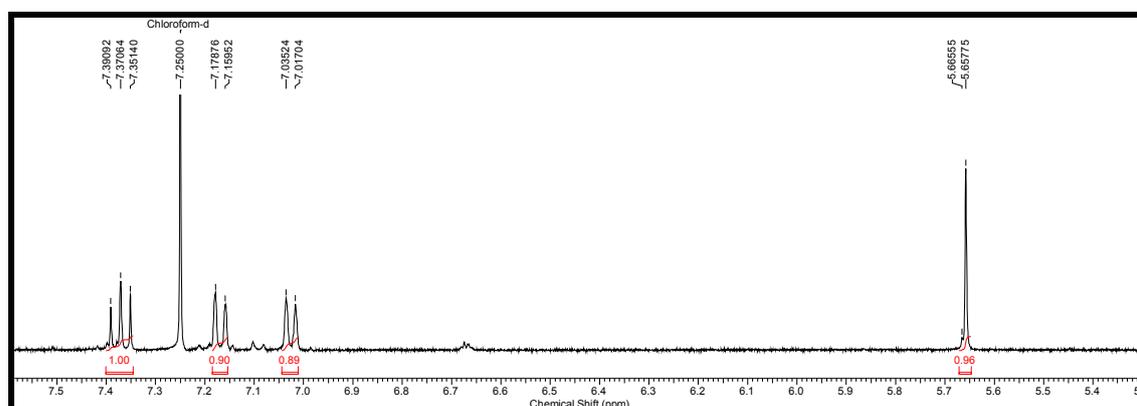


FIGURA 3.36 - Ampliação da região δ 7,50 a 5,30 do espectro de RMN ^1H da substância **06**.

TABELA 3.14 - Dados de RMN ^1H de **06** e comparação com a literatura.

	SUBSTÂNCIA 06 (400 MHz, CDCl_3)	BOHLMANN et al., 1977 (CDCl_3)
^1H	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
3	5,66 (s)	5,69 (s)
6	7,03 (1H, <i>dl</i> , $J=7,3$ Hz)	7,05 (1H, <i>dl</i>)
7	7,37 (1H, <i>t</i> , $J=7,9$ Hz)	7,39 (1H, <i>t</i> , $J=7,9$ Hz)
8	7,17 (1H, <i>dl</i> , $J=7,7$ Hz)	7,19 (1H, <i>dl</i> , $J=7,7$ Hz)
OCH₃	3,94 (s)	3,97 (s)
CH₃	2,67 (s)	2,69 (s)

No espectro de HMBC (FIGURA 3.37) observaram-se correlações dos hidrogênios em δ_H 7,37 (H-7) a três ligações (3J) com os carbonos em δ_C 137,5 e 154,7, atribuídos aos carbonos C-5 e C-9. O hidrogênio em δ 7,17 (H-8) mostrou uma correlação a 2J com o sinal em δ 154,7 (C-9) e a 3J com os sinais em δ 127,6 e 116,6, atribuídos aos carbonos C-6 e C-10. Outra correlação que foi observada foi do hidrogênio H-6 (δ 7,03) a três ligações (3J) com o carbono em δ 116,6 (C-10).

Ainda foi possível observar no HMBC as correlações para o sinal em δ 5,66 (H-3) a 2J com o carbono em δ 169,4 atribuído ao carbono C-4 e a 3J com o sinal em δ 116,6 (C-10). O sinal da metoxila em δ 3,94 apresentou uma correlação a 2J com o carbono em δ 169,4 (C-4) e o sinal da metila em δ 2,67 apresentou uma correlação a 2J com o carbono em δ 137,5 (C-5) e correlações a 3J com os sinais em δ 127,6 (C-6) e δ 116,6 (C-10).

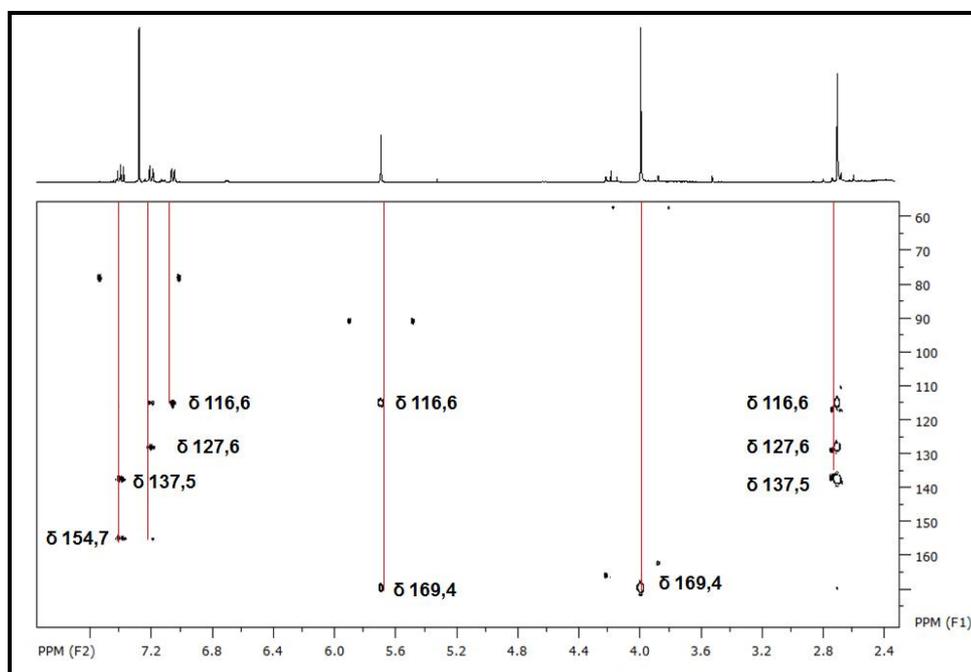
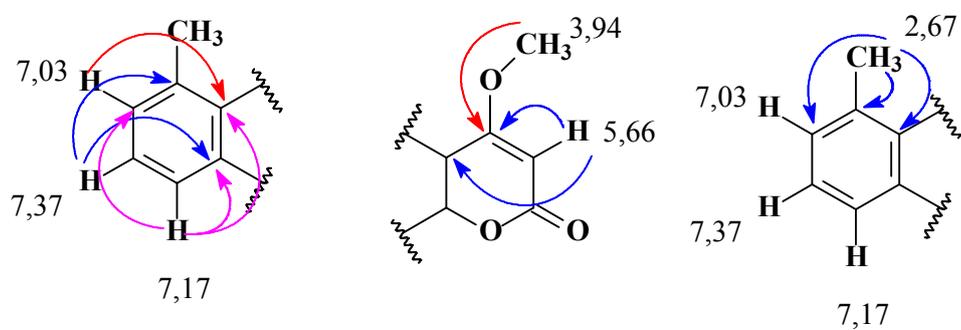


FIGURA 3.37 - Espectro de correlação heteronuclear (1H - ^{13}C), HMBC, (400 MHz, $CDCl_3$) da substância 06.

Os experimentos de g -NOE ^1H - ^1H (FIGURA 3.38) confirmaram que se trata da cumarina 4-metóxi-5-metilcumarina. Quando o sinal dos prótons da metoxila (δ 3,94) foi irradiado, observou-se um incremento no sinal de H-3 (5,66), confirmando a presença da metoxila na posição C-4. Quando o sinal dos prótons referente a metila em δ 2,66 é irradiado é possível observar um incremento do sinal de H-6 (δ 7,03). Foi possível observar um incremento da metoxila (δ 3,94) quando o sinal em δ 5,66 é irradiado. É observado para os sinais dos hidrogênios aromáticos que quando é irradiado o sinal em δ 7,03 (H-6) há um incremento do sinal em δ 7,37 (H-7) e da metila em δ 2,66, para o sinal em δ 7,17 (H-8) observa-se um incremento em δ 7,37 (H-7) e para δ 7,37 um incremento do sinal em δ 7,03 (H-6) e δ 7,17 (H-8).

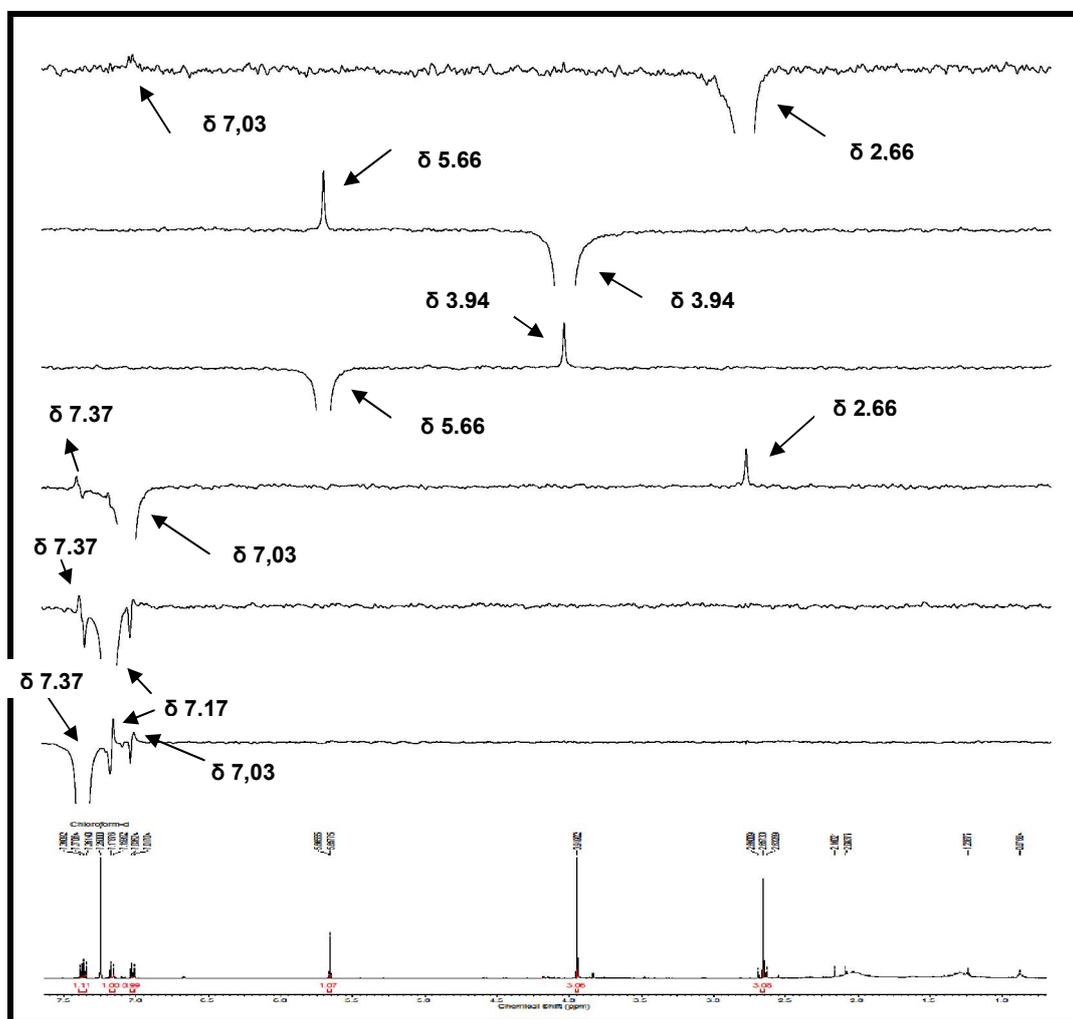
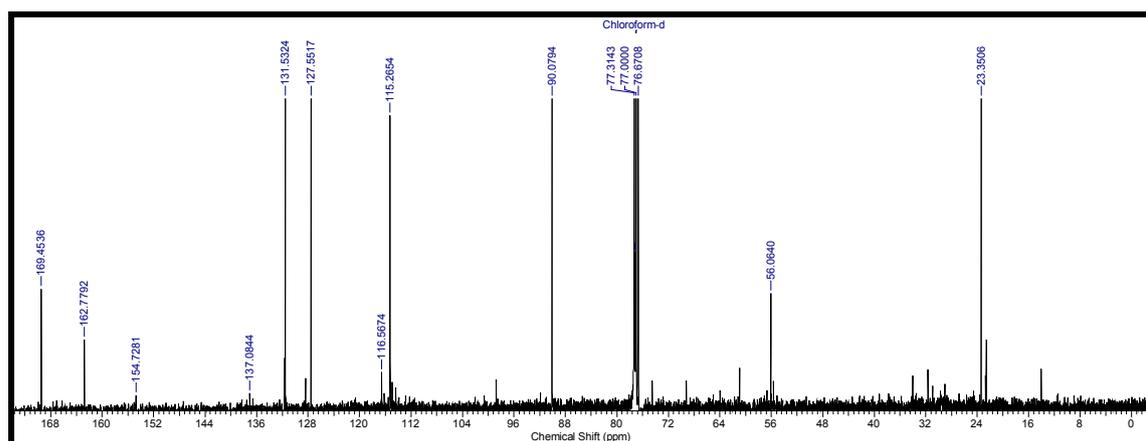


FIGURA 3.38 - Espectros de g -NOE, (^1H - ^1H), (400 MHz, CDCl_3) da substância **06**.

A partir da análise do espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.39) foram observados 11 sinais de carbonos: δ 169,4 (C-4); δ 162,8 (C-2); δ 154,7 (C-9); δ 137,5 (C-5); δ 127,6 (C-6); δ 131,5 (C-7); 116,6 (C-10); δ 115,3 (C-8); δ 90,1 (C-3); δ 56,1 (CH₃-O) e δ 23,3 (CH₃). Todos os sinais foram bem característicos para a estrutura em questão e assim confirmou-se o isolamento da cumarina 4-metóxi-5-metilcumarina, perefiorina ou ekersenina (BOHLMANN et al., 1977).

TABELA 3.15: Dados de RMN ^{13}C de **06**

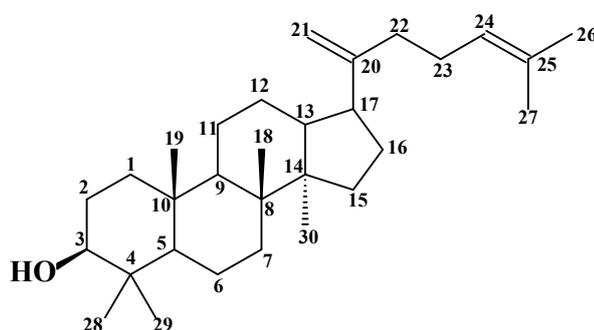
SUBSTÂNCIA 06 (400 MHz, CDCl ₃)	
C ¹³	δ
2	162,8
3	90,1
4	169,4
5	137,5
6	127,6
7	131,5
8	115,3
9	154,7
10	116,6
CH ₃ -O	56,1
CH ₃	23,3

FIGURA 3.39 - Espectro de RMN ^{13}C (400 MHz CDCl₃) da substância **06**.

3.2.4 – Triterpenos

3.2.4.1- Identificação estrutural da substância 07

A substância **07** é um triterpeno do tipo damarano e foi isolado como um sólido branco em grande quantidade da fração hexânica (FAEERTC) proveniente do extrato etanólico das folhas de *T. pallida*. A identificação estrutural foi realizada através de experimentos de RMN ^1H , COSY, HMBC, HSQC, RMN ^{13}C , CG/EM e dados comparativos da literatura (MA et al., 2008; BIANCHINI, 1988).



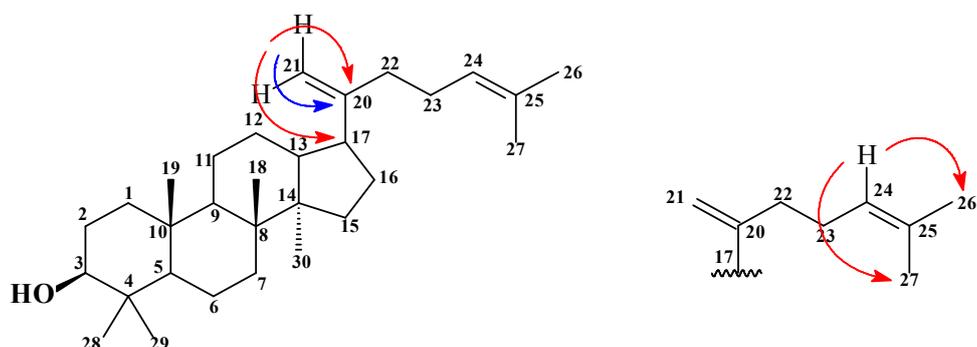
A partir do espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.42) foi possível observar seis sinais referentes a sete grupamentos metílicos em δ_{H} 0,77 (3H, s), 0,85 (3H, s), 0,87 (3H, s), 0,98 (6H, s), 1,62 (3H, s) e 1,69 (3H, s), os quais foram correlacionados com os sinais de carbonos, em δ_{C} 15,4, 16,2, 15,9, (15,6 e 28,9), 17,7 e 25, 7, respectivamente, através do espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C , HSQC, (FIGURA 3.47). Observou-se no RMN ^1H um sinal referente a hidrogênio carbinólico em δ 3,20 (dd, $J= 5,20$ e $11,2$ Hz) e a presença de três sinais de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 4,74 (1H, dl), 4,71 (1H, s) e 5,13 (1H, m).

No espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.43) observou-se 30 sinais de carbonos, sendo quatro deles sinais característicos de carbonos insaturados em δ_{C} 107,5, 124,5, 131,5 e 152,6, atribuídos aos C-21, C-24, C-25 e C-20, respectivamente.

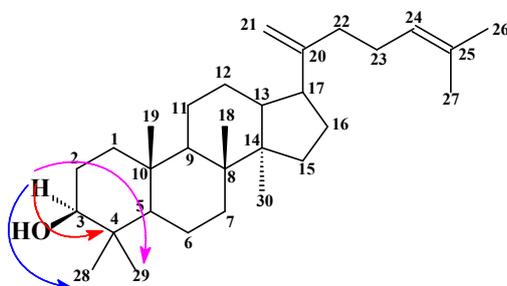
Os dados descritos, juntamente com o espectro de massas (FIGURAS 3.44 e 3.45), o qual forneceu o pico do íon molecular $[\text{M}]^+$ com m/z 426,0 Daltons, possibilitaram atribuir a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

A partir da análise do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, FIGURA 3.48, foi possível observar a correlação dos hidrogênios olefínicos

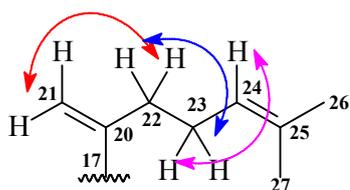
em δ_H 4,71 (1H, *dl*) e 4,74 (1H, *d*) a duas ligações (2J) com o carbono em δ_C 152,6, atribuído ao carbono C-20 e correlações a três ligações (3J) com os carbonos em δ_C 47,8 e 34,1, atribuídos aos carbonos C-17 e C-22. Outra correlação que foi observada no espectro de HMBC foi do hidrogênio H-24 (δ_H 5,13) a três ligações (3J) com os carbonos em δ_C 25,7 (C-26) e δ_C 17,7 (C-27) referentes aos grupamentos metilas (FIGURA 3.48).



Ainda no espectro de HMBC, foi possível observar a correlação do hidrogênio carbinólico em δ_H 3,20 (1H, *d*) a duas ligações (2J) com o carbono em δ_C 39,1 atribuído ao C-4 e a três ligações (3J) com os carbonos em δ_C 28,0 e 15,3, atribuídos aos carbonos C-28 e C-29.



O posicionamento de uma ligação dupla entre os carbonos C-24 e C-25 foi confirmado a partir do espectro de correlação homonuclear de 1H - 1H COSY (FIGURA 3.46) que apresentou acoplamento entre os hidrogênios H-22/H-23, H-22/H-21 e H-23/H-24.



Com base na análise realizada e comparação com dados da literatura, concluiu-se a identificação de um triterpeno de esqueleto damarano, mais conhecido como damaradienol (**07**). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C são apresentados nas TABELAS 3.16 e 3.17, respectivamente.

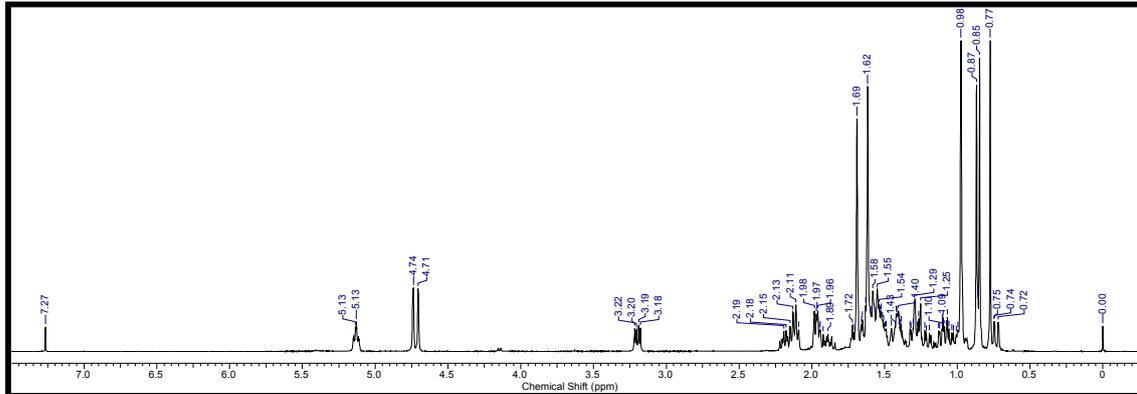


FIGURA 3.40 - Espectro de RMN ^1H de **07** (400 MHz, CDCl_3).

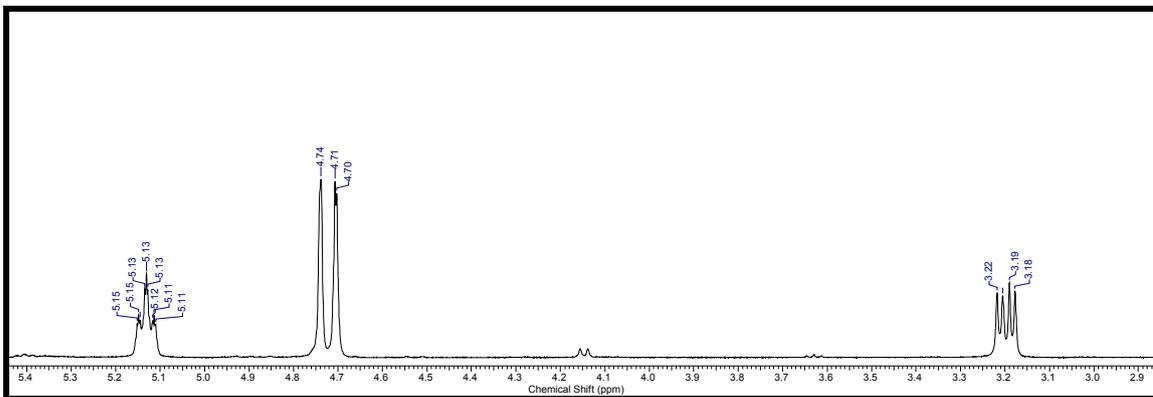


FIGURA 3.41 - Ampliação da região de δ 5,4 a 2,9 do espectro de RMN ^1H de **07**.

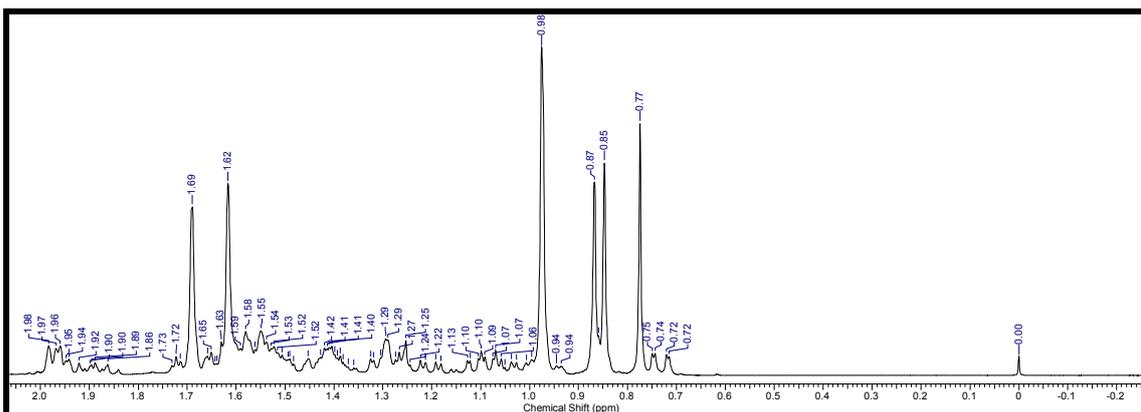


FIGURA 3.42 - Ampliação da região de δ 2,0-0 ppm do espectro de RMN ^1H de **07**.

TABELA 3.16 - Dados de RMN ^1H de **07** e comparação com a literatura.

SUBSTÂNCIA 07 (400 MHz, CDCl_3)		MA et al., 2008 (400 MHz, CDCl_3)
^1H	δ, J (Hz)	δ, J (Hz)
3	3,20 (1H, <i>dd</i> , J= 5,20 e 11,2 Hz)	3,18 (1H, <i>dd</i> , J= 5,16 e 11,0 Hz)
18	0,87 (3H, <i>s</i>)	0,84 (3H, <i>s</i>)
19 e 23	0,98 (6H, <i>s</i>)	0,95 (6H, <i>s</i>)
21	4,71 (1H, <i>dl</i>)	4,67 (1H, <i>s</i>)
21	4,74 (1H, <i>s</i>)	4,68 (1H, <i>s</i>)
24	5,13 (1H, <i>m</i>)	5,16 (1H, <i>s</i>)
26	1,70 (3H, <i>sl</i>)	1,66 (3H, <i>sl</i>)
27	1,62 (3H, <i>sl</i>)	1,58 (3H, <i>sl</i>)
29	0,77 (3H, <i>s</i>)	0,75 (3H, <i>s</i>)
30	0,85 (3H, <i>s</i>)	0,82 (3H, <i>s</i>)

TABELA 3.17- Dados de RMN ^{13}C de **07** e comparação com a literatura.

^{13}C	Substância 07	BIANCHINI, 1988
	(100 MHz, CDCl_3)	(50.3 MHz, CDCl_3)
	δ	δ
1	39,1	39,2
2	27,4	27,5
3	78,9	78,9
4	39,1	39,0
5	55,8	55,9
6	18,3	18,3
7	35,4	35,5
8	40,4	40,5
9	50,9	51,0
10	37,2	37,3
11	21,3	21,4
12	24,9	25,0
13	45,2	45,3
14	49,4	49,5
15	31,3	31,4
16	27,0	27,1
17	47,8	47,8
18	15,9	16,0
19	15,6	15,7
20	152,6	152,7
21	107,5	107,6
22	34,1	34,1
23	28,9	28,9
24	124,4	124,5
25	131,4	131,4
26	25,7	25,7
27	17,7	17,7
28	28,0	28,1
29	15,3	15,4
30	16,2	16,3

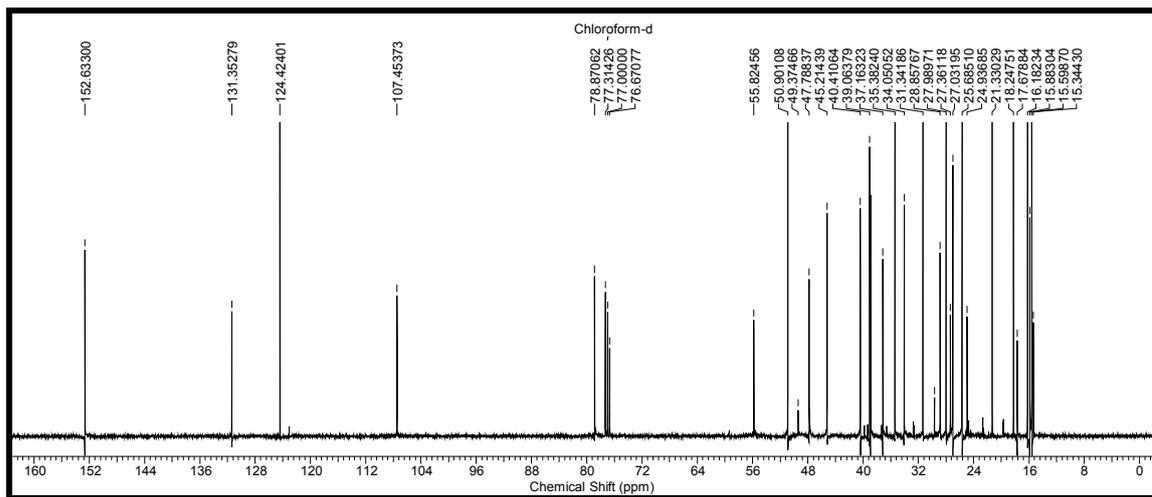


FIGURA 3.43- Espectro de RMN ^{13}C de **07** (100 MHz, CDCl_3).

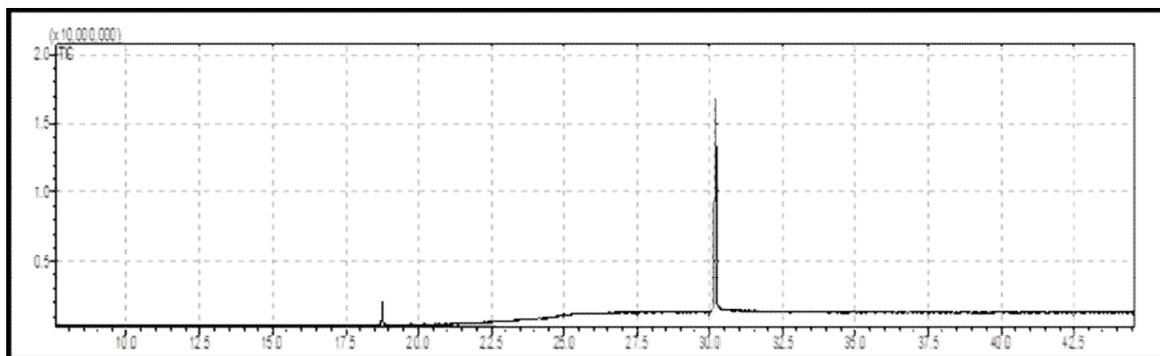


FIGURA 3.44- Cromatograma obtido no CG-EM para **07**. Condições: gás de arraste: N_2 ; temperatura inicial da coluna: $100\text{ }^\circ\text{C}$; tempo inicial de 5 min.; a temperatura da coluna aumentou de $11\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Até $300\text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo nesta temperatura por 20 minutos.

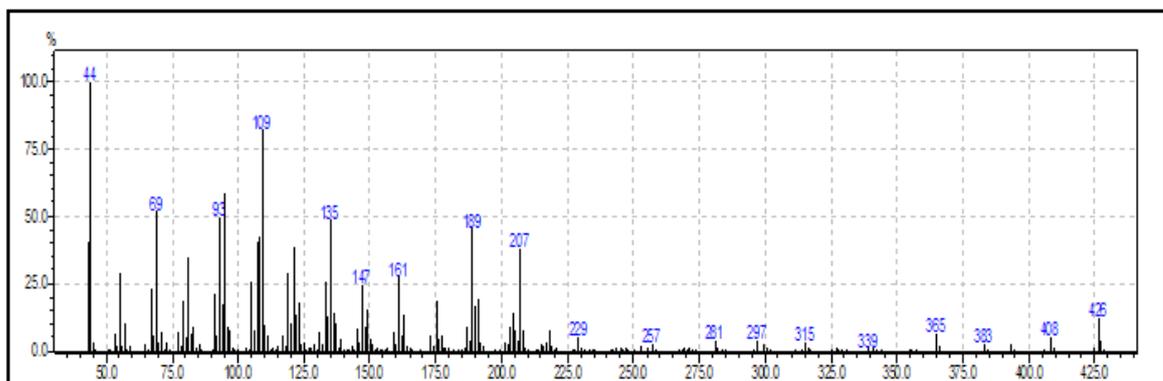


FIGURA 3.45 - Espectro de massas (70 eV , IE) de **07**.

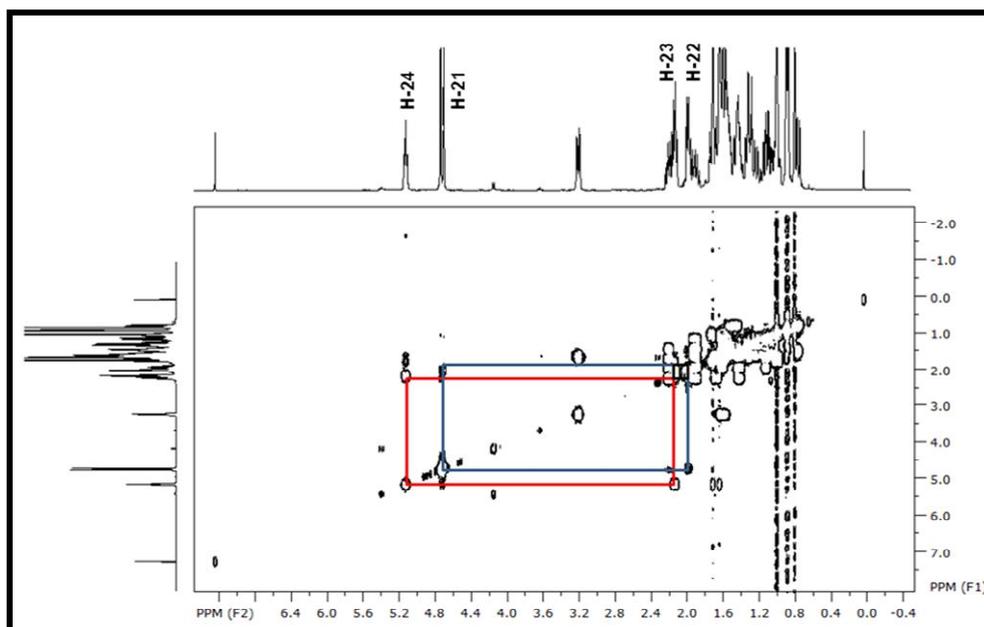


FIGURA 3.46 - Espectro de correlação homonuclear ¹H-¹H, (COSY), de **07** (400 MHz, CDCl₃).

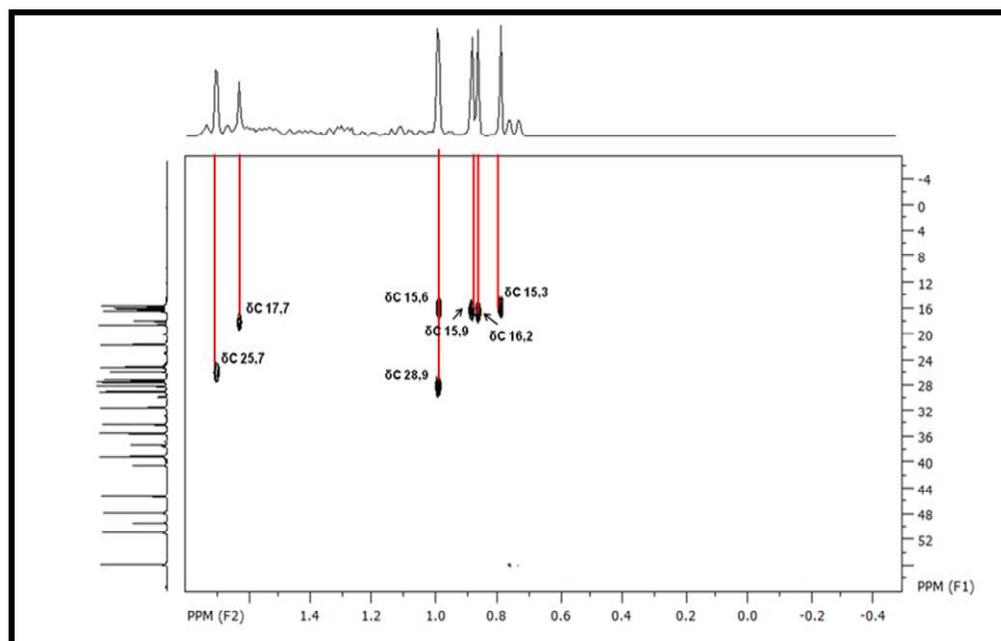


FIGURA 3.47 - Ampliação da região dos hidrogênios alifáticos do espectro de correlação heteronuclear (¹H-¹³C), HSQC, de **07**, (400 MHz, CDCl₃).

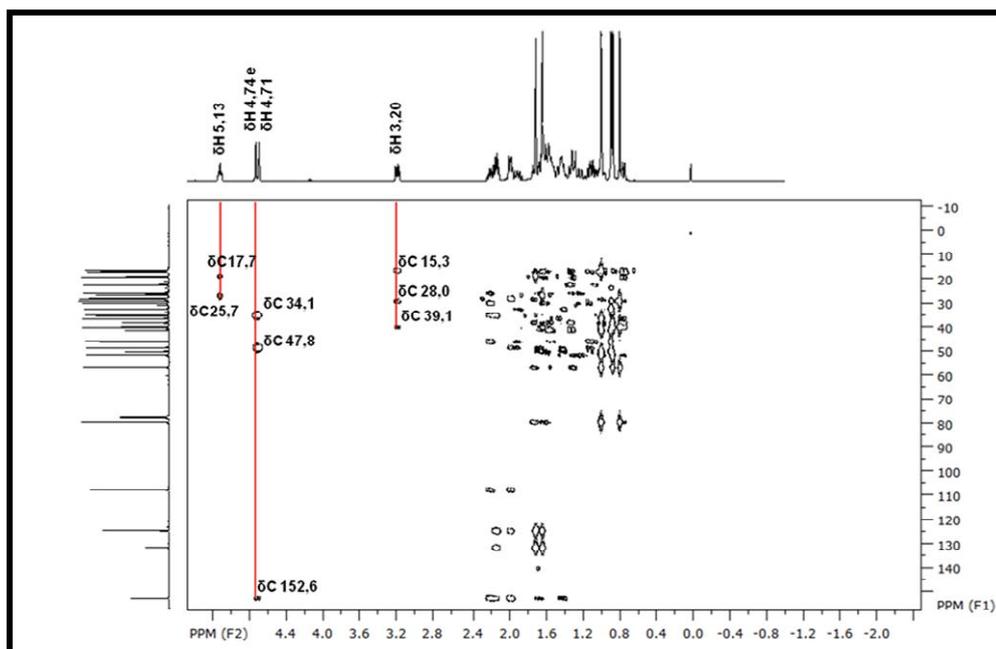
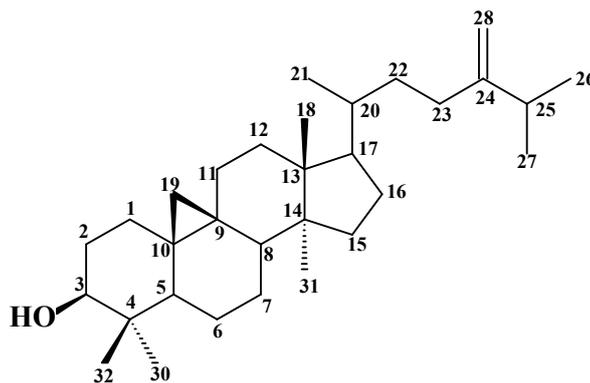


FIGURA 3.48 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HMBC, de **07**, (400 MHz, CDCl_3).

3.2.4.2- Identificação estrutural da substância **08**

O triterpeno do tipo cicloartano foi isolado do extrato hexânico do caule de *To. ciliata* e teve sua estrutura determinada com base nos experimentos de RMN ^1H , ^{13}C e por comparação com dados da literatura (KAWAI et al., 2007; YOSHIDA et al., 1989).



Analisando o espectro de RMN ^1H (FIGURAS 3.49 e 3.51), observaram-se na região entre δ 0,3-1,5 dois dubletos em δ 0,33 (1H, $J = 4,3$ Hz) e δ 0,55 (1H, $J = 4,3$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos do anel ciclopropano

característicos de cicloartanos, e sinais para sete grupos metílicos em δ 0,80 (3H, s), δ 0,89 (3H, d, $J = 6,4$ Hz), 0,88 (3H, s), δ 0,96 (6H, s), δ 1,01 (3H, d, $J = 2,8$ Hz) e δ 1,03 (3H, d, $J = 2,8$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-31, H-21, H-32, H-18/H-30, H-27 e H-26, respectivamente. Também foi possível observar no espectro de RMN ^1H um sinal em δ 2,23 (1H, *m*) o qual foi relacionado ao hidrogênio metínico H-25. Na ampliação do espectro de RMN ^1H (FIGURA 3.50) foi observado sinais em δ 4,65 (1H, *s*) e δ 4,60 (1H, *qt*, $J = 1,5$) atribuídos aos hidrogênios do metileno terminal ligados ao C-28 e um duplo dubleto em δ 3,22 (1H, $J = 11,3$ e 4,3) referente ao hidrogênio oximetínico H-3 α o qual acopla com os hidrogênios H-2 α e H-2 β .

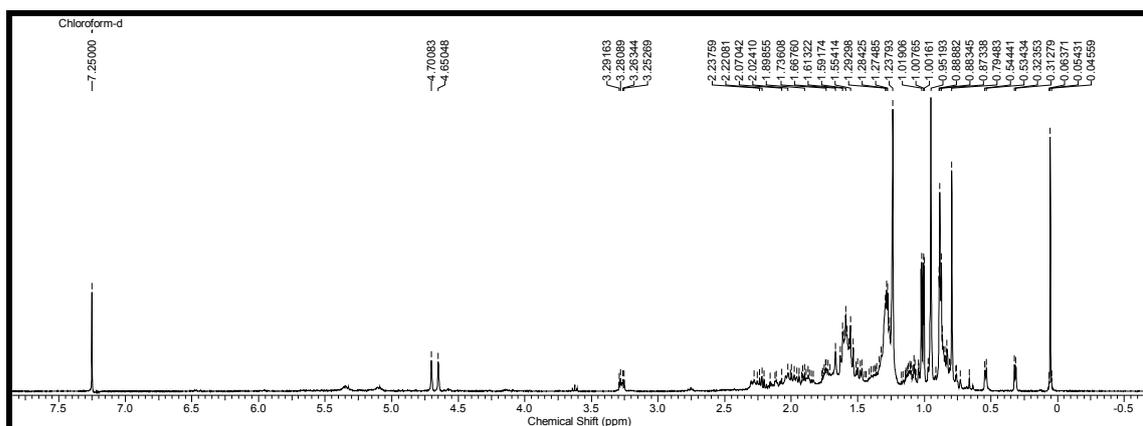


FIGURA 3.49 - Espectro de RMN ^1H de **08** (400 MHz, CDCl_3).

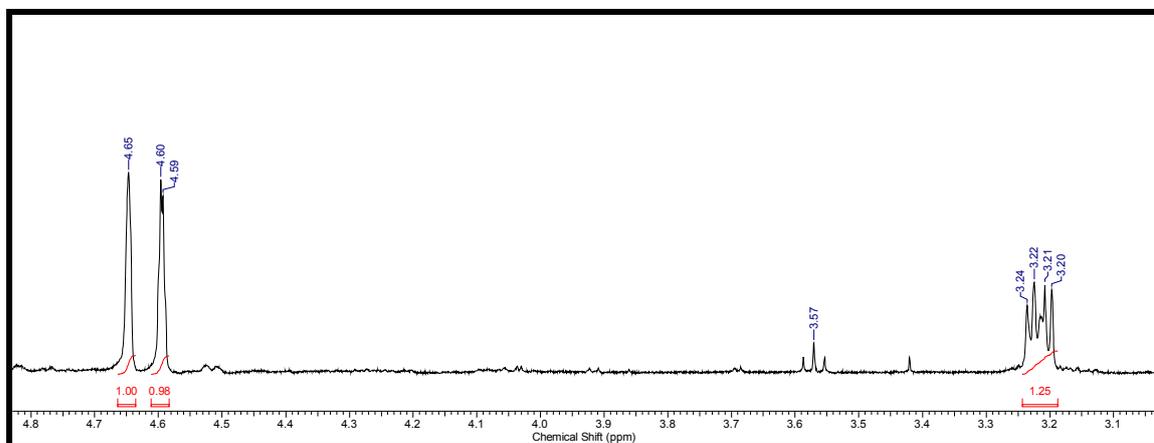


FIGURA 3.50- Ampliação da região δ 4,80 a δ 3,10 ppm do espectro de RMN ^1H de **08**.

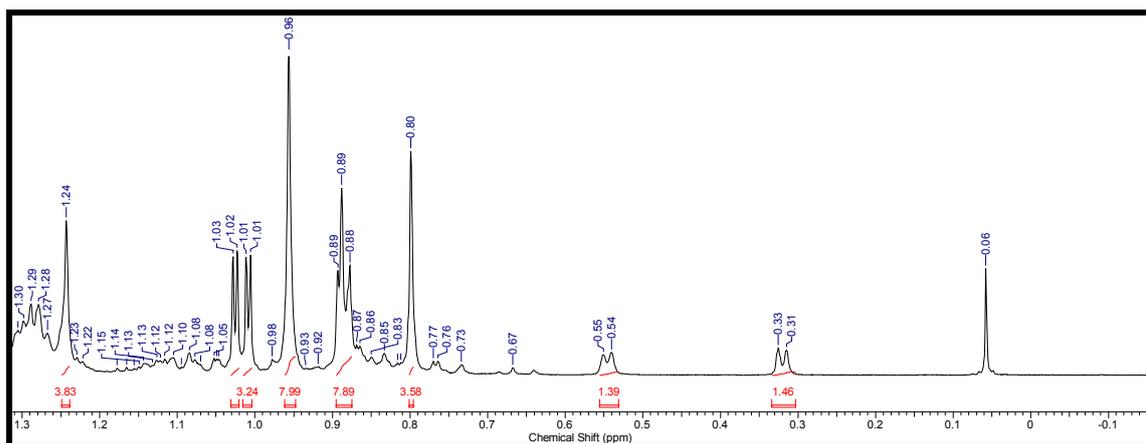


FIGURA 3.51 - Ampliação da região δ 1,30 a δ 0 ppm do espectro de RMN ^1H de **08**.

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.52) confirmou a presença do metileno terminal em C-28 o qual apresentou sinais em δ 156,9 e δ 105,9 atribuídos aos carbonos C-24 e C-28, respectivamente. Foi observado um sinal em δ 78,8 atribuído ao carbono oximetínico C-3.

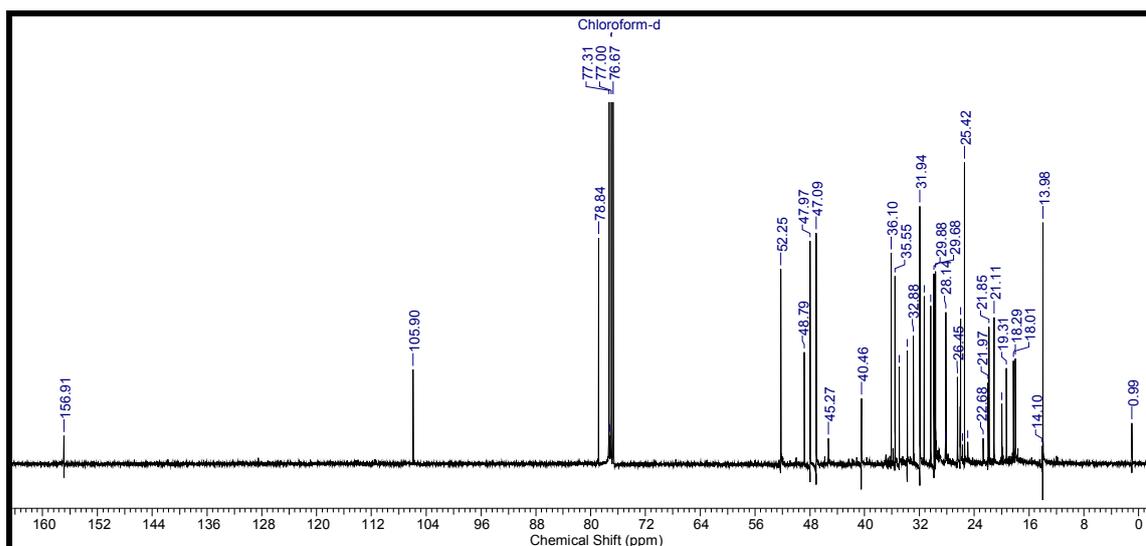


FIGURA 3.52 - Espectro de RMN ^{13}C de **08** (100 MHz, CDCl_3).

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C são apresentados nas TABELAS 3.18 e 3.19, respectivamente. Esses dados estão de acordo com a literatura para o 24-metilenocicloartanol (KAWAI et al., 2007).

TABELA 3.18 - Dados de RMN ^1H de **08** e comparação com a literatura.

	Substância 08 (400 MHz, CDCl_3)	KAWAI et al., 2007 (500 MHz, CDCl_3)
^1H	δ, J (Hz)	δ, J (Hz)
3	3,22 (1H, <i>dd</i> , $J = 11,3$ e $4,3$)	3,28 (1H, <i>m</i>)
18	0,96 (3H, <i>s</i>)	0,96 (3H, <i>s</i>)
19	0,55 (1H, <i>d</i> , $J = 4,3$)	0,55 (1H, <i>d</i> , $J = 4,1$)
	0,33 (1H, <i>d</i> , $J = 4,3$)	0,33 (1H, <i>d</i> , $J = 4,1$)
21	0,89 (3H, <i>d</i> , $J = 6,4$)	0,90 (3H, <i>d</i> , $J = 6,4$)
25	2,23 (1H, <i>m</i>)	2,23 (1H, <i>sept</i> , $J = 6,9$)
26	1,03 (3H, <i>d</i> , $J = 2,8$)	1,03 (3H, <i>d</i> , $J = 2,8$)
27	1,01 (3H, <i>d</i> , $J = 2,8$)	1,02 (3H, <i>d</i> , $J = 2,8$)
28	4,65 (1H, <i>sl</i>)	4,72 (1H, <i>sl</i>)
	4,60 (1H, <i>ql</i> , $J = 1,5$)	4,67 (1H, <i>ql</i> , $J = 1,5$)
30	0,96 (3H, <i>s</i>)	0,96 (3H, <i>s</i>)
31	0,80 (3H, <i>s</i>)	0,81 (3H, <i>s</i>)
32	0,88 (3H, <i>s</i>)	0,90 (3H, <i>s</i>)

TABELA 3.19 - Dados de RMN ^{13}C de **08** e comparação com a literatura.

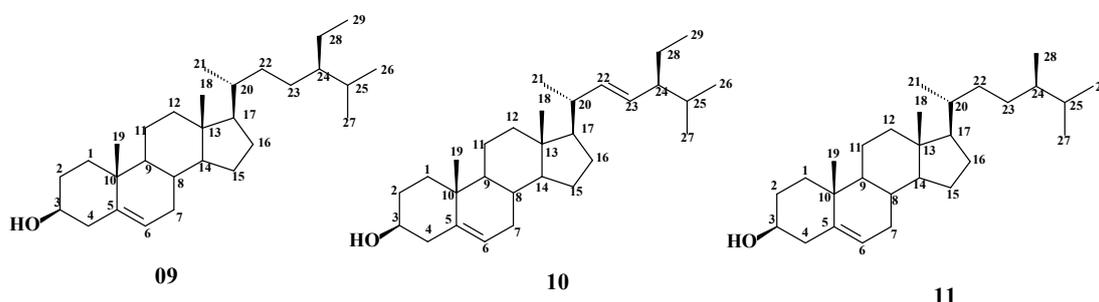
^{13}C	Substância 08	KAWAI et al., 2007	YOSHIDA et al., 1989
	(100 MHz, CDCl_3)	(125 MHz, CDCl_3)	(125 MHz, piridina- d_5)
	δ (ppm)	δ (ppm)	
1	32,88	#	32,56
2	31,30	#	31,26
3	78,84	78,9	78,23
4	40,46	#	41,12
5	47,09	#	47,65
6	21,11	#	21,48
7	26,45	#	26,34
8	47,97	#	48,04
9	19,98	#	20,28
10	26,00	#	26,93
11	26,04	#	26,94
12	33,78	#	33,49
13	45,27	45,3	45,85
14	48,79	#	49,27
15	35,55	#	35,94
16	28,14	#	28,42
17	52,25	#	52,77
18	18,01	18,0	18,21
19	29,88	29,9	29,91
20	36,10	#	36,46
21	18,29	18,3	18,69
22	34,96	#	35,71
23	31,94	#	31,84
24	156,91	156,9	156,91
25	33,78	33,8	34,29
26	21,97	22,0	22,18
27	21,85	21,9	22,08
28	105,90	105,9	106,71
29	-	-	-
30	25,42	25,4	26,14
31	13,98	14,0	14,68
32	19,31	19,3	19,65

valores de deslocamento químico não informado pelos autores.

3.2.5- Esteroides

3.2.5.1- Identificação estrutural das substâncias 09, 10 e 11

Os esteróides sitosterol (**09**) estigmasterol (**10**) e campesterol (**11**) foram isolados em mistura da fração hexânica proveniente dos ramos de *Trichilia pallens* e foram identificados a partir da análise dos experimentos de RMN ¹H e por CG/EM. Os dados obtidos estavam de acordo com a literatura para estes esteróides (SUGA e KONDO, 1974 e SAKAKIBARA et al., 1983).



Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis do lanosterol, porém sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Estes tipos de esteróides são de ampla ocorrência no reino vegetal e normalmente aparecem em mistura devido as propriedades físicas semelhantes (DEWICK, 2001).

A partir da análise do espectro de RMN ¹H (FIGURA 3.53) observou-se sinais característicos de esteróides, tais como de hidrogênio olefínico (δ H 5,35, *d*, $J = 6,0$ Hz, H-6) e de hidrogênio oximetínico (δ H 3,52, *m*, H-3), além de um acúmulo de sinais na região de δ H 0,6 a δ H 2,4 referentes aos vários grupos de hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos, os quais caracterizam a presença de esqueleto esteroidal. O espectro apresentou duplos dubletos em δ H 5,13 ($J = 15,5$ e $8,0$ Hz) e δ H 5,01 ($J = 15,5$ e $8,0$ Hz) referentes aos hidrogênios vinílicos H-22 e H-23, respectivamente, os quais indicaram a presença do estigmasterol (**10**) na mistura.

A mistura foi submetida à CG-EM, para confirmação dos esteróides propostos. A análise via CG (FIGURA 3.54), revelou a presença de três substâncias na mistura. Nos espectros de massas (FIGURAS 3.55, 3.56 e 3.57), pôde-se observar os picos dos íons moleculares com m/z 414, 412 e 400 Daltons, valores

este compatíveis para as fórmulas moleculares $C_{29}H_{50}O$, $C_{29}H_{48}O$ e $C_{28}H_{48}O$, referentes ao sitosterol (**09**), estigmasterol (**10**) e campesterol (**11**), respectivamente.

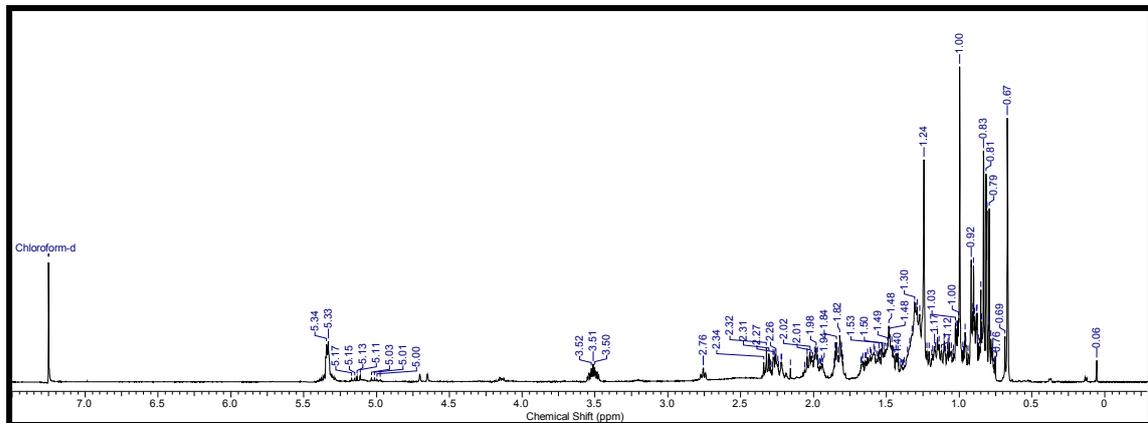


FIGURA 3.53 - Espectro de RMN 1H da mistura dos esteróides, sitosterol (**09**), estigmasterol (**10**) e campesterol (**11**), (400 MHz, $CDCl_3$).

