

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

**“OBTENÇÃO DE INSETICIDAS E FUNGICIDAS A PARTIR
DE *Picramnia Glazioviana* E BAGAÇO DE LARANJAS
PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS”**

LUÍS FELIPE MATOS COSTA*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

***BOLSISTA CAPES**

São Carlos – SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Luis Felipe Matos Costa, realizada em 26/02/2019:

Prof. Dr. João Batista Fernandes
UFSCar

Profa. Dra. Rose Maria Carlos
UFSCar

Profa. Dra. Isabele Rodrigues Nascimento
UNESP

Dedico esse trabalho aos meus pais (Antônio Luís e Rosângela) e a Dayane Lima, pois sempre me incentivaram a ser uma pessoa melhor e nunca desistir de meus sonhos e objetivos. Amo vocês.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão a Deus pelas oportunidades que vem me proporcionando, bem como me direcionar sempre no caminho certo.

Ao Dr. João Batista Fernandes pela amizade, orientação e ensinamentos ao longo desses anos, por não medir esforços em ajudar seus orientandos e por não deixar faltar nada na pesquisa, além do grande homem que é fora do ambiente de trabalho, sempre arrumando um tempinho para tudo e todos, tornando-se um exemplo de vida e até se tornando um espelho para seus alunos.

Ao Departamento de Química – DQ, ao Programa de Pós-graduação em Química – PPGQ, bem como todos seus servidores.

Aos órgãos de fomento: CNPq, FAPESP e CAPES pelo auxílio à pesquisa e pela bolsa de estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Aos meus familiares, por todo apoio e incentivo. Em especial à minha mãe Rosângela, meu pai Antônio Luís e minha irmã Ana Débora. Amo vocês!

À Dayane Lima, pelo amor, companheirismo, paciência, incentivo e por sempre me fortalecer para nunca desistir dos meus objetivos. Você faz parte dessa conquista amor. Te amo!

Aos amigos que estão sempre ao meu lado e até dividem apartamento, Artur, André, Sean, Douglas, Wendel: obrigado por tudo!

Aos grandes amigos que adquiri ao longo desses anos, em especial ao Luciano Pinto, Hugo, Alany, Carol, Ely, Doraí, Luis Guillermo, Taynara, Wilmer, Rafael, Marlon, e Airton por toda amizade, compreensão, torcida e orações. Vocês são parte desta vitória!

À Msc. Alany Ingrid por dividir bancada comigo, bem como por sempre me auxiliar, orientar e ajudar dentro e fora do laboratório. Obrigado de coração. Quero levar sua amizade para o resto da vida.

Ao Msc. Luciano Pinto por não medir esforços em ajudar o próximo, por me auxiliar, ensinar, motivar e estar presente em diversos momentos dentro e fora do laboratório. Obrigado meu irmão.

Ao Dr. Hugo César por me orientar, ensinar e auxiliar em testes e interpretação de dados. Além de que, por ser amigo principalmente fora da área acadêmica. Obrigado meu irmão.

À Dr.^a Rose Maria Carlos por ser uma mãezona e por todas as contribuições científicas e apoio para que parte desse projeto pudesse ser executado.

Ao Msc. Airton Damasceno por sempre estar disposto a me auxiliar, ensinar, motivar. Obrigado meu irmão.

Ao Msc. Rafael pela ajuda nas sínteses e interpretação de dados, bem como todos do Laboratório de Fotoquímica Inorgânica e Bioinorgânica - LAFIB (Marlon, Mariana, Isa, Marco, Kárita, Bia e Pâmela) que contribuíram diretamente ou até indiretamente na pesquisa: meu muitíssimo obrigado!

Ao professor e amigo do ensino médio Msc. Sebastião Gomes e professor Msc. Málisson Lobato por sempre apoiar nesse sonho.

E por fim, ao Msc. Klebson Sodré, ao Dr. João Carneiro e todos os professores, funcionários e amigos da Universidade do Estado do Pará (UEPA) pelo aprendizado e incentivo ao longo da graduação.