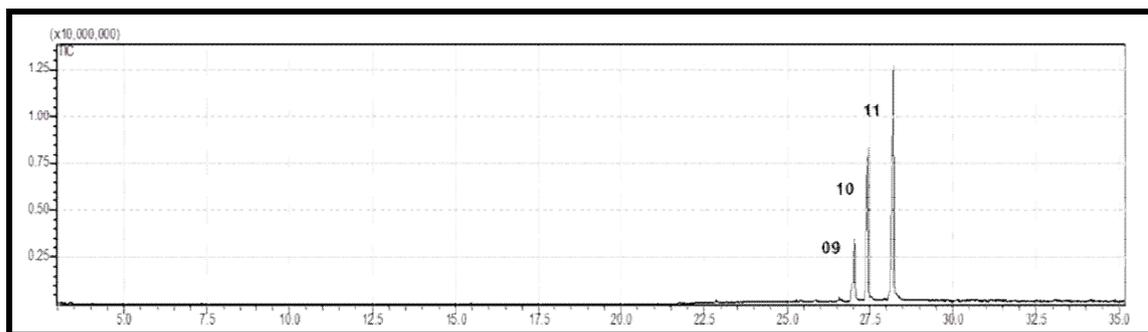


FIGURA 3.54- Cromatograma obtido no CG-EM para os esteróides **09**, **10** e **11**. Condições: gás de arraste: N_2 ; temperatura inicial da coluna: $100^\circ C$; tempo inicial de 5 min.; a temperatura da coluna aumentou de $11^\circ C/min.$ até $300^\circ C$, permanecendo nesta temperatura por 12 minutos.

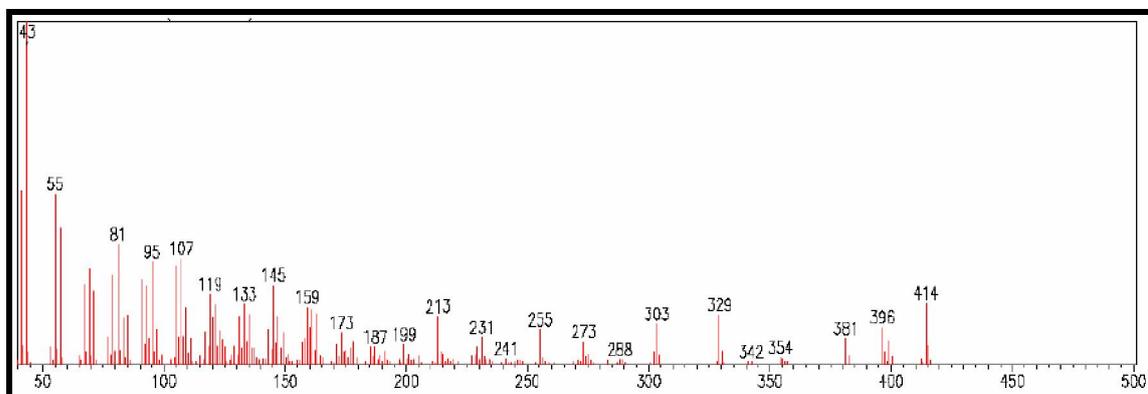


FIGURA 3.55 - Espectro de massas (70 eV, IE) do esteróide **09**.

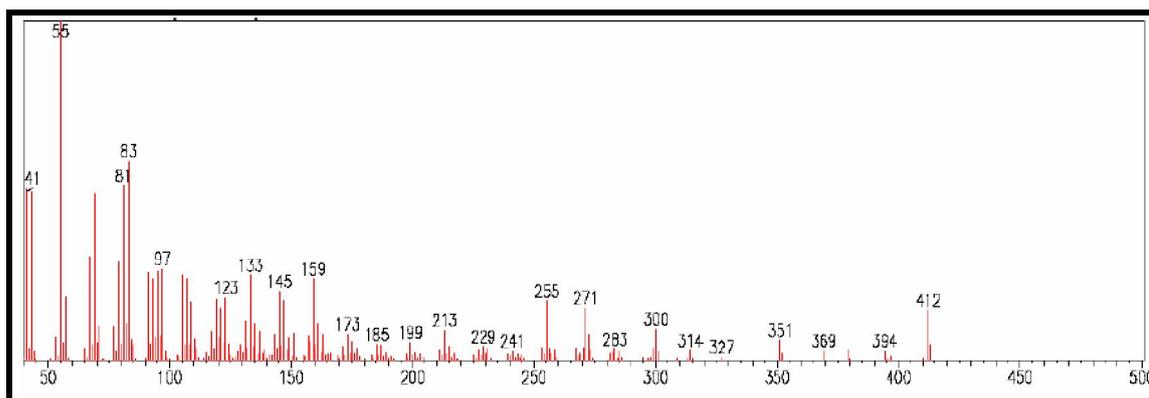


FIGURA 3.56 - Espectro de massas (70 eV, IE) do esteróide **10**.

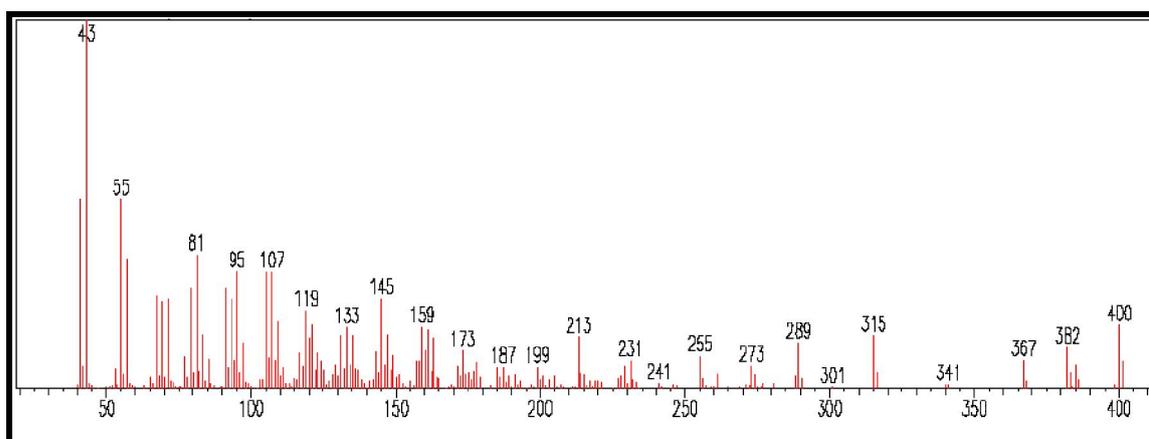


FIGURA 3.57 - Espectro de massas (70 eV, IE) do esteróide **11**.

3.2.6 - Triglicerídeo

3.2.6.1- Identificação estrutural da substância **12**

A substância **12** trata-se de um triglicerídeo e foi isolado da fração hexânica (FHEEFRTC) proveniente do extrato etanólico dos frutos de *To. ciliata* e com base em experimentos de RMN ^1H e por comparação com dados da literatura foi possível a identificação (DE PAULA et al, 2011). Observou-se no espectro de RMN ^1H de **12** (FIGURA 3.58) tripletos em δ 0,88 e δ 0,96 típicos de metilas terminais; um sinal intenso em δ 1,29 de metilenos de cadeia acila, um sinal em δ 1,59 referente aos metilenos β à carboxila, um multiplete em δ 2,03 de metilenos vizinhos à ligação dupla na cadeia acila, um tripleto em δ 2,29 do metileno α a carboxila, sinais de dubletos em δ 4,28 e δ 4,11 relativos a metilenos acilcarbinólicos

e um multipeto em δ 5,33 referente aos hidrogênios olefínicos da cadeia acila e referente também ao metino acilcarbinólico.

Para se determinar as cadeias do triglicerídeo fez-se a reação de transesterificação e foram identificados por análise em CG/EM como sendo: ácido hexadecanóico (38,20 %), ácido octadecenóico (52,54%) e ácido octadecanóico (9,26 %).

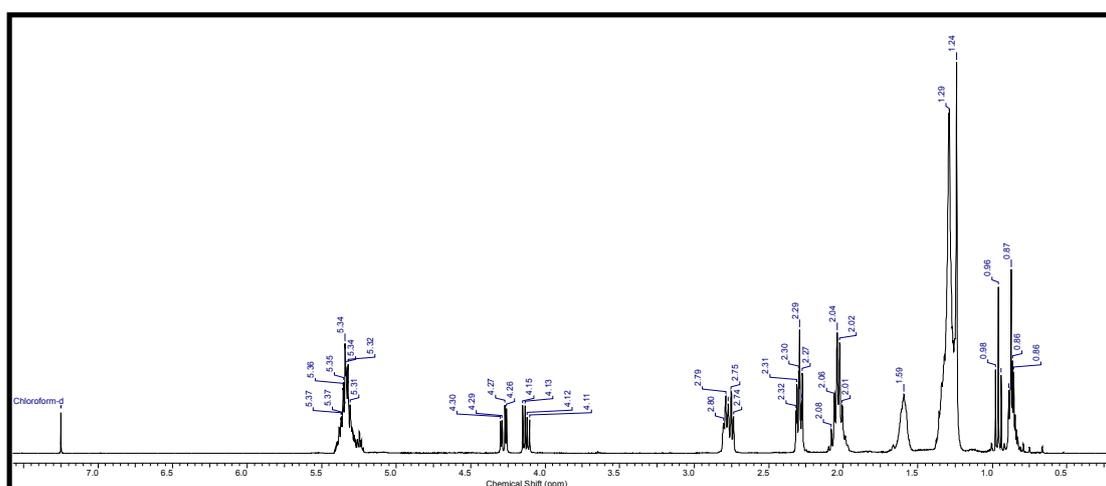
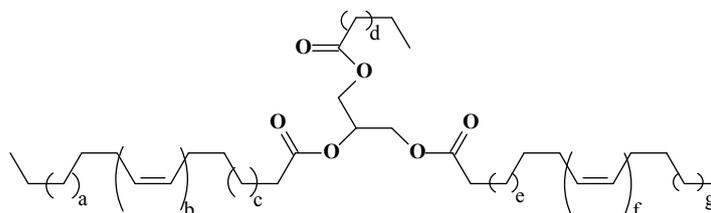
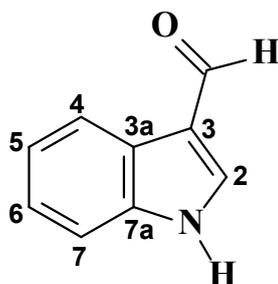


FIGURA 3.58 - Espectro de RMN ¹H da substância **12** (400 MHz, CDCl₃).

3.2.7 - Alcaloide

3.2.7.1- Identificação estrutural da Substância 14

A substância **14** foi isolada da fração diclorometânica das folhas de *T. pallens* e teve sua estrutura caracterizada a partir de dados de RMN ¹H, HSQC, CG-EM e dados da literatura (DUARTE e FERREIRA, 2007).



O espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 3.59 e 3.60) da substância **14**, apresentou um singlete em δ 10,07 característico de hidrogênio de um grupo aldeídico presente na molécula. Em aproximadamente δ 8,70 (*s*) observou-se uma banda alargada característica de hidrogênio ligado a nitrogênio e em δ 7,85 um dubleto atribuído ao H-2 do anel indólico. Também foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,33 (*m*) referente ao H-4 mais desblindado devido a presença do grupo aldeídico vizinho, um multiplete em δ 7,44 atribuído ao H-7 e um multiplete em δ 7,33 referentes aos hidrogênios H-5 e H-6.

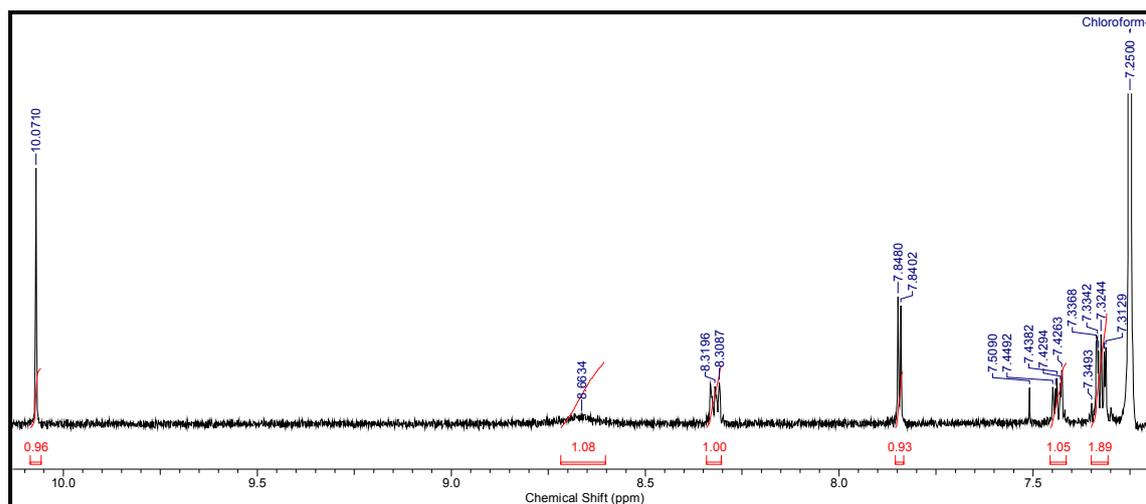


FIGURA 3.59 - Espectro de RMN de ^1H da substância **14** (400 MHz, CDCl_3).

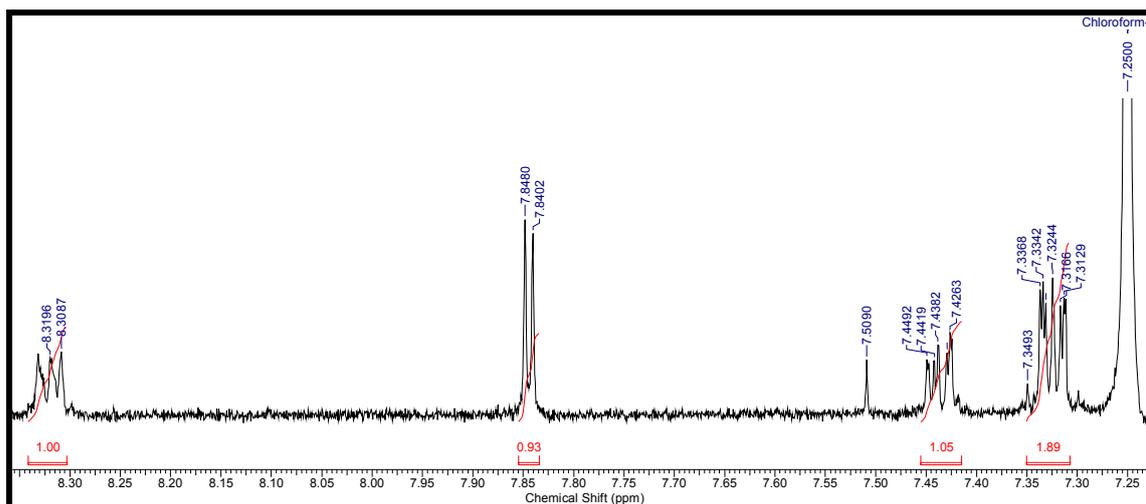


FIGURA 3.60 - Ampliação da região δ 8,40 a 7,30 do espectro de RMN de ^1H de **14** (400 MHz, CDCl_3).

TABELA 3.20- Dados de RMN ^1H de **14** e comparação com a literatura.

^1H	SUBSTÂNCIA 04 (400 MHz, CDCl_3)	DUARTE e FERREIRA, 2007 (400 MHz, CDCl_3)
	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
CHO	10,07 (1H, s)	10,08 (1H, s)
1	8,70 (1H, <i>sl</i> , N-H)	8,77 (1H, <i>sl</i> , N-H)
2	7,85 (1H, <i>d</i> , $J=3,0$ Hz)	7,86 (1H, <i>d</i> , $J=2,8$ Hz)
4	8,33 (1H, <i>m</i>)	8,33 (1H, <i>m</i>)
5 e 6	7,33 (1H, <i>m</i>)	7,33 (1H, <i>m</i>)
7	7,44 (1H, <i>m</i>)	7,44 (1H, <i>m</i>)

A partir da análise do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQC, FIGURA 3.61, foi possível observar as correlações a 1J dos sinais em δ 10,07 com o carbono em δ 185,1, característico de aldeídico, em δ 7,85 (H-2) com o deslocamento em δ 135,3 (C-2) e a correlação dos hidrogênios H-5 e H-6 em δ 7,33 com o carbono em δ 124,0.

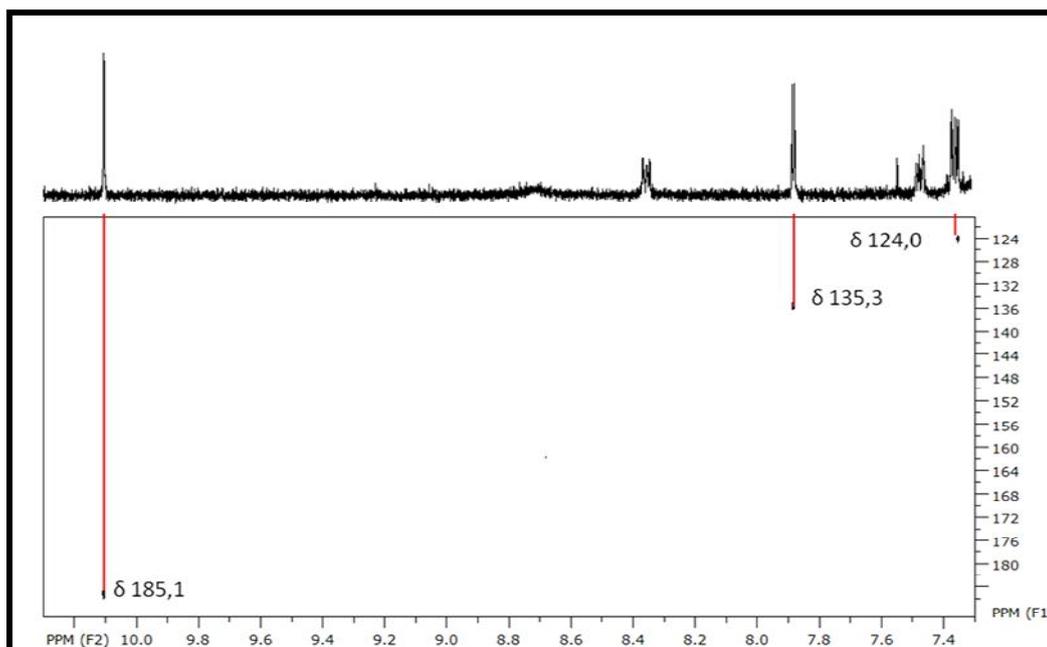


FIGURA 3.61 - Espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C), HSQC, de **14** (400 MHz, CDCl_3).

A substância foi submetida à análise via CG-EM, para confirmação da estrutura a partir da sua massa molecular. A análise via CG-EM (FIGURAS 3.62 e 3.63), revelou o pico do íon molecular em $m/z = 145$ Daltons, sugerindo que a fórmula molecular do composto em questão seja $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$, confirmando a estrutura do 3-indolcarbaldeído. Pelo levantamento realizado, é uma substância conhecida, encontrada tanto como produto natural como sintético, inclusive pode ser encontrada em catálogos da Merck Millipore (804726) para venda, sendo muito utilizada em síntese de outros produtos. Em plantas, foi relatada em *Euphorbia lagascae* pertencente a família Euphorbiaceae (DUARTE e FERREIRA, 2007), não sendo reportado em Meliaceae.

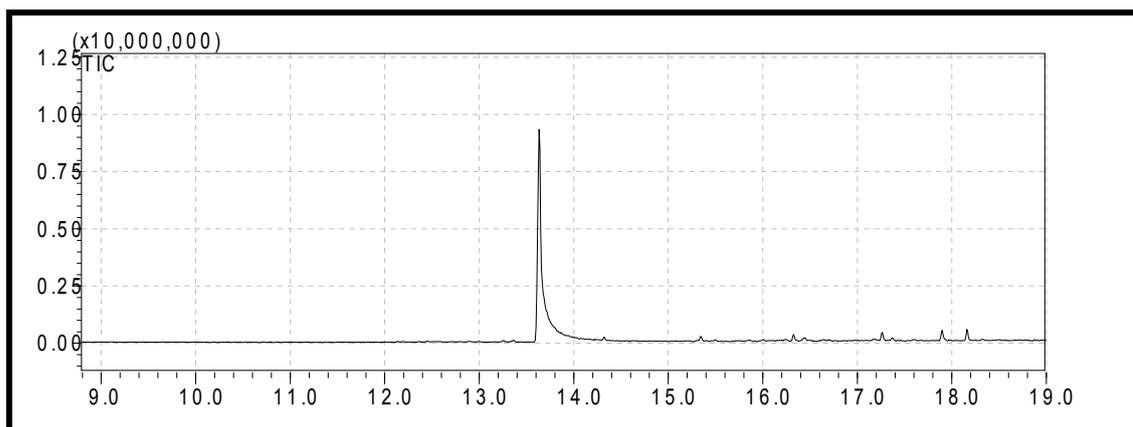


FIGURA 3.62- Cromatograma obtido por CG-EM para a substância **14**. Condições: gás de arraste: N₂; temperatura inicial da coluna: 120°C; tempo inicial de 5 min.; a temperatura da coluna aumentou de 11 °C/min. até 300 °C, permanecendo nesta temperatura por 12 minutos.

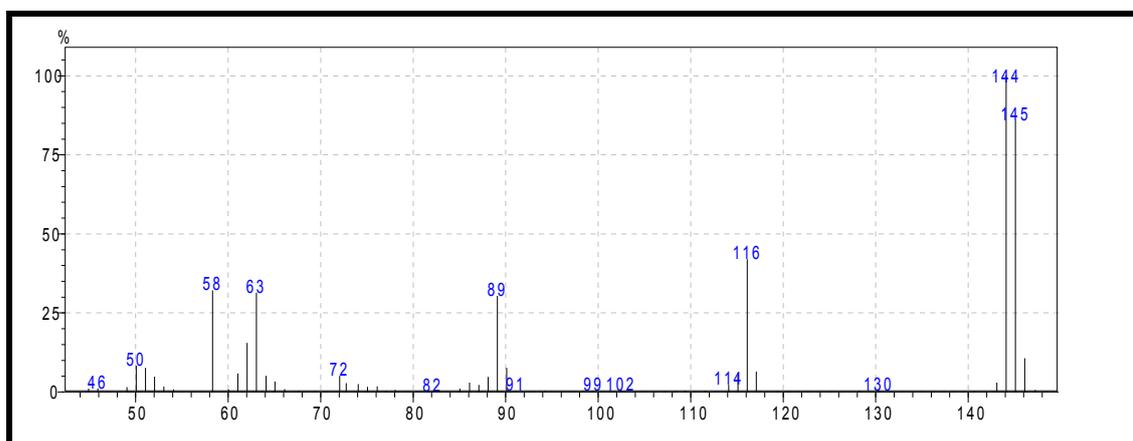
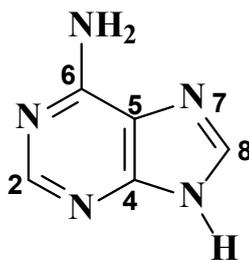


FIGURA 3.63 - Espectro de massas (70 eV, IE) da substância **14**.

3.2.8 – Purina

3.2.8- Identificação estrutural da substância 15

A substância 15 é uma purina e foi isolada da fração acetato de etila (FAEEFTPL) proveniente do extrato etanólico das folhas de *Trichilia pallens* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ¹H, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC, ESI-MS e comparação com dados da literatura (BREITMAIER et al., 1974).



A partir do espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 3.64 e 3.65) observaram-se dois singletos em δ 8,18 e δ 8,11 referentes ao hidrogênios de iminas H-2 e H-8, respectivamente. Também foi observado no espectro um singlete alargado em δ 8,54 característico de hidrogênio ligado a nitrogênio. Estes sinais caracterizam uma purina (TABELA 3.21).

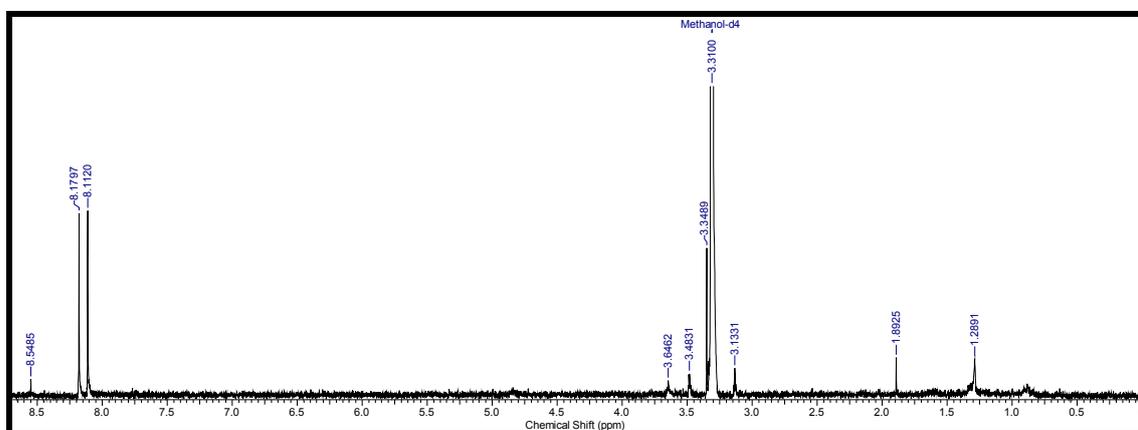


FIGURA 3.64 - Espectro de RMN ^1H da substância **15** (400 MHz, CD_3OD).

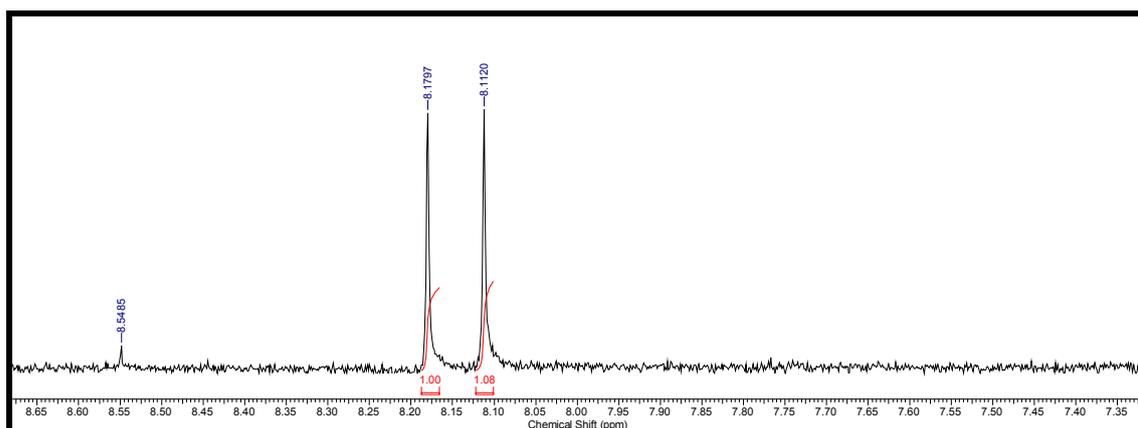
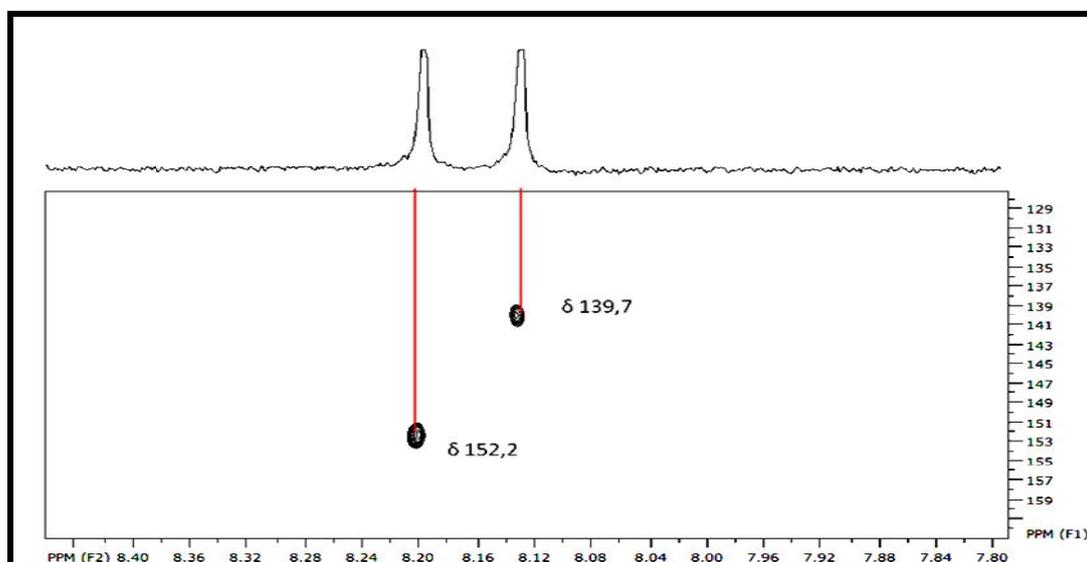


FIGURA 3.65 - Ampliação da região 8,6 a 7,3 ppm do espectro de RMN ^1H da substância **15** (400 MHz, CD_3OD).

TABELA 3.21- Dados de RMN ^1H da substância **15**.

SUBSTÂNCIA 15 (400 MHz, CD_3OD)	
H	δ , J (Hz)
2	8,18 (1H, s)
8	8,11 (1H, s)
H-N	8,54 (1H, s/)

No espectro heteronuclear de HSQC (FIGURA 3.66) é observado correlações a 1J dos sinais em δ 8,18 (H-2) com o carbono em δ 152,2 (C-2) e o hidrogênio em δ 8,11 (H-8) com o sinal em δ 139,7 (C-8) o que indica a presença de uma unidade de purina de acordo com a literatura (BREITMAIER et al., 1974).

FIGURA 3.66- Ampliação do espectro de HSQC da substância **15** (400 MHz, CD_3OD).

A partir da análise do espectro de correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) HMBC, FIGURA 3.67, foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ 8,18 (H-2) a três ligações (3J) com os carbonos em δ 150,7 e 155,3, os quais foram atribuídos aos carbonos C-4 e C-6, respectivamente. O hidrogênio em δ 8,11 (H-8) também apresentou correlações a 3J com os carbonos em δ 150,7 (C-4) e 117,2, sendo este último atribuído ao C-5. Estes dados confirmam a estrutura, já que os

dados (BREITMAIER et al., 1974) de RMN de ^{13}C para esta molécula são: 152,45 (C-2); 151,35 (C-4); 117,3 (C-5); 155,35 (C-6) e 139,4 (C-8).

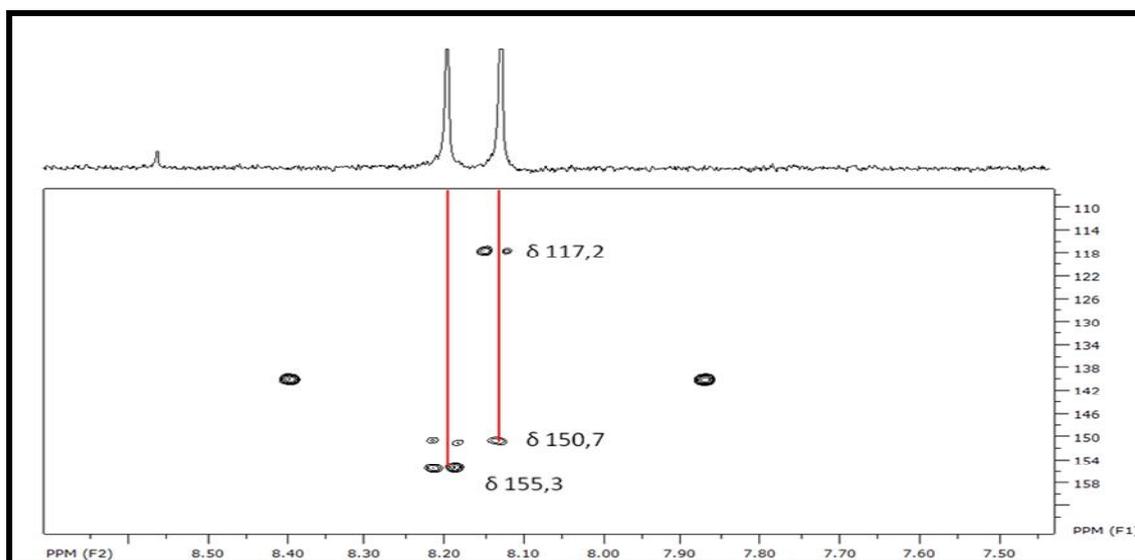
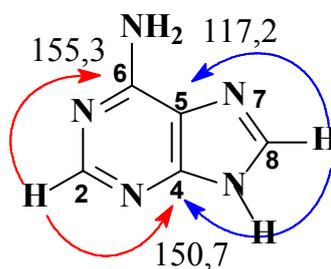


FIGURA 3.67 - Ampliação do espectro de HMBC da substância **15** (400 MHz, CD_3OD).

A substância foi submetida à análise via ESI-MS, para confirmação da estrutura a partir da sua massa molecular. A análise foi realizada no modo positivo de ionização (FIGURA 3.68), o qual revelou o pico do íon molecular em $m/z = 136,1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ Daltons, sugerindo que a fórmula molecular do composto em questão seja $\text{C}_5\text{N}_5\text{H}_5$, confirmando a estrutura de **15**.

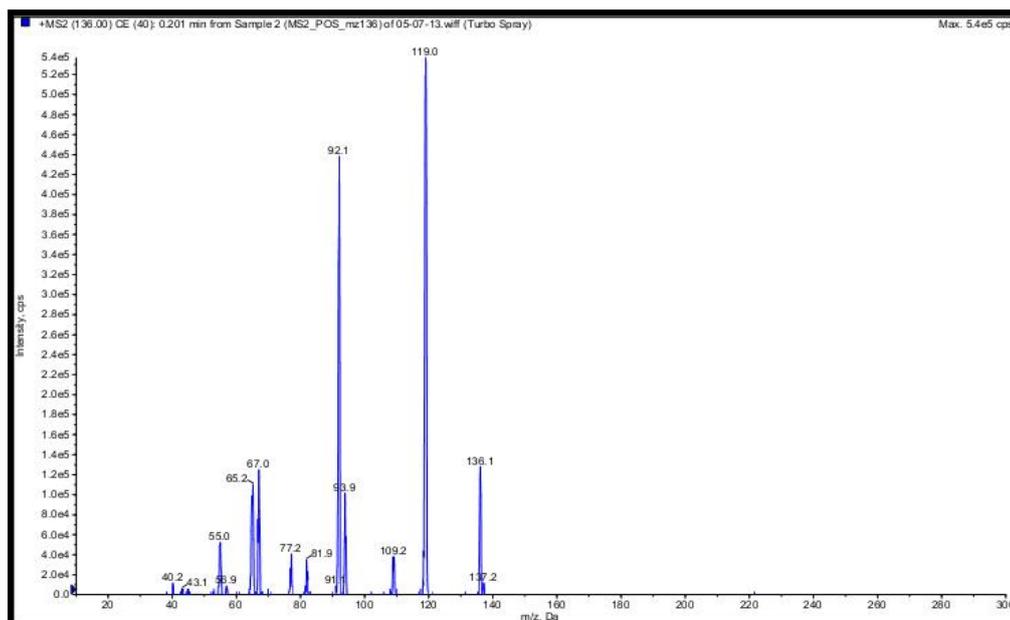
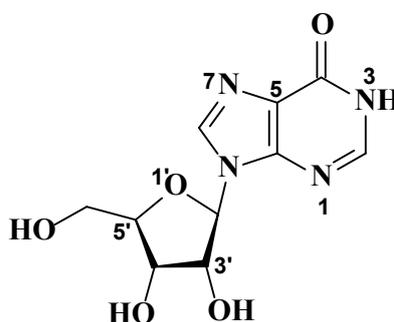


FIGURA 3.68 - Espectro de fragmentação para a substância **15**. ESI/MS, modo positivo de ionização.

3.2.9- Nucleosídeo

3.2.9.1- Identificação estrutural da substância **16**

A substância **16** foi isolada da fração acetato de etila (FAEEFTP) proveniente do extrato etanólico das folhas de *Trichilia pallens* e teve sua estrutura determinada através de experimentos de RMN ^1H , COSY ^1H - ^1H , HSQC, HMBC e comparação com dados da literatura (SILVA, 2007).



A partir do espectro de RMN de ^1H (FIGURAS 3.69, 3.70 e 3.71) observaram-se dois singletos em δ 8,30 e 8,18 referentes ao hidrogênios de iminas H-2 e H-8, respectivamente. Também foram observados um dubleto em δ 5,97 (1H, $J= 6,5$ Hz) o qual foi atribuído ao hidrogênio H-2', um sinal em δ 4,75 (1H, $J= 6,5; 5,5$ Hz) atribuído ao H-3', dos duplos-dubletos em δ 4,33 (1H, $J= 5,0; 2,5$ Hz) referente ao H-4' e em δ 4,18 (1H, $J= 5,5; 3,0$ Hz) para o H-5' e os deslocamentos em δ 3,90 (1H, $J= 12,5; 2,5$ Hz) e δ 3,76 (1H, $J= 12,5; 3,0$ Hz) referentes aos hidrogênios diastereotópicos H-6 α ' e H-6 β ', respectivamente, os quais caracterizam a presença de uma unidade de ribose na estrutura.

TABELA 3.22 - Dados de RMN ^1H de **16** e comparação com a literatura.

SUBSTÂNCIA 16 (400 MHz, CD ₃ OD)		SILVA, 2007 (400 MHz, CD ₃ OD)
H	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
2	8,30 (1H, s)	8,40 (1H, s)
8	8,18 (1H, s)	8,27 (1H, s)
2'	5,97 (1H, d, $J = 6,5$ Hz)	6,05 (1H, d, $J = 6,4$ Hz)
3'	4,75 (1H, dd, $J = 5,5; 6,5$ Hz)	4,40 (m)
4'	4,33 (1H, dd, $J = 2,5; 5,0$ Hz)	4,40 (m)
5'	4,18 (1H, dd, $J = 3,0; 5,5$ Hz)	4,26 (dd, $J = 2,5$ e $5,1$ Hz)
6' α	3,90 (1H, dd, $J = 2,5; 12,5$ Hz)	3,98 (dd, $J = 12,5$ e $3,0$ Hz)
6' β	3,76 (1H, dd, $J = 3,0; 12,5$ Hz)	3,83 (dd, $J = 12,5$ e $3,0$ Hz)

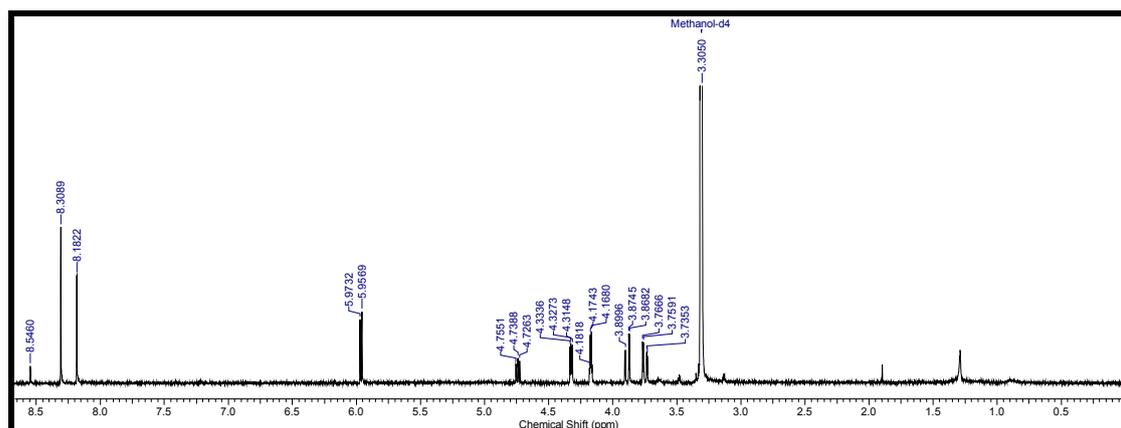


FIGURA 3.69 - Espectro de RMN ^1H da substância **16** (400 MHz, CD₃OD).

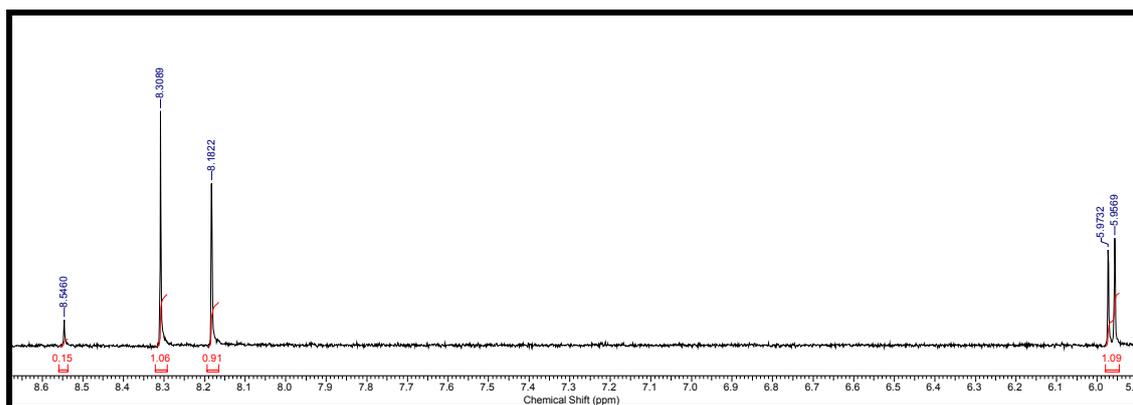


FIGURA 3.70 - Ampliação da região δ 6,55 a 5,70 do espectro de RMN ^1H da substância **16**.

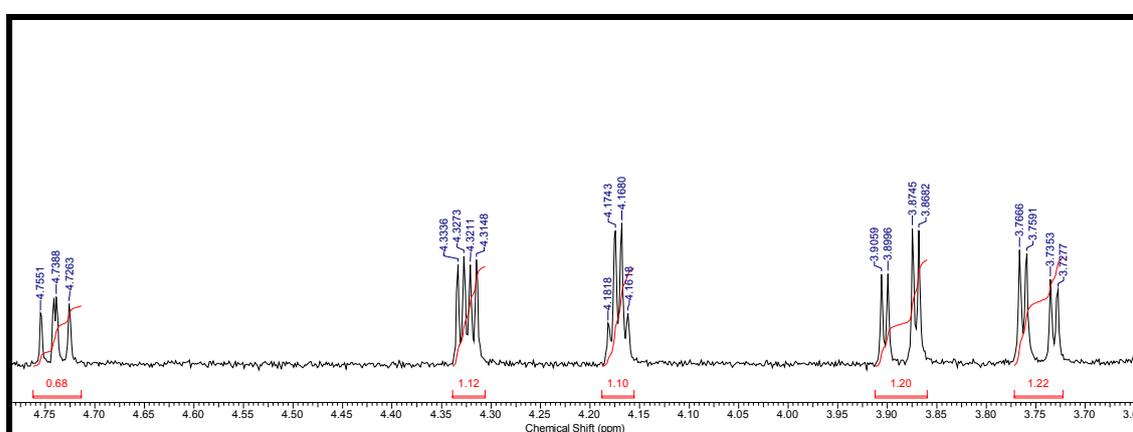


FIGURA 3.71 - Ampliação da região δ 4,60 a 2,40 do espectro de RMN ^1H da substância **16**.

Os sinais dos carbonos foram atribuídos a partir da análise do mapa de correlações do HSQC (FIGURA 3.72), o qual apresentou as respectivas correlações: H-2 (δ 8,30)/ C-2 (δ 140,5), H-8 (δ 8,18)/ C-8 (δ 152,3), H-2' (δ 5,97)/ C-2' (δ 89,9), H-3' (δ 4,75)/ C-3' (δ 74,2), H-4' (δ 4,33)/ C-4' (δ 71,4), H-5' (δ 4,18)/ C-5' (δ 86,9), H-6 α ' (δ 3,90) e H-6 β ' (δ 3,76)/ C-6' (δ 62,1).

Os demais carbonos foram observados no mapa de correlações do HMBC (FIGURAS 3.73), porém detectou-se apenas algumas correlações dos hidrogênios: H-2 (δ 8,30) com os carbonos em δ 119,6 (C-5) e 148,5 (C-6), do H-8 (δ 8,18) com os sinais em δ 148,5 (C-6) e 156,2 (C-4), o duplete em δ 5,97 (H-2') correlacionou-se com δ 74,2 (C-3'), 140,5 (C-2) e 148,5 (C-6) e foi observada

também a correlação do H-3' (δ 4,75) com o sinal em δ 89,9 (C-2'). Assim, os dados apresentados corroboraram com a literatura para o nucleosídeo 5'-inosil.

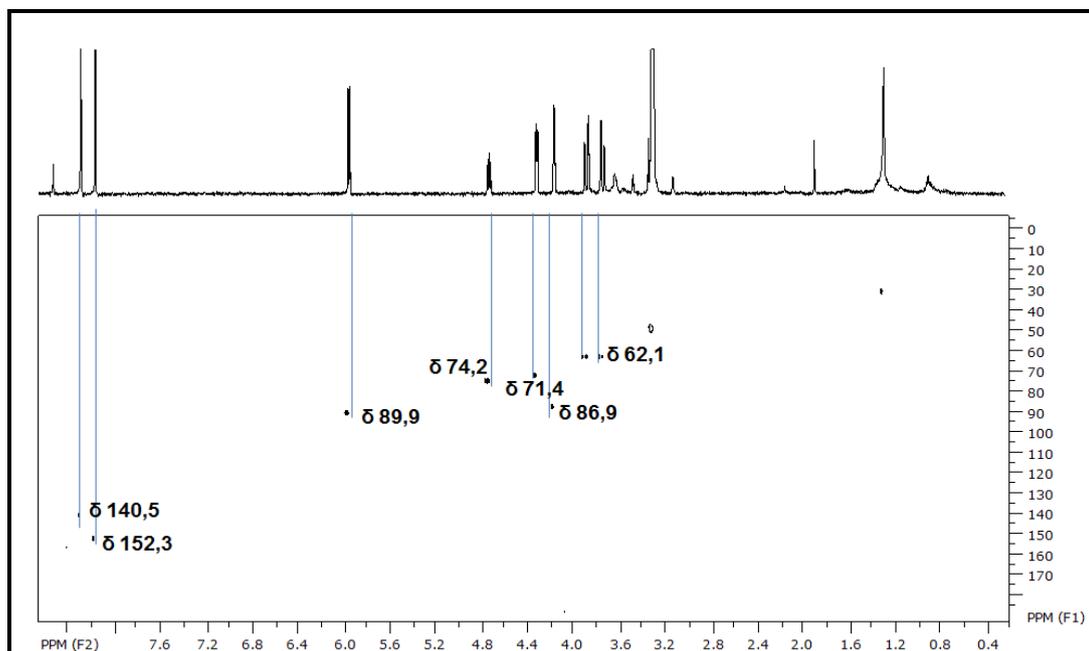


FIGURA 3.72- Espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) de **16** (400 MHz, CD_3OD).

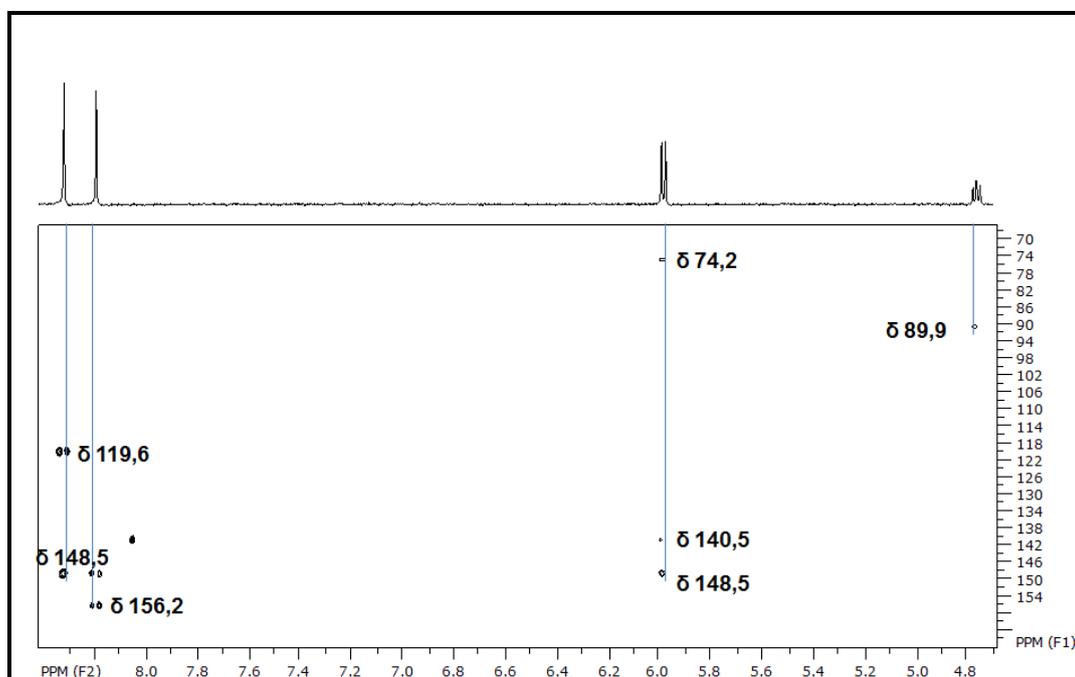
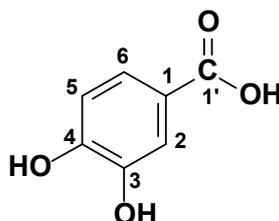


FIGURA 3.73- Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) de **16** (400 MHz, CD_3OD).

3.2.10 – Ácido fenólico

3.2.10.1- Identificação estrutural da substância 19

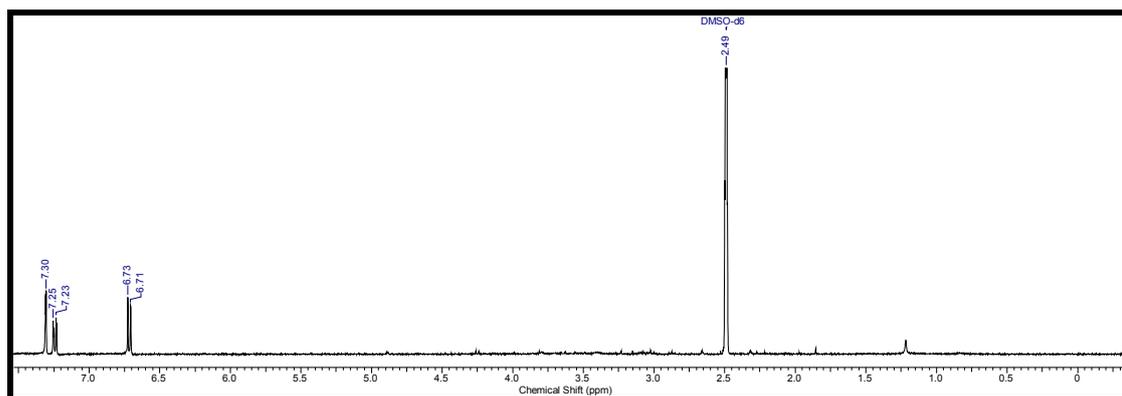
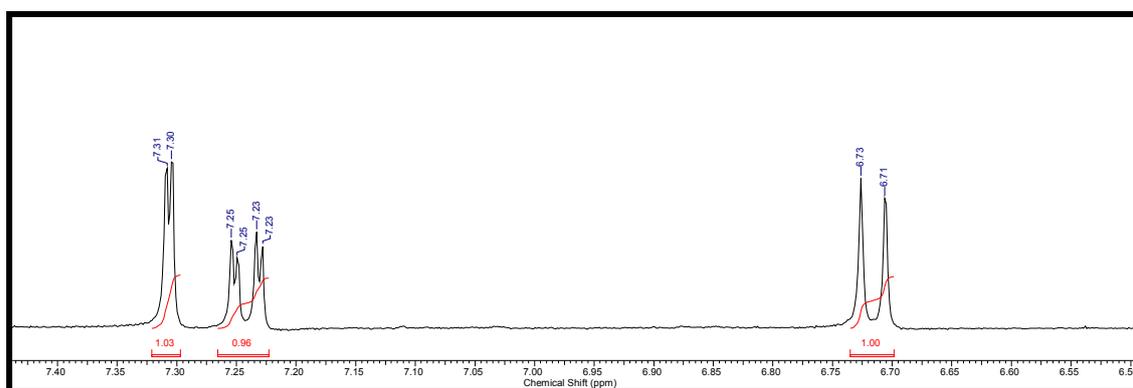
A substância **19** foi obtida da fração acetato de etila de folhas de *T. pallens* e teve sua estrutura caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C , e também por comparação com dados da literatura (MOURA et al., 2011).



O espectro de RMN ^1H (FIGURAS 3.74 e 3.75) apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,30 (*d*, $J=1,5$ Hz, H-2) caracterizando acoplamento meta com H-6 em δ 7,25 (*dd*, $J= 8,5$ e $J= 1,5$ Hz, H-6), o qual apresentou um acoplamento orto e meta com H-5 e H-2, respectivamente, e um sinal em δ 6,73 (*d*, $J= 8,5$ Hz, H-5) com acoplamento orto com H-6, o qual sugeriu a presença de um anel aromático trissubstituído.

TABELA 3.23- Dados de RMN ^1H de **19** e comparação com a literatura.

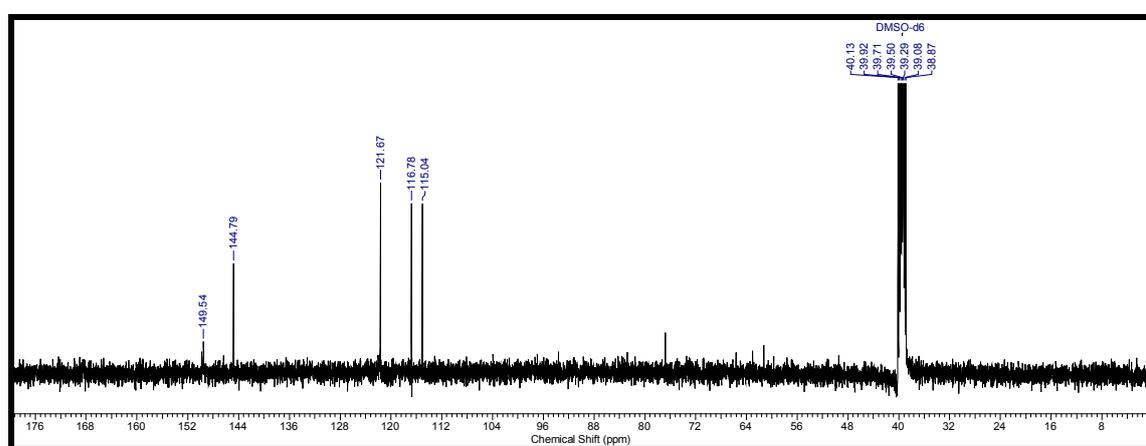
	SUBSTÂNCIA 19 (400 MHz, DMSO- d_6)	MOURA et al, 2011 (500 MHz, DMSO- d_6)
^1H	δ , J (Hz)	δ , J (Hz)
2	7,30 (1H, <i>d</i> , $J=1,5$ Hz)	7,32 (<i>d</i> , $J=1,5$ Hz)
5	6,73 (1H, <i>d</i> , $J= 8,5$ Hz)	6,76 (<i>d</i> , $J=8,5$ Hz)
6	7,25 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,5$; 1,5 Hz)	7,27 (<i>dd</i> , $J=8,5$ e $J=1,5$ Hz)

FIGURA 3.74- Espectro de RMN ^1H da substância **19** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).FIGURA 3.75 - Ampliação da região 7,40 a 6,50 ppm do espectro de RMN ^1H da substância **19** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

O espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 3.76) foi obtido em $\text{DMSO-}d_6$, e assim, foi observado sinais em δ 149,5 e δ 144,8 mais desblindados, referentes aos carbonos C-4 e C-3, respectivamente, devido ao efeito retirador de elétrons das hidroxilas substituídas. Também foi observado sinais em δ 121,6 atribuído aos carbonos C-1 e C-6, em δ 116,8 referente ao C-2 e em δ 115,0 ao C-5. O sinal da carboxila não foi possível ser visualizado no espectro, porém foi confirmado no HMBC, no qual foi observado correlações para os hidrogênios H-2 e H-6 com o carbono em 170,3. Portanto, a substância em questão foi identificada com o ácido protocatecuico.

TABELA 3.24: Dados de RMN ^{13}C de **19** e comparação com a literatura.

C^{13}	SUBSTÂNCIA 19 (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm), J (Hz)	MOURA <i>et al</i> , 2011 (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm), J (Hz)
1'	-	167,0
1/6	121,6	122,4
2	116,8	117,1
3	144,8	145,0
4	149,5	150,0
5	115,0	114,4

FIGURA 3.76: Espectro de RMN C^{13} (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da substância **19**.

4 - ENSAIOS DE BIOATIVIDADE SOBRE AS LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda*

Os ensaios de bioatividade sobre as lagartas de *S. frugiperda* foram desenvolvidos no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), sob a colaboração do Prof. Dr. José Djair Vendramim e Dra. Angelina Maria Marcomini Giongo em parceria com o INCT-Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Pragas do grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSCar e também no Laboratório de Insetos do Departamento de Química-UFSCar sob colaboração da Profa. Dra. Andréia Pereira Matos e a aluna de Iniciação Científica Ana Carolina Volante.

4.1- Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em placas de Elisa

4.1.1– Material e Métodos

- Boeco Germany® Series pipetor;
- Exacta® Micro pippete;
- Placas de Elisa;
- Etanol, acetona e água;
- Dieta artificial (GREENE et al.,1976).

4.1.2– Metodologia

Os ensaios foram realizados sob condições de laboratório ($T= 25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR= $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), com lagartas de *S. frugiperda* criadas em dieta artificial. Foram realizadas quatro repetições contendo 24 lagartas por tratamento (uma placa de Elisa por tratamento) em delineamento inteiramente casualizado.

Para a realização dos experimentos foram acondicionados 2000 μL de dieta artificial por célula, utilizando um pipetador, (FIGURA 4.1). Todas as amostras

foram solubilizadas em acetona ou etanol, e as diferentes concentrações foram obtidas a partir de diluições e 30 µl da mostra foram aplicados sobre a dieta em cada célula, com auxílio de micropipeta. As placas foram mantidas abertas por duas horas para permitir a evaporação do solvente e, em seguida, foi inoculada uma lagarta de primeiro ínstar por célula. Foram feitas quatro repetições para cada amostra testada (tratamento), e assim, cada tratamento consistiu em 4 placas de Elisa, totalizando 96 lagartas por tratamento. Foram realizadas três testemunhas, uma para o controle da água deionizada usada sobre a dieta, outra para a acetona e outra para o etanol. As avaliações de mortalidade foram realizadas diariamente, até o 10º dia após a instalação do experimento.

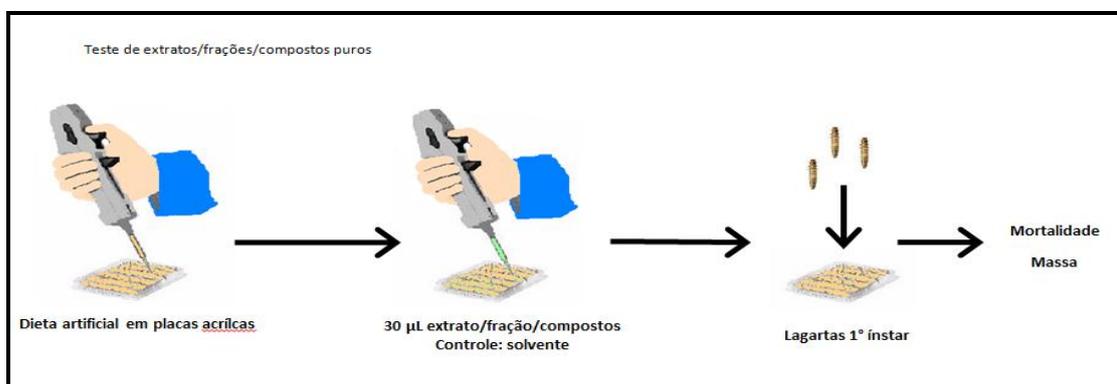


FIGURA 4.1. Bioensaio realizado em Placas de Elisa com *S. frugiperda*.

4.1.3 - Análise dos dados

Para as análises, foi utilizado o programa estatístico R versão 3.0.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013). Todos os bioensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado. Os dados de mortalidade foram analisados por GLM (*General Linear Models*), utilizando o teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$) para comparação de médias; os demais dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificação da homocedasticidade das variâncias dos tratamentos e ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade dos resíduos, e análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Dados que não se adequaram à análise paramétrica foram analisados por GLM, com análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Nos casos em que havia mais de dois tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2- Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em tubos de vidro

Estes ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Insetos do Departamento de Química da UFSCar sob condições de laboratório ($T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$, $UR = 70 \pm 5\%$ e fotofase de 12h). Lagartas de *S. frugiperda* foram mantidas em dieta artificial (KASTEN et al., 1978) e os adultos com solução de mel a 10%.

Para a realização dos bioensaios, as amostras (extratos, frações e substâncias puras) foram solubilizadas em uma pequena quantidade de solvente e misturadas ao ácido ascórbico contido na dieta artificial. Logo após, as amostras foram mantidas em capela até a evaporação do solvente, e em seguida, todas as amostras foram incorporadas à dieta sob temperatura de aproximadamente 50°C (MATOS et al., 2006; LEITE et al., 2008; MATOS et al., 2009). As amostras foram incorporadas em diferentes concentrações, 500 mg para extratos, 300 mg para frações e 30 mg para as substâncias puras em 300 g de dieta artificial. Para cada tratamento também foram preparadas testemunhas, utilizando-se apenas os solventes aos quais as amostras foram solubilizadas na dieta. Depois de incorporadas, as dietas foram vertidas em tubos de vidro ($8,5 \times 2,5\text{ cm}$), previamente esterilizados em estufa a 170°C por 1 h e em seguida fechados com algodão hidrófugo (FIGURA 4.2). Em seguida, os tubos foram mantidos por 24 h em porta-tubos metálicos para eliminação do excesso de umidade. Em seguida, foram inoculadas lagartas recém-eclodidas de *S. frugiperda*, utilizando-se uma lagarta de primeiro ínstar por tubo de vidro.



FIGURA 4.2. Tubos de vidro utilizados no bioensaio e larvas recém-eclodidas de *S. frugiperda*.

Os parâmetros avaliados foram duração das fases larval e pupal, além da massa das pupas e porcentagem de insetos mortos (mortalidade) ao final de cada fase. As pupas obtidas foram pesadas um dia após a pupação e permaneceram em observação até a emergência dos adultos. Para cada tratamento foram utilizadas 30 lagartas, distribuídas em três repetições de dez lagartas cada, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A comparação entre médias dos tratamentos é feita através do Teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade de erro.

4.3 - Resultados e Discussão

4.3.1 Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em placas de Elisa

Os ensaios biológicos utilizando placas de Elisa foram realizados para todos os extratos brutos etanólicos e as respectivas frações provenientes da partição líquido-líquido (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e a fração hidroalcoólica) de frutos, folhas e ramos de *To. ciliata*, folhas e ramos de *T. pallida* e folhas e ramos de *T. pallens*, conforme descrita no FLUXOGRAMA 3.2. Estes ensaios biológicos foram realizados a fim de se verificar a bioatividade dos mesmos, pois de acordo com dados da literatura são espécies vegetais com potencial inseticida. Esta metodologia foi escolhida para *screening* de todos os tratamentos (extratos, frações e substâncias), uma vez que é um método rápido e eficiente, porém inviável pensando-se em avaliar o ciclo completo do inseto. Assim, para as amostras ativas foi empregada a metodologia descrita em 4.2 a fim de se avaliar a bioatividade durante o ciclo completo de *S. frugiperda*.

Primeiramente foi realizado o bioensaio com todos os extratos brutos etanólicos das três espécies (TABELA 4.1), *To. ciliata*, *T. pallida* e *T. pallens*, na concentração de 10.000 ppm. Verificou-se baixa mortalidade em todos os tratamentos após 10 dias de análise diária, comparativamente aos controles (variação de mortalidade de 8 a 21 %). Entretanto, foram observados bons resultados e diferenças significativas em relação a massa média das lagartas ao final do período de avaliação. As lagartas alimentadas em dieta tratada

superficialmente com os extratos etanólicos dos ramos de *T. pallida* e dos ramos de *T. pallens* apresentaram significativa redução da massa, variando de 82 a 95 mg e diferindo do controle água. Vale ressaltar que a análise da mortalidade é feita após 10 dias de ensaio, e são testes preliminares, já que após estes dias ocorre inviabilidade no desenvolvimento das lagartas em placas de Elisa. Segundo dados da literatura (BORGONI et al., 2003), os extratos aquosos dos ramos de *T. pallida* e *T. pallens* a 5% em folhas de milho apresentaram uma grande redução da massa larval.

TABELA 4.1 - Mortalidade e massa larval de *S. frugiperda* alimentadas desde o 1º instar com dieta tratada superficialmente com extratos etanólicos de *T. pallens*, *T. pallida* e *To. ciliata* 1%, após 10 dias.

Tratamento	Mortalidade (%)*	Massa (mg)*
Controle Água	6,25 ± 0,27 a	143,87 ± 8,46 b
Controle Água:Etanol (1:1)	3,13 ± 0,14 a	133,58 ± 3,42 ab
Folhas – <i>T. pallens</i>	12,50 ± 0,41 a	117,12 ± 4,69 ab
Ramos – <i>T. pallens</i>	13,54 ± 0,41 a	82,46 ± 8,02 a
Folhas – <i>T. pallida</i>	16,67 ± 0,38 a	107,01 ± 13,35 ab
Ramos – <i>T. pallida</i>	8,33 ± 0,30 a	95,04 ± 17,15 ab
Folhas – <i>To. ciliata</i>	6,25 ± 0,25 a	110,78 ± 17,46 ab
Ramos – <i>To. ciliata</i>	21,88 ± 0,53 a	105,58 ± 10,85 ab

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, p<0,05).

Na análise das frações provenientes dos extratos brutos etanólicos de *T. pallida* (TABELA 4.2) observou-se baixas mortalidades quando analisadas em até 10 dias de ensaio (variação de 0 a 13%) e comparadas com os controles (1% de mortalidade). No entanto, após a avaliação da massa média das lagartas após 10 dias de ensaio, observou-se que houve um grande efeito no desenvolvimento das lagartas em relação a redução da massa. Verificou-se redução em torno de 96% até o 10º dia quando tratadas com as frações diclorometânicas das folhas (redução para 22 mg) e dos ramos de *T. pallida* (redução para 14,4 mg), estes valores foram comparados com os controles (variação de peso de 340 a 374 mg). Esse resultado mostra claramente que esta grande redução levaria a 100 % de mortalidade do inseto. A mesma tendência foi observada por BORGONI et al., 2003, com variações

drásticas na redução de pesos das lagartas, quando tratadas com extratos aquosos de *T. pallida*.

TABELA 4.2 - Médias da massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com frações de extrato etanólico de folhas e ramos de *T. pallida* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Massa \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Diclorometano - Ramos	14,38 \pm 1,62 a	12,50 \pm 0,38 a
Fração Diclorometano - Folhas	22,13 \pm 2,25 a	9,38 \pm 1,04 ab
Fração Acetato de etila - Ramos	290,99 \pm 32,14 b	1,04 \pm 1,04 bc
Fração Hexano - Folhas	288,16 \pm 20,25 b	0,00 \pm 0,00 c
Fração Acetato de etila - Folhas	375,87 \pm 24,06 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Fração Hexano - Ramos	303,78 \pm 14,35 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Controle Etanol	340,66 \pm 18,00 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Controle Acetona	351,87 \pm 24,70 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Controle Água	374,26 \pm 26,40 bc	1,04 \pm 1,04 bc
Fração Hidroalcoólica - Ramos	325,61 \pm 14,19 bc	0,00 \pm 0,00 c
Fração Hidroalcoólica - Folhas	392,10 \pm 27,32 c	0,00 \pm 0,00 c
F	73,96	-
p	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

Analisando os resultados obtidos para as frações provenientes do extrato etanólico de frutos, folhas e ramos de *To. ciliata* (TABELA 4.3), observou-se que nenhuma das frações apresentaram efeito em relação à mortalidade (uma variação de 0 a 1%) comparando com os controles (variação de 0 a 2%). As frações diclorometânica das folhas e frutos apresentaram efeitos significativos quando avaliadas em relação a massa larval, as quais apresentaram uma redução de massa (variação de 114 a 146 mg) em relação aos controles (variação de 210 a 237 mg), uma redução em torno de 50 % da massa.

TABELA 4.3 - Médias da massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com frações de extrato etanólico de folhas, ramos e frutos de *To. ciliata* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Massa \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Diclorometano - Folhas	114,25 \pm 11,10 a	1,04 \pm 0,10
Fração Diclorometano - Frutos	146,86 \pm 4,65 ab	1,04 \pm 0,10
Fração Acetato de etila - Ramos	158,20 \pm 6,63 abc	1,04 \pm 0,10,
Fração Diclorometano – Ramos	169,33 \pm 12,30 abcd	0,00 \pm 0,00
Fração Hidroalcoólica - Folhas	183,95 \pm 15,07 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Acetato de etila - Folhas	191,41 \pm 9,15 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hexânica - Ramos	193,47 \pm 10,42 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hexânica - Folhas	194,70 \pm 9,53 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hexânica - Frutos	197,06 \pm 13,84 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Acetato de etila - Frutos	198,16 \pm 20,30 bcde	0,00 \pm 0,00
Fração Hidroalcoólica - Frutos	201,90 \pm 5,46 bcde	1,04 \pm 0,10
Controle Água	210,36 \pm 10,22 cde	0,00 \pm 0,00
Fração Hidroalcoólica - Ramos	221,51 \pm 13,17 cde	0,00 \pm 0,00
Controle Etanol	231,88 \pm 14,16 de	1,04 \pm 0,10
Controle Acetona	237,15 \pm 22,42 e	2,08 \pm 0,14
F	2,63	-
p	0,0375	0,3482

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

Na análise das frações provenientes dos ramos e folhas de *T. pallens* (TABELAS 4.4 e 4.5), a fração diclorometânica proveniente do extrato etanólico de ramos foi a que apresentou o melhor resultado. Foi observado que houve uma mortalidade de 30,3 % até o 10º dia de ensaio e que houve uma redução de massa de praticamente 100 %. Comparando valores de 376 mg para o controle e uma variação de 294 a 314 mg para os controles, as lagartas quando tratadas superficialmente com esta fração apresentou uma redução de massa drástica para 4,3 mg no 10º dia de ensaio. Esta fração foi observada por mais uns dias e em vinte dias apresentou 80 % de mortalidade das lagartas. Já nas frações provenientes das folhas, observou-se baixas mortalidades quando analisadas em até o 10º dia de ensaio (variação de 1 a 11%), quando comparadas aos controles (6% de mortalidade). Os resultados em relação à redução de massa não foi diferente, o qual apresentou uma variação de 8 a 22 % de redução quando comparadas ao controle. Segundo BORGONI et al. (2003) extratos aquosos de ramos e folhas de *T. pallens* apresentaram alta eficiência em reduzir o massa da lagarta e a sobrevivência larval quando aplicadas sobre as folhas do milho.

TABELA 4.4 - Médias de massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações de extrato etanólico de ramos de *T. pallens* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Massa \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Diclorometano	4,31 \pm 0,30 a	30,21 \pm 2,62 a
Fração Acetato de etila	289,46 \pm 21,94 b	3,13 \pm 1,99 b
Controle Etanol	294,36 \pm 5,89 b	1,04 \pm 1,04 b
Controle Acetona	314,06 \pm 12,47 b	0,00 \pm 0,00 b
Fração Hidroalcoólica	326,97 \pm 14,21 bc	1,04 \pm 1,04 b
Fração Hexano	374,71 \pm 10,46 c	6,25 \pm 3,61 b
Controle Água	375,62 \pm 13,18 c	0,00 \pm 0,00 b
F	186,33	-
p	< 0,001	< 0,001

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ GLM, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

TABELA 4.5 - Médias de massa e mortalidade (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com frações de extrato etanólico de folhas de *T. pallens* a 1%, após 10 dias

Tratamento	Massa \pm EP (mg) ¹	Mortalidade \pm EP (%) ²
Fração Hexano	344,06 \pm 17,31 a	1,67 \pm 1,67
Fração Diclorometano	372,57 \pm 28,61ab	11,67 \pm 4,25
Fração Acetato de etila	399,22 \pm 24,54 ab	10,00 \pm 4,86
Fração Hidroalcoólica	405,60 \pm 25,42 ab	8,33 \pm 0,00
Controle Etanol	414,96 \pm 13,20 ab	3,13 \pm 1,20
Controle Acetona	435,30 \pm 24,35 ab	6,67 \pm 1,67
Controle Água	443,56 \pm 10,56 b	6,67 \pm 4,86
F	2,63	-
p	0,0375	0,3482

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, $p \leq 0,05$)

¹ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$)

Após a avaliação dos extratos e frações, realizaram-se ensaios de bioatividade com algumas das substâncias isoladas, as quais foram obtidas em quantidade significativa para a realização dos ensaios, onde algumas delas foram provenientes de frações mais ativas. Diante disto, foi possível avaliar seis substâncias isoladas (FIGURA 4.3), três de *To. ciliata*, o limonoide cedrelona (**1**), o flavonoide catequina (**2**) e o triglicerídeo (**3**); uma de *T. pallida* um triterpeno do tipo damarano, o damaradienol (**4**); e a cumarina escopoletina (**5**) obtida das folhas e ramos de *T. pallens* proveniente das frações diclorometânicas, as quais foram mais ativas.

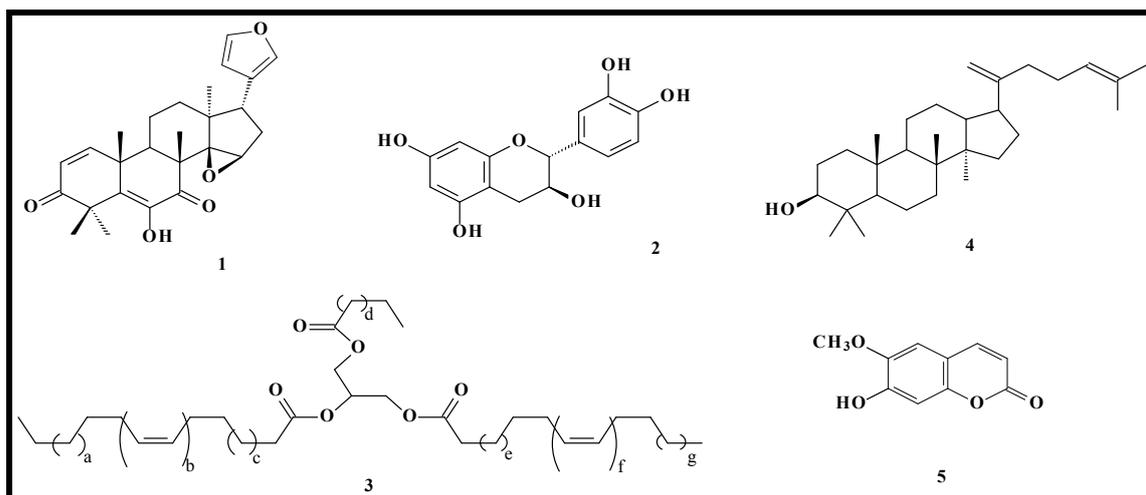


FIGURA 4.3. Substâncias isoladas de *T. pallida*, *T. pallens* e *To. ciliata*, submetidas ao ensaio de bioatividade frente às lagartas de *S. frugiperda*.

Os resultados observados para a catequina (2) são apresentados na TABELA 4.6. Não foi observado efeito em relação à mortalidade e massa quando comparados ao controle. LEITE (2005) verificou através de ensaios de ingestão, que a substância *ent*-catequina nas concentrações de 1, 10 e 50 mg/kg apresentou mortalidade larval de 50,00, 53,33 e 66,67 %, respectivamente. No entanto, neste experimento por se tratar de mistura racêmica um isômero pode estar antagonizando o efeito do outro.

TABELA 4.6 - Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com o flavonoide catequina 1% (10.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Massa \pm EP (mg) ³
Catequina	7,50 \pm 1,94	114,20 \pm 4,63
Controle ¹	5,00 \pm 1,84	134,28 \pm 1,95
F	-	27,76
p	0,4222	< 0,001

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (etanol e água, 1:1); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

Em relação ao ensaio com o triglicerídeo (3) houve efeito na mortalidade ao comparar ao controle, TABELA 4.7. A avaliação da massa larval após 10 dias de ensaio foi evidenciado que houve uma redução de massa em torno de 38% em relação ao controle.

TABELA 4.7 - Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com um triglicérideo a 1% (10.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Massa \pm EP (mg) ³
Triglicérideo	35,00 \pm 6,78	90,67 \pm 4,22
Controle ¹	4,17 \pm 1,39	119,83 \pm 3,28
F	-	27,76
p	< 0,001	< 0,001

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (acetona pura); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

O resultado obtido no ensaio realizado com o triterpeno damaradienol (4) está descrito na TABELA 4.8, e é observado que não apresentou nenhum efeito no desenvolvimento do inseto.

TABELA 4.8 - Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com o triterpeno damaradienol a 1% (10.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Massa \pm EP (mg) ³
Controle ¹	0,00 \pm 0,00	59,16 \pm 3,52
Damaradienol	0,00 \pm 0,00	66,41 \pm 2,50
F	-	2,83
p	-	0,11

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (acetona e água, 1:1). ² Dados não analisados (variância nula); ³ ANAVA, teste F ($p \leq 0,05$)

O ensaio com a escopoletina (5) foi realizado na concentração 1.000 ppm, utilizando-se como controle água e acetona (1:1). Foram utilizadas 10 repetições de 12 lagartas para cada tratamento, e após sete dias foi contabilizado o número de lagartas mortas e as sobreviventes foram pesadas. Diante dos resultados observados para a escopoletina observou-se efeito em relação a mortalidade (14 %) comparados ao controle (1 %) e também apresentou efeito em relação ao peso médio ao final do experimento, uma redução de 23 % quando comparadas ao controle (TABELA 4.9). Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por VERA et al. (2006), em que a escopoletina sintetizada em laboratório foi testada sob efeito antialimentar e tóxico, quando incorporada em dieta artificial para as larvas de *S. frugiperda*. Foram observados para uma concentração de escopoletina de 100 $\mu\text{g/g}$ dieta que não houve efeito sobre a preferência alimentar e tóxico na mesma concentração, não mostrando efeito na duração larval e nem no peso médio e

apenas 10 % de mortalidade larval em relação ao controle durante o experimento. A escopoletina foi isolada das frações diclorometânicas provenientes tanto dos extratos etanólicos de folhas e ramos de *T. pallens*, ambas as frações foram bastante ativas, principalmente, a fração diclorometânica dos ramos que apresentou 100% de mortalidade larval sobre as larvas de *S. frugiperda*. Esta fração é bastante promissora e se faz necessário novos estudos para a busca dos compostos ativos.

TABELA 4.9 - Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão da média) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta tratada com a cumarina escopoletina a 0,1% (1.000 ppm), após sete dias

Tratamento	Mortalidade \pm EP (%) ²	Massa \pm EP (mg) ³
Escopoletina	14,17 \pm 2,50	64,08 \pm 6,98
Controle ¹	1,67 \pm 1,11	82,94 \pm 7,17
F	-	7,04
P	< 0,001	0,016

¹ Solvente utilizado para diluição do composto (acetona e água 1:1); ² GLM, teste de qui-quadrado ($p \leq 0,05$); ³GLM, Teste F ($p \leq 0,05$)

Também foram realizadas as avaliações frente *S. frugiperda* do extrato hexânico do caule de *To. ciliata*, o qual foi preparado para a obtenção da cedrelona (FLUXOGRAMA 3.1). Esta última após ser isolada também foi avaliada. Estes resultados estão apresentados nas TABELAS 4.10 e 4.11.

A avaliação realizada para o extrato hexânico obtido do caule de *To. ciliata* foi realizada em apenas 7 dias com o objetivo de se verificar se havia sinergismo e um aumento na atividade ou uma diminuição, visto que este extrato apresenta majoritariamente o limonoide cedrelona. Em 7 dias de avaliação pode-se verificar pouco efeito em relação a mortalidade dos insetos quando se compara com o controle, porém, houve um efeito em torno de 64% na redução do peso dos insetos, sugerindo que havia algum princípio ativo que afetava bastante no desenvolvimento do inseto, e este efeito está relacionado à presença de cedrelona majoritária, já que a mesma apresenta um forte efeito no crescimento e desenvolvimento do inseto.

TABELA 4.10 - Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com extrato em hexano de caule de *To. ciliata* a 10.000 ppm, após **7 dias** ($23\pm 2^\circ\text{C}$, UR= $50\pm 10\%$, fotofase 14 h)

Tratamento	Mortalidade (%)*	Peso (mg)*
Controle-acetona:água	0,83 \pm 0,83 b	37,72 \pm 1,80 b
Extrato hexânico do caule de <i>To. ciliata</i>	19,17 \pm 6,34 a	13,66 \pm 1,42 a

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, 5%)

Segundo os resultados apresentados na TABELA 4.11, pode-se constatar o efeito da cedrelona quando testada em diferentes concentrações, a qual apresentou altos índices de mortalidades larvais e um forte efeito no desenvolvimento do inseto. Para cedrelona foram realizados testes em diferentes concentrações, pois com esta seria realizada o estudo da ação sob o inseto por análises espectroscópicas, assim saber qual a concentração mínima ativa é fundamental, principalmente, para as análises por Espectrometria de massas. Vários são os trabalhos descritos na literatura em que se demonstram as atividades inseticida e antialimentar do limonoide cedrelona sobre diversas espécies de lepidópteros (SURESH et al., 2002; KOUL e ISMAN, 1992; ARNASON et al., 1987; KUBO et al., 1986). Uma segunda sequência deste experimento com a cedrelona foi realizado com lagartas de 1º instar larval, simultaneamente, e foram coletados alíquotas de larvas nos 3º, 7º e 10º dias de ensaio, para a realização do estudo químico do inseto via Ressonância Magnética Nuclear de 600 MHz.

TABELA 4.11- Mortalidade e massa médias (\pm erro padrão) de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas desde o primeiro ínstar com dieta artificial tratada com cedrelona, após sete dias ($23\pm 2^\circ\text{C}$, UR= $50\pm 10\%$, fotofase 14 h)

Concentração (ppm)	Mortalidade (%)*	Massa (mg)
0,00	2,13 \pm 2,08 d	29,35 \pm 6,13 d
18,75	16,67 \pm 4,81 cd	14,52 \pm 3,73 c
37,50	14,58 \pm 3,99 cd	17,16 \pm 3,83 bc
75,00	33,33 \pm 7,95 bcd	8,85 \pm 2,10 bc
150,00	41,67 \pm 11,79 bc	6,63 \pm 1,90 b
300,00	56,76 \pm 10,31 b	2,84 \pm 0,96 a
600,00	100,00 \pm 0,00 a	-

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si (Tukey, 5%)

4.3.2- Bioensaios por meio de incorporação em dieta artificial em tubos de vidro

Esta metodologia foi escolhida para se avaliar a atividade inseticida quando se é analisado o ciclo de vida completo do inseto. Foram escolhidas para os testes, os extratos brutos, as frações e substâncias puras as quais apresentaram atividades promissoras quando analisadas em placas de Elisa. Assim, realizou-se primeiramente o ensaio com os extratos brutos etanólicos de *To. ciliata* (ramos e folhas), *T. pallida* (ramos e folhas) e *T. pallens* (ramos e folhas) a fim de se analisar a bioatividade e o desenvolvimento frente à *S. frugiperda*, desde o primeiro ínstar larval até a emergência dos adultos.

Durante a análise da duração da fase larval, TABELA 4.12, observou-se que todos os tratamentos causaram um alongamento da fase larval comparando com o branco (17 dias), com exceção do extrato etanólico das folhas de *To. ciliata*. As lagartas alimentadas com os extratos etanólicos de ramos e folhas de *T. pallida* foram as que apresentaram um alongamento da fase larval mais significativo, um aumento de 8 dias para os ramos e de 4 dias para as folhas, ao comparar com o branco. Os extratos etanólicos de folhas e ramos de *T. pallens* e ramos de *To. ciliata* apresentaram alongamento da fase larval de 1,3; 2,25 e 1,69, respectivamente. Uma maior duração da fase larval, em campo, deixará o inseto por mais tempo propenso ao ataque de parasitóides, predadores e entomopatógenos, provocando ainda maior competição pelo alimento. Os adultos que emergirão desses indivíduos terão

assincronia com a população normal e, conseqüentemente, a cópula será dificultada ou quando existir tenderá à consanguinidade pelo acasalamento de indivíduos da mesma geração. Também será diminuído o número de gerações do inseto no ciclo agrícola (TANZUBIL et al., 1990). O prolongamento da fase larval relaciona-se geralmente com o crescimento mais lento e pouca ingestão de alimento, por existir neste um ou vários aleloquímicos tóxicos ou por ocorrer desbalanço nutricional. Em campo, o crescimento lento das lagartas levará a um menor consumo de alimento, ocasionando menor dano nas plantas (TANZUBIL et al., 1990).

A duração da fase pupal para os extratos analisados variou de 9,0 a 10,94 dias, sem diferença significativa entre as médias, TABELA 4.12. Os resultados estão de acordo com os obtidos por RODRÍGUEZ e VENDRAMIM, 1996; 1997 e BORGONI et al., 2005, que trabalharam com espécies de *Trichilia* avaliadas na presente pesquisa e também não constataram efeito negativo dos extratos sobre a duração da fase pupal de *S. frugiperda*. O maior efeito sobre o peso das pupas, TABELA 4.12, foi constatado para os extratos etanólicos de folhas e ramos de *T. pallida* (variação de 159 a 165,7 mg) quando comparadas ao controle (285 mg). Estes dados estão de acordo com dados da literatura (BORGONI et al., 2003; 2005), uma vez que os extratos aquosos de folhas e ramos de *T. pallida* apresentaram redução no peso das pupas em relação a testemunha quando tratadas em folhas de milho. Menor peso de pupas indica menor consumo de alimento ou menor eficiência de conversão do alimento ingerido, possivelmente, devido à presença de deterrentes ou ausência de fagoestimulantes (RODRÍGUEZ et al., 1997).

O prolongamento do período larval e a diminuição do peso das pupas nos indivíduos indicam que, além de inibir o crescimento larval, é possível que também tenha ocorrido inibição na alimentação ou menor eficiência de conversão do alimento ingerido, o que ocorre quando os insetos são sujeitos a altas doses de substância tóxica (TANZUBIL et al., 1990).

TABELA 4.12- Médias da duração da fase larval, fase pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos a 1000 mg.Kg⁻¹ de ramos e folhas de *T. pallens*, *T. pallida* e *To. ciliata*. Temp.: 25 ± 1°C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12 horas.

Tratamento	Duração (dias) (± EP) Fase larval	Duração (dias) (± EP) Fase pupal	Massa pupal (mg) (±EP) ¹
Branco	17,08 ± 1,320 b	8,16 ± 1,546 b	285,04 ± 18,546 a
Controle MeOH	18,35 ± 1,945 ab	8,64 ± 1,432 ab	272,04 ± 33,475 a
Folhas – <i>To. ciliata</i>	17,36 ± 1,989 ab	9,82 ± 1,680 a	247,32 ± 19,638 b
Ramos – <i>To. ciliata</i>	18,77 ± 3,025 a	9,77 ± 1,569 a	270,03 ± 28,788 a
Branco	17,08 ± 1,320 c	8,16 ± 1,546 b	285,04 ± 18,546 b
Controle MeOH	18,35 ± 1,945 c	8,64 ± 1,432 b	272,04 ± 33,475 b
Folhas – <i>T. pallida</i>	21,72 ± 2,074 a	9,81 ± 1,030 a	165,67 ± 19,726 a
Ramos – <i>T. pallida</i>	25,71 ± 3,273 b	10,94 ± 1,765 a	159,05 ± 22,772 a
Branco	17,08 ± 1,320 b	8,16 ± 1,546 a	285,04 ± 18,546 b
Controle MeOH	18,35 ± 1,945 ab	8,64 ± 1,432 a	272,04 ± 33,475 b
Controle Metanol : DCM	18,00 ± 1,589 ab	8,85 ± 1,424 a	269,35 ± 25,035 b
Ramos – <i>T. pallens</i>	19,33 ± 2,249 a	9,00 ± 1,815 a	225,33 ± 31,217 a
Folhas – <i>T. pallens</i>	18,33 ± 1,225 ab	9,50 ± 1,927 a	232,00 ± 20,567 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P ≤ 0,05).

O extrato bruto etanólico das folhas de *T. pallens* foi o único que apresentou alta mortalidade larval (70%), TABELA 4.13. Os outros extratos de folhas e ramos de *To. ciliata* e *T. pallida* e ramos de *T. pallens* não apresentaram efeito na sobrevivência das lagartas, com variação de 0 a 37,4 % de mortalidade larval. Segundo a literatura [RODRIGUEZ E VENDRAMIM (1996; 1997); BORGONI e VENDRAMIM (2003; 2005) e ROEL (1998; 2000a; 2000b; 2006)] os extratos de *T. pallida* e *T. pallens* são bastante promissores como inseticida. Porém, não há relatos de efeitos de extratos etanólicos destas espécies por meio de incorporação em dieta artificial, e sim efeitos significativos para os extratos aquosos em folhas de milho. Assim não se conhece o efeito destes extratos, principalmente, dos seus princípios ativos quando incorporados em dieta artificial. Segundo BORGONI et al., 2003

extratos aquosos de ramos de *T. pallida* e *T. pallens* e folhas de *T. pallens* apresentaram alta eficiência em reduzir o peso da lagarta e a sobrevivência larval quando aplicadas sobre as folhas do milho, destacando que o extrato de folhas de *T. pallens* causou mortalidade total das lagartas, superando os demais tratamentos. Com isso, o melhor resultado apresentado pelas folhas de *T. pallens* corrobora com a literatura, sendo portanto, um extrato bastante promissor neste trabalho.

Não foram constatados efeitos significativos para os extratos etanólicos das três espécies (*T. pallida*, *T. pallens* e *To. ciliata*) na mortalidade pupal (uma variação de 0 a 8,3%) quando comparadas ao controle, TABELA 4.13.

TABELA 4.13- Mortalidade das fases larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com extratos etanólicos, a 1000 mg.Kg⁻¹, de ramos e folhas de *T. pallens*, *T. pallida* e *To. ciliata*. Temp.: 25 ± 1°C; UR: 70 ± 5% e fotofase:12 horas.

Tratamento	Mortalidade larval (%) (± EP)	Mortalidade pupal (%) (±EP)
Branco	16,67 ± 15,275 a	0,00 ± 0,000 a
Controle MeOH	21,10 ± 11,689 a	3,70 ± 6,409 a
Folhas – <i>To. ciliata</i>	26,67 ± 20,817 a	0,00 ± 0,000 a
Ramos – <i>To. ciliata</i>	0,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
Branco	16,67 ± 15,275 a	0,00 ± 0,000 a
Controle MeOH	21,10 ± 11,689 a	3,70 ± 6,409 a
Folhas – <i>T. pallida</i>	26,67 ± 11,547 a	4,17 ± 7,217 a
Ramos – <i>T. pallida</i>	30,00 ± 10,000 a	8,33 ± 14,434 a
Branco	16,67 ± 15,275 b	0,00 ± 0,000 a
Controle MeOH	21,10 ± 11,689 b	3,70 ± 6,409 a
Controle Metanol : DCM	30,00 ± 10,000 b	0,00 ± 0,000 a
Ramos – <i>T. pallens</i>	37,40 ± 14,081 ab	0,00 ± 0,000 a
Folhas – <i>T. pallens</i>	70,00 ± 17,321 a	8,33 ± 14,434 a

^a Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

A partir dos resultados obtidos dos extratos brutos, realizou-se as análises apenas das frações particionadas, provenientes do extrato etanólico das

folhas e ramos de *T. pallens*, já que estas apresentaram os resultados mais significativos.

Dentre os parâmetros avaliados, as frações dos ramos de *T. pallens* apresentaram resultados tanto na duração da fase larval e pupal como na massa pupal quando comparadas aos controles (TABELA 4.14), apenas a fração diclorometânica não foi possível estimar estatisticamente pois ocorreu mortalidade elevada.

TABELA 4.14 - Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as frações de ramos de *T. pallens*, a 100 mg.kg⁻¹.Temp.: 25 ± 1°C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12h.

Tratamento	Duração	Duração (dias) (±	Massa pupal (mg)
	(dias) (± EP) Fase larval	EP) Fase pupal	
Branco	13,95 ± 1,046 b	9,58 ± 0,837 a	286,50 ± 27,894 a
Controle MeOH	14,00 ± 1,443 b	9,48 ± 1,675 a	278,36 ± 32,255 a
Controle (Hexano:DCM)	14,58 ± 2,996 b	9,63 ± 0,769 a	271,31 ± 37,976 a
Controle (Acetona:DCM)	14,50 ± 1,790 b	9,73 ± 0,703 a	285,25 ± 36,554 a
Fração hexânica	15,67 ± 1,455 ab	10,00 ± 1,033 a	283,63 ± 17,278 a
Fração acetato de etila	16,87 ± 2,117 a	9,68 ± 0,779 a	273,89 ± 38,450 a
Fração hidroalcoólica	16,46 ± 1,644 a	9,26 ± 1,913 a	283,39 ± 27,392 a

¹ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P ≤ 0,05).

Os resultados obtidos para mortalidade larval foram bem contrastantes, sendo que a fração hexânica apresentou 40% quando comparada ao seu controle e a fração diclorometânica 100% de mortalidade larval. A mortalidade pupal não foi significativa, quando comparadas ao controle (TABELA 4.15). Os bons resultados obtidos são corroborados pela literatura (BORGONI et al., 2003). Assim, a fração diclorometânica é bastante promissora uma vez que não há relatos na literatura para estudo fitoquímico e atividade desta quando incorporada em dieta artificial de *S. frugiperda*.

TABELA 4.15 - Médias da mortalidade de fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as frações de ramos de *T. pallens*, a 100 mg.kg⁻¹.Temp.: 25 ± 1^oC; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12h.

Tratamento	Mortalidade larval (%) (± EP)	Mortalidade pupal (%) (±EP)
Branco	21,47 ± 11,172 b	12,50 ± 11,546 a
Controle MeOH	13,7 ± 15,168 b	6,67 ± 11,547 a
Controle (Acetona:DCM)	37,4 ± 19,957 b	21,43 ± 25,752 a
Controle (Hexano:DCM)	13,33 ± 15,275 b	8,10 ± 7,337 a
Fração hexânica	40,00 ± 10,000 b	10,30 ± 8,994 a
Fração diclorometânica	100,00 ± 0,000 a	0,00 ± 0,000 a
Fração acetato de etila	23,33 ± 5,774 b	4,17 ± 7,217 a
Fração hidroalcóolica	6,67 ± 5,774 b	3,70 ± 6,409 a

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Para os tratamentos com as frações das folhas de *T. pallens*, os resultados obtidos na duração da fase larval e pupal foram diferenciados quando comparados aos controles. Para as médias de massa pupal, houve pequenas diminuições de massa quando comparadas aos seus controles, TABELA 4.16.

TABELA 4.16 - Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as frações das folhas de *T. pallens*, a 100 mg.kg⁻¹.Temp.: 25 ± 1^oC; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12h.

Tratamento	Duração (dias) (± EP)	Duração (dias) (± EP)	Massa pupal (mg) (±EP) ¹
	Fase larval	Fase pupal	
Branco	13,95 ± 1,046 b	9,58 ± 0,838 a	286,50 ± 27,894 ab
Controle MeOH	14,00 ± 1,443 b	9,48 ± 1,675 a	278,36 ± 32,255 ab
Controle DCM	13,70 ± 1,329 b	9,24 ± 1,044 a	282,18 ± 36,080 ab
Controle Hexano	14,32 ± 1,611 b	9,27 ± 1,185 a	285,46 ± 23,366 ab
Fração hexânica	16,71 ± 2,054 a	9,08 ± 1,188 a	290,50 ± 29,550 ab
Fração diclorometânica	16,20 ± 2,569 a	10,00 ± 1,291a	263,87 ± 30,137 b
Fração acetato de etila	15,11 ± 2,088 ab	9,33 ± 1,033 a	267,66 ± 24,280 ab
Fração hidroalcóolica	14,11 ± 0,937 b	9,82 ± 0,727 a	296,37 ± 26,536 a

¹Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Os resultados de mortalidade larval foram bastante satisfatórios (TABELA 4.17), uma vez que ao comparar com os controles, as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila mostraram mortalidades de 51,47 %, 50% e 70%. Estes dados estão correlacionados com o melhor efeito obtido pelo extrato bruto etanólico das folhas de *T. pallens* (70 % de mortalidade) e assim, estes resultados indicaram em quais frações extraídas estariam os princípios ativos e também, corrobora com os dados da literatura. Segundo BORGONI et al. (2003) extratos aquosos de ramos e folhas de *T. pallens* apresentaram bons resultados frente à *S. frugiperda*, segundo os autores o extrato de folhas de *T. pallens* causou mortalidade total das lagartas quando aplicadas sobre as folhas do milho. Não houve diferença quanto à mortalidade pupal (TABELA 4.17), porém verificou-se variação de 5 a 36 % de mortalidade pupal ao comparar os tratamentos com os controles.

TABELA 4.17- Médias da mortalidade de fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com as frações das folhas de *T. pallens*, a 100 mg.kg⁻¹.Temp.: 25 ± 1°C; UR: 70 ± 5% e fotofase: 12h.

Tratamento	Mortalidade larval (%) (± EP)	Mortalidade pupal (%) (±EP)
Branco	21,47 ± 11,172 bc	12,50 ± 11,456 a
Controle MeOH	13,70 ± 15,168 bc	6,67 ± 11,547 a
Controle DCM	23,33 ± 20,817 bc	6,67 ± 11,547 a
Controle Hexano	6,67 ± 5,774 c	7,03 ± 6,116 a
Fração hexânica	51,47 ± 16,200 ab	5,53 ± 9,584 a
Fração diclorometânica	50,00 ± 10,000 ab	13,87 ± 12,722 a
Fração acetato de etila	70,00 ± 10,000 a	36,10 ± 12,733 a
Fração hidroalcóolica	36,67 ± 23,094 abc	13,33 ± 11,547 a

* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05).

Seguindo esta metodologia, foram realizadas avaliações de todo o desenvolvimento de *S. frugiperda* quando incorporados na dieta artificial 0,3, 3, 15 e 30 mg de cedrelona. Os resultados alcançados foram bastante satisfatórios (TABELAS 4.18 e 4.19), os tratamentos com 15 e 30 mg de cedrelona incorporada na dieta mostraram um efeito significativo no desenvolvimento dos insetos, principalmente na duração da fase larval, em que o período de crescimento foi alongado e os insetos não se desenvolveram.

TABELA 4.18 - Médias da duração de fase larval, fase pupal e massa pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com cedrelona em diferentes concentrações. [Temp.: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $70 \pm 5\%$ e fotofase: 12h].

Tratamento	Duração	Duração (dias) (\pm EP)	Massa pupal (mg) (\pm EP)*
	(dias) (\pm EP) Fase larval	(\pm EP) Fase pupal	
Branco	13,95 \pm 1,046 c	9,58 \pm 0,838 a	286,50 \pm 27,894 a
Controle acetona	14,59 \pm 1,869 bc	9,16 \pm 0,688 a	289,68 \pm 20,453 a
Cedrelona 0,3 mg	15,76 \pm 2,538 b	9,58 \pm 1,176 a	273,12 \pm 29,616 ab
3 mg	17,00 \pm 4,369 b	9,57 \pm 1,434 a	260,83 \pm 29,667 b
15 mg	23,64 \pm 5,182 a	11,25 \pm 3,594 a	157,70 \pm 44,610 c

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

TABELA 4.19 - Médias da mortalidade de fase larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta artificial tratada com cedrelona em diferentes concentrações. [Temp.: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$; UR: $70 \pm 5\%$ e fotofase: 12h].

Tratamento	Mortalidade larval (%)	Mortalidade pupal (%)
	(\pm EP)	(\pm EP)*
Branco	21,47 \pm 11,172 c	12,50 \pm 11,456 b
Controle acetona	26,67 \pm 11,547 c	13,86 \pm 12,722 b
Cedrelona 0,3 mg	43,33 \pm 11,547 bc	0,00 \pm 0,000 b
3 mg	23,33 \pm 15,275 c	9,23 \pm 8,456 b
15 mg	63,33 \pm 5,774 bc	63,90 \pm 12,733 a
30 mg	100,00 \pm 0,000 a	0,00 \pm 0,000 b

* Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Durante a fase larval, no tratamento com 15 mg de cedrelona houve um alongamento de 9 dias em relação ao controle (15 dias) e para o tratamento com 30 mg não foi possível avaliar a duração da fase larval pois houve mortalidade total. A fase pupal não foi significativamente afetada. O prolongamento da fase larval relaciona-se geralmente com o crescimento mais lento e pouca ingestão de alimento.

Durante o bioensaio foi possível observar claramente a inibição do crescimento dos insetos, onde a maioria destes não crescia e não ocorria a muda para a fase pupa. Segundo KUBO et al., 1986, os resultados com o limonoide cedrelona no efeito inibitório do crescimento de diferentes insetos foram bastante

significativos frente às lagartas de *S. frugiperda* e foram comparados aos resultados obtidos pelo limonoide azadiractina, onde a cedrelona apresentou uma EC_{50} de 2 ppm enquanto a azadiractina 0,4 ppm. Com isso, estes resultados obtidos nesta tese são corroborados pela literatura.

Na avaliação da massa pupal, o tratamento com a fração de 15 mg apresentou uma diminuição de 131,98 mg em relação ao controle, o que equivale a uma redução de 46% (TABELA 4.18). Menor massa de pupas indica menor consumo de alimento ou menor conversão do alimento ingerido durante a fase larval, devido à presença de cedrelona que age como um deterrente.

O efeito no comportamento alimentar ocorre devido à presença de aleloquímicos na dieta, destacando-se entre esses, os antixenóticos. Assim, algumas substâncias estimulam a alimentação do inseto, sendo denominadas de substâncias estimulantes ou fagoestimulantes. No caso do inseto ser induzido a paralisar a alimentação, a substância que provoca este estímulo é chamada de fagodeterrente ou fago-inibidora (VENDRAMIM e CASTIGLIONI, 2000).

A inibição ou redução da alimentação está frequentemente relacionada com a inibição do crescimento e do desenvolvimento, diminuição da massa da lagarta e pupa, e alongamento da fase larval (SAXENA, 1987). Assim, quando existe pouca inibição da alimentação causada pela dose tóxica, o inseto cresce, mas é afetado nos estádios subsequentes. Por outro lado, quando a inibição da alimentação é grande, devido às altas dosagens, o inseto é afetado no mesmo estado biológico em que adquiriu a substância inseticida (HERNÁNDEZ, 1995). O principal efeito observado quando a cedrelona foi administrada foi sobre a inibição do crescimento e, como foi descrito na literatura, pode estar correlacionado com a fagodeterrencia do composto. Vários são os trabalhos descritos na literatura em que se demonstram as atividades inseticida, antialimentar e inibidora do crescimento dos insetos pelo limonoide cedrelona sobre diversas espécies de lepdópteros (SURESH *et. al.*, 2002; KOUL *et. al.*, 1992; ARNASON *et. al.*, 1987; KUBO *et. al.*, 1986).

A maioria dos limonoides isolados das meliáceas apresentam características fagodeterrentes. Estudos sobre os mecanismos de ação de substâncias fago-inibidoras demonstraram que a inibição ou redução da alimentação é causada devido à inativação da função de determinados quimiorreceptores ou do estímulo de receptores deterrentes específicos localizados mediano ou lateralmente em sensilas estilocônicas (LI, 1999). Cedrelona tem comprovada ação reguladora de

crescimento ao percevejo *Oncopeltus fasciatus* (CHAMPAGNE et al., 1989) e ação fagodeterrente a *Spodoptera litura* (KOUL, 1983).

Os resultados de mortalidade larval e pupal foram bastante satisfatórios (TABELA 4.19). Na avaliação da mortalidade larval, observou-se uma mortalidade significativa de 63% para o tratamento com 15 mg de cedrelona incorporada na dieta e de 100% para o tratamento com 30 mg, quando comparados aos seus respectivos controles. Os demais tratamentos não apresentaram efeito na sobrevivência das lagartas. Para o estágio pupal, observou-se uma mortalidade significativa apenas para o tratamento de 15 mg de cedrelona, contudo, com 30 mg não foi observada transformação para pupa em nenhuma lagarta e os demais tratamentos não foram estatisticamente significativos.

5 – ESTRATÉGIAS PARA DETECTAR CEDRELONA EM LAGARTAS DE *S. frugiperda* ALIMENTADAS COM DIETA ARTIFICIAL CONTENDO ESTE LIMONOIDE

Os ensaios biológicos para o estudo químico de *S. frugiperda* foram desenvolvidos no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), sob a colaboração do Prof. Dr. José Djair Vendramim e Dra. Angelina Maria Marcomini Giongo, em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos Pragas, com sede no Departamento de Química da UFSCar. Alguns experimentos foram realizados no Laboratório de Insetos do Departamento de Química da UFSCar, sob a colaboração da Profa. Dra. Andréia Pereira Matos.

5.1 – Uso da RMN na detecção de cedrelona em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide

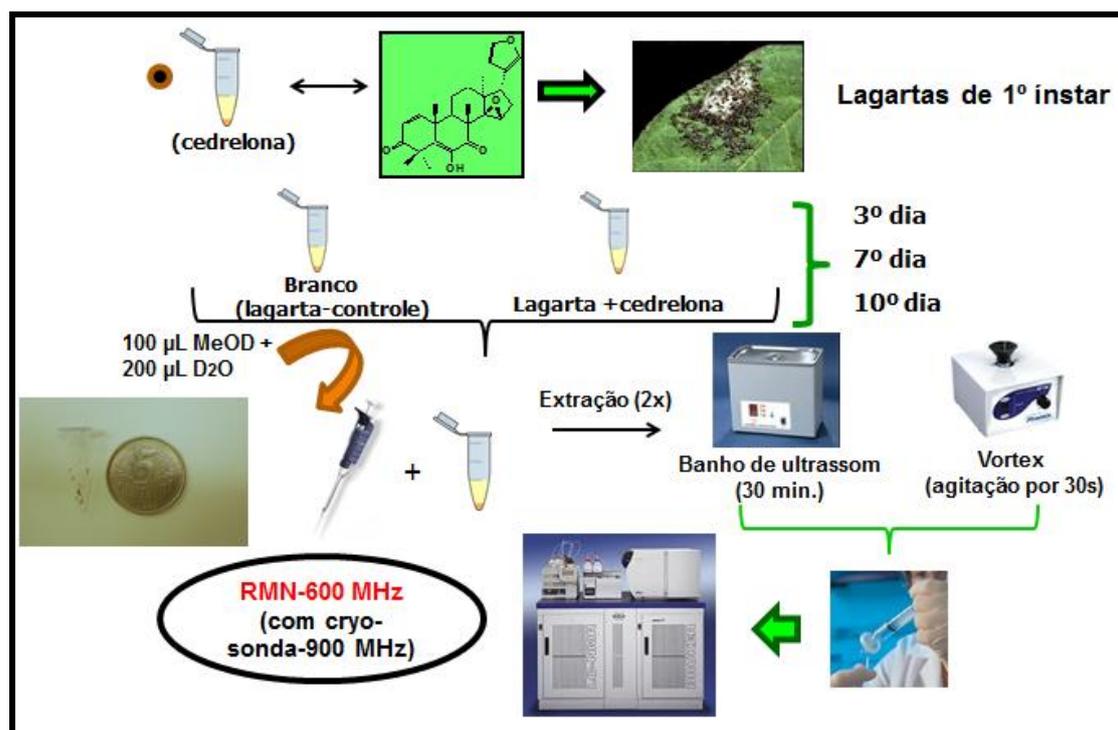
Os experimentos foram desenvolvidos no Departamento de Química da UFSCar nos laboratórios de Produtos Naturais e de Ressonância Magnética Nuclear, sob a colaboração do Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e do aluno de doutorado Elenilson de Godoy Alves Filho.

5.1.1 - Metodologia

Lagartas de *S. frugiperda* no primeiro ínstar larval foram separadas durante o ensaio de bioatividade realizado com o limonoide cedrelona (1) na concentração de 300 ppm (TABELA 4.11), nos 3º, 7º e 10º dias de ensaios. Foram separadas, aleatoriamente, lagartas alimentadas com cedrelona e controles (lagartas sem a presença do limonoide, em contato com o solvente orgânico ou a água) e todas foram armazenadas em freezer -80°C para posteriores análises.

Primeiramente, foi realizada a otimização para a escolha dos solventes de extração das lagartas inteiras. Os solventes escolhidos foram água e metanol

numa proporção de 2:1, no entanto, elas não eram totalmente solubilizadas, devido sua camada lipídica ou cerosa. As lagartas de ambos os tratamentos (com cedrelona e controle) foram submetidas ao processo de extração, sendo maceradas em uma mistura de 200 μL de água deuterada e 100 μL de metanol deuterado sob agitação (em um vórtex) por 30s e mantida por 30 minutos em banho de ultrassom. O processo de extração foi realizado por duas vezes, para garantir uma extração eficiente. Em seguida, o sobrenadante foi separado da fase sólida precipitada com o auxílio de seringa, e após foi filtrada com membrana PTFE (15 mm, 0,22 μm) e transferida para um microtubo de 1,5 mL. A massa larval obtida de *S. frugiperda* foi analisada utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H em 600 MHz, devido à massa pequena de extrato obtido. Essa massa foi pequena porque os ensaios foram realizados com *S. frugiperda* em primeiro estágio larval, e além disso quando alimentadas com cedrelona houve inibição do crescimento das mesmas. Este procedimento pode ser melhor compreendido através do ESQUEMA 5.1.



ESQUEMA 5.1- Procedimento experimental de extração das lagartas de *S. frugiperda* em primeiro instar larval para estudos via RMN.

5.2 – Uso da EM na detecção de cedrelona em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide

Para o presente estudo, as análises foram realizadas no Departamento de Química da UFSCar e no Instituto de Química da USP-São Carlos utilizando o Espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos / NanoLCSystem – Thermo Scientific, sob a colaboração do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e da aluna de Doutorado Livia Medeiros Soman.

5.2.1 - Metodologia

Os ensaios biológicos para o estudo do metabolismo da cedrelona pelo inseto foram realizados em condições de laboratório (temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas), com lagartas de *S. frugiperda* no quinto instar larval criadas em dieta artificial (Greene *et al.*, 1976). Estes experimentos foram realizados utilizando-se dieta artificial em tubos ($8,5 \times 2,5$ cm) previamente esterilizados (ESQUEMA 5.2).

Os experimentos foram realizados em 5 e 24 horas de alimentação para a posterior dissecação dos insetos em seus respectivos órgãos (cabeça, hemolinfa, intestino médio), e simultaneamente foi feita a coleta das fezes excretadas. Foi preparada uma solução salina com NaCl a 0,8% para o auxílio na dissecação das lagartas e uma solução tampão anticoagulante para hemolinfa com o pH ajustado a 4,5 (em um litro de água destilada autoclavada: NaOH 98 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 1,7 mM e ácido cítrico 46 mM).