PRINCIPAIS ABREVIações

δ	-	Deslocamento químico em partes por milhão
1D	-	Experimento de RMN de uma dimensão
2D	-	Experimento de RMN de duas dimensão
ACN	-	Acetonitrila
AcOEt	-	Acetato de etila
atm	-	Atmosfera
BuOH	-	1-Butanol
CCD	-	Cromatografia de camada delgada
CH ₂ Cl ₂	-	Diclorometano
(CD ₃) ₂ CO	-	Acetona deuterada
COSY	-	<i>Correlation spectroscopy</i>
CPC	-	Cromatografia de Partição Centrífuga
<i>d</i>	-	Dubleto
<i>dd</i>	-	Duplo dubleto
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
ESI	-	Ionização por electrospray
EtOH	-	Etanol
H ₂ O	-	Água
Hex	-	Hexano
HMBC	-	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	-	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	-	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	-	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>m</i>	-	Multiplete
M ₁	-	Metal ₁
M ₂	-	Metal ₂
mL	-	Mililitro
<i>m/z</i>	-	Relação massa/carga
MeOH	-	Metanol
nm	-	Nanometro
Phen	-	1,10 - Fenantrolina

ppm	-	Parte por milhão
RMN ¹³ C	-	Ressonância Magnética Nuclear de carbono – 13
RMN ¹ H	-	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio - 1
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
s	-	Singleto
T	-	Tesla
<i>t</i>	-	Tripleto
TEA	-	Trietilamina
u	-	Unidade
μL	-	Microlitro

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – Triagem dos extratos brutos do laboratório de produtos naturais.....	18
TABELA 02 – Massa das frações obtidas na separação do CPC do extrato metanólico de galhos de <i>Picramnia glazioviana</i> no HPLC.....	21
TABELA 03 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da Aloe-emodina (DMSO- d_6 , 14, 1T).....	23
TABELA 04 – Massa das frações obtidas na separação do CPC do extrato metanólico de galhos de <i>Picramnia glazioviana</i> no CPC.....	28
TABELA 05 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Picramnia glazioviana</i>	34
TABELA 06 – Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os complexos do metal ₁ e metal ₂	59
TABELA 07 – Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do complexo do metal ₁ frente ao crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias do experimento.....	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Formigas cortadeiras do gênero <i>Atta</i> e <i>Acromyrmex</i>	02
FIGURA 02 - Filogenia de espécies vegetais.....	05
FIGURA 03 – Esqueletos básicos de substâncias presentes em <i>Picramnia Glazioviana</i>	06
FIGURA 04 – Folhas e Frutos de <i>Picramnia Glazioviana</i>	07
FIGURA 05 – Equipamento de Cromatografia de Partição Centrífuga.....	08
FIGURA 06 – Estrutura da coluna do CPC.....	08
FIGURA 07 - Esquema para utilização do CPC.....	14
FIGURA 08 - Vista geral do formigueiro de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – IBRC - UNESP.....	15
FIGURA 09 - Operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial.....	16
FIGURA 10 - Triagem dos extratos brutos através de CCD.....	19
FIGURA 11 – RMN de ¹ H do extrato metanólico dos galhos em DMSO-d ₆ em equipamento 9,4T.....	19
FIGURA 12 - RMN de ¹ H do extrato diclorometânico das folhas em CDCl ₃ em equipamento 9,4T.....	20
FIGURA 13 – Cromatogramas dos extratos de <i>Picramnia glazioviana</i> . (a) Extrato diclorometânico de folhas; (b) Extrato metanólico de galhos.....	20
FIGURA 14 - Substâncias identificadas em extrato metanólico de galhos de <i>Picramnia glazioviana</i>	21
FIGURA 15 - Substância aloe-emodina identificada em extrato metanólico de galhos de <i>Picramnia glazioviana</i>	22
FIGURA 16 - Proposta de fragmentação de 1 Aloe-emodina por HRMS-MS/MS.....	23
FIGURA 17 - Substância crisofanol identificada em extrato metanólico de galhos de <i>Picramnia glazioviana</i>	24
FIGURA 18 – Substância crisofanol-8-glucoside identificado em extrato metanólico de galhos de <i>Picramnia glazioviana</i>	25
FIGURA 19 - CCD para escolha do sistema de solvente ideal para o CPC dos constituintes do extrato diclorometânico das folhas de <i>Picramnia glazioviana</i>	26
FIGURA 20 - Escolha do sistema de solvente 2, baseado em CCD e HPLC.....	26
FIGURA 21 - Separação do extrato diclorometânico de <i>Picramnia glazioviana</i> acompanhado por CCD.....	27