5.2.1.1 - Amostras de *Spodoptera frugiperda*

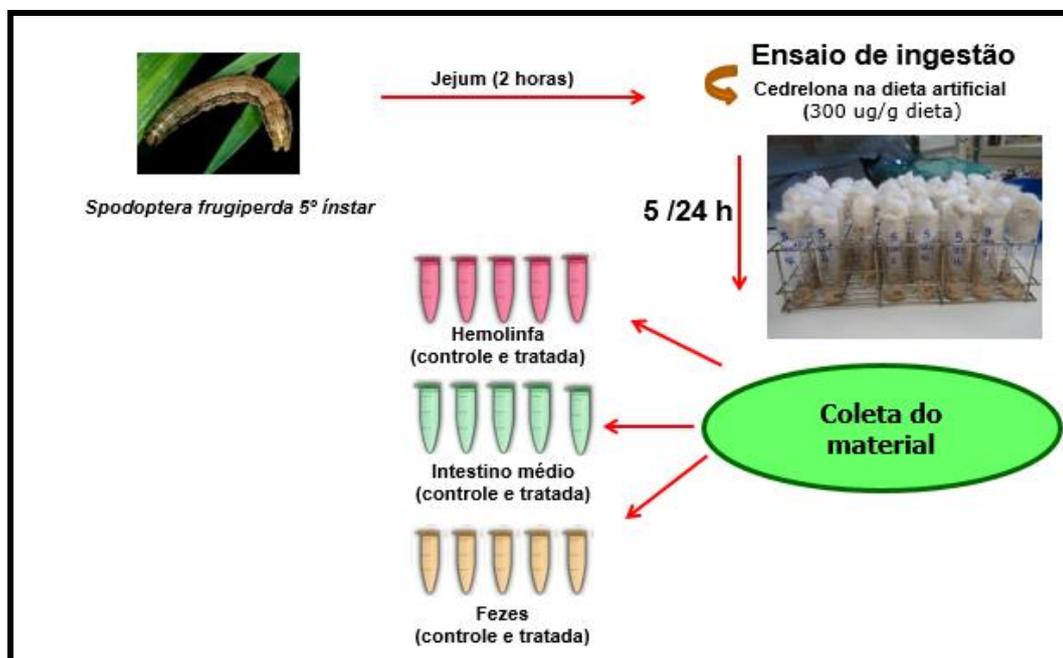
Lagartas de quinto instar ficaram em jejum por duas horas. Em seguida, cada lagarta recebeu, separadamente, uma dieta artificial contendo cedrelona solubilizada em acetona numa concentração de 300 $\mu\text{g/g}$ de dieta artificial. Foi realizado também o experimento para o controle, no qual havia apenas dieta com acetona. Após a alimentação, as lagartas de ambos os tratamentos, controle e com o limonoide cedrelona, foram dissecadas em solução salina para

coleta da hemolinfa e retirada do intestino médio com o auxílio de bisturi sob estereomicroscópio. Também foi realizada a coleta das fezes excretadas em ambos os tratamentos (ESQUEMA 5.3).

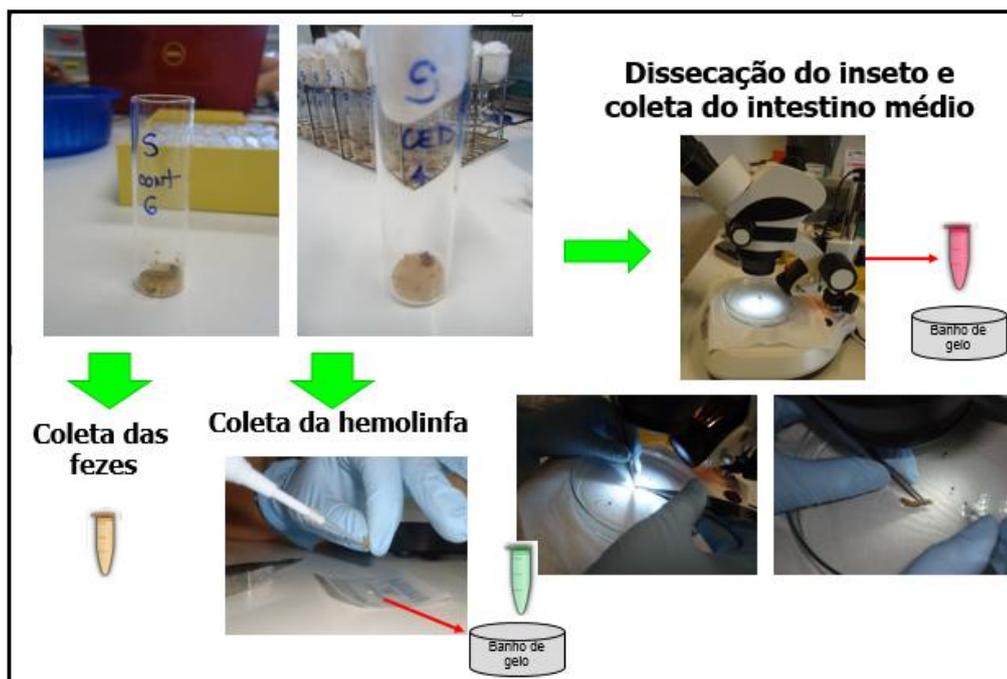
Para a retirada da hemolinfa, primeiramente, a lagarta foi imersa em banho de gelo e após alguns minutos suas pernas medianas foram cortadas com o auxílio de um bisturi. Foram coletados 3 uL de hemolinfa de cada lagarta, que foi misturada à solução anticoagulante. Todo o material foi posteriormente armazenado a -80°C até a realização das análises. Após a retirada da hemolinfa, a lagarta foi submersa na solução salina e, com auxílio de bisturi e pinças cirúrgicas sob estereomicroscópio, foi realizada a retirada do intestino médio e armazenados em microtubos para a posteriores análises.

As fezes foram coletadas com auxílio de espátula e adicionadas em microtubos. Todas as amostras foram congeladas em freezer -80°C para as análises posteriores.

Para a realização do experimento com 24 horas de alimentação foi adotada a mesma metodologia, porém neste experimento foi retirada a cabeça das lagartas de *S. frugiperda* para a realização do estudo de metabolização da cedrelona pelo inseto.



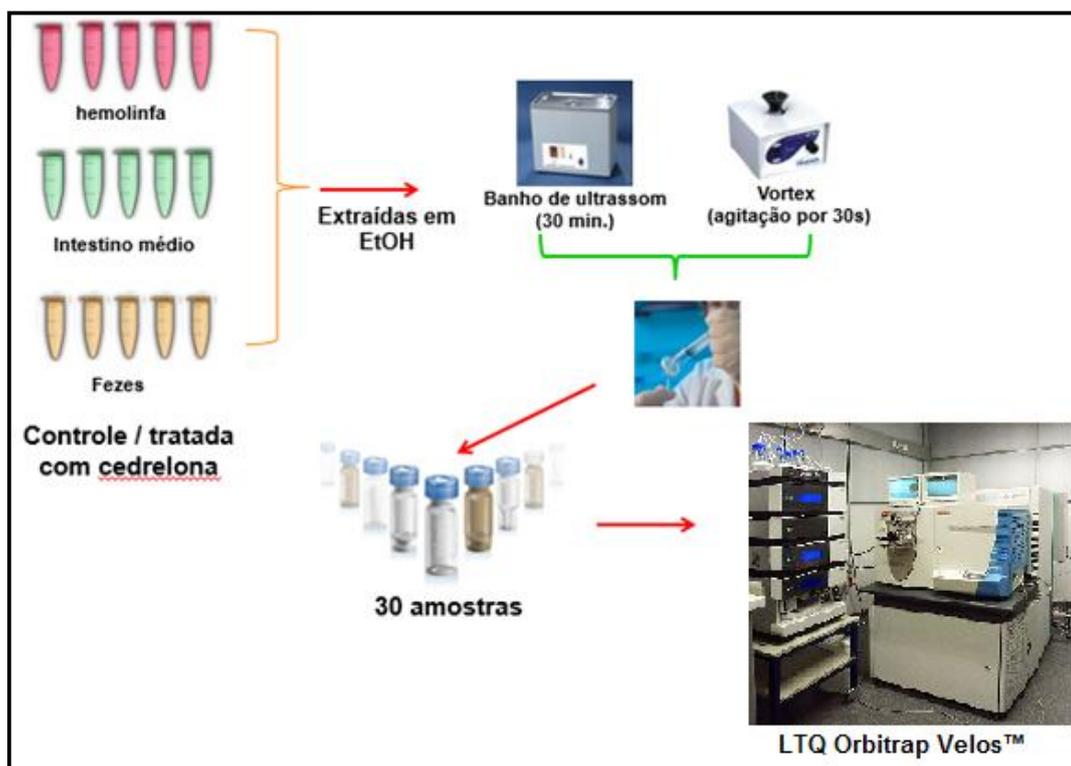
ESQUEMA 5.2 - Experimento do metabolismo da cedrelona realizado com lagartas de *S. frugiperda* no 5º instar usando dieta enriquecida com o princípio ativo.



ESQUEMA 5.3 - Experimento de dissecção das lagartas de *Spodoptera frugiperda* no 5º instar e a coleta da hemolinfa, intestino médio e das fezes excretadas, com réplicas biológicas para cada tratamento.

5.2.1.2 - Preparo dos extratos das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo o limonoide cedrelona para análises via LTQ Orbitrap Velos™

Todas as amostras (hemolinfa, intestino médio e fezes), tanto do controle como aquelas das lagartas alimentadas com cedrelona foram submetidas à extração. A hemolinfa, o intestino médio e as fezes foram macerados em etanol (1000 μ L) sob agitação (em um vortex) por 30 segundos e mantidas por 30 minutos em banho de ultrassom. Este procedimento foi realizado 3 vezes para uma melhor extração. Em seguida, o sobrenadante foi separado da fase sólida precipitada com o auxílio de seringa e após em membrana de politetrafluoretileno / PTFE (15 mm, 0,22 μ m) e transferida para um vial. Foram realizadas quintuplicatas biológicas tanto para o controle como para as lagartas do tratamento com cedrelona (ESQUEMA 5.4). Todos os extratos etanólicos preparados foram submetidos às análises via Espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos™.



ESQUEMA 5.4 - Extração da hemolinfa, intestino médio e das fezes para análises via Linear ion trap - Orbitrap (LTQ Orbitrap Velos™).

5.2.1.3 - Espectrômetro de Massas LTQ Orbitrap Velos™

O equipamento é um espectrômetro de massas de alta resolução que usa o sistema de espectrometria de massas em *tandem*, isto é, MS-MS, para executar estágios múltiplos de fragmentação. O equipamento consiste de um quadrupolo de captura iônica linear (linear ion trap - LTQ) associado a um espectrômetro Orbitrap. O LTQ-Orbitrap Velos é capaz de fornecer a alta precisão de massas necessária para elucidação estrutural de pequenas moléculas, rapidez e diversidade de processos de fragmentação para sequenciamento de proteínas e peptídeos, e sensibilidade analítica para análise de traços de metabólitos, poluentes e fármacos em uma grande variedade de matrizes.

5.2.1.4 - Método otimizado para as análises dos extratos obtidos das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo o limonoide cedrelona via LTQ Orbitrap Velos™ no experimento de 5 horas de alimentação

Para a análise dos extratos etanólicos de hemolinfa, intestino médio e fezes previamente preparados, foi injetada uma alíquota de 20 µL dos analitos no cromatógrafo líquido de ultra-performance, via injetor automático, utilizando um fluxo de 500 µl/min em uma coluna X-terra - C18 - 3.5 µm – Waters (3.0 X 30 mm). Foi utilizada como fase móvel A: H₂O (0,1% ácido fórmico) e B: metanol (0,1% ácido fórmico) em um gradiente de eluição: 0 min (55% B); 3 min (70 % B); 10 min (100 % B); 12 min. (100 % B); 12,5 min. (55% B) e 15 min (55% B).

Para o ajuste dos parâmetros do espectrômetro de massas (EM), foi realizada a inserção direta do analito (solução de cedrelona) e a intensidade do sinal referente ao íon molecular foi monitorada, realizando-se otimizações das energias no EM para uma melhor detecção do íon molecular, para garantir sensibilidade nas análises. Para as otimizações, foi realizada o preparo de soluções de cedrelona em etanol em diferentes concentrações 100 ng/mL > 10 ng/mL > 1 ng/mL > 0,1 ng/mL. As análises foram realizadas utilizando-se a fonte de ionização APCI no modo positivo de ionização.

Os parâmetros do espectrômetro de massas: APCI (+), FTMS, resolução de 60000, fluxo de gás de secagem de 60 ars., fluxo do gás auxiliar de 20 ars, fluxo do gás de varredura 0 arb, temperatura do vaporizador 400 °C, corrente da descarga de 5 µA, temperatura do capilar de 350 °C e S-lente de 30 %. Por fim, os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre *m/z* 130 a *m/z* 550.

Diante do método cromatográfico ajustado, foram realizadas as análises para os extratos de hemolinfa (5 lagartas controle e 5 lagartas tratada com cedrelona), do intestino médio (5 lagartas controle e 5 lagartas tratada com cedrelona) e das fezes excretadas (5 lagartas controle e 5 lagartas tratada com cedrelona), em um total de 30 extratos. Todos os dados foram analisados em quintuplicata, uma vez que se trata de réplicas biológicas e assim, garantindo uma melhor confiabilidade. Os dados serão apresentados neste trabalho em triplicatas.

5.2.1.5 - Detecção da cedrelona nos extratos obtidos das lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide via LTQ Orbitrap Velos™ no experimento de 5 horas de alimentação

As amostras (intestino médio, hemolinfa e fezes) e os controles obtidos no experimento foram submetidas às análises por LC-MS/MS. Os dados obtidos foram baseados em íons selecionados e extraídos para a massa monoisotópica da cedrelona obtida e analisada nas mesmas condições cromatográficas. Os picos cromatográficos obtidos também foram submetidos à comparação ao tempo de retenção da cedrelona e ao seu perfil de fragmentação.

A identificação dos picos cromatográficos também foi baseada nos principais mecanismos de destoxificação utilizados por Lepidóptera, os quais se dividem em fase I e fase II. Na fase I, as enzimas, principalmente as monooxigenases P450, inserem grupos polares e reativos por meio da oxidação, hidrólise e redução para posterior excreção, já na fase II, os metabólitos ativados na fase I são conjugados com glicose, glutathione, sulfato, glucuronato ou fosfato (SCHOONHOVEN et al., 2005; CHANINE e O'DONNELL, 2011). Baseado nessas informações, algumas propostas foram feitas e são discutidas no item 5.4.3. Foi realizado a busca de possíveis produtos de metabolização da cedrelona pelo método de extração de íons selecionados e comparação dos tratamentos com cedrelona e amostras controle, para verificar possíveis picos de interesse.

5.2.1.6 - Desenvolvimento do Método de Quantificação da cedrelona nos extratos das fezes excretadas por *S. frugiperda* quando alimentadas com este limonoide - Preparo de Amostras e Otimização dos parâmetros via LTQ Orbitrap Velos™

Para análises de quantificação, um fator crucial para resultados precisos e exatos é que as amostras devem ser homogêneas e representativas de um material total. Porém, realizou-se o preparo dos extratos das fezes excretadas e coletadas para 5 lagartas diferentes e aleatórias quando as mesmas foram alimentadas com dieta enriquecida em cedrelona numa concentração de 300 µg/g

de dieta, no entanto, foram massas diferentes dos extratos uma vez que cada lagarta (réplica biológica) tem um metabolismo diferente, ou seja, cada uma apresenta um determinado consumo, porém numa mesma resposta metabólica. Com isso, foi construída uma curva de calibração com o padrão isolado do caule de *To. ciliata* e a partir destes dados, foi possível estimar a quantidade de cedrelona intacta excretada nas fezes das larvas de *S. frugiperda*. Também foi estimado os valores de cedrelona na dieta que restou nos tubos onde foram efetuados os experimentos, após a retirada da dieta que restou para as análises, estes foram lavados com etanol, extraídos e, posteriormente, analisados para se verificar se parte da cedrelona retida ficou nos tubos. Todos os tratamentos foram submetidos aos mesmos procedimentos de extração. O experimento realizado foi de 24 horas baseado no mesmo procedimento do ESQUEMA 5.2.

5.2.1.6.1 - Obtenção da curva de calibração

Para a preparação da solução estoque mediu-se precisamente 1 mg de cedrelona isolada de *To. ciliata* que foi transferida para um frasco de vidro volumétrico. O mesmo foi solubilizado em 1 mL de etanol, obtendo-se assim, a solução estoque a qual apresentou concentração nominal de 1000 µg/mL.

A partir da solução estoque foram preparadas as seguintes soluções padrão de calibração: 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 e 1000 ng/mL.

Com as soluções do padrão preparadas, em triplicatas, a curva de calibração foi obtida nas seguintes concentrações escolhidas: 1; 5; 7,5; 10; 25; 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 ng/mL. A curva de calibração foi obtida através da regressão linear, considerando a área das bandas cromatográficas relativas às concentrações dos analitos. Um mínimo de onze diferentes concentrações foi considerado. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação.

5.2.1.6.2 - Preparo das amostras dos extratos de fezes das lagartas de *S. frugiperda* no 5º instar quando alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona para análises de quantificação

As amostras escolhidas para a quantificação foram as fezes excretadas por cinco lagartas aleatórias de 5º instar quando alimentadas com cedrelona por 24 horas, além das fezes foi realizado para a dieta restante e para a solução obtida após a lavagem dos tubos onde foram realizados os experimentos. Após as etapas de pré-tratamento, cada amostra foi extraída com 1500 µL de EtOH sob agitação (em um vortex) por 30 s e mantidas por 30 minutos em banho de ultrassom, este procedimento foi realizado 3 vezes para uma melhor extração. Em seguida, o sobrenadante foi separado da fase sólida precipitada com o auxílio de seringa e filtrada com membrana PTFE (15 mm, 0,22 µm) e transferida para um vial. Foram realizadas cinco réplicas biológicas tanto para o controle como para as larvas do tratamento com cedrelona.

Cada seqüência de análise continha cinco amostras biológicas e experimentais para assegurar a seletividade do método. As amostras foram quantificadas pela construção de uma curva de calibração por padronização externa para a cedrelona. Para o tratamento da dieta artificial que restou foi realizado uma diluição de 10 µL da solução do extrato obtido devido à alta concentração destas amostras, obtendo-se uma solução de 1000 µL (990 µL de etanol + 10 µL de extrato). Uma vez obtidos os extratos diluídos, estes foram analisados sob os parâmetros cromatográficos otimizados. Assim, as amostras referentes à dieta restante foram quantificadas a partir dos valores obtidos para os extratos diluídos, e a partir destes, estimou-se os valores quantificados para os extratos concentrados.

5.2.1.6.3 - Parâmetros das análises de quantificação dos extratos de fezes das lagartas de *S. frugiperda* no 5º instar quando alimentadas com cedrelona via LTQ Orbitrap Velos™

Para a análise dos extratos das fezes, dieta restante e da lavagem dos tubos, foi injetada uma alíquota de 20 µL no cromatógrafo líquido de ultra-performance, via injetor automático, utilizando um fluxo de 500 µl/min em uma

coluna X-terra- C18 - 3.5 µm- Waters, 3.0 X 30 mm. Foi utilizada como fase móvel A: H₂O (0,1% ácido fórmico) e B: metanol (0,1% ácido fórmico) em um gradiente de eluição: 0 min (15% B); 4 min (60 % B); 7 min (70 % B); 9 min. (100 % B); 12,0 min. (100% B) e 15 min (15% B).

Os parâmetros do espectrômetro de massas: APCI (+), FTMS, resolução de 60000, fluxo de gás de secagem de 60 ars, fluxo do gás auxiliar de 20 ars, fluxo do gás de varredura 0 arb, temperatura do vaporizador 400 °C, corrente da descarga de 5 µA, temperatura do capilar de 350 °C e S-lente de 30 %. Por fim, os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre *m/z* 130 a *m/z* 550.

5.2.1.7 - Estudo da metabolização da cedrelona a partir dos extratos de hemolinfa, intestino médio, cabeça e fezes excretadas de lagartas de *S. frugiperda* no 5º instar larval quando alimentadas com cedrelona durante 24 horas - via LTQ Orbitrap Velos™

Os ensaios biológicos para o estudo do metabolismo da cedrelona pelo inseto foram realizados nas mesmas condições do experimento realizado em 5 horas de alimentação, assim como o preparo dos extratos segundo os ESQUEMAS 5.2 e 5.3. Para o preparo dos extratos da cabeça, foi realizado utilizando-se a solução salina e auxílio de bisturi e pinças cirúrgicas sob estereomicroscópio. As amostras da cabeça de cada lagarta foram armazenadas em microtubos para posteriores análises. O método para o LC-MS/MS utilizado foi o mesmo para o estudo de quantificação, uma vez que foi o mesmo experimento biológico. Os cromatogramas para os extratos de hemolinfa, intestino médio e cabeça serão apresentados em triplicatas para os tratamentos com cedrelona e controle.

A identificação da cedrelona intacta e possíveis produtos de metabolização nas fezes e nos órgãos dos insetos (hemolinfa, intestino e cabeça) foram realizados a partir da comparação dos seus cromatogramas com aqueles dos respectivos controles e padrão.

5.3 - Análise da atividade metabólica do inseto

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Plantas Inseticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), sob a colaboração do Prof. Dr. José Djair Vendramim e Dra. Angelina Maria Marcomini Giongo.

5.3.1. Metodologia

A fim de se verificar os efeitos da cedrelona sobre os processos de metabolismo das lagartas, foram determinados parâmetros nutricionais a partir das lagartas alimentadas com cedrelona. Assim, mediu-se a taxa metabólica relativa que é a quantidade de alimento gasto pela lagarta em metabolismo por grama de massa corpórea por dia e o custo metabólico que indica a porcentagem de alimento que é metabolizado em energia para a manutenção da vida. Ambos os parâmetros foram avaliados e comparados às lagartas controle sem a presença de cedrelona na dieta.

Assim, lagartas de quarto instar foram individualizadas em tubos de vidro (8,5 x 2,5 cm), que foram pesados antes e depois da colocação da dieta artificial contendo cedrelona na concentração 300 µg/g (300 ppm) de dieta. A cedrelona foi dissolvida em 1 mL de acetona e misturada à dieta após a preparação, antes que solidificasse, e à dieta controle foi adicionado o mesmo volume de acetona. Após quatro dias, as lagartas e as fezes foram separadas das sobras de dieta e as lagartas foram mortas por congelamento. Todo o material foi colocado em estufa de secagem a 50 °C, durante 7 dias, para a obtenção da massa de matéria seca, sendo, em seguida, os referidos materiais pesados e utilizados para a determinação dos índices nutricionais. A partir destes dados foi possível obter, no período de alimentação, a massa do alimento fornecido (Af), a massa do alimento restante (Ar), a massa das fezes (F), o ganho da massa das lagartas (B), a massa média das lagartas (C) e a massa do alimento ingerido (I). Para a quantidade de alimento metabolizado (M) é estimado a partir da fórmula $M = [(I-F)-B]$. Em seguida, foi possível determinar o valor da taxa metabólica relativa e o custo metabólico, como indicado a seguir:

•Taxa metabólica relativa (RMR) (g/g/dia)

$$\text{RMR} = \frac{\text{M}}{\text{C} \times \text{T}}$$

M = quantidade de alimento metabolizado (g)

C = massa média das lagartas (g)

T = tempo de alimentação (dias)

•Custo metabólico (MC) (%)

$$\text{MC} = 100 - \frac{\text{B}}{\text{I} - \text{F}} \times 100$$

B = ganho de massa das lagartas (massa final – inicial) (g)

I = quantidade de alimento ingerido (g)

F = quantidade de fezes (g)

5.4 - Resultados e Discussões - Uso da RMN na detecção de cedrelona em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide

Foram realizadas as análises de todas as amostras via RMN ¹H afim de verificar qual o perfil químico de cada uma delas e, a partir destes dados, indentificar possíveis produtos do metabolismo da cedrelona realizado pelo inseto em diferentes estágios de desenvolvimento buscando entender o mecanismo de metabolização da substância administrada. Os espectros de RMN ¹H foram comparados utilizando o programa TopSpin. Todos os espectros foram analisados e comparados ao controle no mesmo estágio larval.

As amostras referentes às larvas alimentadas com dieta artificial sem a presença do limonoide cedrelona, produziram espectros de RMN de ¹H (FIGURAS 5.1- 5-5) revelando claramente que não houve alteração no metabolismo do inseto. Foram observadas pequenas alterações que podem ser justificadas por se tratar de amostras de organismo animal em diferentes estádios de desenvolvimento larval e também foi observado que houve reprodutibilidade, o que mostrou eficiência no método de extração.

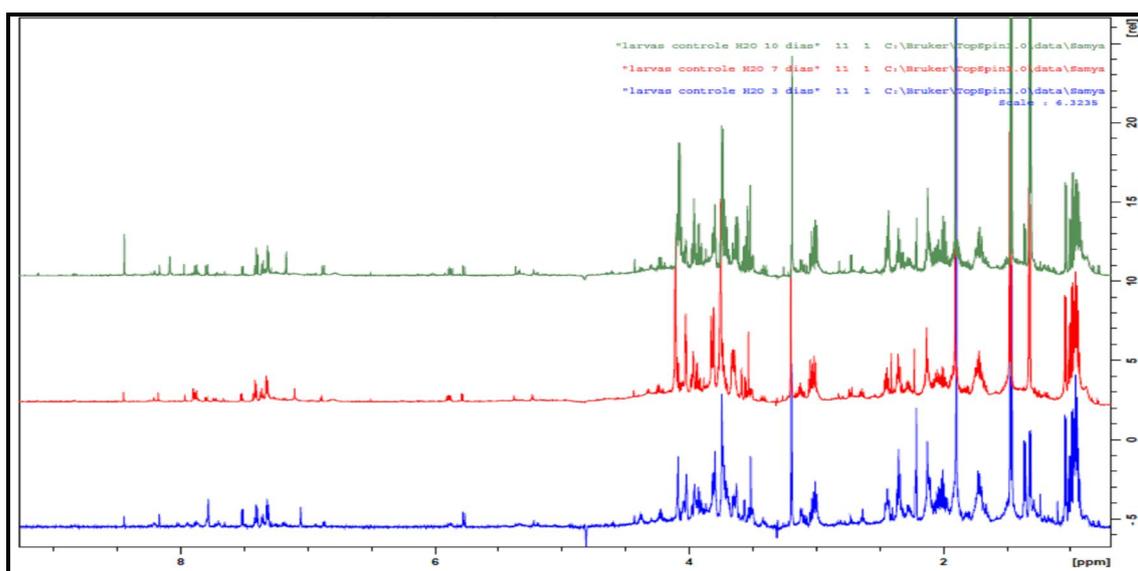


FIGURA 5.1- Comparação dos espectros de RMN ^1H (D_2O e MeOD; 600 MHz) dos extratos dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 3 $^\circ$, 7 $^\circ$ e 10 $^\circ$ dias de ensaio. Legenda (**verde**: 10 dias; **vermelho**: 7 dias e **azul**: 3 dias).

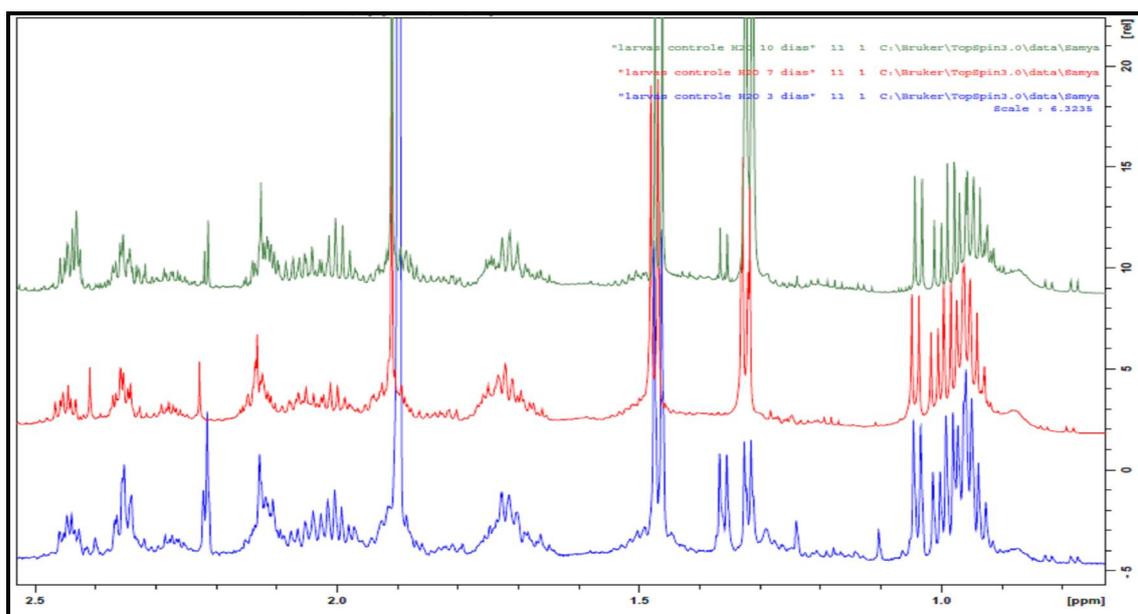


FIGURA 5.2- Ampliação da região δH 2,5 a 0,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3 $^\circ$, 7 $^\circ$ e 10 $^\circ$ dias de ensaio]. Legenda (**verde**: 10 dias; **vermelho**: 7 dias e **azul**: 3 dias).

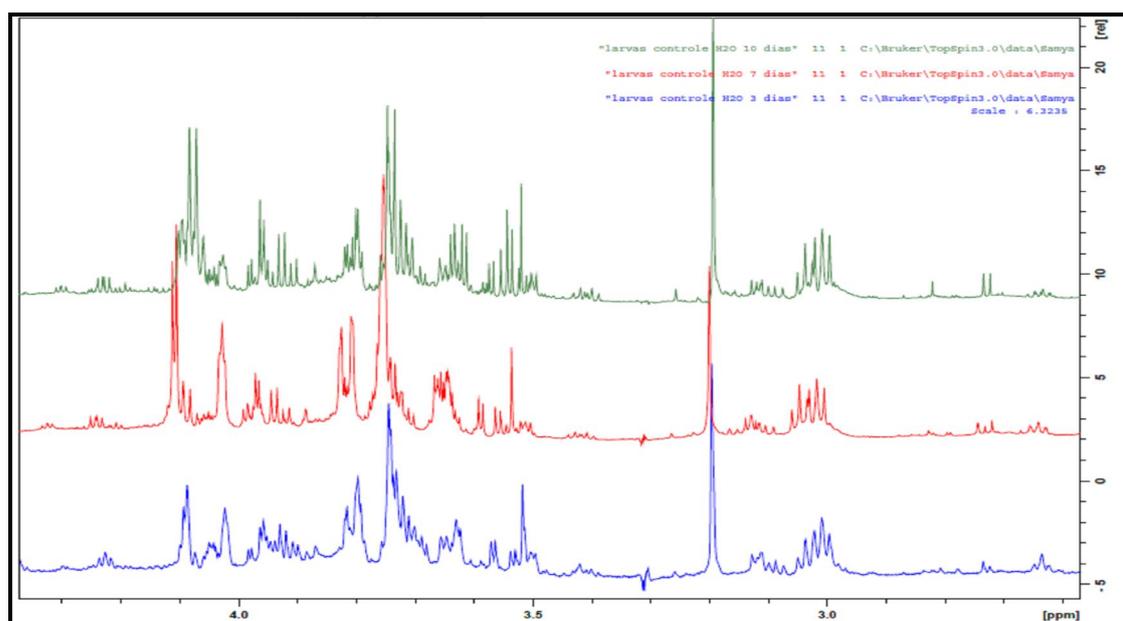


FIGURA 5.3 - Ampliação região δ H 4,5 a 2,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3^o, 7^o e 10^o dias de ensaio]. Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

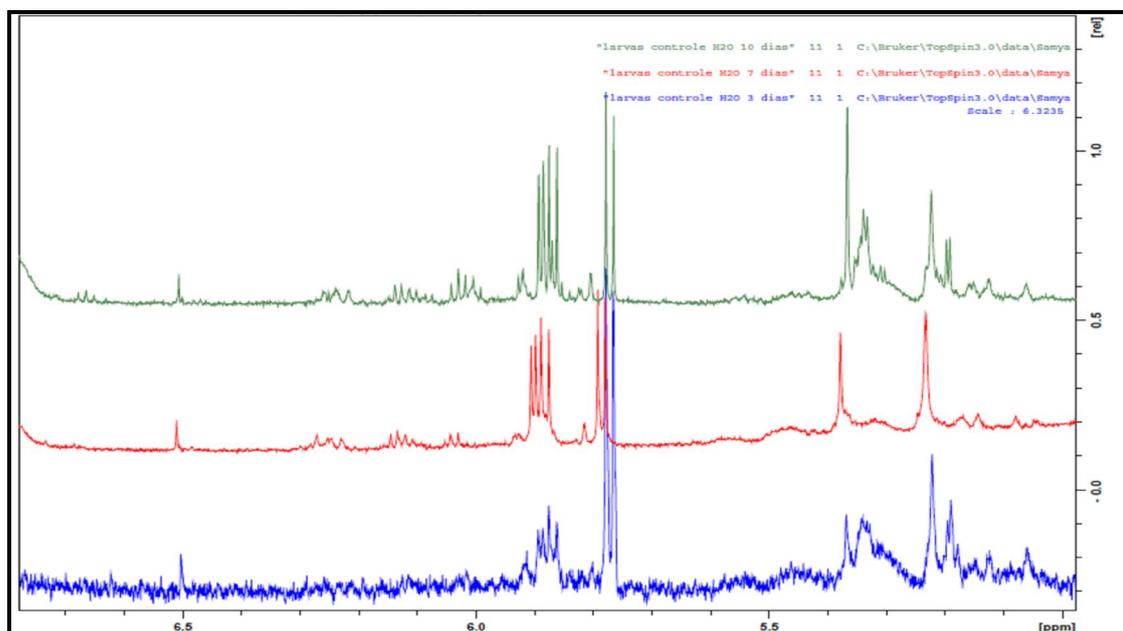


FIGURA 5.4 - Ampliação da região δ H 7,0 a 5,0 ppm comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3^o, 7^o e 10^o dias de ensaio]. Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

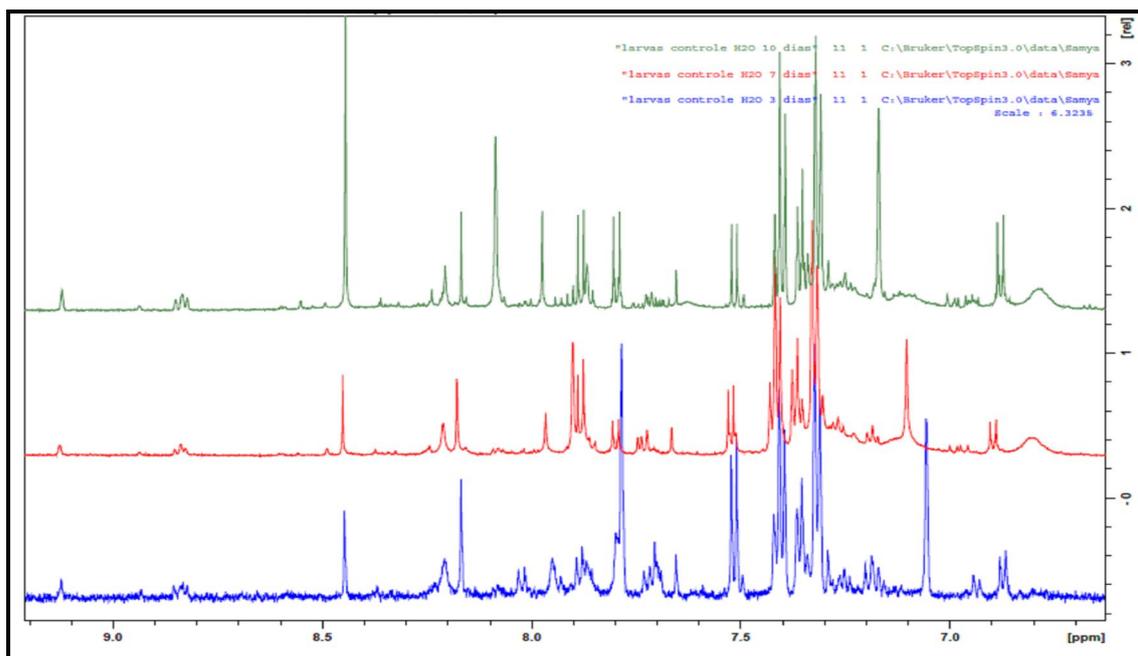


FIGURA 5.5- Ampliação da região δH 9,0 a 7,5 ppm da comparação dos espectros de RMN 1H dos extratos dos controles [lagartas sem a presença do limonoide cedrelona durante o 3º, 7º e 10º dias de ensaio]. Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

As amostras referentes às lagartas alimentadas com dieta contendo cedrelona mostraram diferenças significativas nos espectros. Esses mostram a presença do limonoide e outros sinais (FIGURA 5.6-5.10) que indicam variação metabólica do inseto nos diferentes estágios de desenvolvimento. Na região dos hidrogênios aromáticos (FIGURA 5.10 e 5.11) é mais visível maior diferença na comparação dos sinais, indicando a presença do limonoide e de alguns produtos que podem ser derivados da cedrelona metabolizada pelas larvas. O metabolismo ou detoxificação é a primeira resposta à presença de um possível inseticida. Este mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente para prevenir a ação no sítio alvo (FUKUTO e MALLIPUDI, 1983).

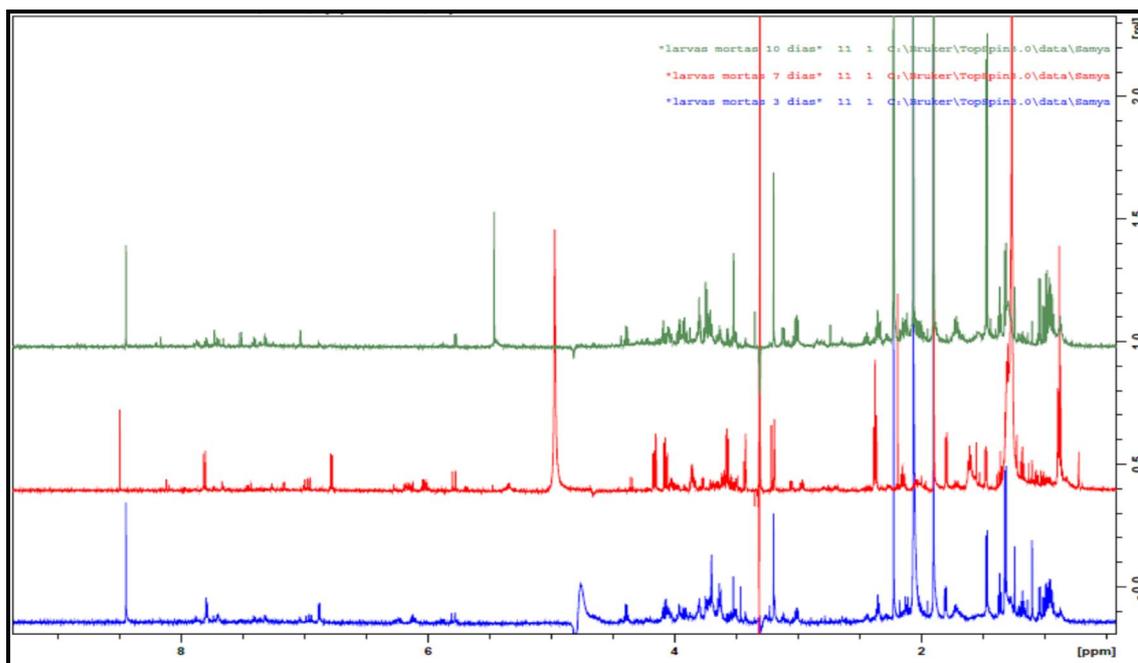


FIGURA 5.6 - Comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 $^{\circ}$, 7 $^{\circ}$ e 10 $^{\circ}$ dias de ensaio com o limonoide cedrelona (D_2O e MeOD; 600 MHz). Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

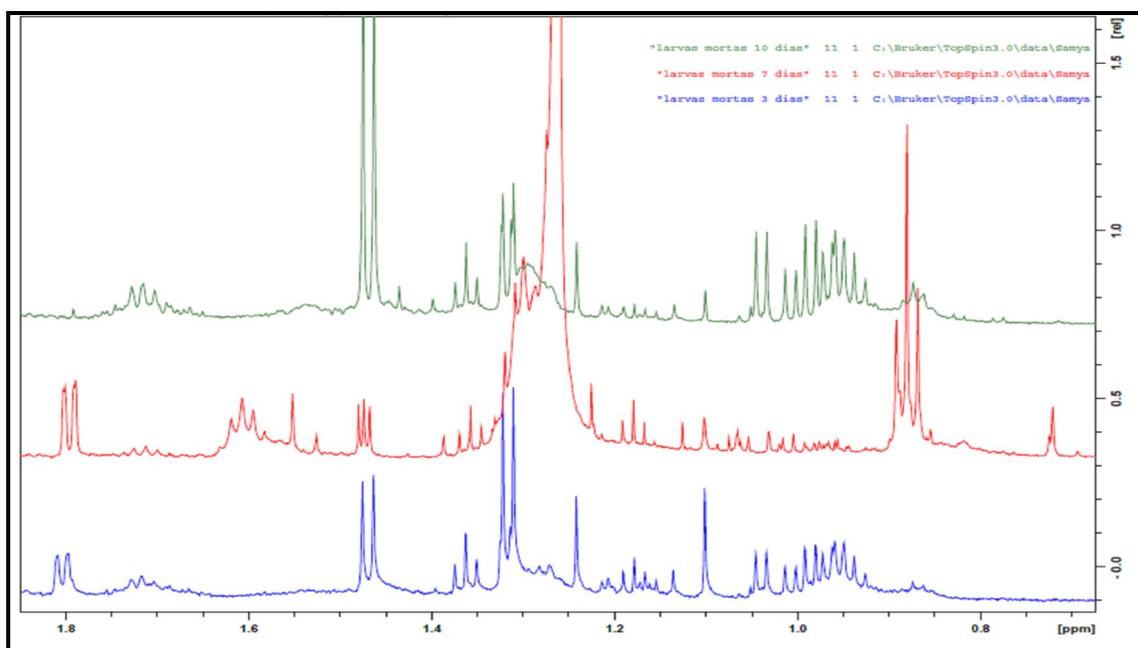


FIGURA 5.7 - Ampliação da região δH 1,8 a 0,7 ppm da comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 $^{\circ}$, 7 $^{\circ}$ e 10 $^{\circ}$ dias de ensaio com o limonoide cedrelona. Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

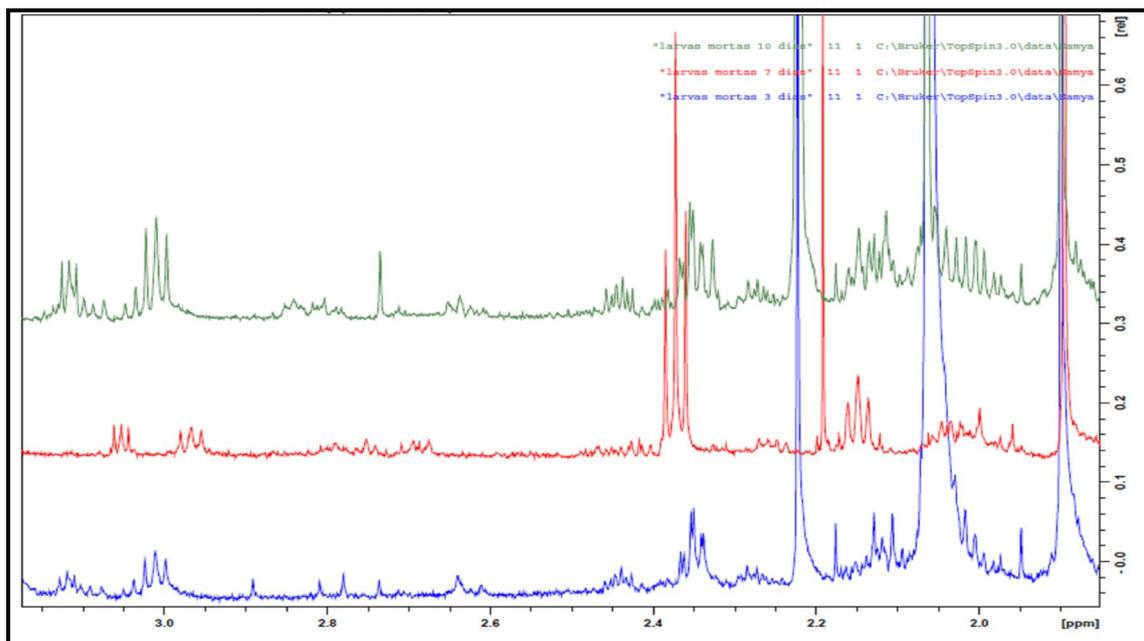


FIGURA 5.8. Ampliação da região δH 3,4 a 1,8 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3^o, 7^o e 10^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona. Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

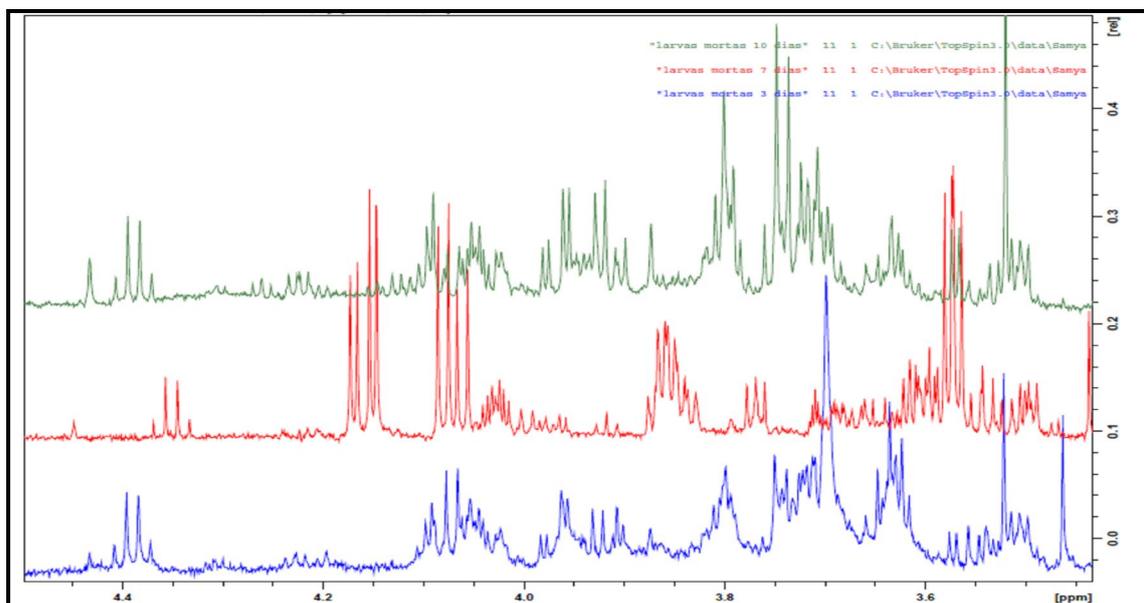


FIGURA 5.9. Ampliação da região δH 4,2 a 3,4 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3^o, 7^o e 10^o dias de ensaio com o limonoide cedrelona. Legenda (verde: 10 dias; vermelho: 7 dias e azul: 3 dias).

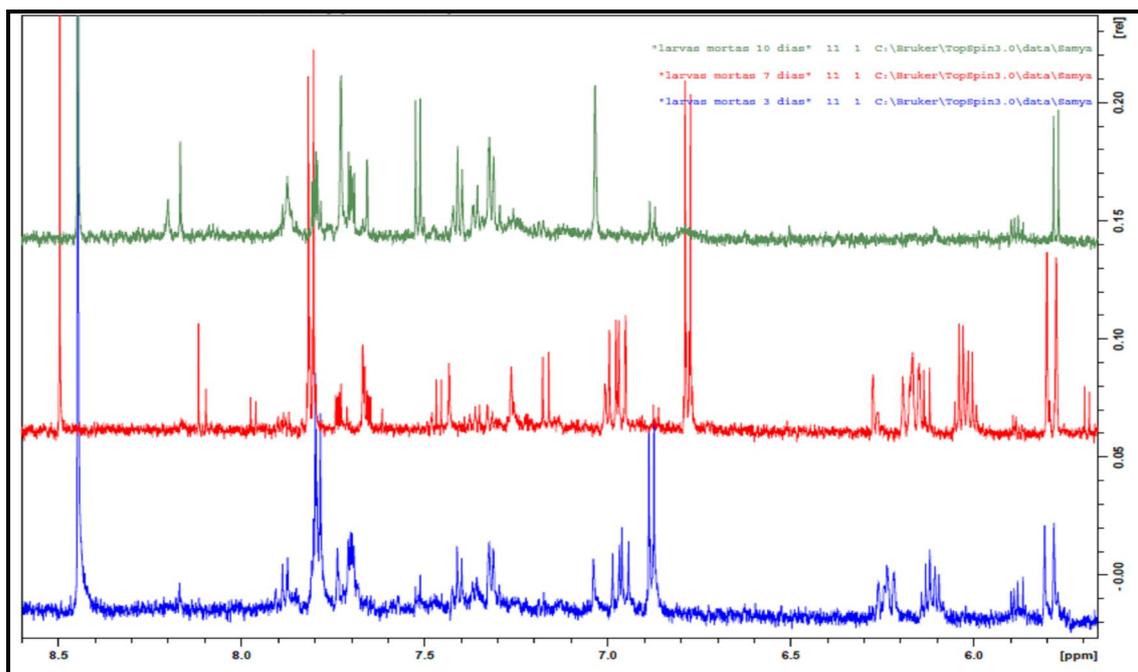


FIGURA 5.10. Ampliação da região δ H 8,5 a 5,8 ppm da comparação dos espectros de RMN 1 H dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona durante o 3 $^{\circ}$, 7 $^{\circ}$ e 10 $^{\circ}$ dias de ensaio com o limonoide cedrelona. Legenda (**verde**: 10 dias; **vermelho**: 7 dias e **azul**: 3 dias).

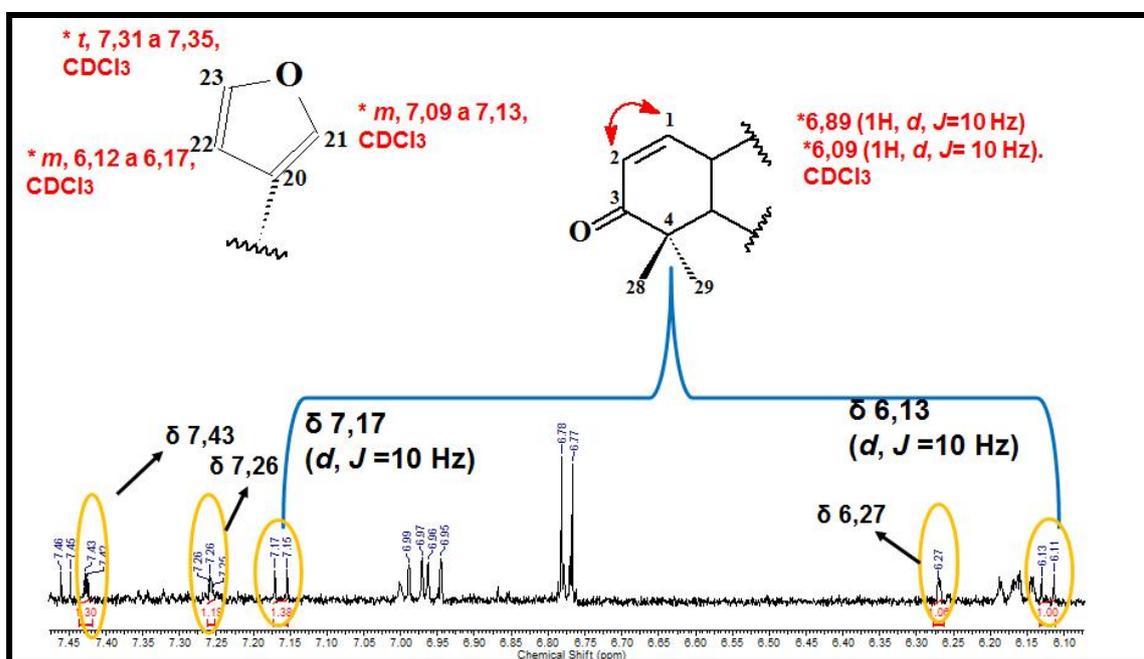


FIGURA 5.11- Ampliação do espectro de RMN 1 H dos extratos das lagartas tratadas com o limonoide cedrelona em 7 dias de ensaio. (600 MHz, CD_3OD e D_2O). *Dados espectrais de RMN 1 H para cedrelona em $CDCl_3$.

As amostras referentes às fezes excretadas pelos insetos controles (lagartas alimentadas com dieta artificial sem a presença do limonoide cedrelona) apresentaram espectros de RMN ^1H com pequenas diferenças, as quais podem ser justificadas por se tratarem de excreções em diferentes estágios do desenvolvimento da larva (FIGURAS 5.12- 5.15).

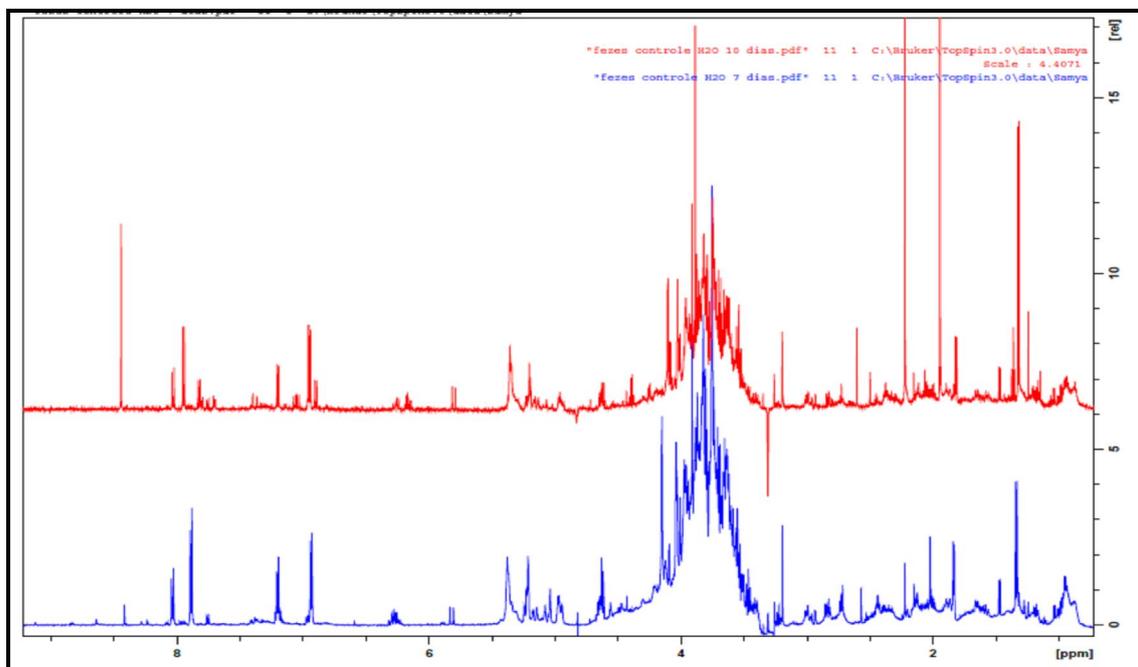


FIGURA 5.12- Comparação dos espectros de RMN ^1H (D_2O e MeOD ; 600 MHz) dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7 $^{\circ}$ e 10 $^{\circ}$ dias de ensaio. Legenda (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias). TopSpin.

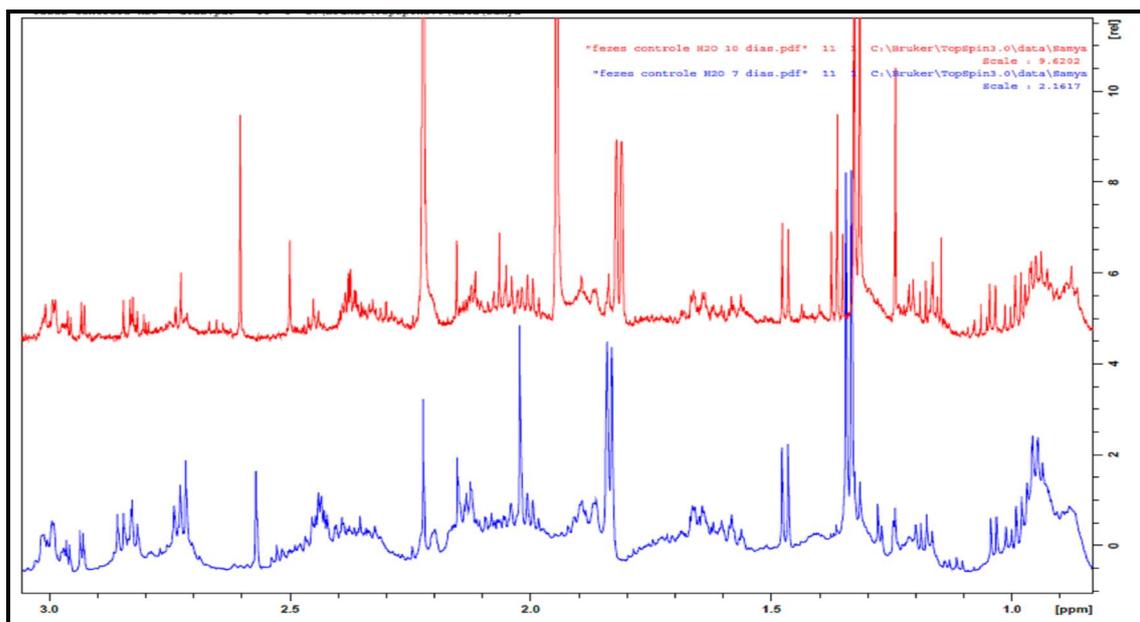


FIGURA 5.13 - Ampliação da região δH 3,0 a 0,8 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7^o e 10^o dias de ensaio. Legenda: (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

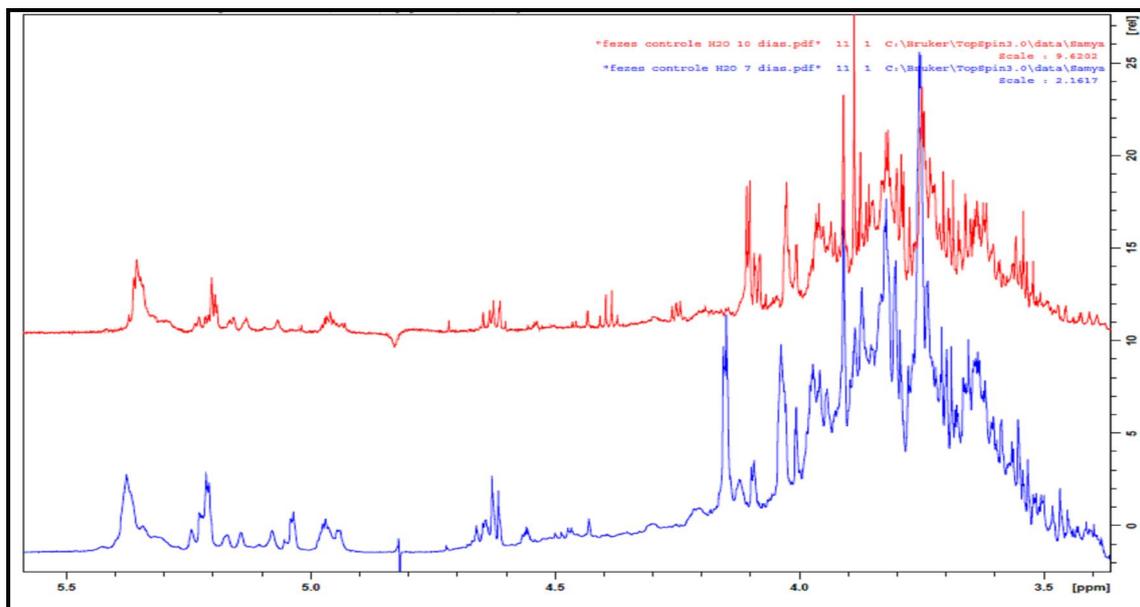


FIGURA 5.14 - Ampliação da região δH 5,5 a 3,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7^o e 10^o dias de ensaio. Legenda (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

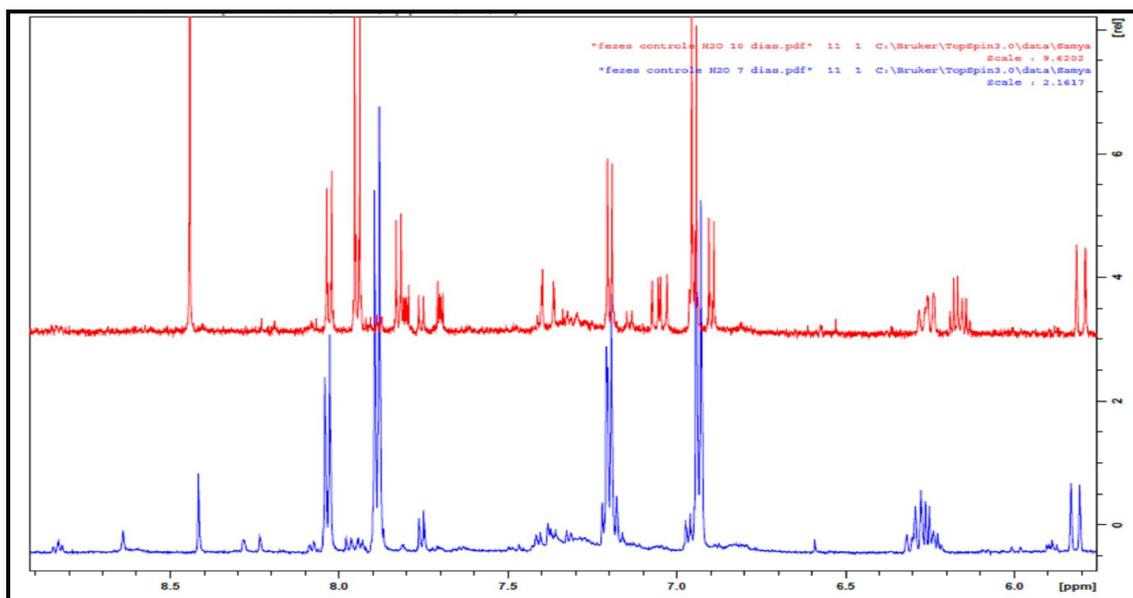


FIGURA 5.15 - Ampliação da região δ H 9,0 a 5,8 ppm da comparação dos espectros de RMN 1 H dos extratos das fezes dos controles (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona) durante o 7^o e 10^o dias de ensaio. Legenda (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

As amostras referentes às fezes excretadas pelas lagartas alimentadas com cedrelona levaram a espectros de RMN 1 H onde foi possível observar que houve uma diferença significativa nos espectros, o que mostra que na presença do limonoide houve mudanças no metabolismo do inseto (FIGURAS 5.16-5.19). Na região dos hidrogênios aromáticos (FIGURA 5.19) houve diferença nas integrais dos sinais. Alguns multipletos em δ 7,20, 7,95 e 8,05 foram observados em 7 dias de ensaios, e esses não foram observados em 10 dias de experimento. Em 10 dias foram observados dubletos em δ 7,38 e 7,42 bem intensos e sinais em δ 7,80 e 6,85, os quais não foram encontrados em 7 dias de ensaio. Estes sinais podem estar relacionados a compostos de metabolização da cedrelona pelas lagartas em produtos menos tóxicos sendo liberados nas fezes.

A modificação do inseticida pode ocorrer por vários processos metabólicos levando a produtos menos tóxicos ou mesmo eliminado rapidamente do corpo do inseto. A eliminação ocorre principalmente através das fezes.

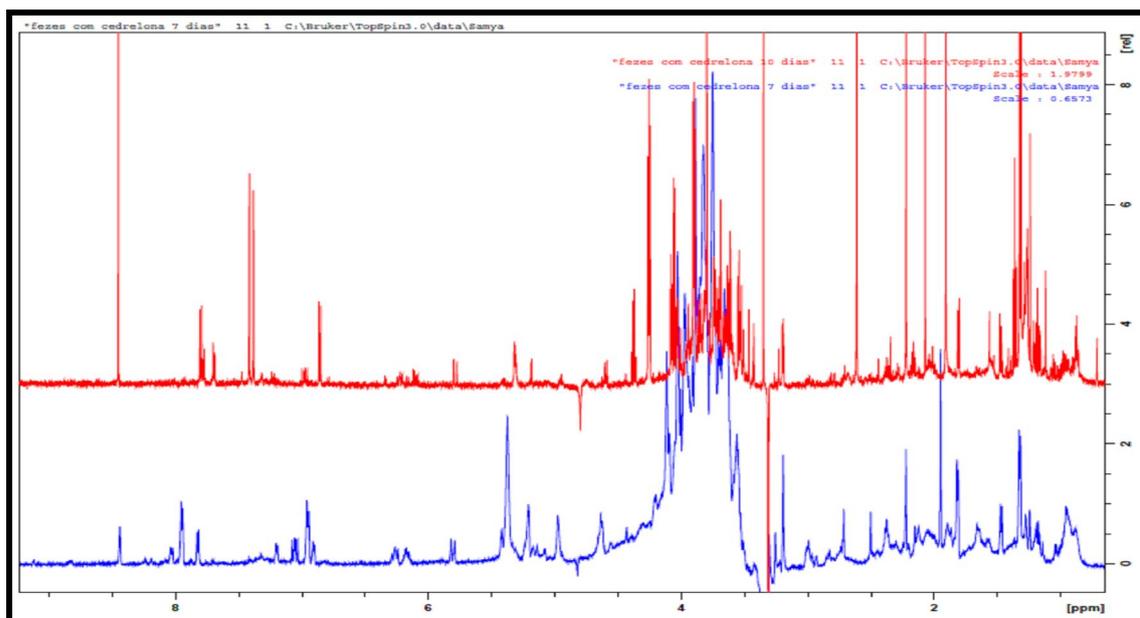


FIGURA 5.16 - Comparação dos espectros de RMN ^1H (D_2O e MeOD ; 600 MHz) dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7 $^{\circ}$ e 10 $^{\circ}$ dias de ensaio. Legenda (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

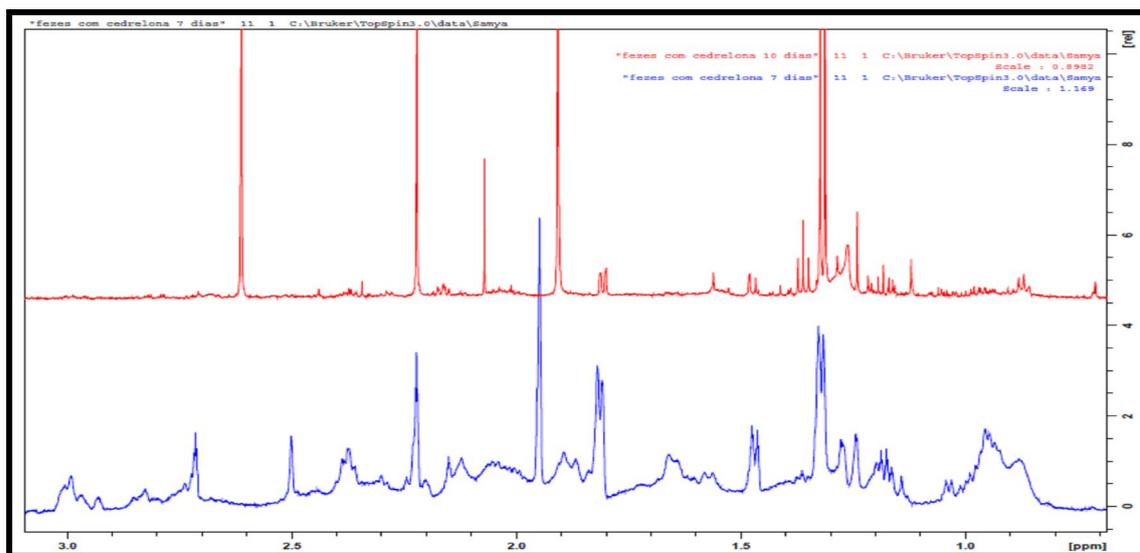


FIGURA 5.17- Ampliação da região δH 3,0 a 0,7 ppm da comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7 $^{\circ}$ e 10 $^{\circ}$ dias de ensaio. Legenda: (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

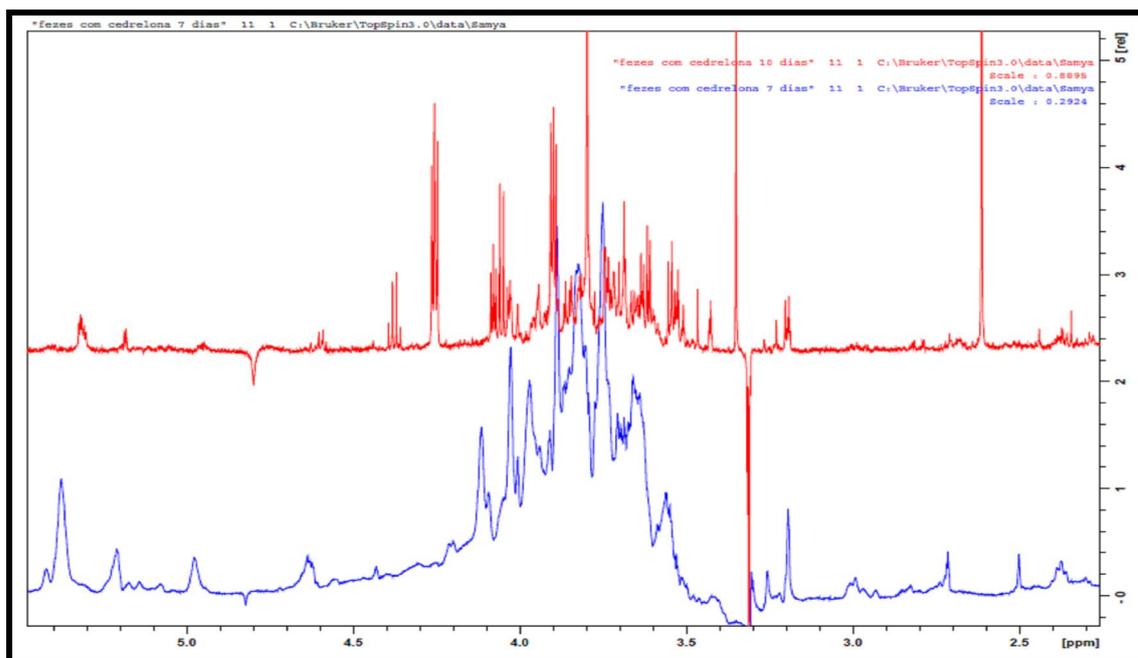


FIGURA 5.18- Ampliação da região δH 5,5 a 2,3 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7^o e 10^o dias de ensaio. Legenda (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

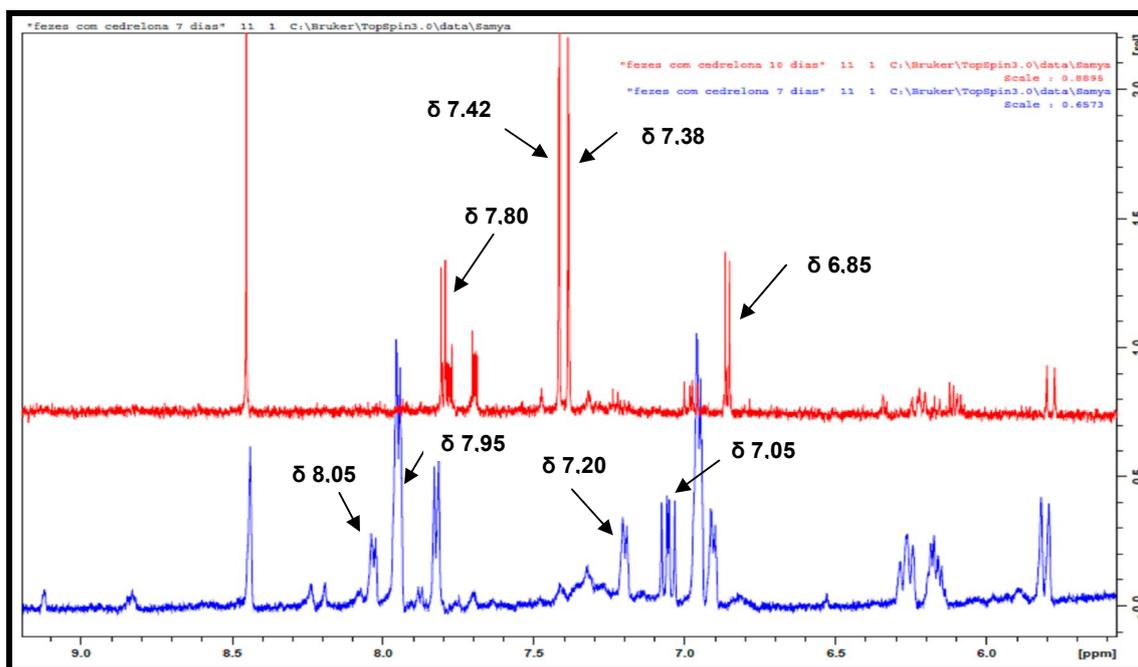


FIGURA 5.19 - Ampliação da região δH 9,0 a 5,8 ppm da comparação dos espectros de RMN ¹H dos extratos das fezes excretadas pelas lagartas tratadas com cedrelona durante o 7^o e 10^o dias de ensaio. Legenda (**vermelho**: 10 dias e **azul**: 7 dias).

As amostras referentes às larvas tratadas com cedrelona em 3 dias de experimento mostraram diferenças significativas no espectro de RMN ^1H quando comparadas ao controle (FIGURAS 5.20 e 5.21). Na região dos hidrogênios aromáticos (FIGURA 5.21) foi possível observar alguns multipletos em δ 6,98, δ 6,17 e δ 5,80, os quais não foram encontrados no controle. Estes sinais podem estar relacionados a compostos de metabolização da cedrelona pelo inseto.

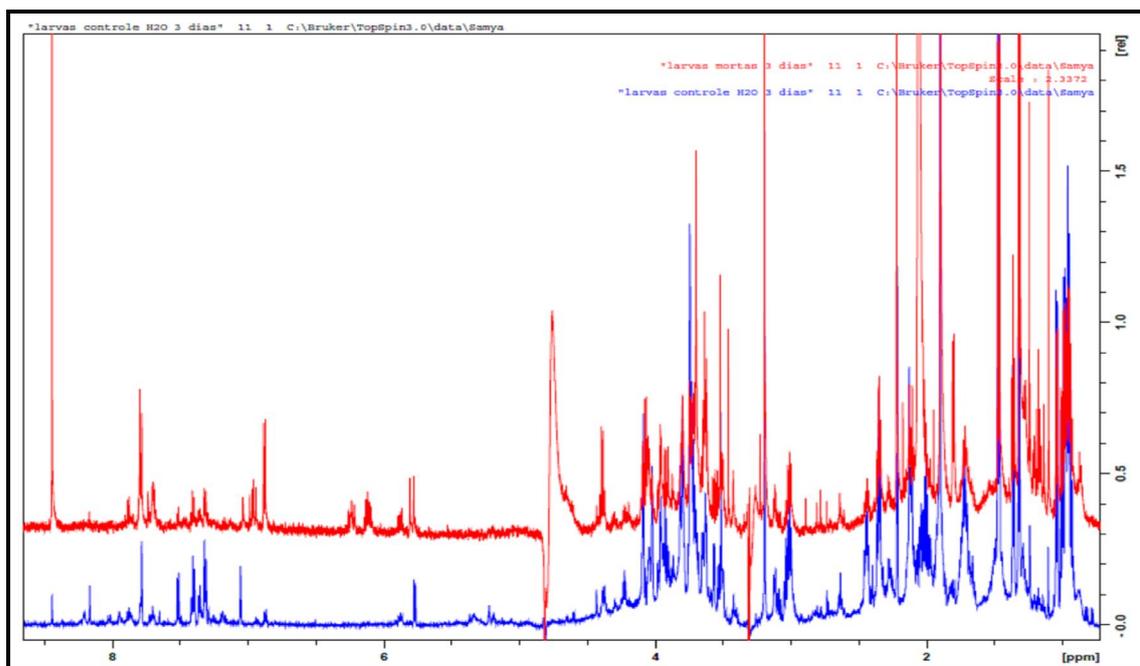


FIGURA 5.20 - Comparação dos espectros de RMN ^1H) dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 3^o dia de ensaio. Legenda: (**vermelho**: lagartas tratadas com cedrelona e **azul**: controle).

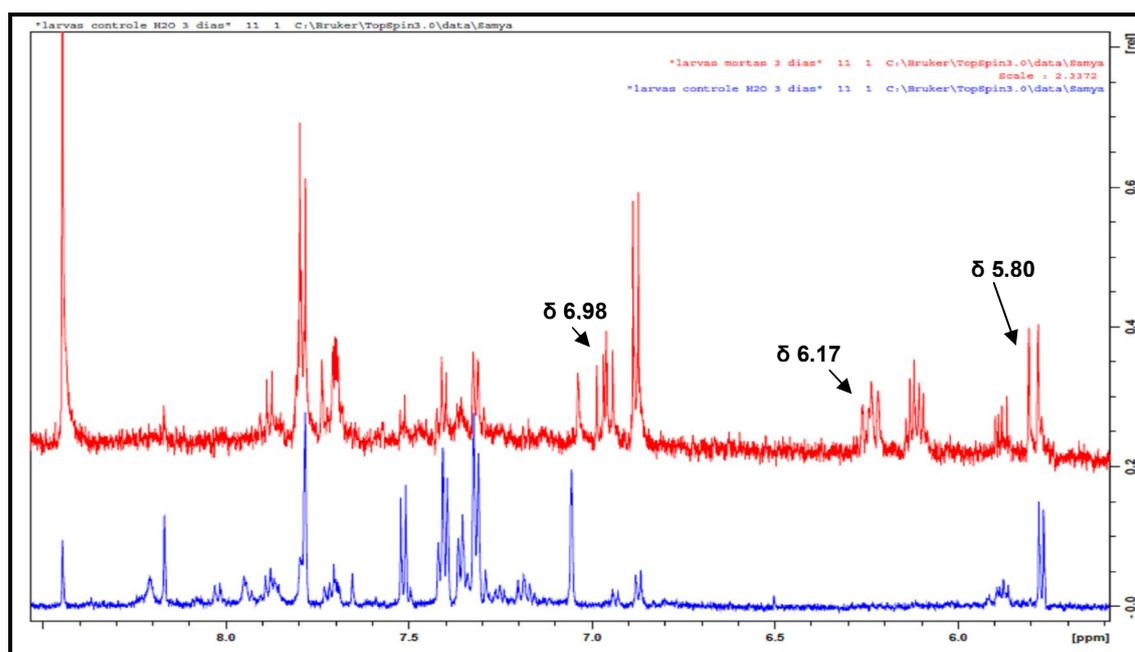


FIGURA 5.21 - Ampliação da região δ H 8,5 a 5,5 ppm da comparação dos espectros de RMN 1 H dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 3º dia de ensaio. Legenda: (**vermelho**: lagartas tratadas com cedrelona e **azul**: controle).

As amostras referentes às I lagartas alimentadas com cedrelona em 7 dias de ensaio levaram a espectros de RMN 1 H com uma diferença significativa em comparação ao controle, o que mostra que na presença do limonoide houve mudanças no metabolismo do inseto (FIGURAS 5.22 e 5.23). Na região dos hidrogênios aromáticos (FIGURA 5.23) foram observados multipletos em δ 6,98, δ 6,17 e δ 5,80, os quais foram encontrados em 3 dias de ensaio. Também foram encontrados sinais em δ 7,82, 7,47, 7,18, 6,79, 6,14 e 5,70 e estes não foram visualizados no espectro de RMN 1 H referente ao controle. Estas diferenças indicam a presença da cedrelona e de alguns produtos que podem ter sido metabolizados pelas lagartas.

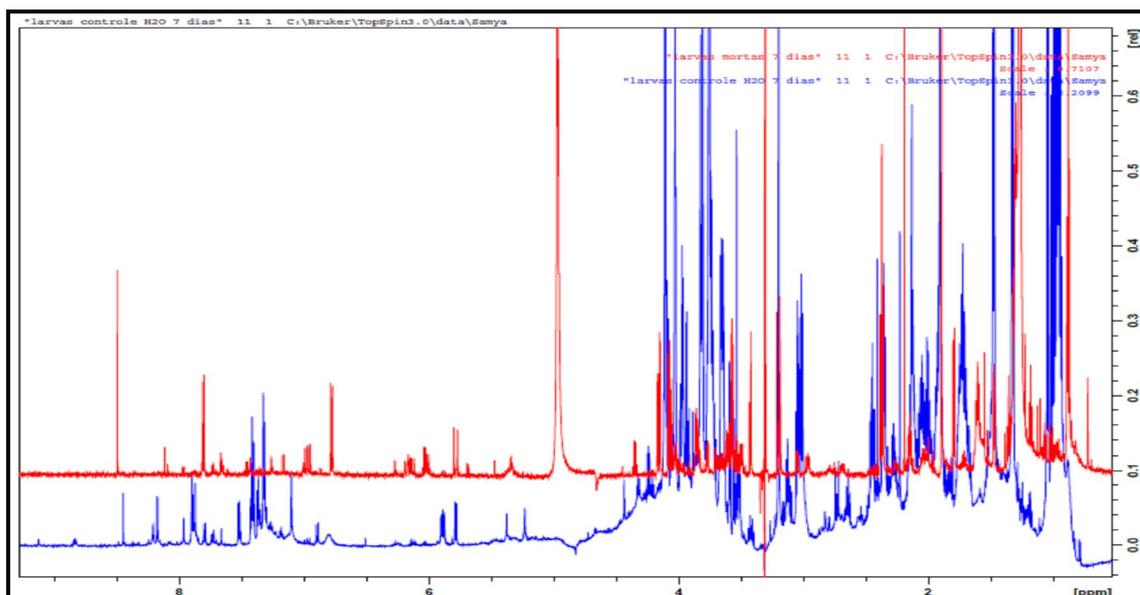


FIGURA 5.22 - Comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 7^o dia de ensaio. Legenda: (**vermelho**: lagartas tratadas com cedrelona e **azul**: controle).

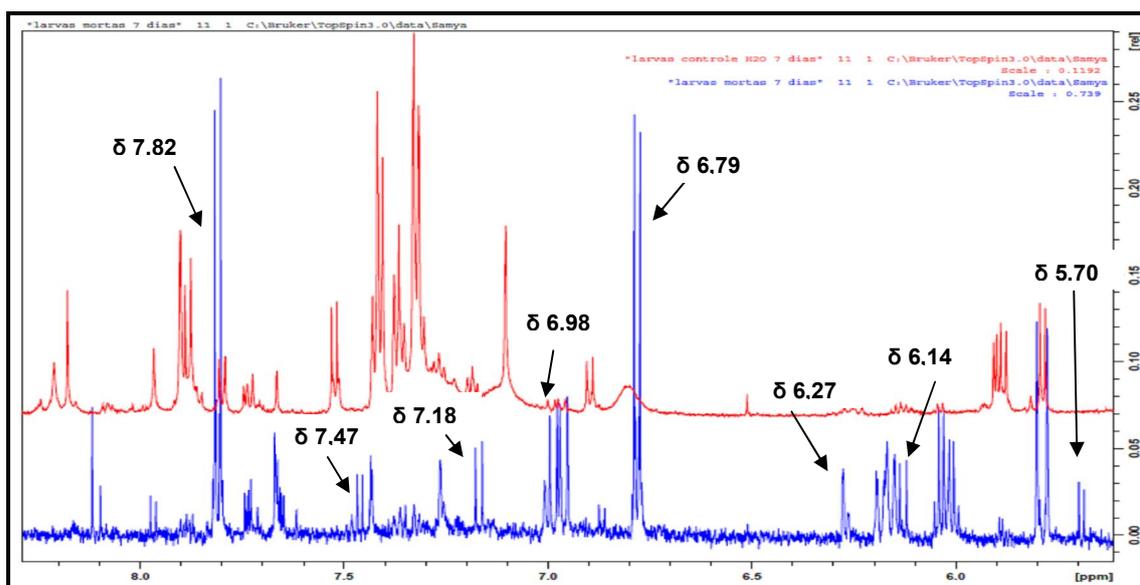


FIGURA 5.23 - Ampliação da região $\delta\text{H } 8,3$ a $5,7$ ppm da comparação dos extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona vs controle durante o 7^o dia de ensaio. Legenda: (**vermelho**: controle e **azul**: lagartas tratadas com cedrelona).

Para os extratos das lagartas mortas tratadas com cedrelona em 7 dias de ensaio foi realizado o experimento de COSY ^1H - ^1H , (FIGURAS 5.24 e 5.25), com a finalidade de determinar quais sinais que estariam se correlacionando, e a partir

disso, identificar possíveis produtos do metabolismo. Para a mesma amostra foi realizado o experimento bidimensional HSQC (FIGURA 5.27), porém, não houve resolução devido à pequena quantidade de amostra.

Analisando o espectro de COSY (FIGURA 5.24) foi possível observar correlações entre os hidrogênios em δ 3,65 e 1,47, característicos de hidrogênios de alanina e entre os sinais δ 4,35 e 1,36 similares àqueles do ácido láctico. A alanina é um aminoácido regulador do metabolismo da glicose e o ácido láctico tem papel em muitos processos bioquímicos (HUMAN METABOLOME DATABASE, 2014).

Ainda no espectro de COSY (FIGURA 5.25) foram observadas correlações de hidrogênios em δ 7,82 e 6,79, os quais se apresentaram como dubletos com constante de acoplamento de 8,76 Hz. Esses sinais foram relacionados ao aminoácido tirosina. A β -D-glicopiranosil-O-L-tirosina parece ser o principal metabólito de armazenamento de tirosina para a produção de substratos de difenol no curtimento de cutícula dos insetos lepidópteros (THOMPSON, 1990). No espectro de HSQC (FIGURA 5.27) foi possível observar correlações que indicaram a presença desse aminoácido, observou-se correlações dos hidrogênios em δ 6,79 com o carbono em δ 115,3 e 7,82 com o carbono em δ 132,3. Estes sinais de carbonos observados são característicos para os descritos na literatura para a L-tirosina, δ 133,4 e 118,9 (HUMAN METABOLOME DATABASE, 2014).

No espectro de COSY (FIGURA 5.25) foi observada uma correlação bastante importante entre o sinal em δ 7,18 (d , $J=10,0$ Hz) e 6,14 (d , $J=10,0$ Hz), os quais são característicos dos hidrogênios H-1 e H-2 pertencentes ao anel A do limonoide cedrelona (FIGURA 5.26). Estes sinais foram observados apenas nas lagartas mortas alimentadas com cedrelona em dieta artificial e não apareceram nos espectros das lagartas do controle.

A partir da análise do espectro de COSY (FIGURA 5.25), observou-se uma correlação dos hidrogênios em δ 7,47 (d , $J=7,60$) e 5,70 (d , $J=7,60$), a qual foi relacionada à presença de uracila, e confirmada de acordo com dados da literatura (HUMAN METABOLOME DATABASE, 2014). Uracila é uma pirimidina que ocorre naturalmente em RNA. Ela faz par de bases com a adenina e é substituída por timina no DNA. A função da uracila no organismo é ajudar a realizar a síntese de muitas enzimas necessárias para a função celular através de ligação com riboses e fosfatos. Uracila serve como regulador alostérico e coenzima para muitas reações

bioquímicas importantes. Sua utilização também está envolvida na biossíntese de polissacarídeos e no transporte de açúcares contendo aldeídos.

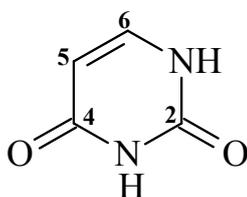


TABELA 5.1: Dados de RMN ^1H da uracila e comparação com a literatura.

	Uracila (600 MHz, D ₂ O e CD ₃ OD)	WISHART et al., 2009 * (500 MHz, D ₂ O)
H	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
5	5,70 (1H, d, J=7,6)	5,79 (1H, d, J=7,69)
6	7,47 (1H, d, J= 7,6)	7,52 (1H, d, J= 7,69)

*fonte: Human Metabolome Database (versão 3.0).

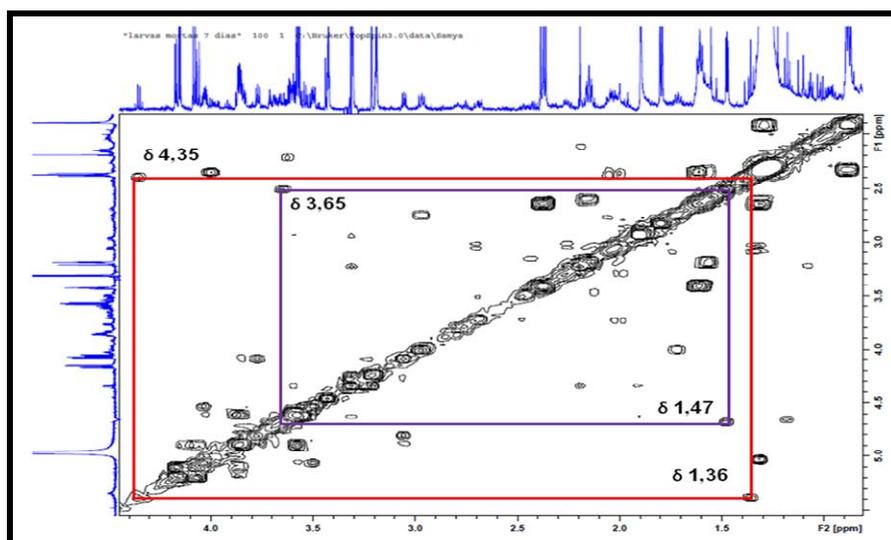


FIGURA 5.24 - Ampliação do espectro de COSY na região de δH 4,30 a 0 ppm dos extratos das lagartas mortas em 7 dias de ensaio tratadas com cedrelona.(600 MHz; MeOD e D₂O).

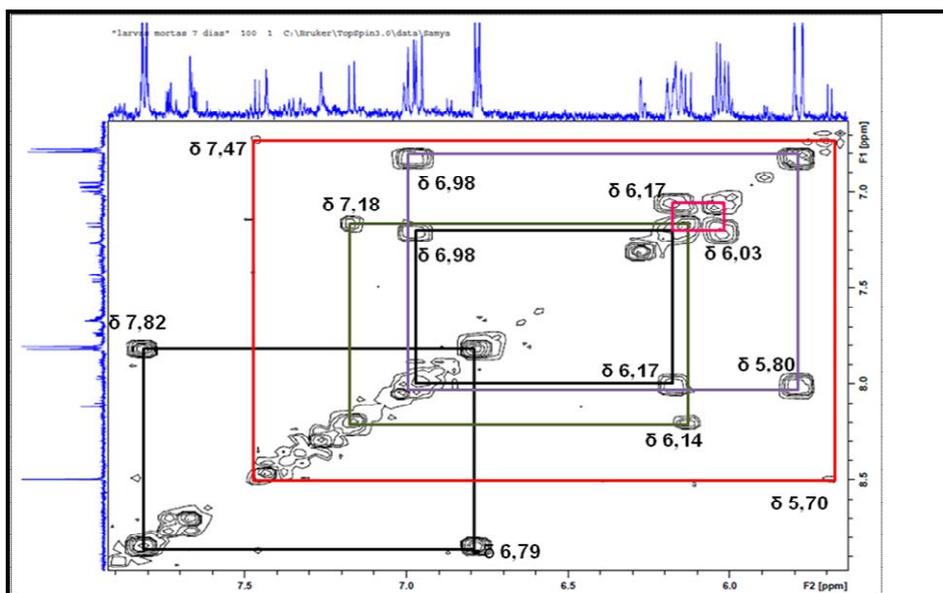


FIGURA 5.25 - Ampliação do espectro de COSY na região de δ^H 8,0 a 5,5 ppm dos extratos das lagartas mortas em 7 dias de ensaio tratadas com cedrelona.

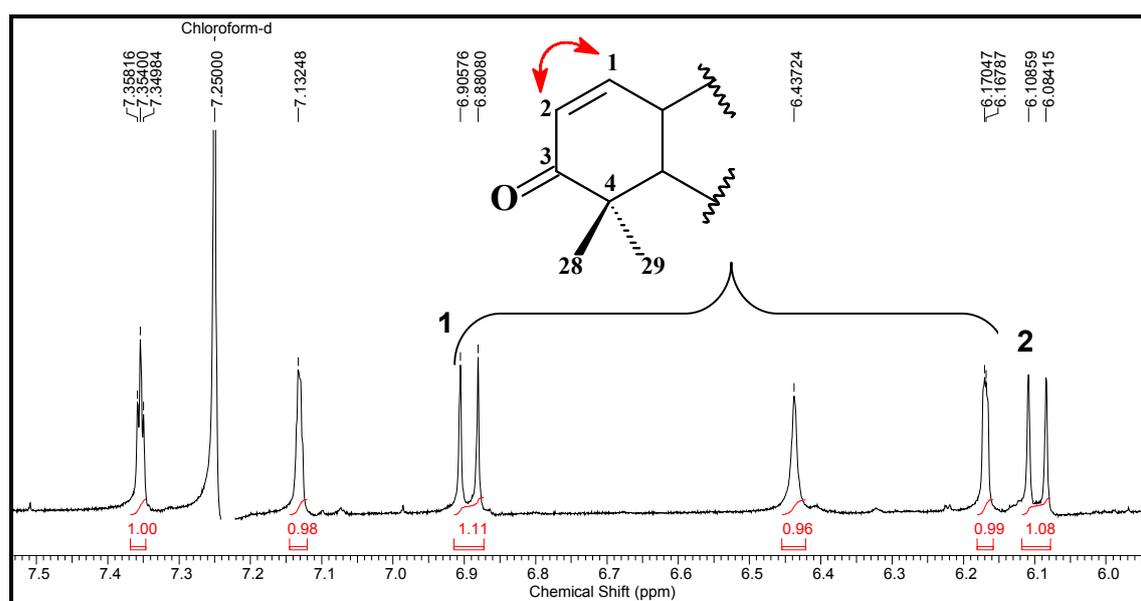


FIGURA 5.26 - Ampliação da região δ 7,50 a 6,00 ppm do espectro de RMN 1H da cedrelona (1).

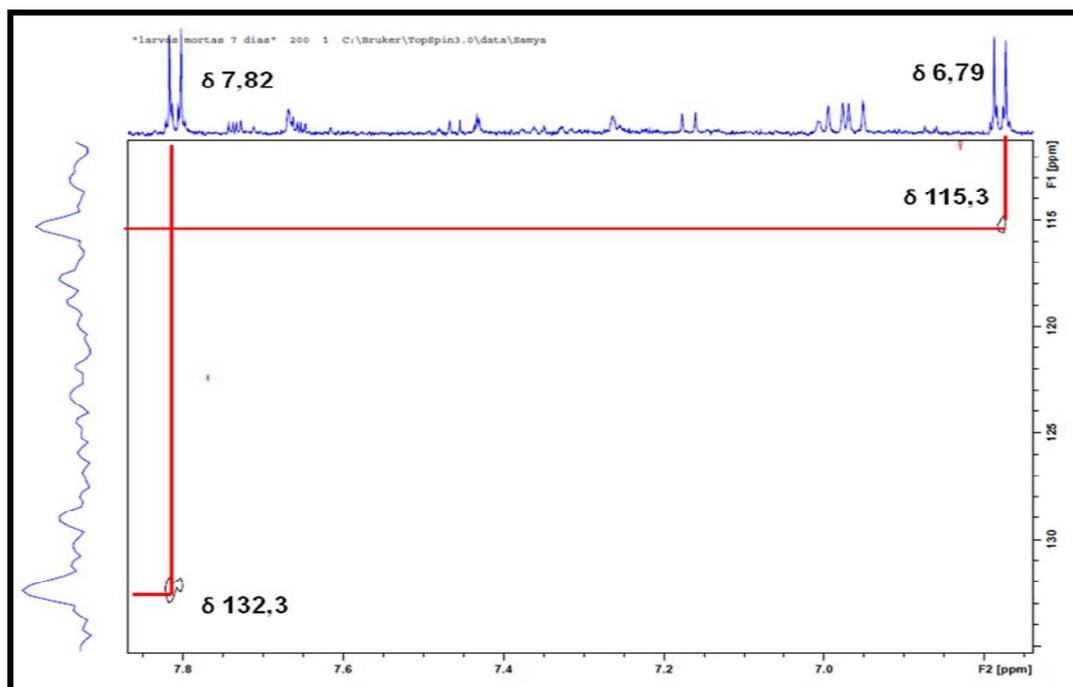


FIGURA 5.27 - Espectro de correlação heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC), ampliação da região δ 8,0 a 6,00 ppm dos extratos das lagartas mortas em 7 dias de ensaio tratadas com cedrelona (600 MHz; CD₃OD e D₂O).

As amostras referentes às lagartas alimentadas com dieta contendo cedrelona em 10 dias de experimento mostraram pequenas diferenças nas integrais dos sinais nos espectros de RMN ¹H quando comparadas ao controle (FIGURAS 5.28 e 5.29). Observou-se sinais bem intensos em δ 7,05 e 7,75 (FIGURA 5.29), os quais não foram encontrados nos extratos das lagartas controle. As lagartas alimentadas com cedrelona durante o 10º dia de ensaio não apresentaram mortalidade, mas foram afetadas no seu crescimento e, conseqüentemente, no seu metabolismo.

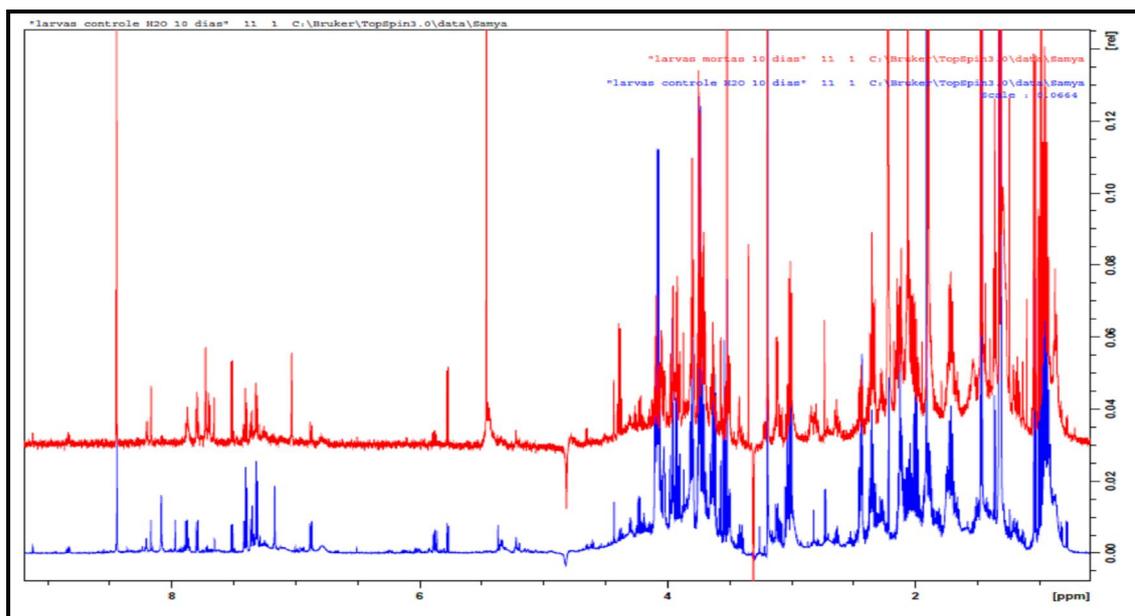


FIGURA 5.28 - Comparação dos espectros de RMN ^1H (D_2O e MeOD ; 600 MHz) dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona vs controle durante o 10^o dia de ensaio. Legenda: (vermelho: lagartas tratadas com cedrelona e azul: controle).

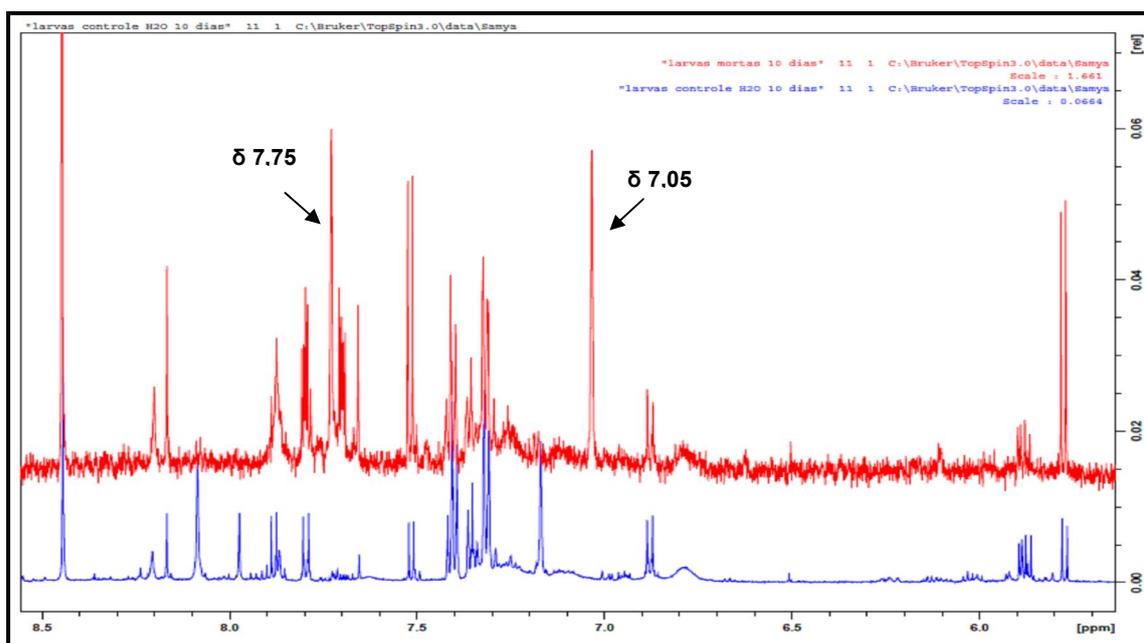


FIGURA 5.29 - Ampliação da região δH 8,5 a 5,5 ppm da comparação dos extratos das lagartas tratadas com cedrelona vs controle durante o 10^o dia de ensaio. Legenda: (vermelho: lagartas tratadas com cedrelona e azul: controle).

As amostras referentes às fezes excretadas pelas lagartas alimentadas com cedrelona em 7 dias de ensaio levaram a espectros de RMN ^1H com diferenças significativas ao comparar às larvas controle (FIGURA 5.30 e 5.31). Alguns multipletos em δ 7,95, 7,80, 7,05 e 6,15 foram observados (FIGURA 5.31), e esses não foram encontrados no controle (lagartas sem a presença do limonoide cedrelona). Estes sinais podem estar relacionados a compostos de metabolização da cedrelona, os quais são liberados nas fezes.

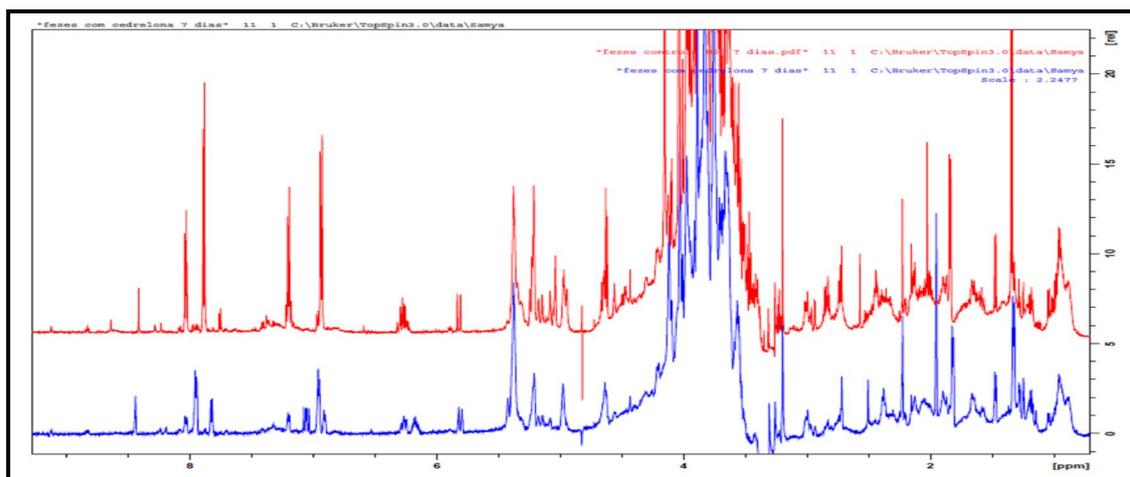


FIGURA 5.30 - Comparação dos espectros de RMN ^1H (D_2O e MeOD; 600 MHz) dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle ao 7º dia de ensaio. Legenda (**vermelho**: controle e **azul**: com cedrelona).

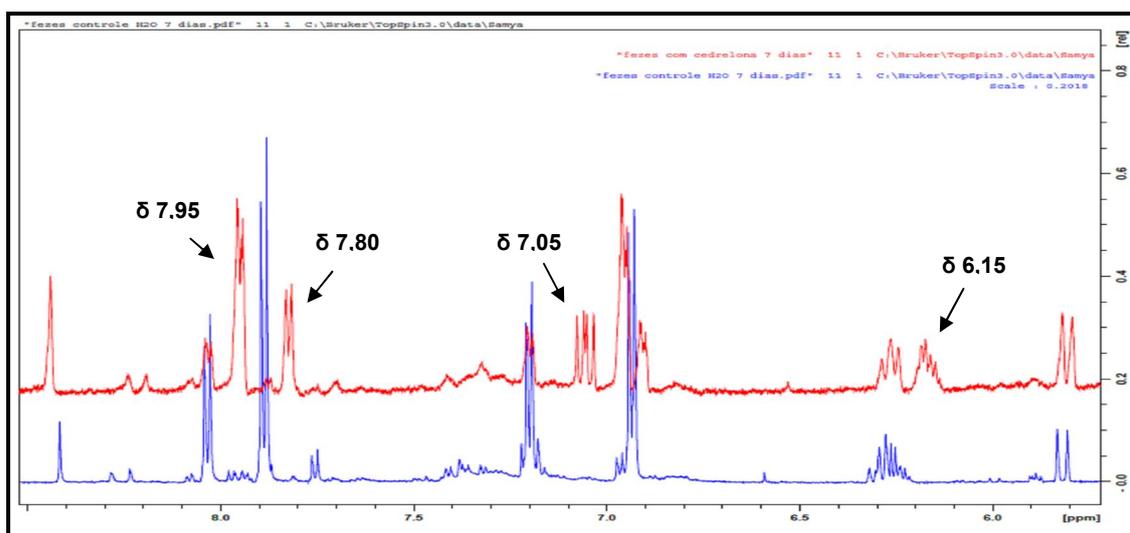


FIGURA 5.31 - Ampliação da região δH 8,5 a 5,5 ppm da dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle ao 7º dia de ensaio. Legenda (**vermelho**: com cedrelona e **azul**: controle).

As amostras referentes às fezes excretadas pelas larvas tratadas com cedrelona em 10 dias de experimento mostraram diferenças significativas no espectro de RMN ^1H quando comparadas ao controle (FIGURAS 5.32 e 5.33). Na região dos hidrogênios aromáticos (FIGURA 5.33) foi possível observar dubletos bem intensos em δ 7,38 e 7,42, os quais não foram encontrados nas amostras de fezes excretadas pelas lagartas controle. Estes sinais podem estar relacionados a produtos de metabolização da cedrelona pelas lagartas em produtos menos tóxicos e esses sendo liberados nas fezes.

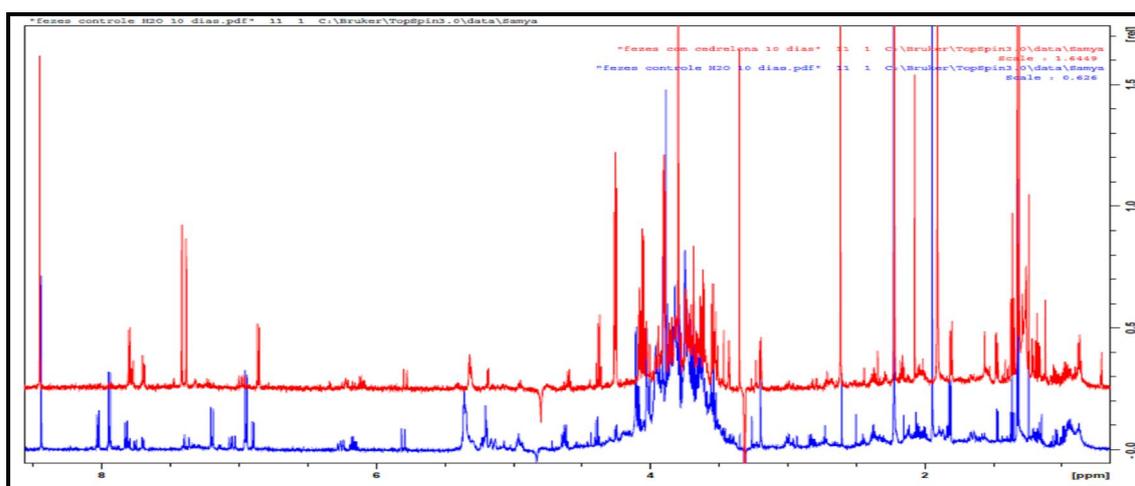


Figura 5.32- Comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle durante o 10º dia de ensaio. Legenda (**vermelho**: com cedrelona e **azul**: fezes do controle).

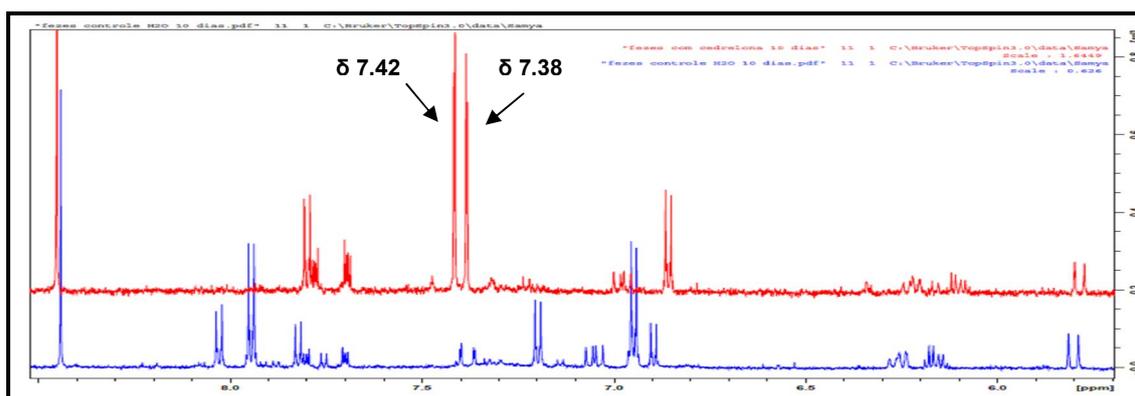


FIGURA 5.33 - Ampliação da região δH 9,0 a 5,5 ppm da comparação dos espectros de RMN ^1H dos extratos das fezes das lagartas tratadas com cedrelona vs fezes do controle durante o 10º dia de ensaio. Legenda (**vermelho**: com cedrelona e **azul**: fezes do controle).

5.5 - Resultados e Discussões - Uso da EM na detecção de cedrelona em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo este limonoide

5.5.1 - Análise dos extratos de hemolinfa, intestino médio e fezes excretadas por *S. frugiperda* no experimento de 5 horas de alimentação

O limite de detecção obtido para a cedrelona foi de cerca de 10 ng/mL em concordância com a razão S/N obtida em todas as concentrações testadas (FIGURA 5.34), o que garantiu uma ótima detecção e sensibilidade nas análises. O espectro de íons fragmentos obtidos pode ser observado na FIGURA 5.35 e o mecanismo de fragmentação no ESQUEMA 5.5, no qual pode-se constatar a perda de uma molécula de água quando é gerado o íon fragmento $m/z = 405,20467$ e a subsequente perda de monóxido de carbono, levando ao íon fragmento $m/z = 377,20987$. Também foi verificada a formação do íon fragmento $m/z = 395,22034$ bem estável referente à perda de CO do anel B do limonoide em questão.