FIGURA 22 - Separação da extrusão do extrato diclorometânico de <i>Picramnia glazioviana</i> acompanhado por CCD. (a) CCD sem revelação; (b) CCD revelada com vanilina sulfúrica.....	28
FIGURA 23 - Comparação através de CCD da separação das fase móvel (corrida) e fase estacionária (extrusão) do extrato diclorometânico de <i>Picramnia glazioviana</i> . (a) CCD sem revelação; (b) CCD revelada com vanilina sulfúrica.....	29
FIGURA 24 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 15 da extrusão do CPC [(CD ₃) ₂ CO, 9,4 T)].....	31
FIGURA 25 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 12 da extrusão do CPC [(CD ₃) ₂ CO, 9,4 T)].....	32
FIGURA 26 - Comparação dos espectros de RMN de ¹ H das frações 23 e 26 da extrusão, respectivamente.....	33
FIGURA 27 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com <i>Picramnia glazioviana</i>	34
FIGURA 28 - Ensaio de inibição dos extratos frente ao fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> após 30 dias de experimento.....	35
FIGURA 29 – Esqueleto básico das classes de Flavonóides.....	37
FIGURA 30 - Esquema da síntese dos complexos do Metal ₁	44
FIGURA 31 - Esquema da síntese dos complexos do Metal ₂	45
FIGURA 32 - Propostas dos complexos com Metal ₁	51
FIGURA 33 - Proposta de fragmentação do complexo 1 com Metal ₁	52
FIGURA 34 - Proposta de fragmentação do complexo 2 com Metal ₁	53
FIGURA 35 - Proposta de fragmentação do complexo 3 com Metal ₁	53
FIGURA 36 - Proposta de fragmentação do complexo 4 com Metal ₁	54
FIGURA 37 - Proposta de fragmentação do complexo 5 com Metal ₁	54
FIGURA 38 - Proposta dos complexos com Metal ₂	55
FIGURA 39 - Comparação de absorção no UV-vis do precursor com os complexos do Metal ₁	56
FIGURA 40 - Comparação dos espectros de emissão dos complexos do com Metal ₁ com o bagaço em EtOH/H ₂ O com excitação entre 325 e 375nm.....	57
FIGURA 41 - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os complexos	58

FIGURA 42 - Inibição dos complexos do Metal₂ frente ao fungo simbiote da formiga com 7 dias de experimento. (a) Complexos via de síntese EtOH/H₂O; (b) Controle....60

RESUMO

OBTENÇÃO DE INSETICIDAS E FUNGICIDAS A PARTIR DE *Picramnia glazioviana* E BAGAÇO DE LARANJAS PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS.

Devido nosso país ter dimensão continental e clima muito apropriado para prática de numerosas variedades de plantações, é necessário obter controle adequado das pragas que afligem as produções alimentícias. Uma das principais pragas agrícolas são os insetos, em especial formigas cortadeiras, que reduzem consideravelmente a produtividade e, portanto, competem com o homem com relação ao alimento. Sendo assim, este trabalho descreve o estudo dos extratos metanólico dos galhos e diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*, cujo o objetivo principal é controlar a atividade de formigas cortadeiras visando reduzir a sua ação como praga agrícola. Como metodologia para separação e caracterização dos compostos foram utilizadas técnicas de HPLC-DAD, CPC-DAD, RMN-1D e 2D, UPLC-HRMS. Além disso, testes de atividades inseticidas foram realizadas frente a formigas cortadeiras das espécies *Atta* e *Acromyrmex* e ensaios de inibição frente ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Os resultados demonstram atividades inseticidas e fungicida dos extratos brutos estudados, bem como a identificação de substâncias químicas já relatadas no gênero, como por exemplo, as antraquinonas Aloe-emodina e Crisofanol que em trabalhos no grupo de pesquisa já apresentaram atividades inseticidas. Além disso, um trabalho com *Citrus*, mais especificamente bagaço de laranja, foi realizado, onde complexos metálicos foram gerados com metabólitos químicos presentes no meio e atividades inseticidas e fungicidas foram testadas. Como resultados, houve a proposta de caracterização dos complexos por meio principalmente de análise no UPLC-HRMS, além disso, os complexos do metal 2 apresentaram ação inseticida em formigas e inibição no seu fungo simbiote. Sendo assim, a aplicação de uma abordagem de separação (CPC) pouco utilizada no Brasil para extratos complexos, auxiliado pela resposta das atividades biológicas proeminentes geraram possibilidade de futuras aplicações dos resultados, como também oportunidades para novos trabalhos no grupo de pesquisa. Além disso, a complexação de substâncias de interesse advindas de extratos complexos em metais, geraram a redação de uma patente com os resultados obtidos, contribuindo assim para abordagens inovadoras na Química de Produtos Naturais.