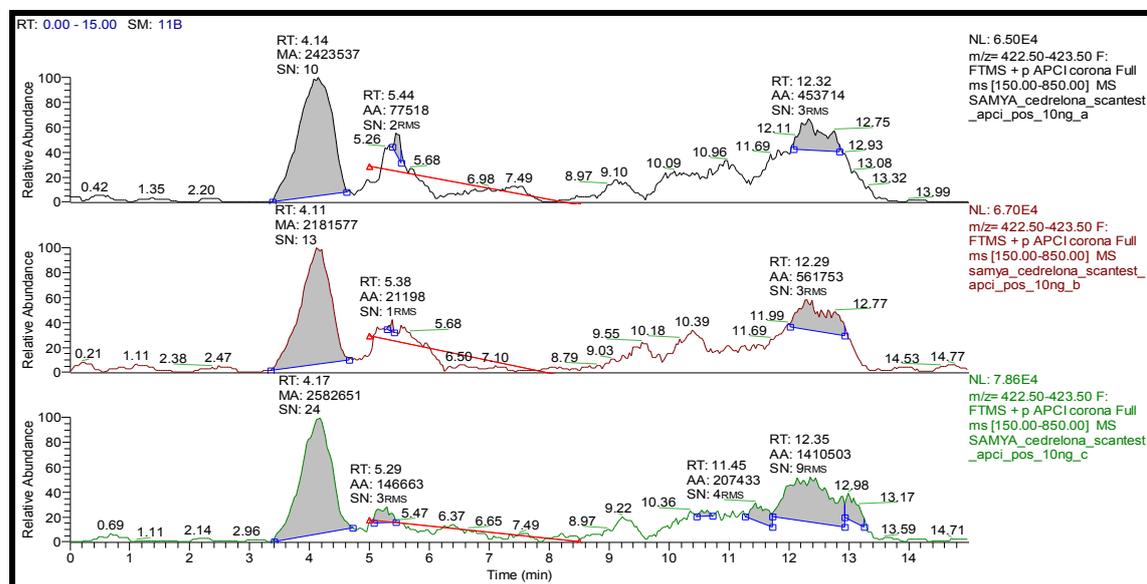


FIGURA 5.34 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 na concentração de 10,0 ng/mL de cedrelona.

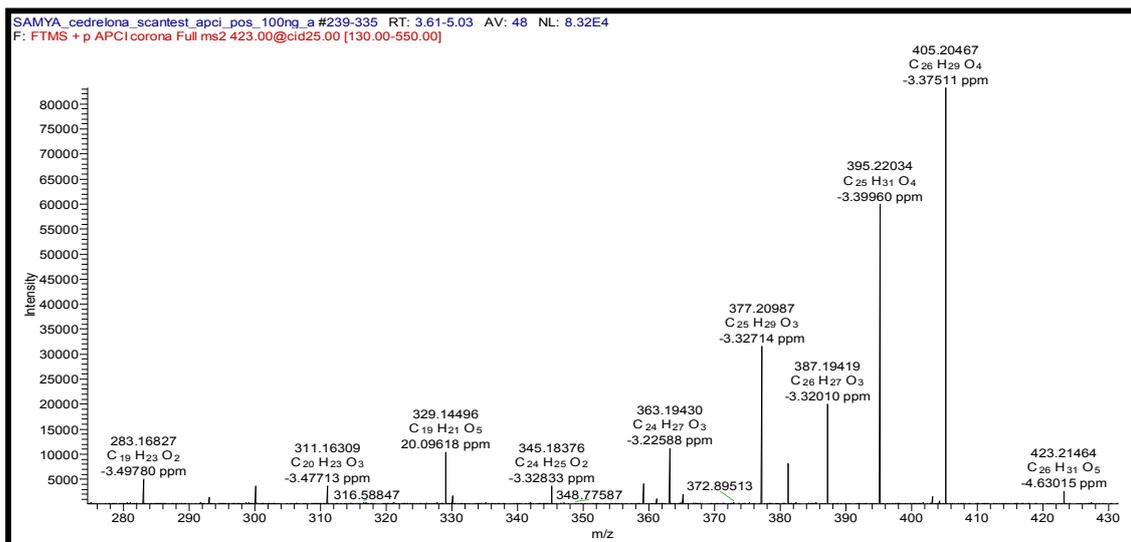
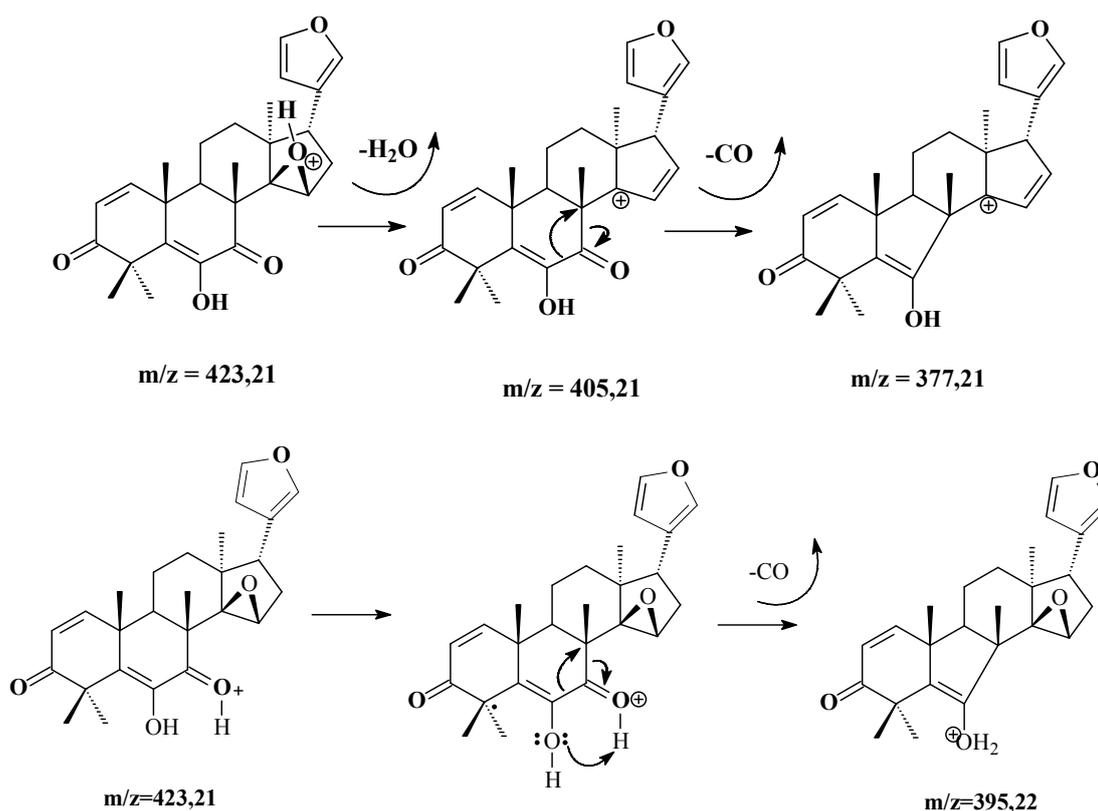


FIGURA 5.35 - Espectro de íons fragmentos para m/z 423,21484 referente à massa monoisotópica exata da cedrelona.



ESQUEMA 5.5 - Proposta de fragmentação para a cedrelona no modo positivo de ionização utilizando a fonte de ionização APCI.

Primeiramente, o objetivo do estudo foi verificar a existência, ou não, de metabólito (intacto ou metabolizado) nos órgãos internos da lagarta e nas fezes, e a partir destes dados, monitorar possíveis produtos do metabolismo. O monitoramento de possíveis produtos durante a metabolização do composto pode levar a uma melhor compreensão da ação do mesmo e assim, contribuir para desenvolvimento de novos inseticidas mais específicos.

A identificação do metabólito intacto foi realizada a partir da comparação dos dados obtidos para a cedrelona. É importante ressaltar que a prioridade, inicialmente, foi identificar o limonoide intacto com o intuito de entender se o inseto estava acumulando ou metabolizando a cedrelona.

Os extratos da hemolinfa analisados não apresentaram o metabólito intacto, como pode ser observado na FIGURA 5.36. A ausência da cedrelona na hemolinfa nas lagartas de 5^o ínstar pode ser justificada pelo fato de que na fase larval o sequestro de metabólitos deve ser acompanhado pela prevenção da autointoxicação, pois a hemolinfa é o principal sistema de transporte destes metabólitos. Outro fator importante são os altos custos fisiológicos que estão envolvidos neste processo devido à necessidade de locais de armazenamento, tais como glândulas e outras adaptações morfológicas e fisiológicas, como por exemplo, transformações enzimáticas nos aleloquímicos a compostos menos tóxicos (OPTIZ e MÜLLER, 2009).

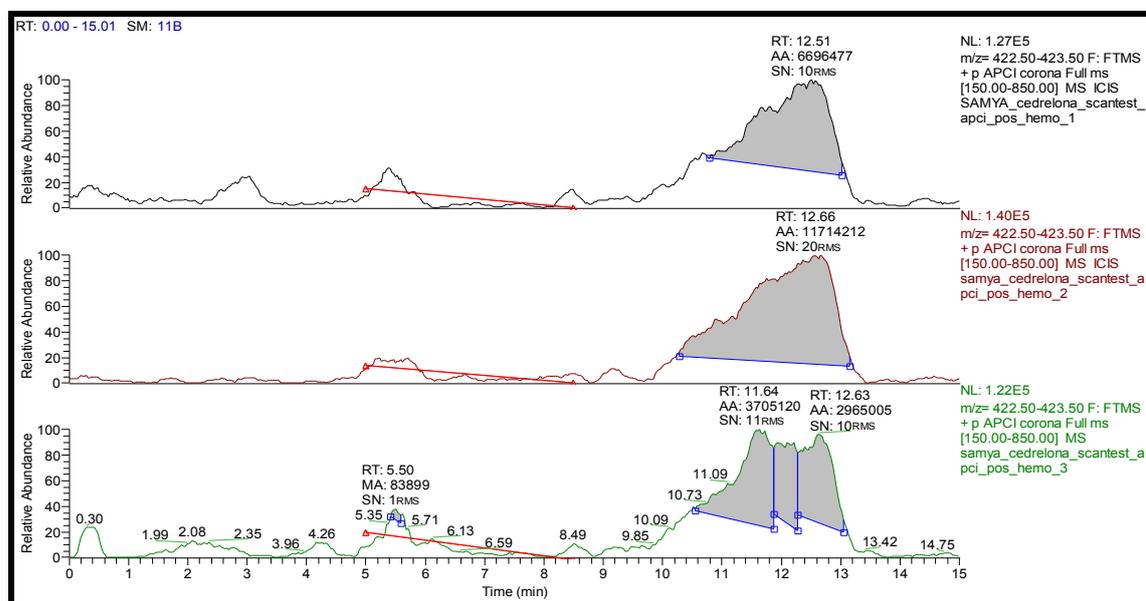
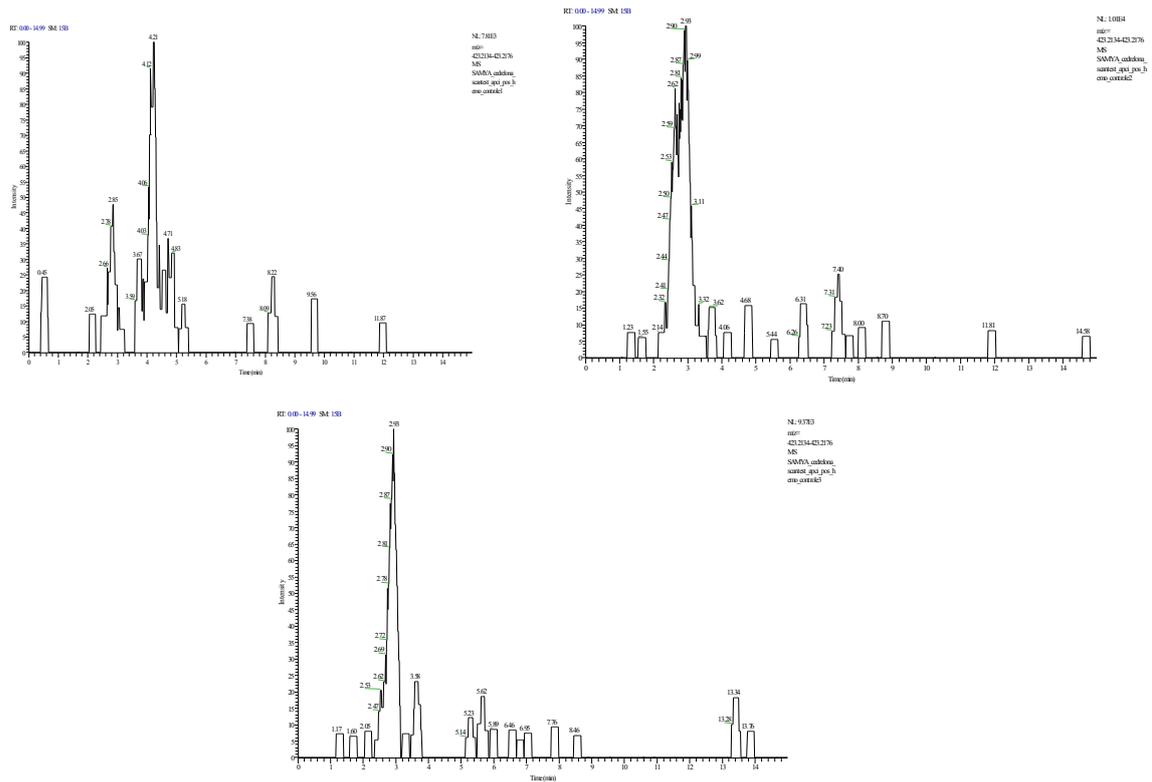


FIGURA 5.36 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de hemolinfa do tratamento com cedrelona. (Triplicatas selecionadas).



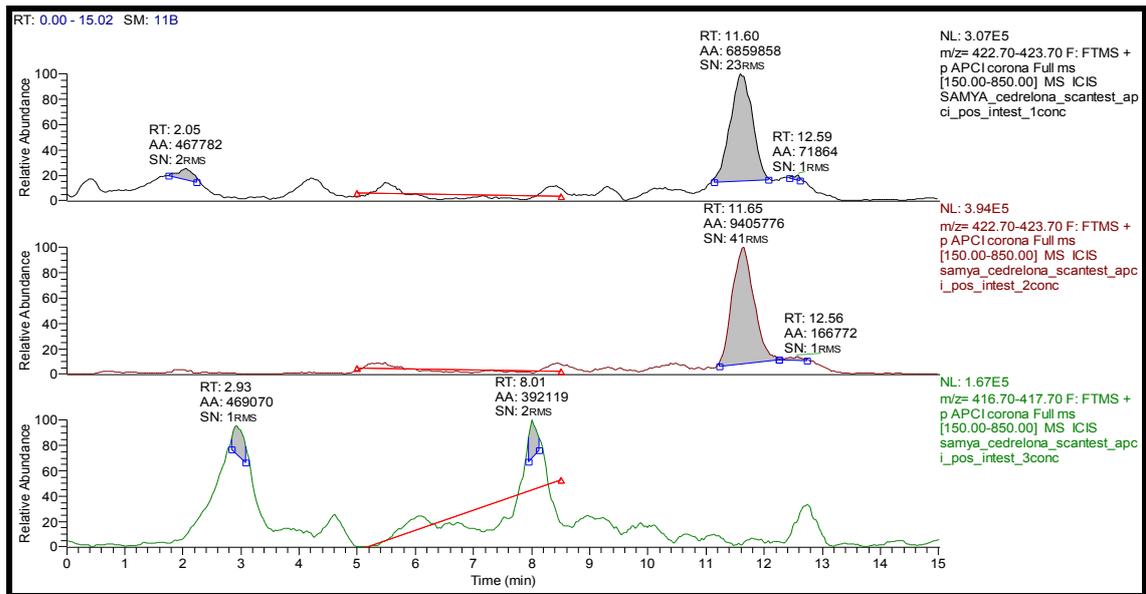


FIGURA 5.38 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de intestino médio do tratamento com cedrelona.

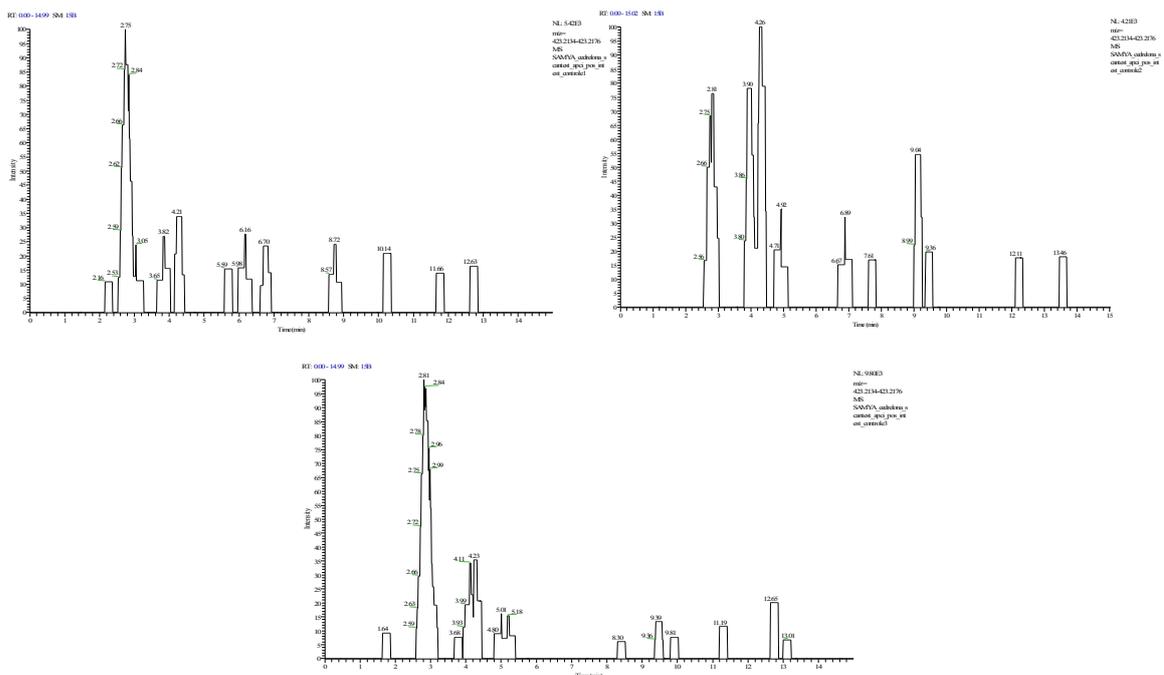


FIGURA 5.39 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de intestino médio do tratamento controle.

Nos extratos de fezes das lagartas alimentadas com cedrelona, podemos observar a partir dos cromatogramas, FIGURAS 5.40, a presença do limonoide intacto, sendo confirmado a partir do espectro de íons fragmentos,

FIGURA 5.41, para a massa monoisotópica exata e pelo tempo de retenção em 4,2 minutos. Observou-se que praticamente toda a cedrelona foi detectada sob a forma inalterada. MARTUCCI, 2012 verificou em extratos de fezes de *Chlosyne lacinia saundersii* (Lepidoptera: Nymphalidae) a excreção dos metabólitos sob forma inalterada quando alimentadas com plantas de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) e *Vernonia polyanthes* (Asteraceae). Um dos mecanismos descritos na literatura que é capaz de justificar a presença de metabólitos secundários inalterados é a redução da absorção. Como este experimento foi de 5 horas de alimentação, pode ter sido ineficiência na absorção. Amostras controle de fezes (FIGURA 5.42) mostraram um íon com massa próxima à cedrelona (FIGURA 5.43), porém com distinta massa monoisotópica e distinto tempo de retenção em 4,6 minutos, comprovando a ausência da cedrelona no controle.

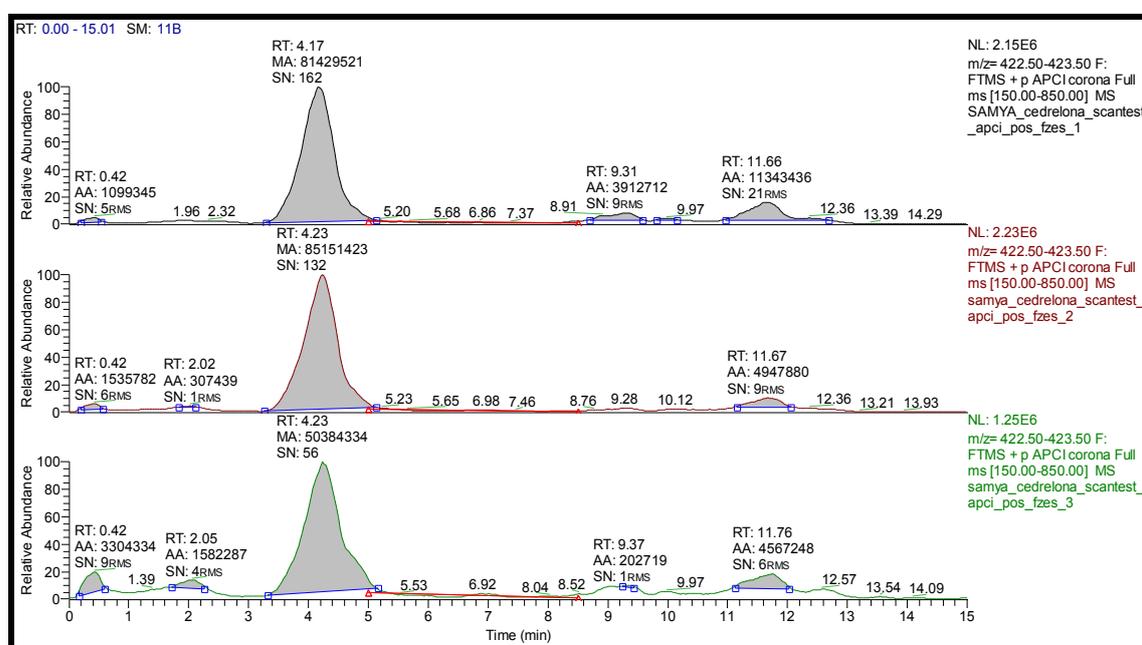


FIGURA 5.40 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21464 dos extratos de fezes das lagartas alimentadas com cedrelona.

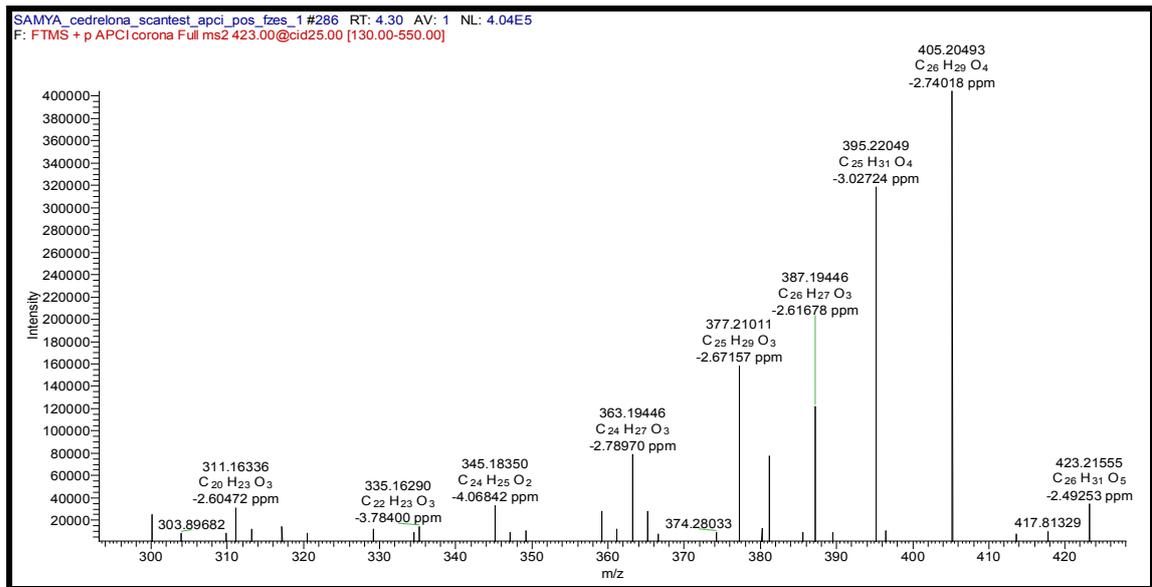


FIGURA 5.41 - Espectro de íons fragmentos para m/z 423,21484 extraído dos extratos das fezes com cedrelona.

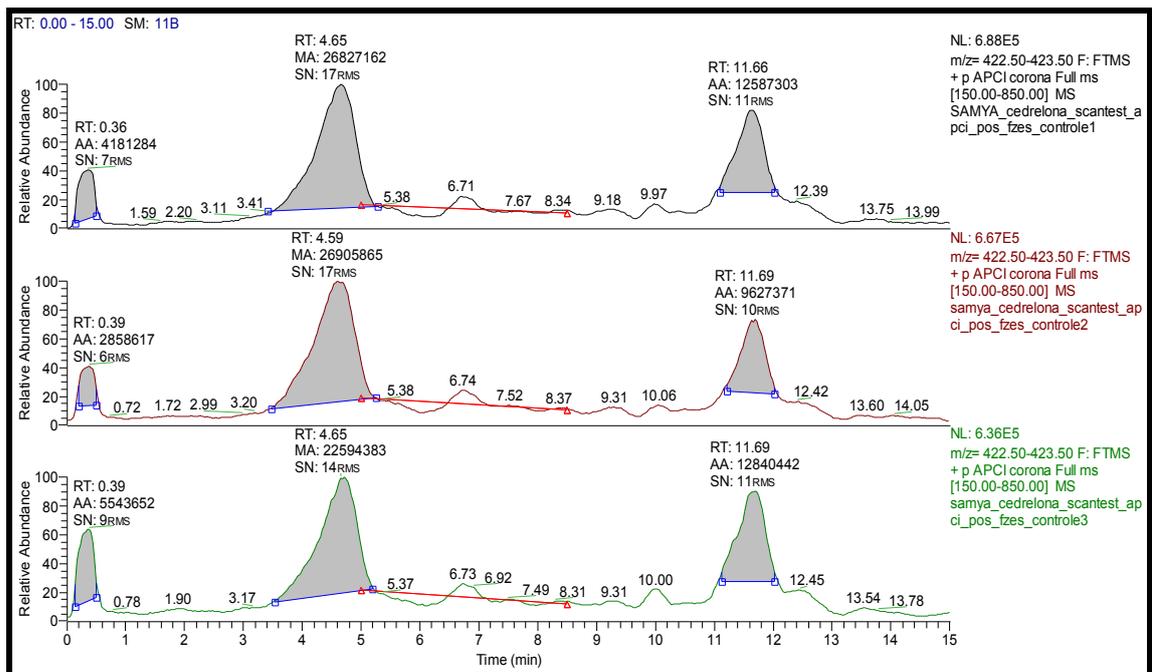


FIGURA 5.42 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,21484 dos extratos das fezes das lagartas controle sem a presença de cedrelona.

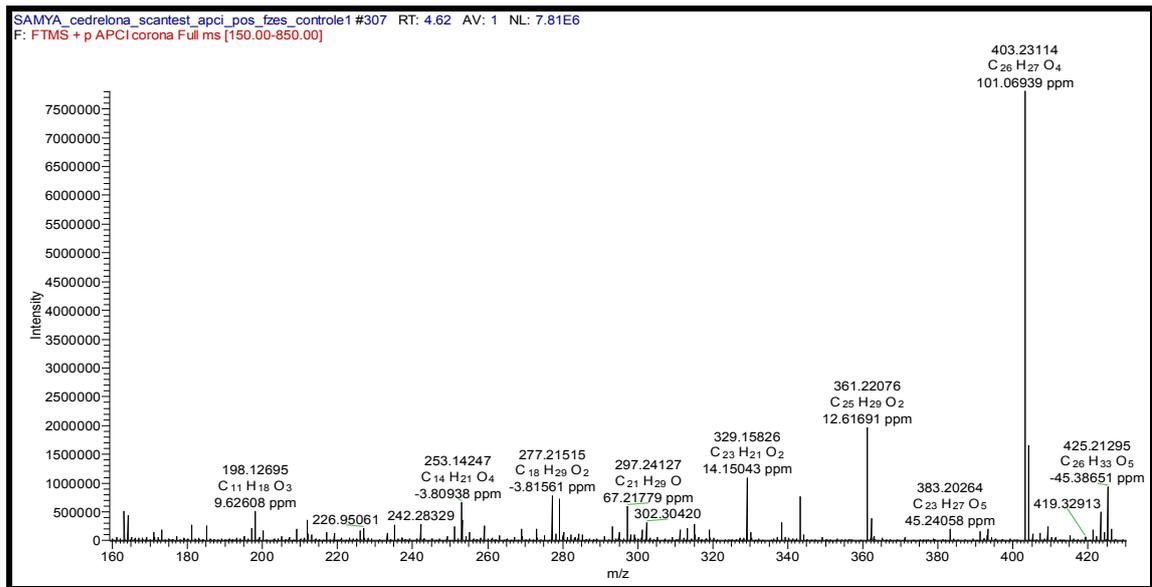


FIGURA 5.43 - Espectro de íons fragmentos para m/z 425,21295 encontrado para uma massa próxima da cedrelona porém com massa monoisotópica distinta extraído dos extratos das fezes controle.

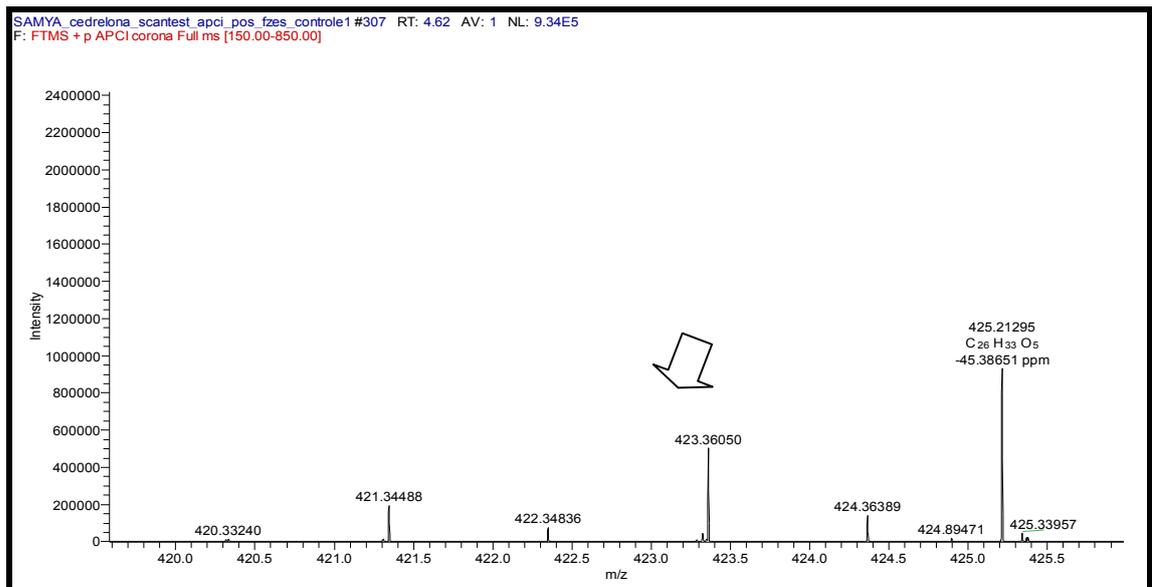


FIGURA 5.44 - Ampliação do espectro de íons fragmentos para m/z 425,21295 encontrado para uma massa próxima da cedrelona porém com massa monoisotópica distinta extraído dos extratos das fezes controle.

Diante destes resultados, algumas hipóteses foram levantadas. Provavelmente, na concentração a qual foi enriquecida na dieta e fornecida aos insetos, os mesmos apresentaram mecanismos de acúmulo saturados, portanto,

estes são liberados nas fezes, ou então, o metabólito atingiu a concentração máxima no tecido da lagarta a partir da qual passou a ser eliminado do organismo.

De acordo com os mecanismos de acúmulo, insetos herbívoros como em Lepidoptera, apresentam matrizes extracelulares compostas por microfibras de quitina ligadas a uma mistura de proteínas e glicoproteínas. Estas matrizes são chamadas de membranas peritróficas, as quais formam uma bainha fina em torno do conteúdo do lúmen do intestino. Quando se trata de aleloquímicos, as matrizes extracelulares não permitem uma permeabilidade destes compostos, e assim, estas podem funcionar como uma primeira defesa, reduzindo a absorção destes compostos (BARBEHENN, 2001; FRANKFATER et al., 2005).

O fato de *S. frugiperda* excretar grandes quantidades de cedrelona em sua forma inalterada nos indica que esta espécie pode utilizar de outros mecanismos para contornar os efeitos inseticidas comprovados. Assim, realizou-se a quantificação do consumo de cedrelona para saber quanto de cedrelona foi usada em metabolização, porém agora avaliando a alimentação das lagartas de 5º instar larval em 24 horas para se verificar a resposta metabólica em um maior tempo. A análise da atividade metabólica foi comparada à uma dieta normal para se confirmar se houve mudanças no metabolismo do inseto.

5.5.2- Resultados alcançados no estudo da quantificação de cedrelona nos extratos das fezes excretadas por *S. frugiperda*

O método cromatográfico foi otimizado, satisfatoriamente, a partir dos cromatogramas dos extratos de fezes obtidos, para a obtenção da resolução que permitisse a quantificação da cedrelona. Assim, todas as amostras quantificadas foram analisadas comparando com o padrão de referência (cedrelona). A partir da FIGURA 5.45, pode ser visualizado o cromatograma referente à seleção e extração da massa monoisotópica exata do padrão (cedrelona) em um tempo de retenção de 6,9 minutos.

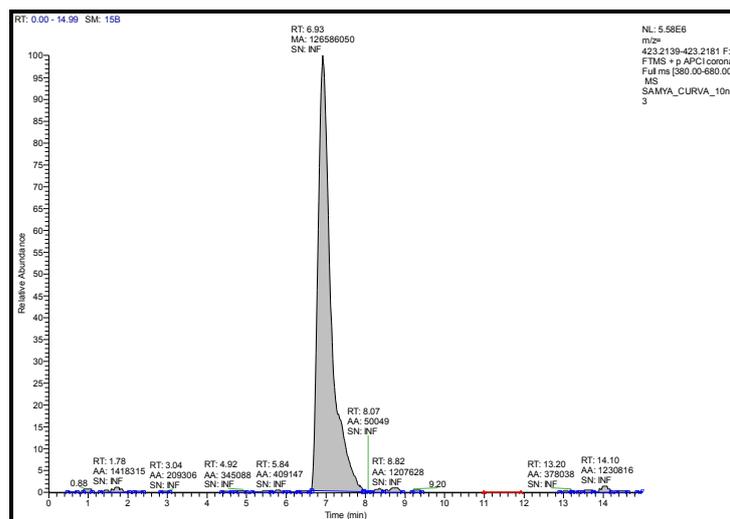


FIGURA 5.45 - Cromatograma de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 do padrão de referência. Método cromatográfico ajustado como descrito no item 5.2.1.6.3.

A curva de calibração foi construída plotando a área das bandas contra sua respectiva concentração (média das triplicatas). Com os resultados obtidos da curva analítica, foram estimados matematicamente os coeficientes angular e linear a e b e o coeficiente de correlação R através do método matemático conhecido por regressão linear. Esse método permite obter uma relação linear simples entre a resposta do detector e a concentração das amostras descrita pela equação $y = ax + b$ (conhecida por equação de reta). A equação de reta definida foi $y = 1.10^7 x + 9.10^7$ com um coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9977$. Essa equação pode ser verificada na FIGURA 5.46. Os coeficientes de variação entre as replicatas para todas as concentrações de cedrelona escolhidas ficaram com a média de 3,6%. Esses valores encontrados estão de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA, que admite curvas cujo R^2 seja maior que 0,98. As áreas das bandas referentes à todas réplicas biológicas foram calculadas e são apresentadas na TABELA 5.2.

A determinação da concentração do analito de interesse (cedrelona) nas amostras de fezes, dieta restante e lavagem dos tubos foram realizadas substituindo a área da banda medida no cromatograma na equação da reta obtida a partir da curva de calibração construída. Os valores teóricos e quantificados para todos os tratamentos estão dispostos na TABELA 5.3.

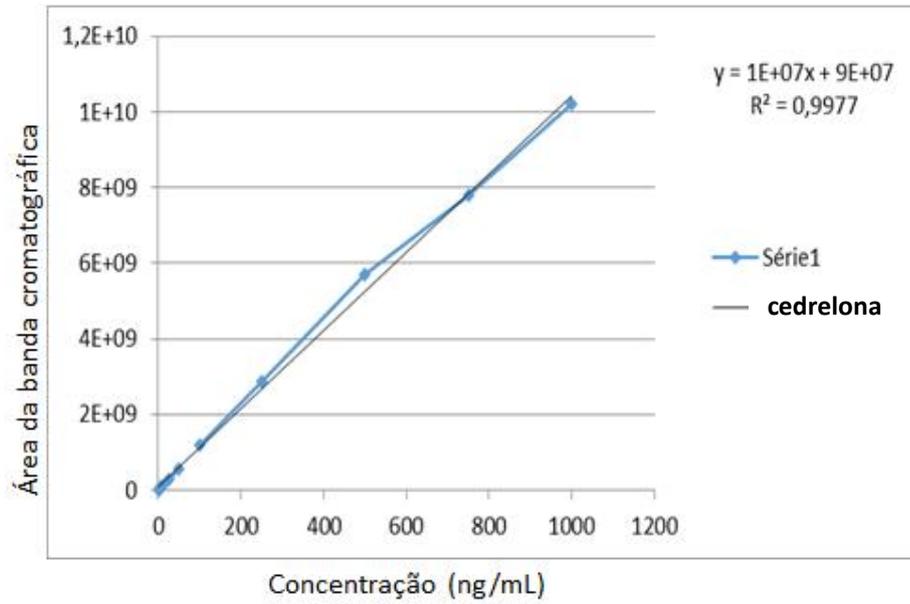


FIGURA 5.46- Curva de calibração por calibração externa de cedrelona. Faixa linear de trabalho de 1 – 1000 ng/mL. Cada ponto da curva (em triplicata) foi analisado sob os parâmetros cromatográficos descritos no item 5.2.1.6.3.

TABELA 5.2 - Áreas das bandas cromatográficas (extratos de fezes, extratos da lavagem dos tubos e extratos da dieta restante).

Amostras Quantificadas			
	Extratos de fezes (AA)	Extratos da dieta restante (AA)	Extratos da lavagem dos tubos (AA)
Lagarta 1	140530630	7309748278	567618592
Lagarta 2	1215838334	6456063880	1170316018
Lagarta 3	1955272491	8372480643	3489400197
Lagarta 4	4728975969	6288895949	953611859
Lagarta 5	2160598289	6288737511	5723110968

TABELA 5.3 - Valores teóricos e quantificados de cedrelona nos tratamentos (extratos de fezes, extratos da lavagem dos tubos e extratos da dieta restante).

Controles		
	* Conc. Teórica de cedrelona na dieta consumida (µg/g dieta)	* Conc. Teórica de cedrelona na dieta restante (µg/g dieta)
Lagarta 1	25,6	130,6
Lagarta 2	27,4	126,4
Lagarta 3	34,6	131,6
Lagarta 4	39,4	106,6
Lagarta 5	31,0	126,8

Amostras Quantificadas			
	Conc. Quantificada nas fezes (ng/g dieta)	Conc. Quantificada na dieta restante (µg/g dieta)	Conc. Quantificada na lavagem dos tubos (ng/g dieta)
Lagarta 1	5,05	108,3	47,8
Lagarta 2	112,6	95,5	108,0
Lagarta 3	186,6	124,2	339,9
Lagarta 4	463,9	93,0	86,4
Lagarta 5	207,1	93,0	563,3

* O cálculo da concentração teórica foi baseado na concentração de cedrelona usada para o preparo da dieta considerando que toda a cedrelona tenha sido extraída.

A partir dos cromatogramas das fezes (FIGURA 5.47), observou-se que em 24 horas de alimentação, diferente do que foi verificado em 5 horas de alimentação, o inseto metabolizou grande parte da cedrelona, sendo liberados nas fezes os produtos do metabolismo e uma pequena quantidade de cedrelona intacta, pois foi verificado valores abaixo de 500 ng, segundo os dados de quantificação (TABELA 5.3). Vale ressaltar, que estes valores são considerados estimativas, uma

vez que, trata-se de amostras de difícil extração e de massas diferentes dos extratos obtidos, pois optou-se em quantificar as fezes excretadas como um todo e cada lagarta aleatória tem um consumo diferente. Cada réplica biológica mostrou a mesma resposta metabólica, porém em dados quantitativos diferentes, pois cada inseto tem sua resistência a determinados metabólitos. O metabolismo ou detoxificação é a primeira resposta à presença de um possível inseticida. Este mecanismo permite ao inseto modificar ou detoxificar o inseticida a uma taxa suficiente o bastante para prevenir a ação no sítio alvo (FUKUTO e MALLIPUDI,1983).

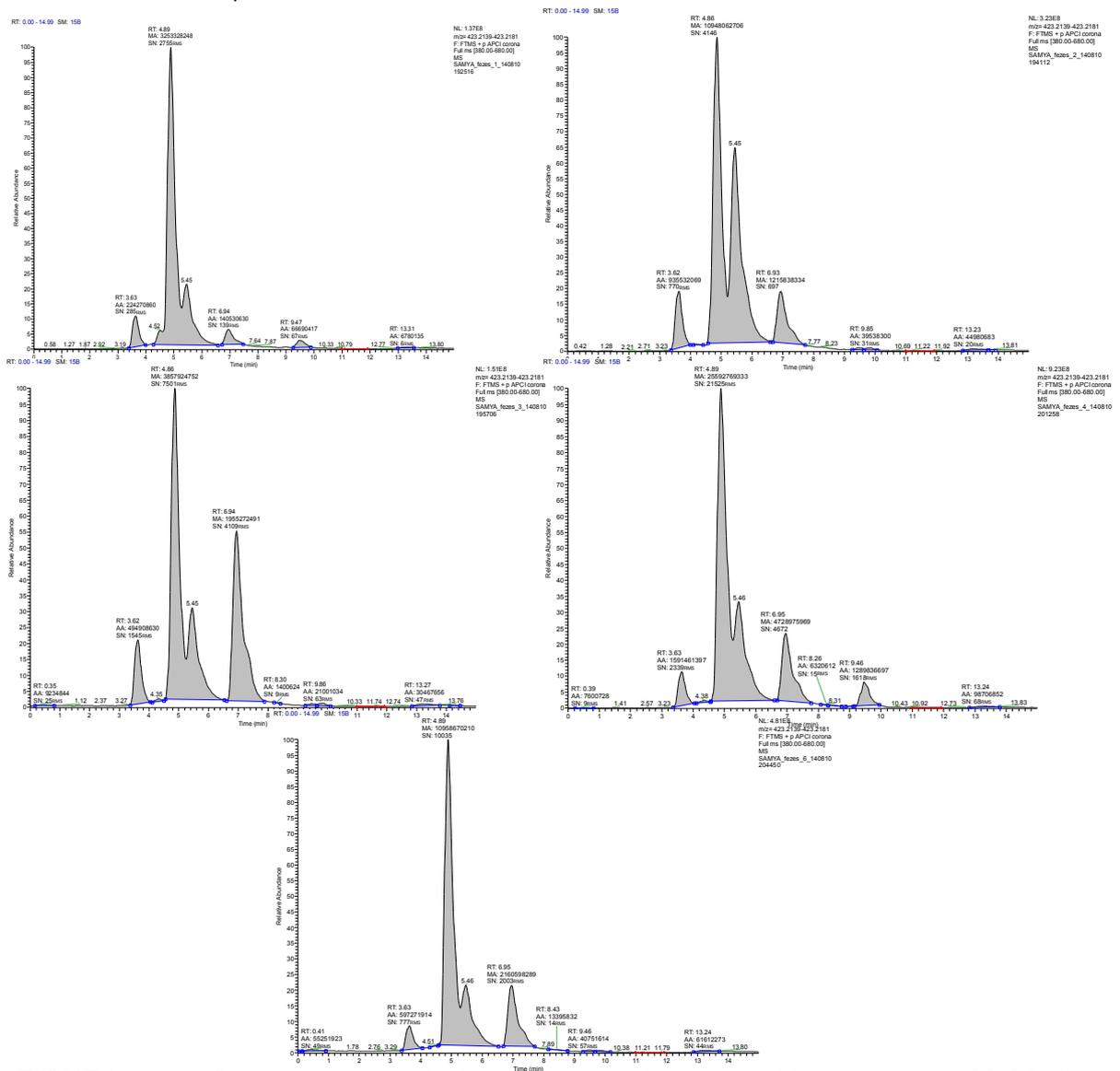


FIGURA 5.47 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos das fezes de cinco lagartas alimentadas com cedrelona. Extratos realizados de forma quantitativa, em um total de 5 replicatas.

concentração quantificada com os valores teóricos calculados baseado na concentração de cedrelona fornecida na dieta artificial (TABELA 5.3). Pois, conhecendo a quantidade adicionada e a quantidade quantificada foi possível prever. Observou-se a partir dos cromatogramas, FIGURA 5.49, que não haveria possibilidade dos picos referentes aos possíveis produtos de metabolização da cedrelona serem artefatos provenientes da extração, já que foi o mesmo método e só foi detectada a cedrelona intacta fornecida, em comparação ao cromatograma referente ao padrão o qual foi usado no experimento. Assim, pode-se verificar claramente a presença apenas do pico no tempo de retenção em 6,97 minutos referente à cedrelona. Diante destes dados, foi confirmado a presença da cedrelona intacta quando foi selecionada e extraída a sua referida massa monoisotópica exata.

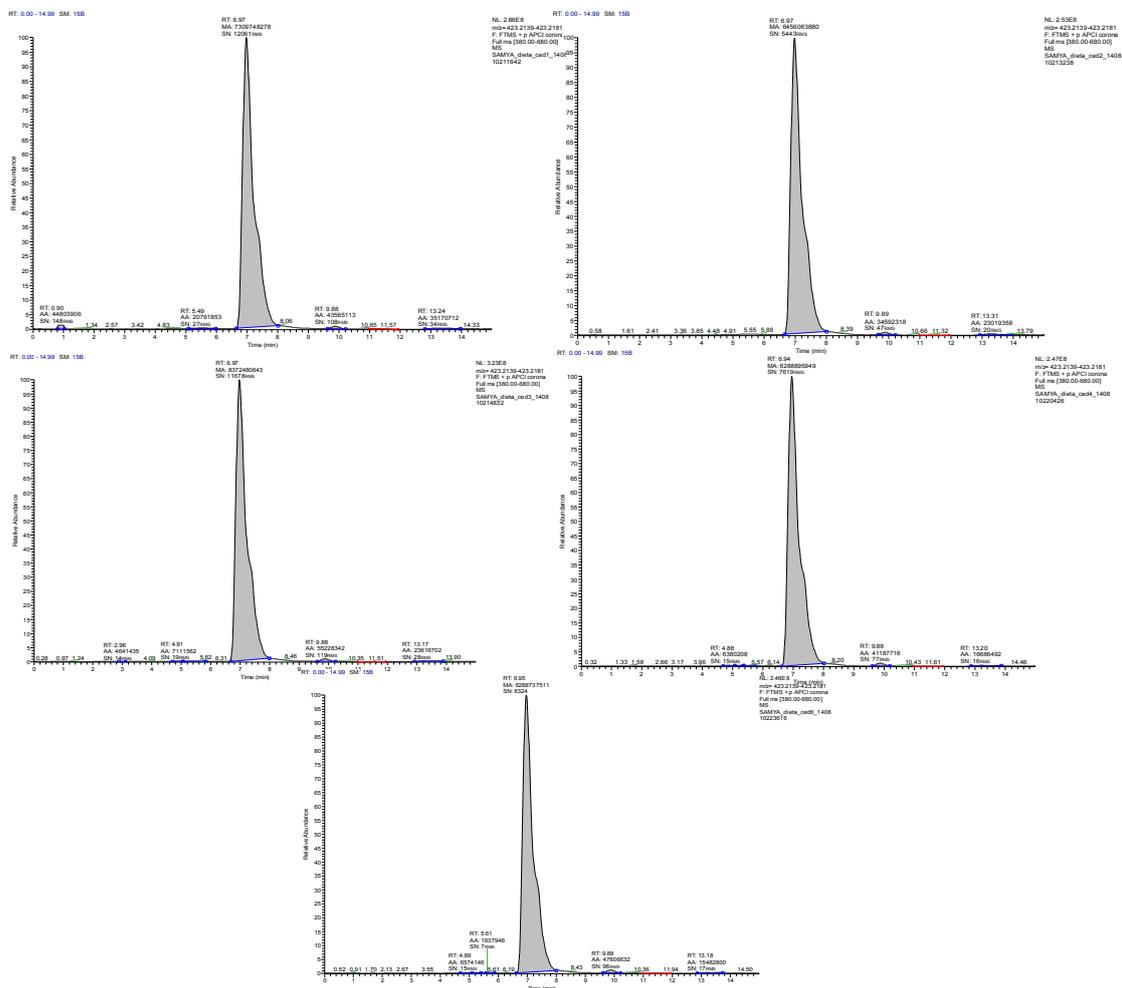


FIGURA 5.49 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos da dieta enriquecida com cedrelona de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas). Extratos realizados de forma quantitativa (5 replicatas).

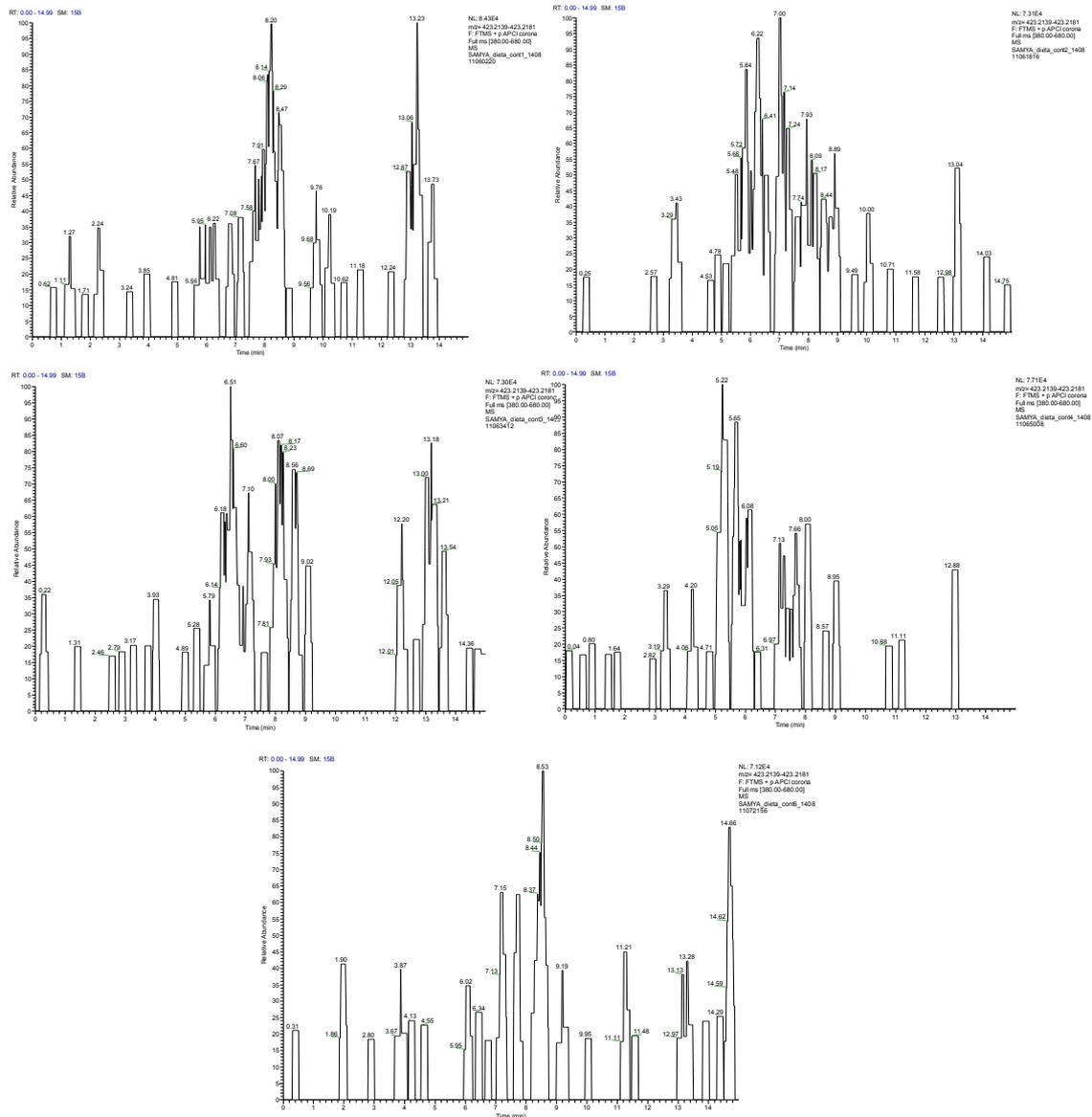


FIGURA 5.50 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos da dieta controle sem a presença de cedrelona de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas). Extratos realizados de forma quantitativa, em um total de 5 replicatas.

Observou-se no tratamento referente à lavagem dos resíduos presentes nos tubos utilizados os quais foram realizados os experimentos, que a concentração de cedrelona detectada foi na faixa de 50 a 600 ng, e isso se deve à presença de resíduos tanto da dieta fornecida quanto de fezes. Diante desta informação, é possível observar a partir dos cromatogramas da FIGURA 5.51, a presença minoritária dos possíveis produtos de metabolização os quais foram

observados nas fezes e da cedrelona intacta, pois nos tubos continham tanto resíduos de fezes como da dieta fornecida.

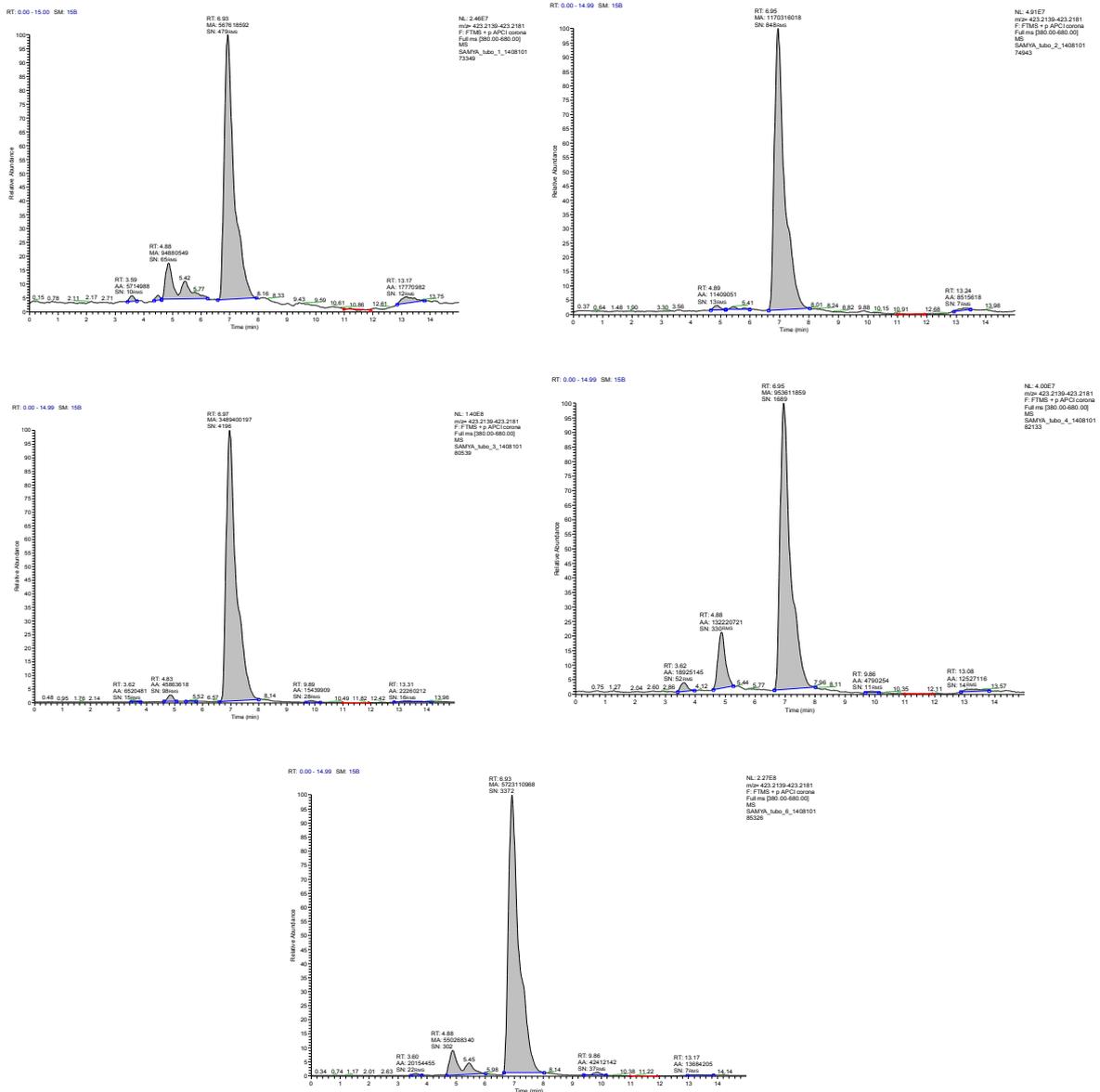


FIGURA 5.51 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes à lavagem dos tubos os quais foram realizados o experimento de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas). Extratos realizados de forma quantitativa, em um total de 5 replicatas.

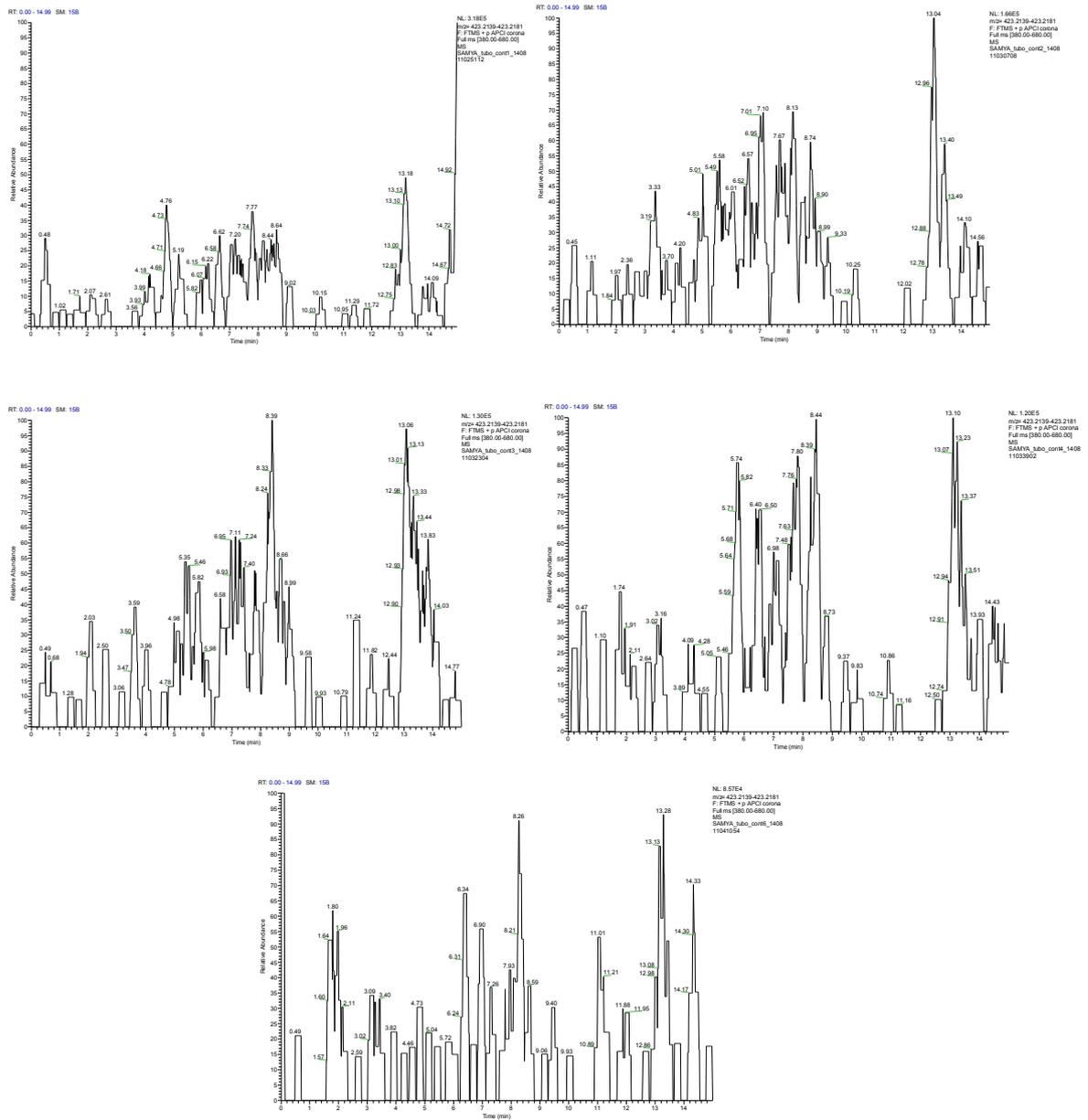


FIGURA 5.52 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes à lavagem dos tubos os quais foram realizados o experimento controle sem a presença da cedrelona de cinco lagartas diferentes (réplicas biológicas). Extratos realizados de forma quantitativa, em um total de 5 replicatas.

5.5.3 - Resultados alcançados na análise dos extratos de hemolinfa, intestino médio, cabeça e fezes das lagartas de 5º íntar de *S. frugiperda* quando alimentadas com cedrelona em 24 horas via LTQ Orbitrap Velos™ para o estudo da metabolização

Os extratos das fezes e dos órgãos do inseto (hemolinfa, cabeça e intestino) coletados de *S. frugiperda* no quinto estágio larval durante o experimento de 24 horas de alimentação com dieta enriquecida em cedrelona apresentaram o limonoide intacto e possíveis produtos de metabolização. Vale ressaltar que a identificação de metabólitos provenientes do metabolismo foi baseada nos principais mecanismos de destoxificação utilizados por Lepidoptera, os quais já foram mencionados. Em todos os tratamentos foi feito uma varredura de possíveis produtos contendo glicolisação, redução, oxidação ou modificações nos anéis do limonoide (FIGURA 5.53), porém em nenhum dos tratamentos foram detectados os produtos sugeridos, pelo menos numa concentração detectável em concordância ao S/R. Na presença de um possível inseticida, alguns insetos herbívoros podem transformar metabólitos em substâncias menos tóxicas. MAAG et al. (2014), relatou a elucidação de uma substância isolada a partir dos extratos de fezes de *S. frugiperda*, o qual é um produto de destoxificação do inseto em que ocorre a metabolização de um produto através da glicolisação enzimática.

Em geral, os insetos metabolizam o alimento muito rápido, em poucas horas de alimentação. Porém, quando o alimento tem algum composto xenobiótico, como um aleloquímico de planta, ele pode demorar mais tempo pra metabolizar. Isto explicaria o fato do não surgimento de possíveis produtos de metabolização durante o experimento de cinco horas de alimentação realizado com as larvas de *S. frugiperda*. Provavelmente o inseto não tenha conseguido metabolizar a cedrelona, por isso ela foi detectada inalterada nas fezes. Este fato indica que a via de metabolização da cedrelona deve levar um tempo maior pra ser ativada. GIONGO (2014), descreve testes enzimáticos para a verificação de alterações na quantidade/atividade de importantes enzimas de destoxificação a partir das lagartas de *S. frugiperda* (atividade total de proteases, atividade da glutathione S-transferase e quantificação de monooxigenases do citocromo P450 e a atividade da acetilcolinesterase), porém não foi observada nenhuma alteração das enzimas com

cinco horas de alimentação, apenas a atividade da acetilcolinesterase foi observada. Estes dados da literatura corroboram com os dados apresentados, uma vez que, em cinco horas de alimentação não foi verificada a metabolização da cedrelona. Nos estudos de alimentação em 24 horas houve a metabolização, porém com a presença de cedrelona intacta em concentração muito pequena nas fezes.

Ao realizar a busca por possíveis produtos de metabolização em Lepidóptera foram encontrados possíveis produtos com massa monoisotópica próxima à da cedrelona nos cromatogramas dos extratos das fezes coletadas (FIGURAS 5.54). Ainda foi possível observar que o perfil de fragmentação para os picos cromatográficos nos tempos de retenção 3,7; 4,9; e 6,9 são similares àqueles da cedrelona (FIGURAS 5.55, 5.56 e 5.57).

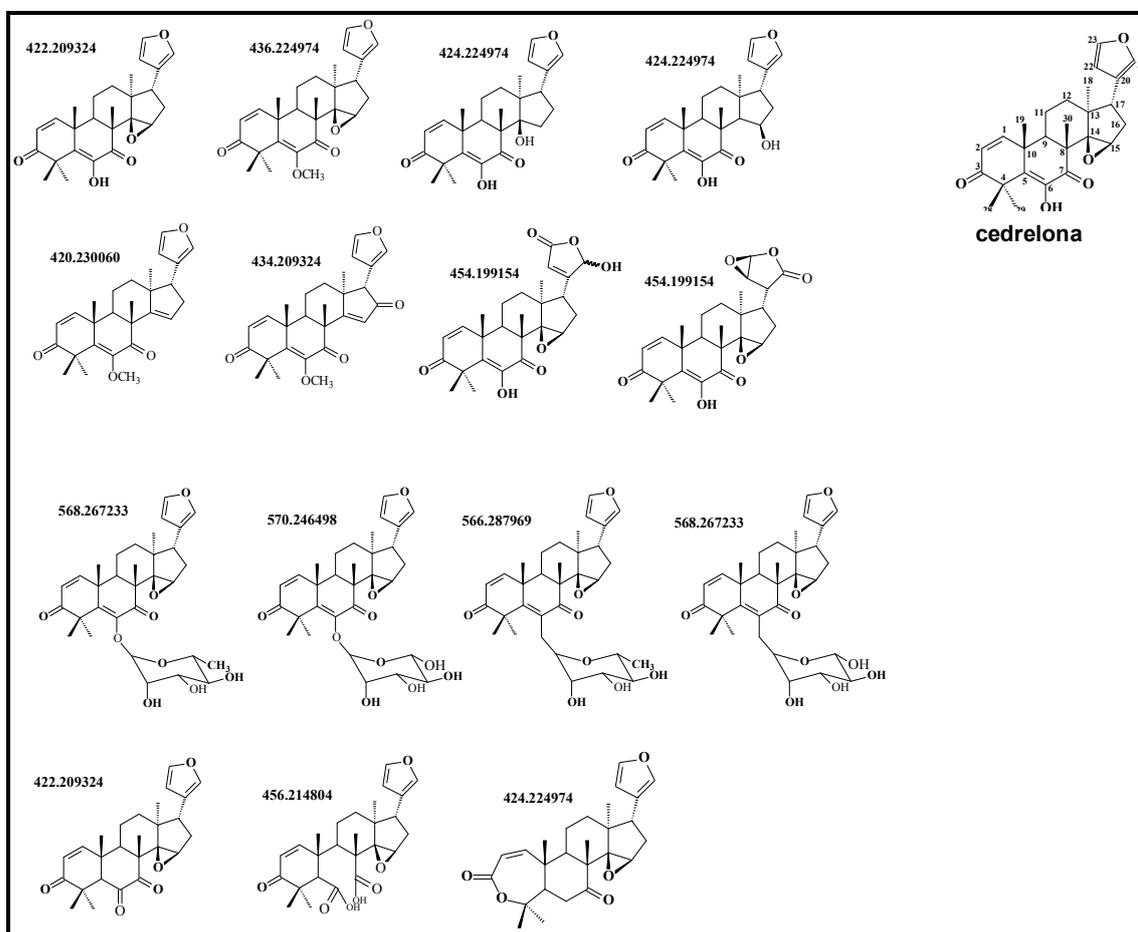


FIGURA 5.53- Estruturas derivadas do limonoide cedrelona, com suas respectivas massas monoisotópicas exatas.

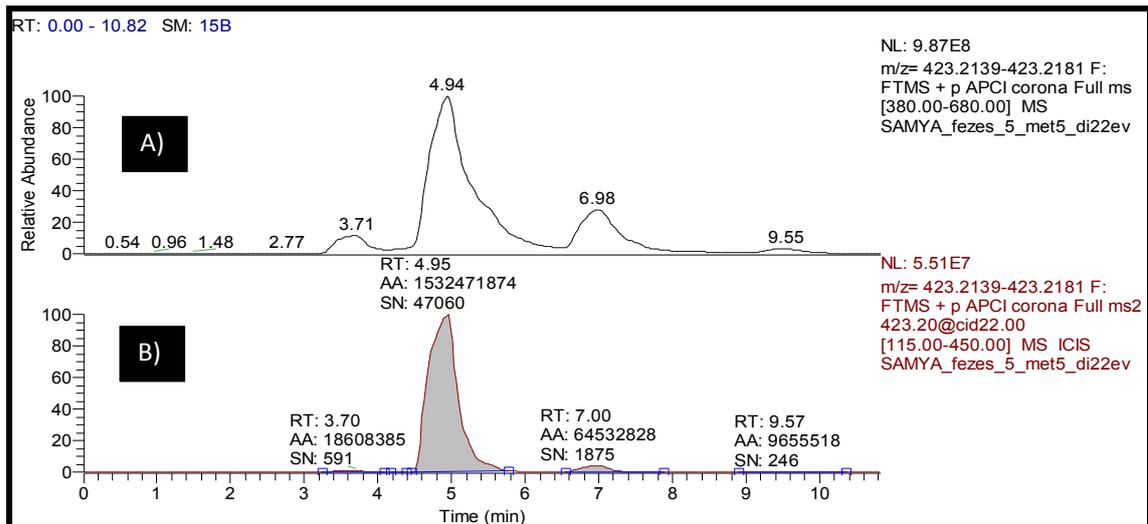


FIGURA 5.54 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos das fezes de *S. frugiperda* alimentadas com cedrelona. Bandas cromatográficas em tempos de retenção de 3,7, 4,9 e 6,9. O limonoide cedrelona é referente à banda em 6,9 em concordância ao padrão. A) Abundância relativa dos picos cromatográficos durante a corrida; B) Picos cromatográficos selecionados para obtenção dos íons fragmentos com as respectivas áreas e a relação sinal/ruído.

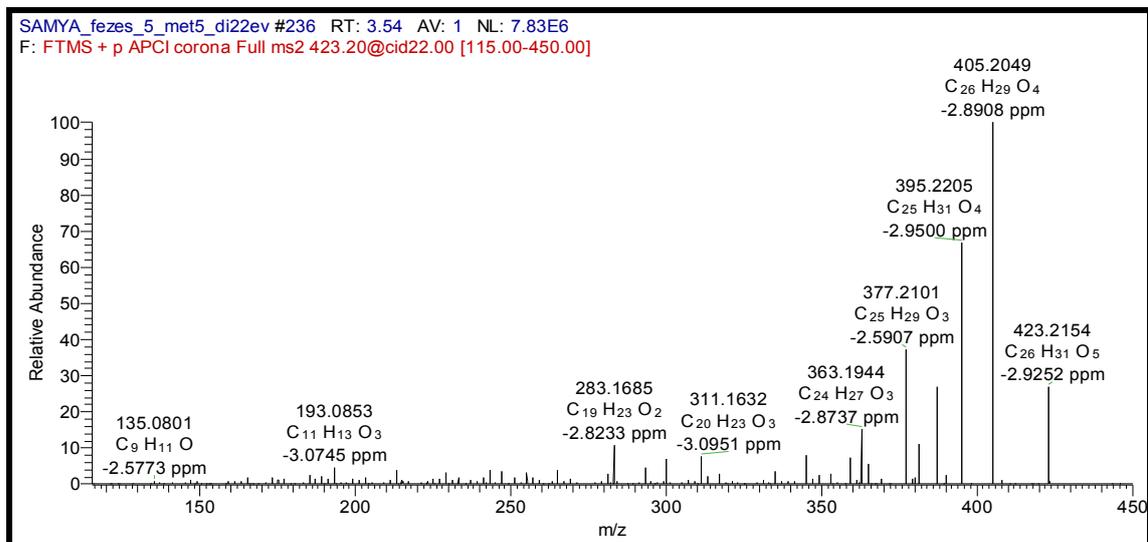


FIGURA 5.55 - Espectro de íons fragmentos para m/z 423,2151 extraído da banda em 3,70 referente ao possível produto metabolizado.

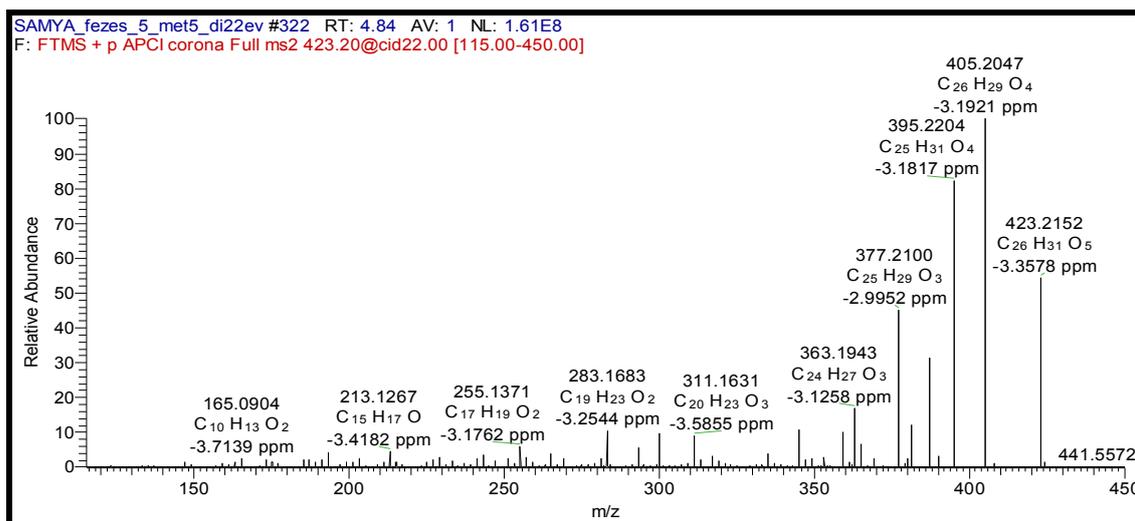


FIGURA 5.56 - Espectro de íons fragmentos para m/z 423,2151 extraído da banda em 4.84 referente ao possível produto metabolizado.

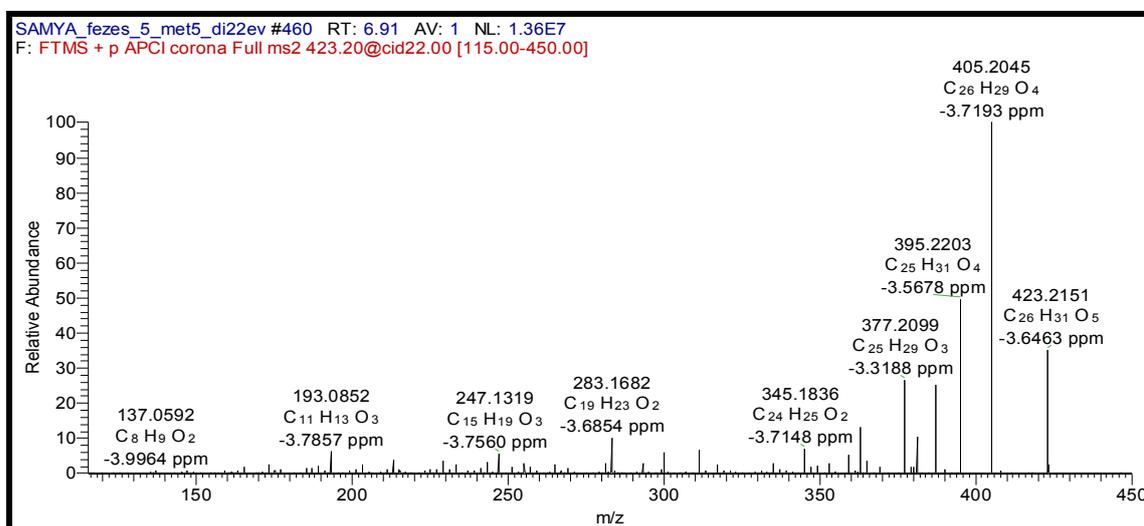


FIGURA 5.57 - Espectro de íons fragmentos para m/z 423,2151 extraído da banda em 6.98 referente ao limonoide cedrelona.

Nota-se nos cromatogramas referentes aos extratos do intestino médio (FIGURA 5.58), a presença de cedrelona intacta referente ao pico em 6,9 minutos e alguns picos em 4,8, 5,3 e 9,5 que podem estar relacionados à metabolização, porém com massa próxima da cedrelona. Observou-se neste tratamento uma maior concentração de cedrelona intacta acumulada e de forma minoritária os outros produtos dos referidos picos.

A retenção de cedrelona no intestino das lagartas no experimento de alimentação em 24 horas, permitiu a metabolização do composto como pode ser observado nos cromatogramas. Isto pode ser devido um maior tempo de contato

com as enzimas de detoxificação, como por exemplo, a glutionina *S-transferase* e as monooxigenases do citocromo P450.

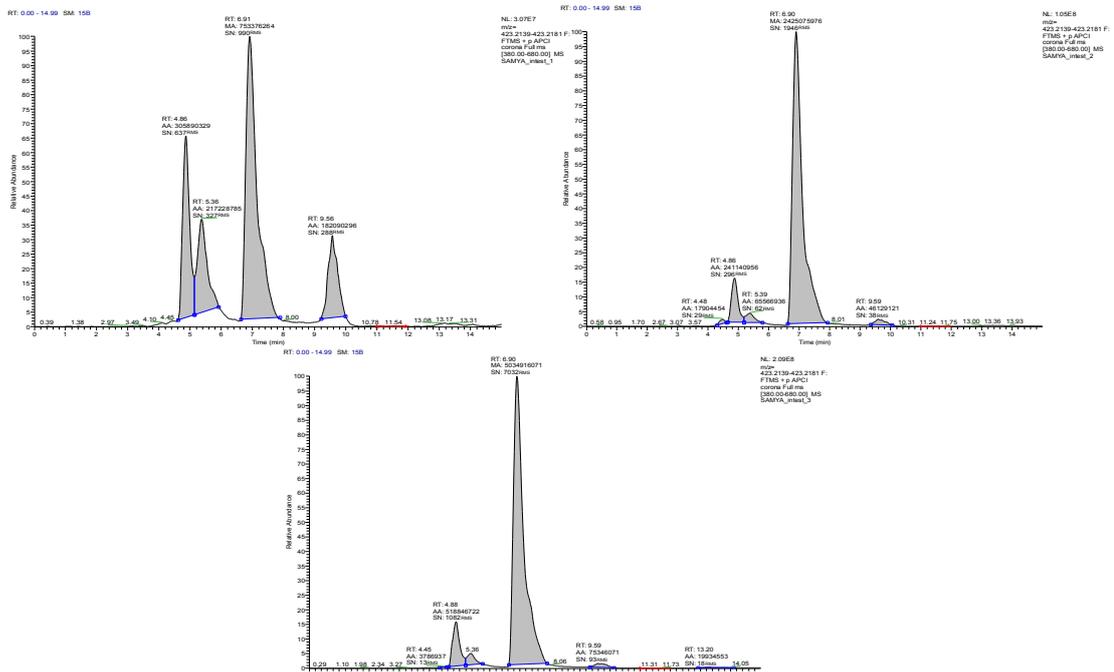


FIGURA 5.58 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de intestino médio de três lagartas diferentes alimentadas com cedrelona.

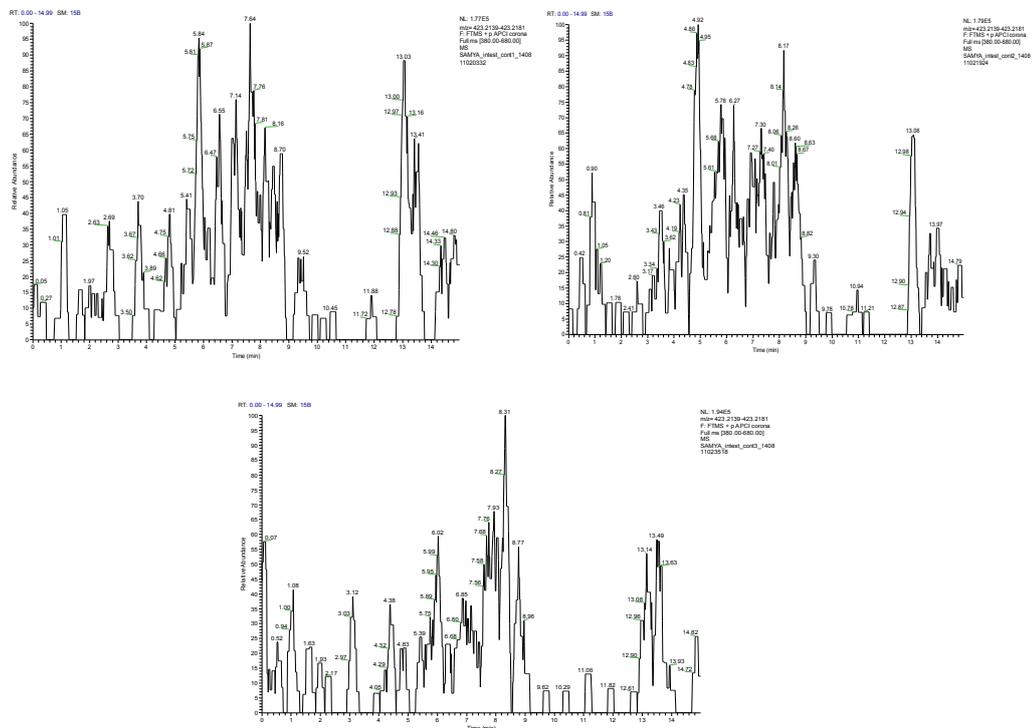


FIGURA 5.59 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de intestino médio de três lagartas diferentes controles.

Com relação aos extratos da hemolinfa coletadas das lagartas, pode-se observar a partir dos cromatogramas apresentados, FIGURA 5.60, a presença do pico referente à cedrelona intacta em uma quantidade minoritária e a presença dos picos referentes aos possíveis produtos de metabolização em 3,7, 4,7 e 5,3 minutos. Contudo a segunda réplica apresentou-se com ausência de picos, o que pode ser relacionado a problemas de coagulação, degradação, na extração ou mesmo de detecção. No experimento de cinco horas de alimentação, praticamente não foi detectada cedrelona intacta na hemolinfa e baseado no que já foi discutido este fato pode ser justificado pelo alto custo fisiológico necessário para armazenamento desses metabólitos.

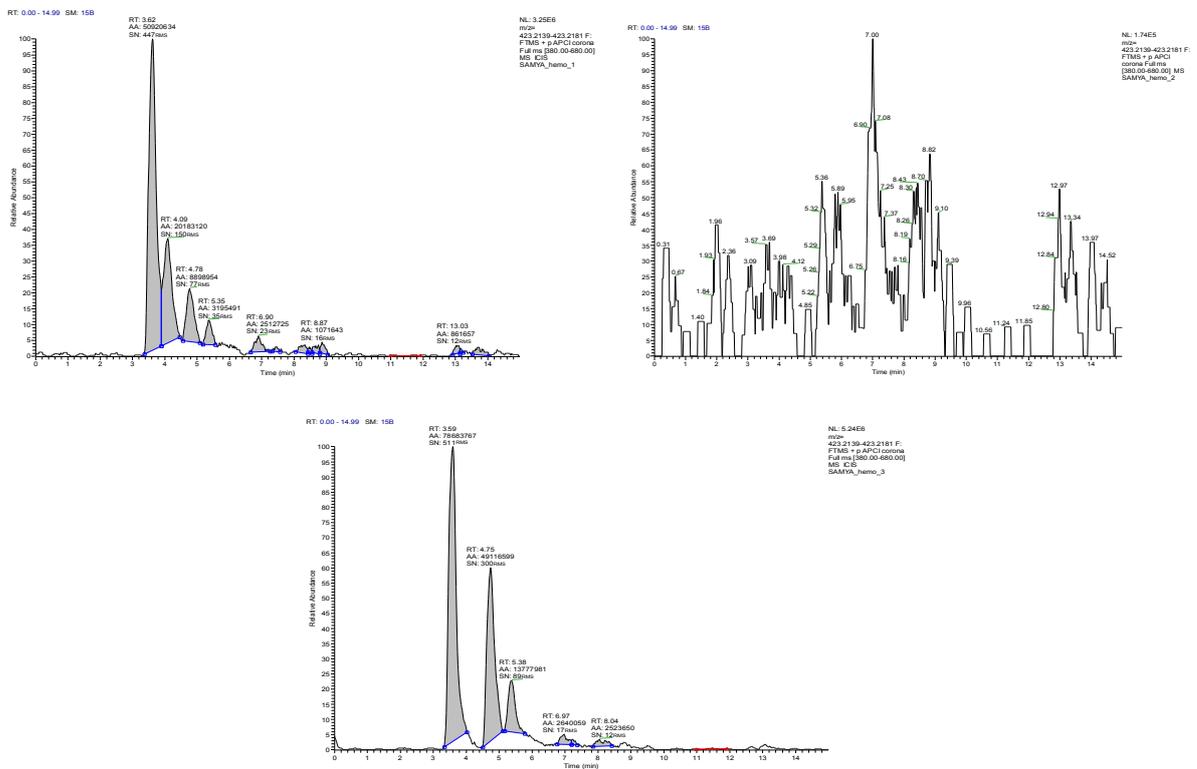


FIGURA 5.60 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de hemolinfa de três lagartas diferentes alimentadas com cedrelona (triplicatas biológicas).

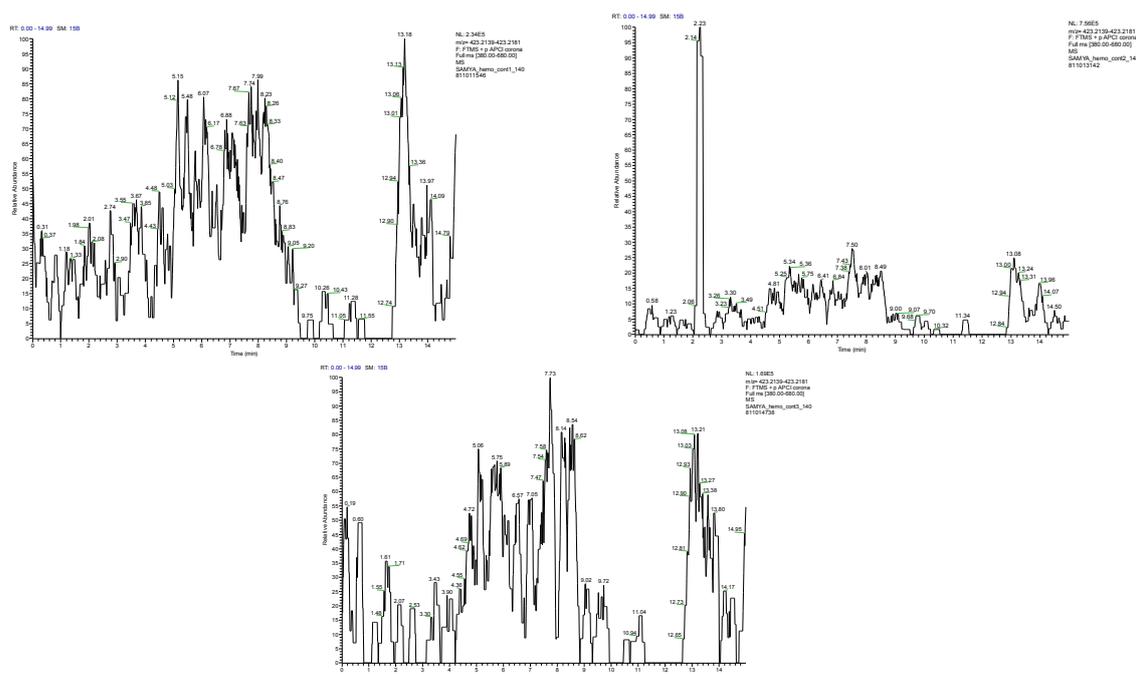


FIGURA 5.61 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 dos extratos de hemolinfa de três lagartas diferentes alimentadas com dieta controle (triplicatas biológicas).

Os cromatogramas dos extratos da cabeça dos insetos estudados (FIGURA 5.62) mostrou tanto a presença da cedrelona intacta como alguns picos referentes aos produtos de metabolização. GIONGO (2014), relatou em seus estudos enzimáticos com lagartas de *S. frugiperda*, que os testes para a verificação de alterações na quantidade/atividade de acetilcolinesterase realizados mediante extratos enzimáticos de lagartas de quarto instar inteiras alimentadas com cedrelona que foi verificado o aumento da atividade desta enzima.

A enzima acetilcolinesterase está presente no sistema nervoso central dos insetos e é responsável pela degradação da acetilcolina (neurotransmissor) e também regula a transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas. O aumento da função desta enzima verificado com a presença de cedrelona estaria comprometendo a transmissão sináptica, uma vez que há um aumento da degradação do neurotransmissor (GIONGO, 2014). Uma hipótese que pode ser levantada é que o aumento desta atividade enzimática além de prejudicar a transmissão do impulso nervoso pode estar comprometendo os processos de metabolização do inseto, e assim, foi verificado a presença de cedrelona não metabolizada em algumas das réplicas biológicas avaliadas. Vale ressaltar que cada

réplica se trata de uma lagarta aleatória, o qual pode vir a apresentar uma resposta diferente. Porém, são imprescindíveis estudos direcionados.

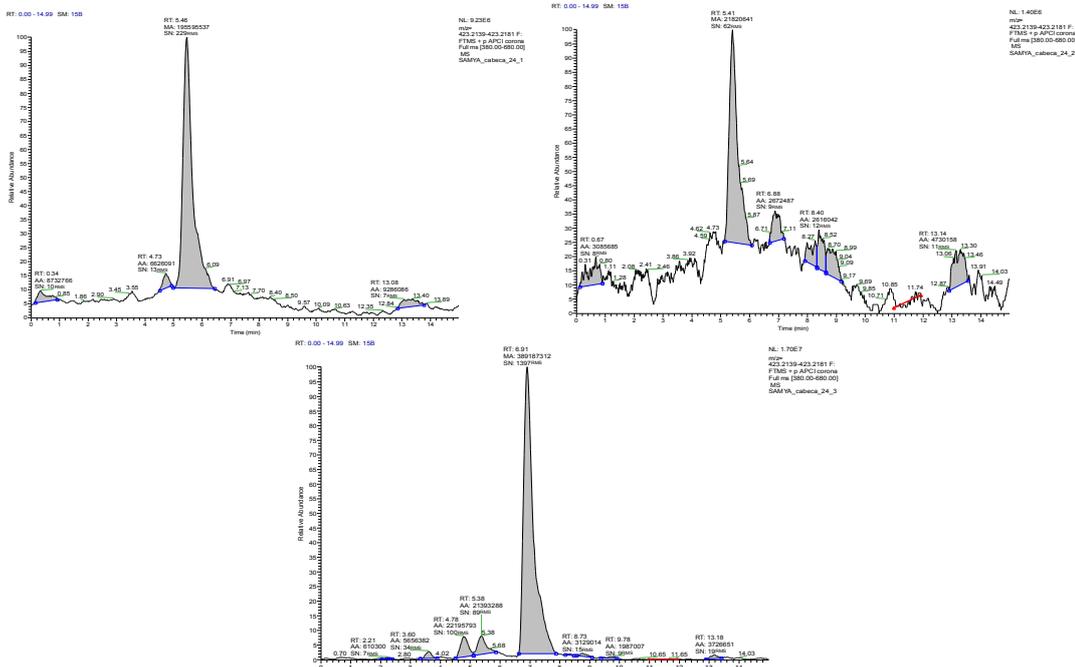


FIGURA 5.62 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes a cabeça de três lagartas diferentes (triplicatas biológicas).

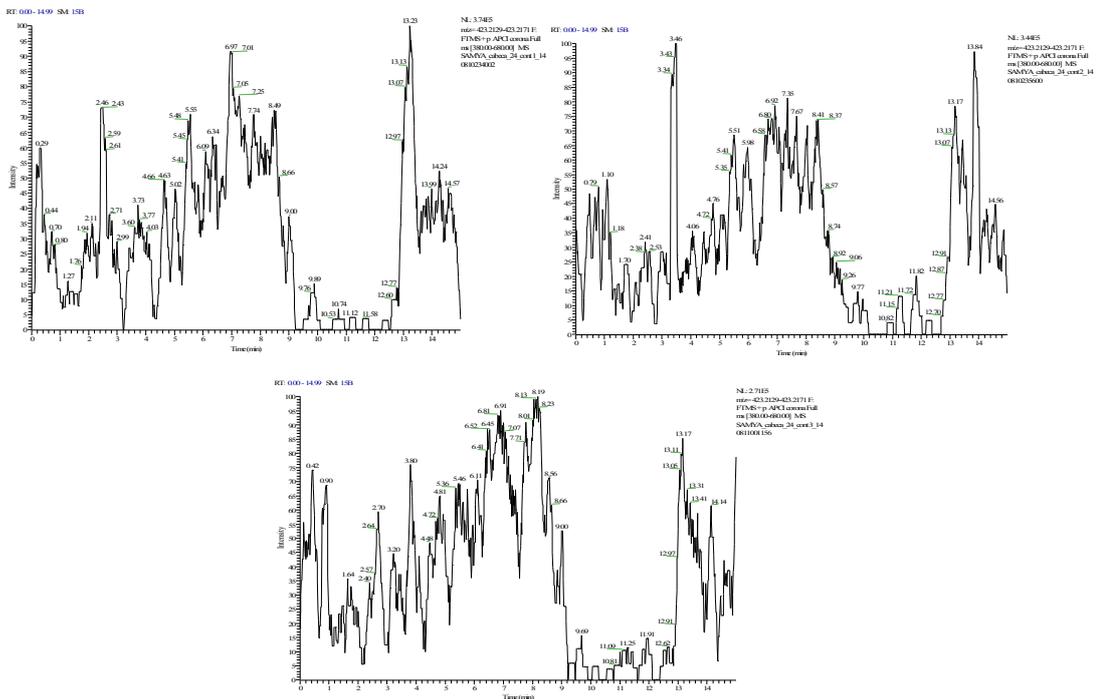


FIGURA 5.63 - Cromatogramas de íons selecionados e extraídos para m/z 423,2151 das amostras referentes à cabeça de três lagartas diferentes alimentadas com dieta controle (triplicatas biológicas).

5.6 - Resultados alcançados na análise da atividade metabólica

Na análise da atividade metabólica do inseto, é possível observar, de acordo com a TABELA 5.4, que o valor da taxa metabólica relativa das lagartas que ingeriram cedrelona aumentou em dez vezes em relação ao controle, havendo também um aumento no custo metabólico. As lagartas que estavam sendo alimentadas com cedrelona na dieta reduziram sua alimentação pela metade após ingestão da dieta enriquecida, assim, essa redução, provavelmente, ocorre pelo desvio de energia que seria utilizada para conversão em biomassa, para utilização em detoxificação, o que se confirma pelo aumento do custo metabólico.

Os parâmetros avaliados indicam alterações no metabolismo das lagartas, já que estas lagartas continuam se alimentando da dieta contendo cedrelona, mas não ganham massa corpórea como aquelas do controle, devido à redução na eficiência de conversão do alimento em biomassa. A pequena quantidade de alimento consumido se deve ao efeito tóxico causado pela ingestão de cedrelona, que reduziu a conversão do alimento em biomassa e, conseqüentemente, reduziu o crescimento das lagartas. Essa alteração no metabolismo foi verificada no estudo químico do inseto em diferentes estágios larvais por RMN e por Espectrometria de Massas, onde foi observada a metabolização da cedrelona pelo inseto.

Devido à menor ingestão de alimento fornecido, as lagartas que receberam dieta com cedrelona excretaram menor quantidade de fezes e assimilaram menor quantidade desta do que aquelas do controle. Observando a quantidade de alimento excretado e assimilado, verificou-se que no controle o assimilado foi utilizado para o ganho de peso corpóreo e metabolismo. No tratamento com dieta contendo cedrelona apenas uma pequena quantidade foi usada para conversão em biomassa (massa corpórea) e grande parte foi utilizada no metabolismo, como indicaram os valores da taxa e custo metabólico. Esse metabolismo elevado pode estar relacionado à tentativa de detoxificação do composto pelo inseto. O alto custo de energia para a detoxificação é sugerido pela observação de cedrelona não metabolizada.

A toxicidade de cedrelona foi caracterizada por redução no crescimento e prolongamento do período larval. Ao passar o tempo o consumo de alimento é reduzido, mas o inseto não para de ingerir a dieta, utilizando-o principalmente nos

processos metabólicos e não para o crescimento, levando a uma redução na conversão deste alimento em massa corpórea.

TABELA 5.4 - Parâmetros nutricionais de lagartas de quarto instar de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo cedrelona a 300 ppm após quatro dias.

Tratamento	Taxa metabólica relativa (g/g/dia)	Custo metabólico (%)
Controle	0,60 ± 0,06	69,94 ± 2,45
Cedrelona	6,38 ± 1,50	86,33 ± 3,42

6 - ESTUDO DA MICROBIOTA ASSOCIADA À *S. frugiperda*

O estudo da microbiota associada à *S. frugiperda* foi desenvolvido no Departamento de Química da UFSCar no Laboratório de Bioensaios com Micro-organismos e Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos sob colaboração do Dr. Leonardo Toffano, Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho e da aluna de Doutorado Marília A. Trapp.

6.1 - Materiais e equipamentos

6.1.1- Materiais

- Água deionizada ultra pura esterelizada;
- Álcool grau P.A. Synth® a 70 %;
- Álcool grau P.A. Synth® a 95 %;
- Micropipetas Gilson® de 10, 100 e 1000 µL;
- Tubos de vidro de 5 mL Alça de Drigalski;
- Alça de platina (5 cm x 0,5 cm);
- Bico de Bunsen;
- Placas de Petri Petric® diâmetro 9 cm;
- Bastão de vidro estéril;
- Ágar Nutriente HIMEDIA®;
- Solução aquosa de hipoclorito de sódio a 0,2 %;
- Papel de filtro estéril;
- Lâminas de microscopia;
- Solução de cristal violeta;
- Solução de lugol;
- Solução de safranina
- Corante fucsina;
- Óleo de imersão.

6.1.2 - Equipamentos

- Autoclave vertical Phoenix Luferco ®;
- Capela de fluxo laminar vertical;
- Estufa incubadora de laboratório com demanda bioquímica de oxigênio 411D Nova Ética (B.D.O. sigla em inglês);
- Microscópio óptico (até 1000 x) L 2000A;
- Espectrômetro de Massas com Ionização por Laser hifenizado a um detector de tempo de voo (Ionização por Dessorção a Laser Assistido por Matriz, MALDI-TOF, sigla em inglês) (Autoflex Speed; Bruker Daltonics).

6.2 – Isolamento de micro-organismos simbiotes de *S. frugiperda*

Lagartas de quinto ínstar de *S. frugiperda* alimentadas por 24 horas com dieta contendo cedrelona e estas sem a presença do limonoide (controle) foram submetidas aos procedimentos de dissecação para a retirada do intestino médio em solução salina de NaCl 0,8% sob estereomicroscópio de acordo com o ESQUEMA 5.3. Foram retirados cinco intestinos, tanto das lagartas alimentadas com o princípio ativo (cedrelona), como daquelas do controle. Em capela de fluxo laminar, os intestinos foram mergulhados em soluções de esterilização, separadamente, na seguinte ordem: solução aquosa de hipoclorito de sódio a 0,2 %; etanol 70% (v/v) e água deionizada esterilizada. Por último, o excesso do solvente foi eliminado colocando rapidamente o material biológico em papel de filtro estéril. O tempo de cada imersão foi de 60s. Após a esterilização, os intestinos de cada tratamento foram misturados e macerados em tubos de vidro de 5 mL de volume contendo 1000 µL de água esterilizada utilizando-se bastão de vidro estéril. A suspensão para cada tratamento, com cedrelona e controle, foi agitada e diluída seriadamente ($1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$, $1/10^5$ e $1/10^6$) e colocada em contato com o meio de cultura em placas de Petri. O experimento foi feito em triplicata para cada diluição de cada tratamento (C - com cedrelona e S - sem cedrelona) e as placas inoculadas para uma das três diluições realizadas, $1/10^2$ (C-2/S-2), $1/10^4$ (C-4/S-4) e $1/10^6$ (C-6/S-6). Utilizou-se o meio de cultivo ágar nutriente para o crescimentos dos isolados.

Cada isolado obtido foi cultivado em meio líquido e uma alíquota das células em cultivo preservada em 20% glicerol e depositada em freezer -80%. Para

as análises por MALDI-TOF/MS os isolados foram reativados em meio de cultura do tipo BHI (Brain Heart Infusion), e para a análise de caracterização morfológica estes foram reativados em meio de cultura ágar nutriente.

6.3 – Análise dos isolados via MALDI-TOF/MS

Para a comparação da diversidade dos micro-organismos do intestino médio de *S. frugiperda*, foram realizadas as análises para todos os isolados obtidos dos tratamentos controle e com cedrelona nas referidas diluições ($1/10^2$, $1/10^4$ e $1/10^6$). Porém, para o tratamento S-6 não houve crescimento de micro-organismos em nenhuma das réplicas. Para cada tratamento foram escolhidos dois pontos aleatórios e as análises feitas em triplicatas. Na matriz utilizada de ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) sobre a placa de ionização com as amostras de interesse, ocorreu a formação homogênea da cocrystalização para posterior análise. Uma vez finalizada a sequência de aquisição dos sinais dos espectros de massas, os dados adquiridos foram subsequentemente comparados com a base de dados para bactérias disponível no software MALDI Biotyper (versão 3.1, Bruker Daltonics GMBH). Para identificação microbiana, diferentes critérios como presença ou ausência de picos, intensidades de picos, lista de valores de picos de relação m/z foram utilizados, caracterizados como “*fingerprint*”. O “*fingerprint*” foi então analisado por comparação possibilitando o agrupamento das espécies microbianas.

6.4 - Caracterização morfológica dos isolados

Todas as bactérias avaliadas morfológicamente foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e previamente reativadas. Em seguida, foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar nutriente. Após 48 h de crescimento, as mesmas foram repicadas para tubos de ensaio contendo caldo nutriente, e deixadas crescer por 12 h. Em seguida, suspensões bacterianas foram colocadas em contato com o meio de cultura em placas de Petri contendo ágar nutriente para as posteriores análises de caracterização morfológica.

6.4.1 - Metodologia

Para a caracterização da morfologia das bactérias isoladas foram realizados esfregaços e posteriormente observados em microscópio óptico. Primeiramente, foi colocado no centro de uma lâmina de vidro uma gota de água esterilizada. Em seguida, utilizou-se uma alça de platina previamente flambada em chama para retirada de uma pequena porção do crescimento microbiano, a qual foi homogeneizada com a gota. A lâmina foi colocada sobre a chama fazendo movimentos circulares até secar completamente a porção microbiana. Após fixação na lâmina foi realizada a coloração utilizando-se o corante fucsina. Após a coloração, as células microbianas foram visualizadas ao microscópio óptico, utilizando-se de um aumento de 1000x, pelo uso de uma lente objetiva de 100x, com auxílio de óleo de imersão.

6.4.2 - Coloração de Gram para bactérias

Neste processo, o esfregaço bacteriano foi tratado com reagentes na seguinte ordem: adição de corante violeta genciana, a solução de iodo (cuja função é fixar o corante no interior da célula), o álcool (agente descolorante que remove o corante identificando bactérias gram-negativas) e o corante vermelho safranina. As bactérias gram-positivas retêm o corante violeta genciana e aparecem coradas em violeta-escuro. Bactérias gram-negativas perdem o cristal violeta quando tratadas com álcool e são coradas com o corante safranina e apresentando uma coloração vermelha. Em seguida, o corante é desprezado lavando a lâmina em água corrente. Após o procedimento, as células microbianas foram visualizadas ao microscópio óptico, utilizando-se de um aumento de 1000x, pelo uso de uma lente objetiva de 100x, com auxílio de óleo de imersão.

6.5 - Resultados da análise via MALDI-TOF/MS dos micro-organismos isolados das lagartas de *S. frugiperda*

As análises por MALDI-TOF/MS possibilitou a identificação segura dos micro-organismos isolados em nível de gênero. Foi possível identificar somente um gênero para todos os isolados, *Enterococcus*. Além disso, através da similaridade

dos espectros de massas foi possível determinar a relação filogenética entre os micro-organismos (FIGURAS 6.2, 6.3, 6.4 e 6.5). Entre os isolados foi possível identificar para todos os tratamentos a espécie *Enterococcus mundtii*, com exceção do tratamento AC6 em que a identificação foi não confiável (TABELA 6.1). Porém, houve uma diferença significativa na abundância da microbiota entre os tratamentos. Para o tratamento com cedrelona houve uma maior quantidade de micro-organismos com um crescimento acelerado quando comparados aos controles em todas as diluições, como pode ser observado na FIGURA 6.1. Esta técnica de caracterização microbiana por MALDI-TOF/MS aplicada a sistemáticas microbiológicas é um campo de investigação emergente com aplicações promissoras em estudos da diversidade microbiológica de identificação e agrupamento. *Enterococcus spp.* são amplamente distribuídos na natureza e relatados em mais de 37 taxa de insetos, estando associados a diferentes habitats, como a água, o solo, as plantas e o trato gastrointestinal de vertebrados e invertebrados (PALMER et al., 2010; MARTIN e MUNDT, 1972).

ALMEIDA (2013), relatou o estudo da microbiota associada ao trato digestivo de linhagens de *S. frugiperda* resistentes aos principais inseticidas utilizados no seu controle com o objetivo de selecionar micro-organismos com potencial de metabolização de xenobióticos. O autor verificou no trato digestivo de *S. frugiperda* tratada por diferentes inseticidas, e espécie *E. mundtii* estava associada à 100% dos indivíduos de diferentes regiões do país. Relatos da literatura (BRINKMANN et al., 2008) indicam que *Enterococcus* são os micro-organismos mais ativos metabolicamente no intestino de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae).

A metabolização da cedrelona, a qual parece estar ocorrendo no intestino das larvas alimentadas com dieta contendo este limonoide, pode estar associada ao potencial destes micro-organismos em metabolizá-la, hipótese reforçada pela literatura. A alteração na composição da microbiota quando o inseto é exposto a produtos tóxicos indica a possibilidade do uso destes para metabolizar tais compostos. Este estudo é preliminar e se faz necessário muitas investigações científicas para o aprofundamento destas hipóteses. No entanto, o crescimento acelerado deste micro-organismo na presença da cedrelona indica o potencial desse simbionte como metabolizador de outros inseticidas.

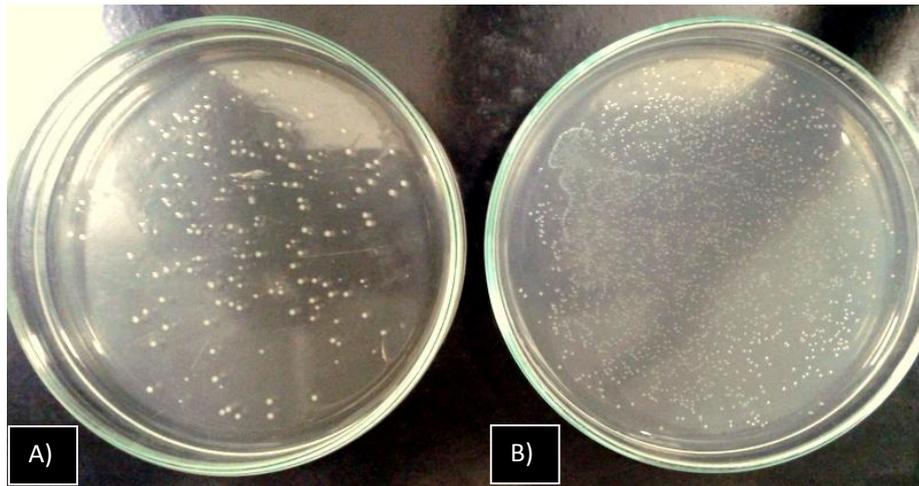


FIGURA 6.1 - *Enterococcus mundtii* isolados do trato digestivo de lagartas de quinto instar de *S. frugiperda*. Isolados de lagartas controle sem a presença do limonoide cedrelona; B) isolados de lagartas alimentadas com cedrelona enriquecida na dieta. Meio de cultivo: ágar nutriente.

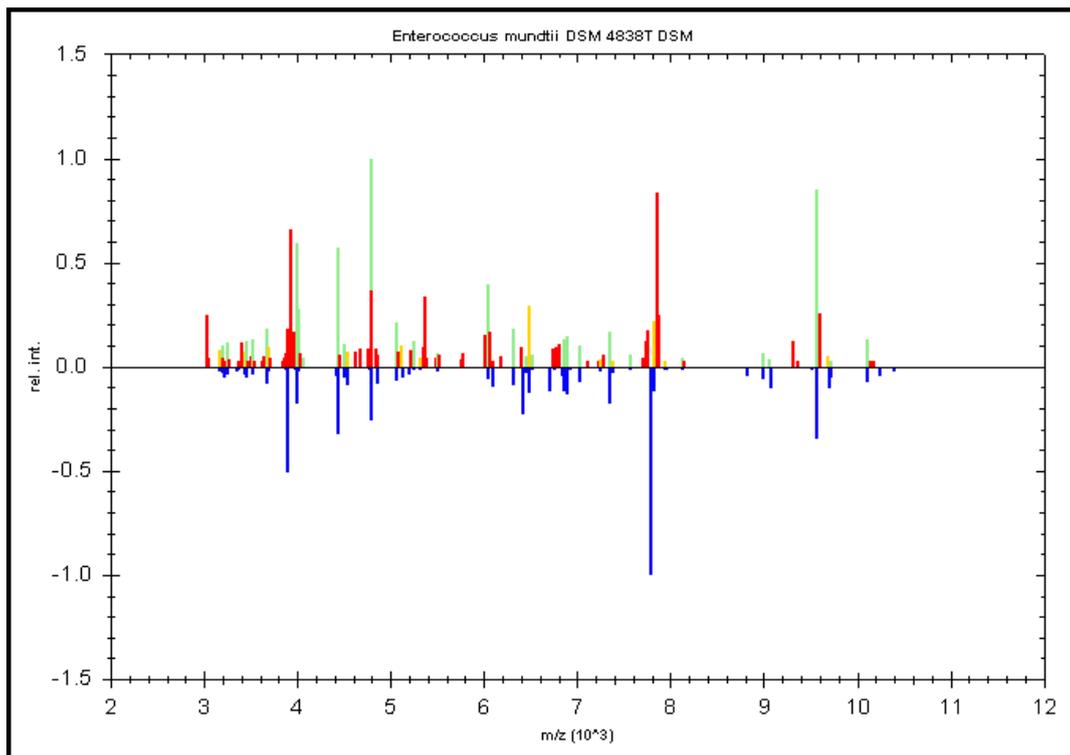


FIGURA 6.2. Espectro de massas MALDI-TOF/MS do isolado AC2 de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com cedrelona. Legenda [azul: *Enterococcus mundtii* – MALDI Biotyper / bactéria AC2 (verde: identificação segura de gênero; amarelo: provável identificação de gênero; vermelho: identificação não confiável)].

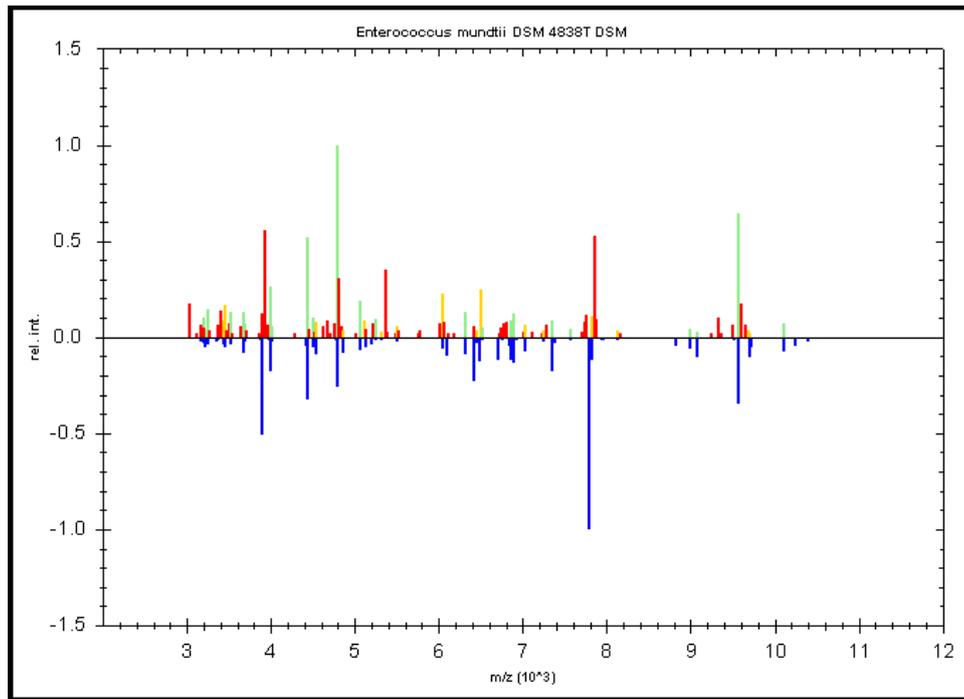


FIGURA 6.3. Espectro de massas MALDI-TOF/MS do isolado AC4 de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com cedrelona. Legenda [azul: *Enterococcus mundtii* – MALDI Biotyper / bactéria AC4 (verde: identificação segura de gênero; amarelo: provável identificação de gênero; vermelho: identificação não confiável)].

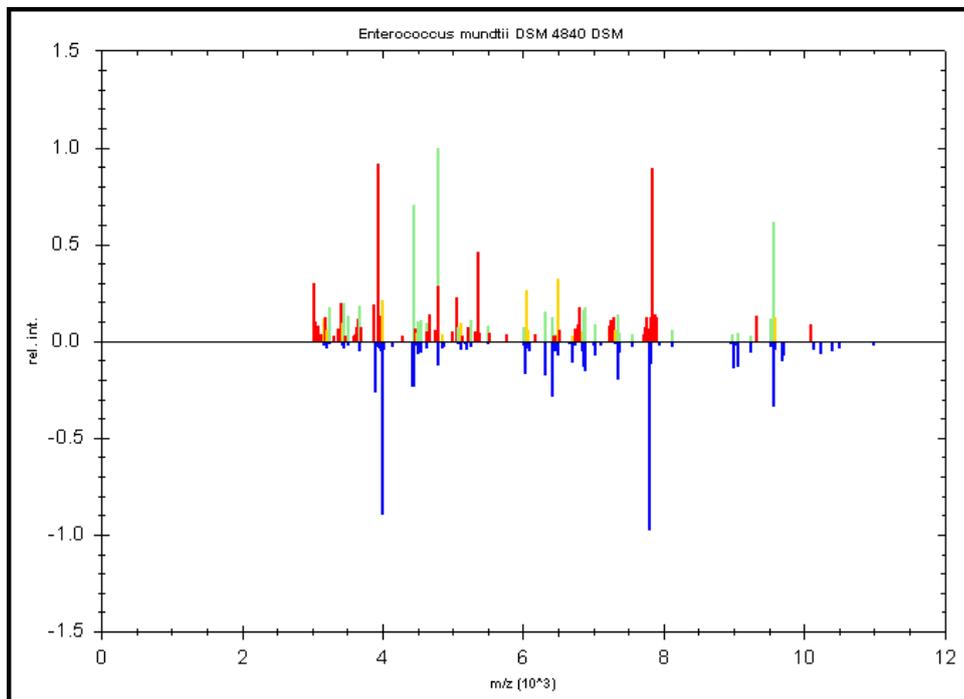


FIGURA 6.4. Espectro de massas MALDI-TOF/MS do isolado AS2 de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta controle. Legenda [azul: *Enterococcus mundtii* – MALDI Biotyper/ bactéria AS2 (verde: identificação segura de gênero; amarelo: provável identificação de gênero; vermelho: identificação não confiável)].

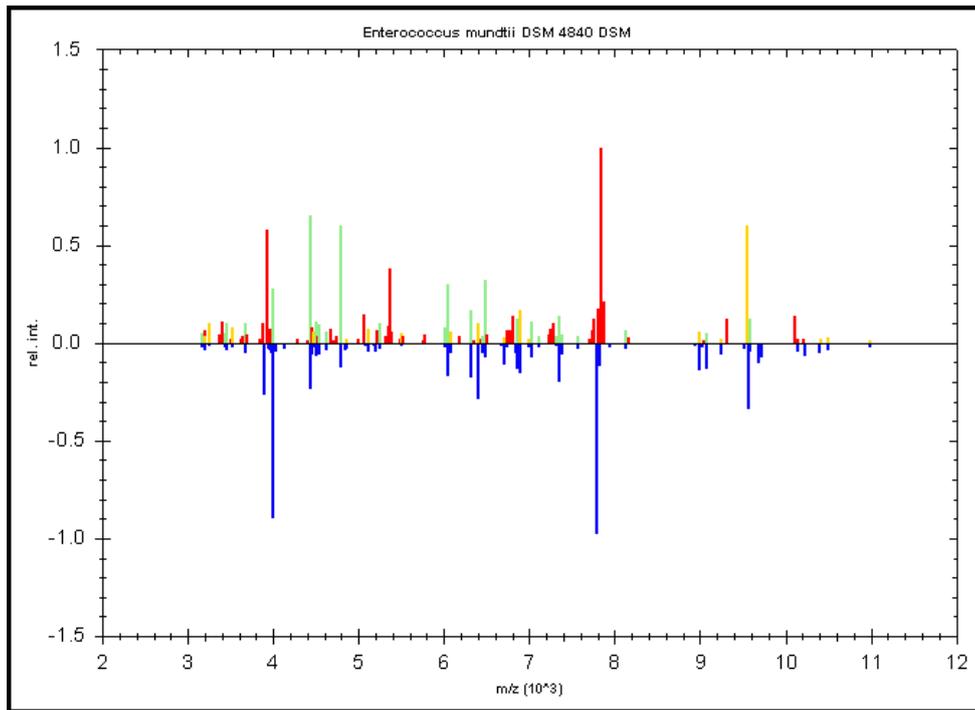


FIGURA 6.5. Espectro de massas MALDI-TOF/MS do isolado AS4 de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta controle. Legenda [azul: *Enterococcus mundtii* – MALDI Biotyper / bactéria AS4 (verde: identificação segura de gênero; amarelo: provável identificação de gênero; vermelho: identificação não confiável)].

TABELA 6.1 - Identificação a nível de gênero pela taxonomia aplicada dos isolados com a base de dados (MALDI Biotyper, versão 3.1) do equipamento.

Tratamento	Isolados	Gênero
Isolados de lagartas alimentadas (com cedrelona -C)	AC2	<i>Enterococcus</i>
	AC2	<i>Enterococcus</i>
	AC4	<i>Enterococcus</i>
	AC4	<i>Enterococcus</i>
	AC6	Não identificada
	AC6	Não identificada
Isolados de lagartas controle (sem a presença de cedrelona - S)	AS2	<i>Enterococcus</i>
	AS2	<i>Enterococcus</i>
	AS4	<i>Enterococcus</i>
	AS4	<i>Enterococcus</i>
	AS6 (não houve crescimento)	---

6.6 – Resultados da caracterização morfológica dos isolados

Dentre inúmeros métodos que existem para se distinguir as bactérias que nos rodeiam, uma técnica importante e eficaz para uma caracterização morfológica e estrutural rápida é a coloração de esfregaços pelo Método de Gram. A técnica foi desenvolvida por Hans Christian Gram em 1884, e consiste na coloração diferencial de bactérias que permite sua classificação em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (CHAN et al., 2001).

As bactérias isoladas a partir das lagartas de *S. frugiperda* controle e alimentadas com cedrelona foram caracterizadas morfológicamente por simples visualização no microscópio óptico. Essa técnica de coloração de esfregaços microbianos aliados à coloração de Gram permitem identificar o formato de algumas células e determinar sua classificação. Para os isolados, foram verificados o formato em cocos da célula bacteriana e teve sua classificação de Gram positivas pela permanência de coloração azul pelo método utilizado, permitindo a identificação de *Enterococcus mundtii*. Também foram verificadas em todas as colônias características iridescentes, sendo um traço definidor destas colônias. As imagens das colônias (iridescência; morfologia e coloração de Gram) podem ser observadas na FIGURA 6.6.

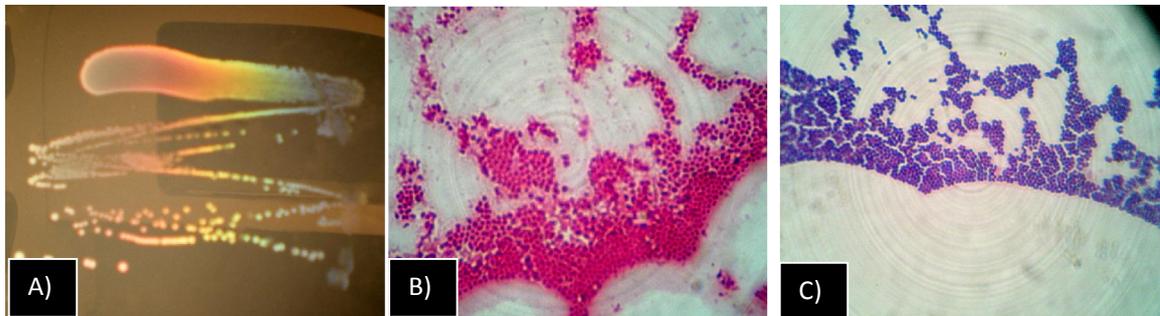


FIGURA 6.6 - Identificação microbiana para as bactérias isoladas de *S. frugiperda* (*Enterococcus mundtii*). A) Característica iridescente das colônias; B) Estrutura morfológica em formato de cocos (corante fucsina de fundo); C) Coloração de Gram.

7. MEDIDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE

Os experimentos de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foram realizados no Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica (LAFIB) do Departamento de Química da UFSCar sob colaboração da Profa. Dra. Rose Maria Carlos em parceria com o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Controle Biorracional de Insetos e Pragas do grupo de Produtos Naturais da UFSCar.

Um dos mecanismos de ação dos principais grupos de inseticidas está relacionado à inibição da atividade da enzima AChE, inativando-a e impedindo que ocorra a quebra do neurotransmissor acetilcolina. Com isso, os receptores pós-sinápticos ficam sobrecarregados e não recebem novos estímulos. Isso faz com que não cheguem estímulos aos músculos, o que paralisará a respiração muscular, causando a morte do inseto. Diante disto, foram realizados os ensaios da atividade enzimática para verificar quais substâncias testadas no inseto alvo (*Spodoptera frugiperda*) são inibidoras da enzima AChE, e assim possíveis candidatos à inseticidas que interagem com alvos específicos no sistema nervoso (neurotóxicos).

Os experimentos de inibição da enzima AChE foram realizados utilizando o método de Ellman (ELLMAN et al., 1961), com algumas adaptações:

- 1) Acetiltiocolina + H₂O $\xrightarrow{\text{AChE}}$ acetato + tiocolina (I)
- 2) Tiocolina + ditiobisnitrobenzoato (II) \rightarrow tiocolina-tionitrobenzoato + dissulfeto + tionitrobenzoato (III)

A atividade enzimática é avaliada por métodos colorimétricos utilizando o reagente de Ellman (ou DTNB), o qual se baseia na medida da velocidade de produção da tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina. Assim, a tiocolina (I) reage com o ácido 5, 5' ditiobis-[2- nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) (II) formando dissulfetos e um ânion estável (III) de coloração amarela, o qual absorve em 412 nm. Na FIGURA 7.1, pode-se observar o mecanismo reacional envolvido na detecção da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.

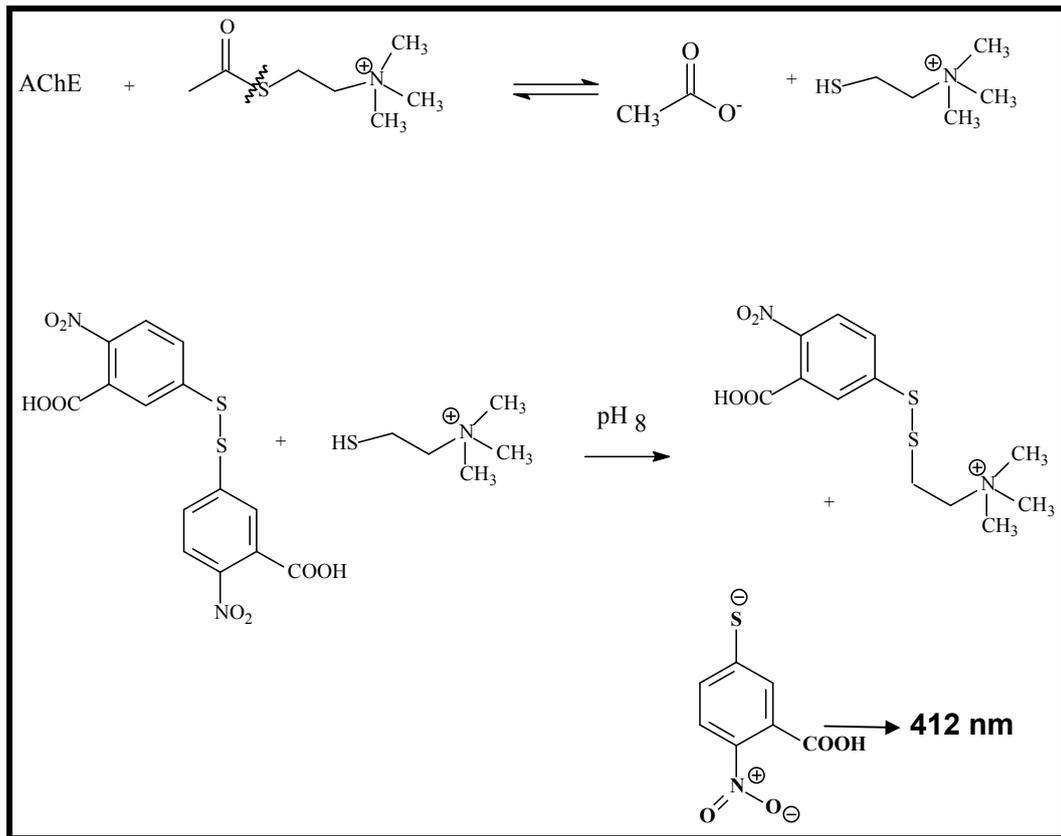


FIGURA 7.1 - Mecanismo reacional envolvido na detecção da atividade anticolinesterásica pelo método de Ellman.

7.1 - Metodologia

7.1.1 - Reagentes

- Ácido 5, 5' Ditiobis-[2- nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman);
- Iodeto de acetiltiocolina (ACTI);
- Acetylcolina esterase;
- Tris - HCl;
- NaCl;
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$;
- NaOH;
- Metanol (grau analítico HPLC);
- água Milli-Q;
- BSA;

Soluções:

- (1) 50 mM Tris/HCl pH 8 ;
- (2) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0.1% de soroalbumina bovina (BSA);
- (3) 50 mM Tris/HCl pH 8, contendo 0.1 M de NaCl e 0.02 M de MgCl₂.6H₂O (solução eletrolítica);
- (4) 3 mM de Ácido 5, 5' Ditiobis-[2-nitrobenzóico] (DTNB ou reagente de Ellman) ou solução 333 µM de DTNB;
- (5) 15 mM de Iodeto de acetilticolina (ACTI) ou solução 100 µM de ACTI;
- (6) Solução de 5 U/mL de AChE.

7.1.2 - Ensaio de inibição enzimática

Primeiramente foram preparadas as soluções tampões: solução (1): foi preparada adicionando-se 6,057 g de Tris-HCl para 1 litro de água Milli-Q, com posterior adição de solução de NaOH até que o pH da solução decrescesse até 8,0; solução tampão (2): foi adicionado 0,1 mg de BSA em 100 mL da solução tampão (1); solução eletrolítica (3): foi adicionado 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂.6H₂O em um volume de 100 mL da solução (1). Para o preparo da solução 333 µM de DTNB (4), pesou-se 0,01365 g em um volume de 100 mL da solução eletrolítica (3).

Em seguida, preparou-se a solução do substrato (iodeto de acetilcolina) na concentração de 100 µM em água Milli-Q e a enzima AChE (5 U/mL) liofilizada foi mantida sob gelo por 20 minutos e depois sob agitação por mais um período de 10-15 minutos, para obtenção de uma solução homogênea. É importante ressaltar que a enzima foi diluída em solução BSA (2) para 5 U/mL.

Todas as substâncias foram solubilizadas em metanol e foram preparadas soluções na concentração de 100 µM. Para as medidas espectrofotométricas foram adicionados em uma cubeta de 1 cm de caminho óptico 2875 µL de solução 333 µM do DTNB, 100 µL da solução contendo a substância (100 µM) e 15 µL da enzima (5 U/L). Após a adição da enzima foram cronometrados 14 min e 30 segundos, onde neste intervalo foi realizada a leitura do branco em espectrofotômetro no comprimento de onda de 412 nm, afim de subtrair a absorbância da substância e do solvente utilizado. Após 14 minutos e 30 segundos foi adicionado 10 µL de 100 µM do iodeto de acetilcolina com homogeneização da

cubeta para reagir com o DTNB e após 30 segundos da adição foi realizada a leitura no espectrofômetro UV-Vis, utilizando o modo de avaliação cinético. A absorbância da mistura foi medida a 412 nm e a cinética da reação é medida durante 30 minutos.

O mesmo procedimento foi realizado para o branco (metanol) afim de se obter dados comparativos, considerando 100 % da atividade da enzima. A porcentagem de inibição foi realizada comparando a velocidade das amostras com a velocidade do branco. Os resultados foram lançados em gráficos de barras indicando a porcentagem da atividade enzimática.

7.2 - Resultados e Discussões

Algumas das substâncias isoladas foram ensaiadas frente à enzima acetilcolinesterase para *screening* de possíveis candidatos a inseticidas que interagem com alvos específicos no sistema nervoso central dos insetos. Foram avaliadas as substâncias, cedrelona (1), os triterpenos damaradienol (2) e 24-metilenocicloartanol (3), os flavonoides catequina (4), epicatequina (7) e galocatequina (9), as cumarinas siderina (5) e escopoletina (10), o limonoide 23-hidrooxicedrelonelídeo (6), um nucleosídeo 5'-inosil (8), o alcalóide 3-indol carbaldeído (11) e o ácido protocatecuico (12). Estas substâncias podem ser visualizadas na FIGURA 7.2.

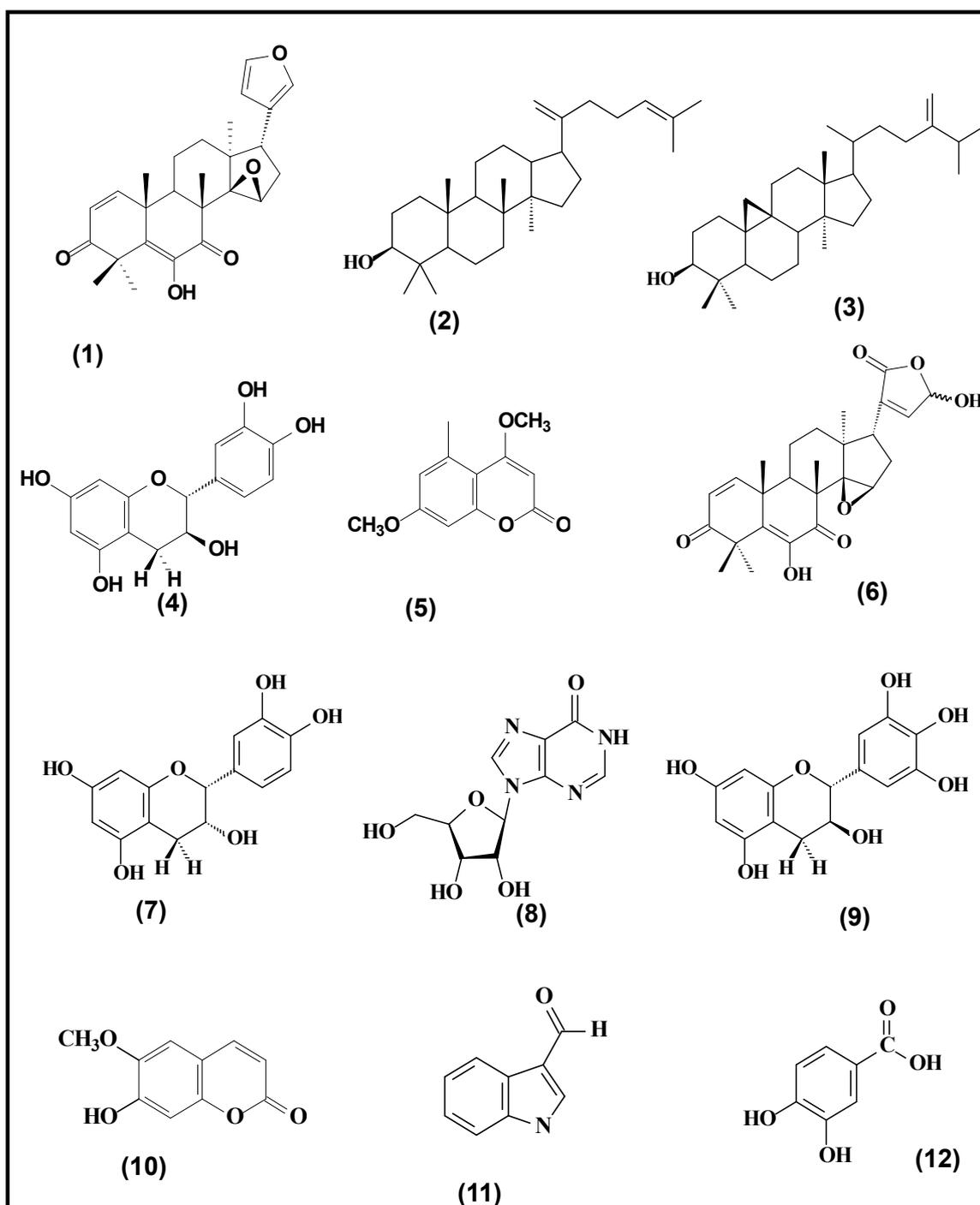


FIGURA 7.2 - Substâncias isoladas e submetidas ao ensaio de inibição à AChE.

Os resultados da inibição enzimática frente à AChE foram relevantes, uma vez que três das substâncias testadas apresentaram uma inibição acima de 50 % quando comparadas ao branco, de 84 %, 70% e 57% para as substâncias cedrelona (1), damaradienol (2) e 24-metilenocicloartanol (3), respectivamente (FIGURA 7.3). As demais substâncias não apresentaram resultados significativos,

uma vez que não inibiram a atividade da enzima. O melhor resultado foi apresentado pela cedrelona, um limonoide do tipo apo-eufol. Os limonoides têm mostrado atividades inseticidas em plantas que normalmente não são atacadas por insetos (VIEGAS Jr, 2003).

O bom resultado apresentado para a cedrelona é bastante promissor, uma vez que este apresentou atividade significativa sobre as larvas de *S. frugiperda*, e assim, poderíamos associar a ação inseticida decorrente da inibição da AChE. GIONGO (2014), observou em seus estudos enzimáticos com extratos enzimáticos de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com cedrelona que houve alterações na quantidade/atividade de AChE após a ingestão deste limonoide em dieta artificial. Porém, o autor realizou o ensaio com extratos enzimáticos do próprio inseto e não da enzima isoladamente. Estudos direcionados são fundamentais.

A enzima AChE, quando ligada à molécula inseticida resulta em acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua e descontrolada de impulsos nervosos. Os sintomas de intoxicação por inseticidas incluem tremores, convulsões e, eventualmente, colapso do sistema nervoso central e morte. Também ocorre a dessensibilização do receptor de acetilcolina que cessa o impulso nervoso levando o inseto à morte (ELDEFRAWI, 1976; ELDEFRAWI et al., 1982).

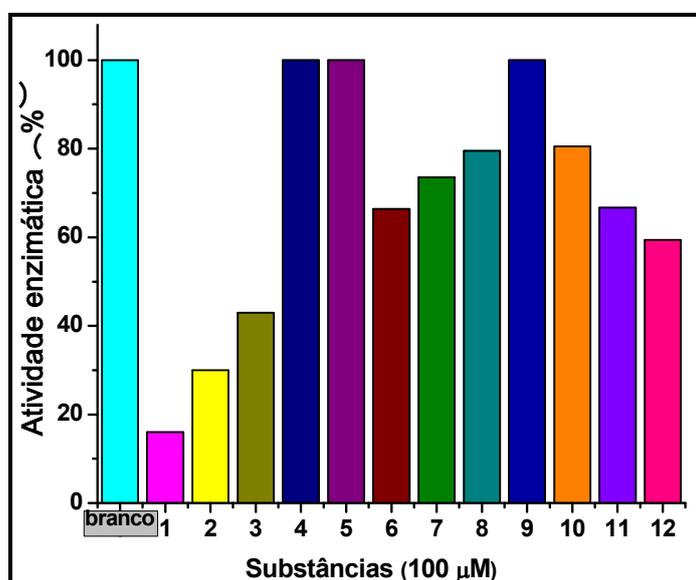


FIGURA 7.3: Efeito das substâncias isoladas de *T. pallida*, *T. pallens* e *To. ciliata* na inibição frente à enzima acetilcolinesterase a 100 µM. (branco - 100% da atividade enzimática).

8 - CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das espécies *T. pallida*, *T. pallens* e *To. ciliata* na busca de princípios ativos à *S. frugiperda*, proporcionou o isolamento e identificação de 19 metabólitos secundários, entre estes esteróides, triterpenos, limonoides, cumarinas, flavonoides, um ácido fenólico, um nucleosídeo e uma purina. O estudo da espécie *T. pallens* é de grande relevância, pois trata-se de um estudo inédito na literatura, sendo uma contribuição considerável para o conhecimento químico da família Meliaceae.

A partir dos ensaios inseticidas por ingestão sobre as larvas de *S. frugiperda* realizados com os extratos brutos, frações e substâncias puras de *T. pallida*, *T. pallens* e *To. ciliata*, verificou-se que aquelas provenientes dos ramos e folhas das duas espécies de *Trichilia* foram as que apresentaram maiores efeitos no desenvolvimento do inseto. A fração dos ramos de *T. pallens* levou a 100% de mortalidade larval. As lagartas alimentadas com cedrelona se desenvolveram apenas até os primeiros ínstares larvais mostrando um forte efeito no crescimento, o qual pode ter ocorrido devido ao efeito.

O estudo das lagartas de 1º instar na presença de cedrelona via RMN de ¹H (600 MHz) permitiu detectar a cedrelona intacta principalmente nas fezes do inseto. Também foram detectados alguns metabólitos primários como alguns aminoácidos. Contudo, devido à pequena quantidade de material não foi possível identificar derivados de cedrelona modificada pelo inseto.

As análises pelo LTQ-Orbitrap Velos permitiram uma alta sensibilidade, resolução e exatidão no estudo dos extratos de hemolinfa, intestino médio, cabeça e fezes coletadas das lagartas de quinto instar alimentadas com cedrelona.

As análises dos extratos das fezes excretadas proveniente das larvas de *S. frugiperda* alimentadas por 5 e 24 horas com dieta enriquecida em cedrelona, demonstraram que a metabolização da cedrelona leva um maior tempo para ser ativada, pois em 5 horas o limonoide foi excretado intacto praticamente todo nas fezes. Isto sugere que o mecanismo pelo qual o inseto acumula esta substância está saturado, ou, as larvas utilizam o mecanismo de redução da absorção a partir de matrizes extracelulares presentes do inseto. Já em 24 horas, o inseto deve ter metabolizado grande parte da cedrelona, pois somente uma pequena quantidade desta intacta foi detectada nas fezes, ou seja, valores abaixo de 500 ng foram verificados nos experimentos de quantificação.

Na análise dos extratos de hemolinfa, praticamente, não foi detectada cedrelona, aparecendo apenas como traços. Provavelmente a larva para evitar a intoxicação e altos custos fisiológicos, elimina a cedrelona via o intestino médio, onde esta foi detectada. Nos extratos de cabeças analisados, foi verificada a presença de cedrelona intacta, sugerindo um provável modo de ação sob o sistema nervoso central. Isso foi confirmado nos ensaios com a enzima AChE em solução, onde a cedrelona apresentou inibição enzimática.

Na análise da atividade metabólica do inseto, observou-se que o valor da taxa metabólica relativa aumentou em dez vezes em relação ao controle, o qual pode estar relacionado à tentativa de detoxificação do composto pelo inseto. Para o custo metabólico foi verificado um aumento quando as lagartas ingeriram cedrelona. O alto custo de energia para eliminar a cedrelona e evitar a intoxicação é sugerido pela quantidade deste limonoide encontrado no intestino e fezes.

As análises por MALDI-TOF/MS possibilitou a identificação segura dos micro-organismos isolados em nível de gênero *Enterococcus* para os tratamentos com cedrelona e controle. Entre os isolados foi possível identificar para todos os tratamentos a espécie *Enterococcus mundtii*, com exceção do tratamento AC6 em que a identificação foi não confiável. O crescimento acelerado verificado para o tratamento com cedrelona pode estar associado ao potencial destes micro-organismos em metabolizar a cedrelona, uma vez que esta parece ser metabolizada nos intestinos analisados. Além disto, através da caracterização morfológica, foram verificados a morfologia em cocos para as células bacterianas de *E. mundtii* e a classificação como Gram positivas.

Para algumas destas substâncias isoladas avaliou-se a atividade frente à enzima AChE na forma de *screening* para possíveis candidatos a inseticidas naturais, sendo o melhor resultado alcançado para a cedrelona.

Estas conclusões ainda não permitem afirmar com certeza quais metabólitos seriam provenientes do metabolismo do inseto e se alguns foram nocivos para *S. frugiperda*. Outras questões seriam que metabólitos foram capazes de auxiliar na inibição do crescimento das larvas de *S. frugiperda* e, possivelmente, os modelos eficientes para o controle do inseto. Os insetos não se defendem apenas dos metabólitos fornecidos, mas também tem que lidar com os produtos de metabolização desses compostos, os quais podem ser mais ativos do que as moléculas precursoras. Enfim, os resultados alcançados abriram portas para novos estudos, como a elucidação destes produtos de metabolização e quais enzimas que estariam envolvidas neste processo.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESIDA, G. A. & OKORIE, D. A. "Heudebolin: a new limonoid from *Trichilia heudelottii*". *Phytochemistry*, **12**: 3007, 1973.

AGOSTINHO, S. M. M. Estudo fitoquímico de *Toona ciliata* (Meliaceae) e avaliação da atividade biológica de seus metabolitos secundários. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química - UFSCar, 1996. Tese de doutorado, 261 p.

ALCADE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J. & BALLESTEROS, A. "Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes". *Trends in Biotechnology*, **24** (6): 281-287, 2006.

ALMEIDA, L. G. Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, 2013. Dissertação de mestrado. 22/99 p.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brasil. "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos". Resolução RE nº 899. 29 de maio de 2003.

ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; DONSKOV, N. & KUBO, I. "Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilalis*". *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **43**: 221-226, 1987.

ARNASON, J. T.; BERNARDS, M. A. Impact of constitutive plant natural products on herbivores and pathogens. *Canadian Journal of Zoology*, **88**: 615-627, 2010.

BARBEHENN, R. V. "Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals". *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **47**: 86-99, 2001.

BERENBAUM, M. R. "The Earwig's Tail: A Modern Bestiary of Multi-legged Legends". Cambridge: Harvard University Press. 2009.

BIANCHINI, J.; GAYDOU, E. M.; RAFARALAHITSIMBA, G.; WAEGELL, B. & ZAHRA, J. "Dammarane derivatives in the fruit lipids of *Olea madagascariensis*". *Phytochemistry*, **27**(7):2301-2304, 1988.

BORGONI, P.C. & VENDRAMIM, J.D. "Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. *Neotrop. Entomol.*, **32**: 665-669, 2003.

BOGORNÍ, P.C. & VENDRAMIM, J.D. "Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho". *Neotropical Entomology*, **34**(2):311-317, 2005.

- BOHLMANN, F.; ZDERO, C. "Über inhaltsstoffe der tribus mutisieae*". *Phytochemistry*, **16**: 239-242, 1977.
- BOWMAN, D.D. "Parasitologia Veterinária de Georgis". 8.ed. Barueri: Manole, 2006. 422p.
- BRACA, A.; POLITI, M.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C. "Chemical Composition and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Wild and Cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) Leaves". *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 6689-6695.
- BRAGA, I.A. & VALLE, D. "Aedes aegypti: inseticidas, mecanismos de ação e resistência". *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16(4):279-293, 2007.
- BREITMAIER, E. & VOELTER, W. "Einflüsse von substituenten in 6-stellung auf die ¹³C-chemischen verschiebungen der Kohlenstoffatome des purins". *Tetrahedron*, **30**: 3941-3943, 1974.
- BRINKMANN, N.; MARTENS, R. & TEBBE, C. "Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta)". *Environmental Microbiology*, 74(23): 7189-7196, 2008.
- BROGDON, W. G & MCALLISTER J. C. "Insecticide resistance and vector control". *Emerging Infectious Diseases*, 4(4):605-613, 1998.
- CARVALHO, R. P. L. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (Smith J. E.) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, 1970. Tese de Doutorado, 170 p.
- CHAGAS, A. C. S.; Oliveira, M.C.S.; GIGLIOTI, R.; CALURA, F.H.; FERREZINI, J.; FORIM, M. R. & BARROS, A.T.M. "Efficacy evaluation of a commercial neem cake for control of *Haematobia irritans* on *Nelore cattle*". *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **19**:1-5, 2010.
- CHAHINE, S. & O'DONNELL, M. J. "Interactions between detoxification mechanisms and excretion in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*". *The Journal of Experimental Biology*, **214**: 462-468, 2011.
- CHAMPAGNE, D. E.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. & TOWERS, G. H. N. "Insecticidal activity of phytochemical and extracts of the Meliaceae". In: ARNASON, PHILOGÉNE, B. I. R., MORAND, P. (Ed.) *Insecticides of plant origin*. Washington: American Chemical Society, 1989. chap. 8, p. 95
- CHAN W. R.; GIBBS, J. A. & TAYLOR, D. R. "Triterpenoids from *Trichilia havanensis* Jacq. Part I. The acetates of havanensin and trichilenone, new tetracarboxylic tetranortriterpenes". *J. Chem. Soc. Perkin*, **1**: 1047, 1973.
- CHAN, S.; HORNER, S. R.; FAUCHET, P. M.; MILLER, B. L. "Identification of Gram Negative Bacteria Using Nanoscale Silicon Microcavities". *J. Am. Chem. Soc.* 123 : 11797, 2001.

- CHAPMAN, R. F. (Ed). The insects - Structure and function. Cambridge University Press, 1998, 770p;
- CLARK. A.G.; SHAMAAN, N.A; DAUTERMAN, W. C & HAYAOKA, T. "Characterization of multiple glutathione transferases from the house fly, *Musca domestica* (L.)". *Pesticide Biochemistry and Physiology* **22**:51-59, 1984.
- CORRÊA, J.C.R. & SALGADO, H.R.N. "Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão", Rev. Bras. Pl. Med., 13 (4): 500-506, 2011.
- COSTA, E.L.N.; SILVA, R. F. P. & FIUZA, L. M." Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas". Acta Biologica Leopoldensia, 26 (2): 173-85, 2004.
- CROCOMO, W. B. Consumo e utilização de milho, trigo e sorgo *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepdoptera Noctuidae). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, 1983. Tese de Doutorado, 83 p.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 21).
- CRUZ, J. & TURPIN, F. T. "Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento de cultura do milho". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **17** (3), 355-9, 1982.
- DAVIS, A. L.; CAI, Y.; DAVIES, A. P. & LEWIS, J. R. "¹H and ¹³C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols". *Magnetic Resonance in Chemistry*, **34**: 887-890, 1996.
- DE PAULA, A. J. A.; KRUGEL, M.; MIRANDA, J. P.; ROSSI, L. F. S. & COSTA NETO, P. R. "Utilização de argilas para purificação de biodiesel". Quim. Nova, 34(1): 91-95, 2011.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. 2ª ed. England: John Wiley & Sons, LTD, 2001.
- DEVAPPA, R. K; ANGULO-ESCALANTE, M. A; MAKKARA, H. P. S. & BECKERA, K. "Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*". *Industrial Crops and Products*, **38**: 50-53, 2012.
- DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N. & JOHRI, A. K. "Biotechnology and bioremediation: successes and limitations". Applied microbiology and biotechnology. 59 (2):143-152, 2002.
- DUARTE, N. & FERREIRA, M. J. U. "Lagaspholones A and B: Two New Jatrophenolane-Type Diterpenes from *Euphorbia lagascae*". *Org. Lett.*, 9 (3), 2007.
- DUKE, S. O; DAYAN, F.E & RIMANDO, A.M. "Natural products and herbicide discovery". In: COBB, A.H.; KIRKWOOD, R.C. (Ed.). Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield: *Sheffield Academic Press*,105-133, 2000.

- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. V. & FEATHERSTONE, R. M. *Biochem. Pharmacol.*, **7**: 88-95, 1961.
- ELDEFRAWI, A. T. "The acetylcholine receptor and its interaction with insecticide". *Insect Biochem Physiol*, 297-326, 1976.
- ELDEFRAWI, A.T.; MANSOUR, N. & ELDEFRAWI, M.E. Insecticides affecting acetylcholine receptor interactions. *Pharmac. Theor.* **16**, 45-65, 1982.
- ETO, M. "Biochemical Mechanisms of Insecticidal Activities". *In. Chemistry of Plant Protection*, **6**: 65-107, 1990.
- FERRARI, F. J. "Biochemical and genetic in insecticide resistance". *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*, **12**:731-773, 1985.
- FERRARI, J. A. "Insecticide resistance In: The Biology of Disease Vectors". Colorado: University Press of Colorado; 1996.
- FFRENCH-CONSTANT, R. H, PITTENDRIGH, B.; VAUGHAN, A. & ANTHONY, N. "Why there so few resistance-associated mutation target genes?", *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **353**:1685-1693, 1998.
- FORIM, M. R.; SILVA, M. F. G. F.; CASS, Q. B.; FERNANDES, J. B. & VIEIRA, P. C. "Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing". *Analytical Methods*, **2**: 860-869, 2010.
- FRANKFATER, C.; SCHÜHLY, W.; FRONCZEK F. R. & SLATTERY, M. "Processing of a sesquiterpene lactone by *Papilio glaucus* caterpillars", *Journal of Chemical Ecology*, **31**: 2541-2552, 2005.
- FUKUTO, T. R. & N. M. MALLIPUDI. "Suppression of metabolic resistance through chemical structure modification" In: G. P. Georghiou & T. Saito. "Pest resistance to pesticides: challenges and prospects". *Plenum Press*, 557-578, 1983.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; DE BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R.A. & ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. *Manual de Entomologia Agrícola*. São Paulo. Editora Agronômica "Ceres". 2ª edição, p. 648, 1988.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.P; DE BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J.R.S. & OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.
- GATEHOUSE, J. A. "Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction". *New Physiology*, **56**:145-169, 2002.
- GIONGO, A. M. M. Busca por compostos de *Trichilia pallida* Swartz, *Trichilia pallens* C. DC. e *Toona ciliata* M. Roemer com bioatividade sobre *Spodoptera*

frugiperda (J. E. Smith, 1797). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, 2014. Tese de Doutorado.

GODFREY, C. R. A.; Agrochemical from Natural Products, Marcel Dekker Inc., New York, 1994.

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C. & DICKERSON, W.A. "Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium". *Journal of economic Entomology*, 69(4): 487-488, 1976.

HERNÁNDEZ, C. R. Efeito de extratos de Meliaceae no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, 1995. Tese de doutorado, 100 p.

HEMINGWAY, J. & RANSON, H. "Insecticide resistance in insect vectors of human disease". *Annual Review Entomology*, 45:371-391, 2000.

HOWE, G. A. & JANDER, G. "Plant immunity to insect herbivores". *Ann. Rev. Plant Biol.*, 59, 41–66, 2008.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y. & HOWES, M. J. "Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi". *Natural Products Reports*, 23:181-199, 2006.

<http://www.pragasarroz.xpg.com.br>, (Acesso em maio de 2014)

<http://www.agricultura.gov.br/>, (Acesso em setembro de 2014).

<http://www.castrolanda.coop.br>, (Acesso em maio de 2014).

<http://picasaweb.google.com/investigaciongolfito/Meliaceae>, (Acesso em maio de 2012).

<http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/img=6137>, (Acesso em maio de 2012).

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Toona_ciliata_var._pubescens_.jpg, (Acesso em maio de 2012).

http://www.saveourwaterwaysnow.com.au/01_cms/details_pop.asp?ID=333, (Acesso em maio de 2012).

<http://www.opresenterural.com.br>, (Acesso em maio de 2012).

<http://marcosfilgueira.wikidot.com/sistema-nervoso-dos-insetos>, (Acesso em junho de 2013).

HUMAN METABOLOME DATABASE, Version 3.0.

INADA, A.; KONISHI, M.; MURATA, H. & NAKANISHI, T. "Structures of a new limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*". *J. Nat. Prod.*, 57: 1446, 1994.

ISMAN, M. B.; MATSUURA, H.; MACKINNON, S.; DURST, T.; TOWERS, G. H. N. & ARNASON, J. T. "Phytochemistry of the Meliaceae: So many terpenoids, so few insecticides". *Recent Advances in Phytochemistry*, **30**: 155-178, 1996.

ISMAN, M. B. "Insect antifeedants. Pesticide Outlook", **13**:152-157, 2002.

ISMAN, M. B. & GRIENEISEN, M. L.. " Botanical insecticide research: many publications, limited useful data", *Trends in Plant Science*, 19(3):140-145, 2014.

KAKUMANI, P. K.; MALHOTRA, P.; MUKHERJEE, S. K. & BHATNAGAR, R. K. "A draft genome assembly of the army worm, *Spodoptera frugiperda* Genomics", 104(2):134-43, 2014.

KAWAI, S.; TAKADA, Y.; TSUCHIDA, S.; KADO, R. & KIMURA, J. Sterols from bivalves *Calyptogena soyoae* and *Bathymodiolus septemdiarum* living in deep sea. *Fisheries science*, **73**: 902-906, 2007.

KASTEN, P. JR.; PRECETTI, A. A. C. M. & PARRA, J. R. P. "Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural". *Rev. Agric.* **53**: 68, 1978.

KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A. & TAGO, K.; FUKATSU, T. "Symbiont-mediated insecticide resistance". *PNAS*, **109**: 8618, 2012.

KOUL, O. "Feeding deterrence induced by plant limonoids in the larvae of *Spodoptera litura*". (F) *Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie*, **95**:166-171, 1983.

KOUL, O. & ISMAN, M. B. "Toxicity of the limonoid allelochemical cedrelone to noctuid larvae". *Entomol. Exp. Appl.*, **64**: 281-287, 1992.

KUBO, I. & KLOCKE, J.A. "Insect ecdysis inhibitors". In: GREEN, M.B.; HEDIN, P. (eds.). "Natural resistance of plants to insects". *ACS Symposium Series*, **296**: 206-219, 1986.

LEITE, A. C. Estudo Químico e Atividades Biológicas de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2005. Tese de Doutorado, 323 p.

LEITE, A. C.; MATOS, A. P.; BATISTA-PEREIRA, L. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. & DA SILVA, M. F. G. F. "Activity of triterpenoids from *Cedrela fissilis* (Meliaceae) against *Spodoptera frugiperda*". *Biopest. Int.* **4**: 28, 2008.

LI, X. "Recent studies on insecticidal activities of limonoids from meliaceous plants". *Entomologia Sinica*, **6**: 283-288, 1999.

LUO, X.; WU, S.; MA, Y. & WU, D. "Tetranorterpenoids from *Walsura yunnanensis*". *J. Nat. Prod.*, **63**:947-951, 2000.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S. P.; da SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; ARRUDA, G. M. S. P.; SANTOS, A. S. & SOUZA FILHO, A. P.

- S. "Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae)". *Quim. Nova*, 31(3): 493-497, 2008.
- LOEB, M.J.; MARTIN, P.A.W.; HAKIM, R.S.; GOTO, S. & TAKEDA, M. "Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*". *Journal of Insect Physiology*, 47:599-606, 2001.
- MAAG, D.; DALVIT, C.; THEVENET, D.; KÖHLER, A.; CHRISTOFF WOUTERS, F.; GIDDINGS VASSAO, D.; GERSHENZON, J.; WOLFENDER, J.-L.; TURLINGS, T. C.; ERB, M. & GLAUSER, G. "3-β-D-Glucopyranosyl-6-methoxy-2-benzoxazolinone (MBOA-N-Glc) is an insect detoxification product of maize 1,4-benzoxazin-3-ones". *Phytochemistry*, 102: 97-105, 2014.
- MA, X.; DI, D. & SHI, Y. "Triterpenoids and steroids from *Ixeridium gracile*". *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3), 2008.
- MARTUCCI, M. E. P. Análise da interação ecoquímica entre a lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Ribeirão Preto, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 2012. Dissertação de Mestrado.
- MAFEZOLI, J. Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae. São Carlos, Programa de Pós graduação em Química – UFSCar, 2001. Tese de doutorado.
- MARTIN, J. D. & MUNDT, J. O. "Enterococci in insects". *Applied Microbiology*, 24(4): 575-580, 1972.
- MARTINEZ, S. S. "O Nim – *Azadirachta indica*". Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Instituto Agrônômico do Paraná. Londrina: IAPAR, 142 p.2002.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; CALEGARI, E.R.; BATISTA-PEREIRA, L.G.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; FERREIRA-FILHO, P. & RODRIGUES, R. R. "Atividade biológica de extratos orgânicos de *Trichilia spp.* (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em dieta artificial". *Bioassay*, 1:1-6, 2006.
- MATOS, A. P.; NEBO, L. VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. & SILVA, M. F. G. F. das. "Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* Meliaceae". *Quím. Nova*, 32: 1553, 2009.
- MENEZES, E. L. A. "Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola". Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58p.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10 jun 2014.

- MIKOLAJCZAK, K. L. & D. K. REED. "Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach". *J. Chem. Ecol.* **13**: 99-111, 1987.
- MOURA, A. C. S.; Wagner VILEGAS, W. & SANTOS, L. C. "Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* linn. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicalar". *Quim. Nova*, 34(7):1136-1140, 2011.
- MORDUE (LUNTZ), A. J. & BLACKWELL, A. "Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology*", 39 (11): 903-924, 1993.
- MORDUE (LUNTZ), A. J. & NISBET, A. J. "Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects". *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(4): 615-632, 2000.
- MUÑOZ, E.; LAMILLA, C.; MARIN, J. C.; ALARCON, J. & CESPEDES, C. L. "Antifeedant, insect growth regulatory and insecticidal effects of *Calceolaria talcana* (Calceolariaceae) on *Drosophila melanogaster* and *Spodoptera frugiperda*". *Industrial Crops and Products* **42**: 137– 144, 2013.
- NAGASAMPAGI, B. A.; SRIRAMAN M. C.; YANKOV, L. & DEV, S. "Siderin from *Cedrela toona*". *Phytochemistry*, 14 (7): 1673, 1975.
- NAKATANI, M., J. C. JAMES, & K. NAKANISHI. "Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the Southern army worm". *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 1228-1230, 1981.
- NEWMAN, J. D.; CRAGG, M. & SNADER, K. H. "Natural products as Sources of new drugs over the Period 1981-2002". *Journal of Natural Products*, **66** (7), 1022-1037, 2003.
- NEBO, L.; MATOS, A. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. & RODRIGUES, R. R.. "Atividade inseticida dos frutos de *Trichilia clausenii* (meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda*". *Quim. Nova*, 33(9):1849-1852, 2010.
- NISHIDA, R. "Sequestration of defensive substances from plants by Lepidoptera". *Annual Reviews in Entomology*, **47**: 57-92, 2002.
- OLIVEIRA, M.S.S.; ROEL, A.R.; ARRUDA, E.J. & MARQUES, A.S. "Eficiência de produtos vegetais no controle da lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Ciência Agrotecnologia*, 31(2):326-331, 2007.
- OPPENORTH, F. J. "Biochemical and genetic in insecticide resistance". In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* **12**:731-773, 1985.
- OPTIZ, S. E. W. & MULLER, C. "Plant chemistry and insect sequestration". *Chemoecology*, **19**: 117-154, 2009.

PALMER, K. L.; CARNIOL, K.; MANSON, J. M.; HEIMAN, D.; SHEA, T.; YOUNG, S.; ZENG, Q.; GEVERS, D.; FELDGARDEN, M. & BIRREN, B. "High quality draft genome sequences of 28 *Enterococcus* sp. Isolates". *Journal of Bacteriology*, 192(9): 2469-2470, 2010.

PATRÍCIO, P. C. & CERVI, A. C. "O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná", Brasil. *Acta Biol. Par.*, **34** (1, 2, 3, 4): 27-71. 2005.

PENNIGTON, I. D. Flora neotropica. New York, *New York Botanical Garden*, 470p. (monograph 28. Meliaceae), 1981.

ROCHA, W. C. Busca de substâncias bioativas em plantas amazônicas: *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae), *Trichilia pallida* e *Trichilia rubra* (Meliaceae). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 2004. Tese de Doutorado. 221 p.

RODRÍGUEZ, H., C. & J.D. VENDRAMIM. "Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Man. Integ. Plagas* **42**: 14-22, 1995.

RODRÍGUEZ H., C. & J.D. VENDRAMIM. "Avaliação da bioatividade de extratos aquosos de Meliaceae sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)". *Rev. Agric.* **72**: 305-318, 1997.

RODRÍGUEZ H., C. & J.D. VENDRAMIM. "Uso de índices nutricionales para medir el efecto insectistatico de extractos de meliáceas sobre *Spodoptera frugiperda*". *Man. Integ. Plagas* **48**: 11-18, 1998.

RODRÍGUEZ-HAHN, L.; CÁRDENAS, J. & ARENAS, C. "Trichavensin, a pterianin derivative from *Trichilia havanensis*". *Phytochemistry*, **43**: 457, 1996.

ROEL, A. R. Efeito de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) na sobrevivência e desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, 1998. Tese de Doutorado, 115 p.

ROEL, A. R., J. D. VENDRAMIM, R. T. S. FRIGHETTO & N. FRIGHETTO. "Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)". *An. Soc. Entomol. Brasil* **29**: 799-808, 2000a.

ROEL, A. R., J. D. VENDRAMIM, R. T. S. FRIGHETTO & N. FRIGHETTO. "Efeito do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) no desenvolvimento e sobrevivência da lagarta-do-cartucho". *Bragantia*, **59**: 53-58, 2000b.

ROEL, A. R. & VENDRAMIM, J. D. "Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)". *Ciência Rural*, 36(4):1049-1054, 2006.

SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H. & OHKI, T. "6 β -Hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus*". *Phytochemistry*, **22**: 2553-2555, 1983.

- SAXENA, R. C. "Antifeedants in tropical pest management". *Insect Science and its Application*, 8(4-5-6): 731-736, 1987.
- SCHRAMM, K.; GIDDINGS VASSAO, D.; REICHEL, M.; GERSHENZON, J. & WITTSTOCK, U. "Metabolism of glucosinolate-derived isothiocyanates to glutathione conjugates in generalist lepidopteran herbivores". *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **42**: 174-182, 2012.
- SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A. & DICKE, M. "Insect-Plant biology". Oxford University Press: Oxford, Reino Unido, 2 ed., 2005.
- SILVA, M. F. DAS G. F. DA, AGOSTINHO, S. M. M., PAULA, J. R. DE, OIANO NETO, J., CASTRO-GAMBOA, I., RODRIGUES FO., E., FERNANDES, J.B., & VIEIRA, P.C. "Chemistry of *Toona ciliata* and *Cedrela odorata* graft (Meliaceae): Chemosystematic and Ecological Significance". *Pure Appl. Chem.*, **71**:1083-1087, 1999.
- SILVA, S. C. Estudo químico de microorganismos associados a *Khaya ivorensis* (MELIACEAE). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2007. Tese de Doutorado. 141-144 p.
- SINGH, M.; KHOKHAR, S.; MALIK, S. & SINGH, R. "Evaluation of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Extracts against American Bollyworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**: 3262-3268, 1997.
- SOUZA, J. C. A. V.; BARROSO, D. G. & CARNEIRO, J. G. A.. "Cedro australiano (*Toona ciliata*)". Programa Rio Rural. *Manual Técnico*, 21, 2010.
- SUGA, T. & KONDO, S. "Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*". *Phytochemistry*, **13**: 522-523, 1974.
- SUMAN, D. S.; PARASHAR, B. D. & PRAKASH, S. "Efficacy of various insect growth regulators on organophosphate resistant immatures of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from diferente geographical areas of India". *Journal of Entomology*, **7**:33-43, 2010.
- SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; WESLEY, S. D.; SINGH, N. D. P.; MALATHI, R. & RAJAN, S. S. "Insect antifeedant activity of tetranortriterpenoids from the Rutales. A perusal of structural relations". *J. Agric. Food Chem.* **50**(16):4484-90, 2002.
- TANZUBIL, P.B. & A.R. MCCAFERRY. "Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the African armyworm, *Spodoptera exempta*". *Crop Prot.* **9**: 383, 1990.
- THOMPSON, S. N. "Nmr spectroscopy: Its basis, biological application and use in studies of insect metabolism". *Insect Biochem.* **20**(3): 223-237, 1990.

- TORRECILLAS, S. M. & J. D. VENDRAMIM. Extratos aquosos de ramos de *Trichilia pallida* e o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em genótipos de milho. *Sci. Agr.* **58**: 27-31, 2001.
- VERA, N.; POPICH, S.; LUNA, L.; CRAVERO, R.; SIERRA, M. G. & BARDÓN, A. "Toxicity and Synergism in the Feeding Deterrence of Some Coumarins on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)". *Chemistry & Biodiversity*. **3**: 21-26, 2006.
- VENDRAMIM, J.D. & CASTIGLIONI, E. "Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas". In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos, Santa Maria, Ed. Pallotti, 113-128, 2000.
- VIEGAS JR., C. "Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos". *Quim. Nova*, **26**: 390, 2003.
- VILLAR M., C., J.L. AYZLA A., C. RODRÍGUEZ H. & A. LAGUNES T. "Utilización de infusiones y extractos acuosos vegetales en el combate del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en San Luis Potosí". *Rev. Chapingo* **15**: 105-107, 1990.
- WAIGH, R. D., ZERIHUN, B. M. & MAITLAN, D. J. "Ten 5-methylcoumarins from *Clutia abyssznica*". *Phytochemistry*, 30(1): 333.-335,1991.
- WARE G. W. "An introduction to insecticides [monografia na Internet]. 3rd ed. University of Minnesota"; 2000 [cited 2003 Nov 03]. Disponível em: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>.
- WERREN, J. H. "Symbionts provide pesticide detoxification". *PNAS*, **109**: 8364, 2012.
- WISHART, D.S, KNOX, C., GUO, A. C, EISNER, R., YOUNG, N., GAUTAM, B., HAU, D. D., PSYCHOGIOS, N., DONG, E., BOUATRA, S., MANDAL, R., SINELNIKOV, I., XIA, J., JIA L, CRUZ, J. A., LIM, E., SOBSEY, C. A., SHRIVASTAVA, S., HUANG, P., LIU, P., FANG, L., PENG, J., FRADETTE, R., CHENG, D., TZUR, D., CLEMENTS, M., LEWIS, A., DE SOUZA, A., ZUNIGA, A., DAWE, M., XIONG, Y., CLIVE, D., GREINER, R., NAZYROVA, A., SHAYKHUTDINOV, R., LI, L., VOGEL, H. J. & FORSYTHE, I. "HMDB: a knowledgebase for the human metabolome". *Nucleic Acids Res.*, **37**, 2009
- WITTSTOCK, U., AGERBIRK, N., STAUBER, E.J., OLSEN, C.E., HIPPLER, M., MITCHELL-OLDS, T., GERSHENZON, J. & VOGEL, H. "Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense". *Proc. Natl. Acad.* **101**: 4859-4864, 2004.
- YOSHIDA, K.; HIROSE, Y.; IMAI, Y. & KONDO, T. "Conformational Analysis of Cycloartenol, 24-Methylenecycloartanol and Their Derivates". *Agric. Biol. Chem.*, **53**(7): 1901-1912, 1989.
- YU, S. J. "Insecticide Resistance in the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **39**:84-91, 1991.

YU, S. J.; NGUYEN, S. N. & ABO-ELGHAR, G. E. "Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)". *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 77(1):1-11, 2003.

YU, S. J. "The toxicology and biochemistry of insecticides", Taylor and Francis Inc., Philadelphia, 2008.