PALAVRAS-CHAVE: *Picramnia glazioviana*; Cromatografia de Partição Centrífuga; Bagaço de Laranja; Complexos metálicos.

ABSTRACT

OBTAINING INSECTICIDES AND FUNGICIDES FROM *Picramnia Glazioviana* AND ORANGE BAGASSE FOR THE CONTROL OF LEAF-CUTTING ANT.

Because our country has a continental dimension and a very suitable climate for practicing numerous varieties of crops, it is necessary to obtain adequate control of the pests that afflict food production. One of the main agricultural pests is insects, especially leaf-cutting ants, which greatly reduce productivity and thus compete with man for food. Thus, this work describes the study of the methanolic extracts of the branches and dichloromethane of leaves of *Picramnia glazioviana*, whose main objective is to control the activity of leaf cutting ants in order to reduce their action as agricultural pest. HPLC-DAD, CPC-DAD, NMR-1D and 2D, UPLC-HRMS techniques were used for the separation and characterization of the compounds. In addition, tests of insecticidal activities were carried out against cutter ants of the *Atta* and *Acromyrmex* species and inhibition tests against the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. The results demonstrate insecticidal and fungicidal activities of the crude extracts studied, as well as the identification of chemical substances already reported in the genus, such as the anthraquinones Aloe-emodin and Chrysophanol, which have already shown insecticidal activity in the research group. In addition, a work with Citrus, more specifically orange bagasse, was carried out, where metallic complexes were generated with chemical metabolites present in the medium and insecticidal and fungicidal activities were tested. As results, there was the proposal of characterization of the complexes mainly through analysis in the UPLC-HRMS, in addition, the complexes of metal 2 presented insecticidal action on ants and inhibition in their symbiont fungus. Thus, the application of a separation approach (CPC) in Brazil for complex extracts, aided by the response of prominent biological activities, generated the possibility of future applications of the results, as well as opportunities for new work in the research group. In addition, the complexation of substances of interest from complex extracts in metals, led to the writing of a patent with the results obtained, thus contributing to innovative approaches in the Chemistry of Natural Products.

KEYWORDS: *Picramnia glazioviana*; Centrifugal Partition Chromatography; Orange bagasse; Metallic complexes..

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	01
CAPÍTULO 1	02
1– INTRODUÇÃO	02
1.1– <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e seu fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	02
1.2– Controle de formigas cortadeiras.....	03
1.3– Importância de produtos naturais e metabólitos secundários.....	03
1.4–Ordem <i>Picramniales</i>	04
1.5– Histórico de <i>Picramniaceae</i> e seus constituintes químicos.....	06
1.6 – <i>Picramnia glazioviana</i>	07
1.7– Cromatografia de Partição Centrífuga - CPC.....	08
2– OBJETIVOS	10
3– PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	11
3.1– Materiais utilizados.....	11
3.2– Equipamentos.....	11
3.3– Análise e seleção dos extratos por CCD e RMN de ¹ H.....	12
3.4– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	12
3.5– Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC).....	13
3.6– Ensaio Biológicos.....	15
3.6.1 – Ensaio por ingestão com as operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	15
3.6.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	16
4– RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1– Análise dos extratos por CCD, RMN de ¹ H e separação no HPLC.....	18
4.2– Substâncias identificadas no extrato metanólico de <i>Picramnia glazioviana</i>	21
4.2.1 – Caracterização da substância 1 (Aloe-emodina)	22
4.2.2 – Caracterização da substância 2 (Crisofanol).....	23
4.2.3 – Caracterização da substância 3 (Crisofanol-8-glucoside).....	24
4.3 – Separação do extrato diclorometânico de <i>Picramnia glazioviana</i> utilizando CPC.....	25

4.3.1 – Análise das Frações da Separação da Fase Móvel por RMN de ^1H (CORRIDA).....	29
4.3.2 – Análise das Frações da Separação da Fase Estacionária por RMN de ^1H (EXTRUSÃO).....	30
4.4 – Ensaio biológicos.....	33
4.4.1 – Ensaio de toxicidade frente as formigas cortadeiras.....	33
4.4.2 – Ensaio de toxicidade frente ao fungo simbiote.....	35
CAPÍTULO 2.....	37
1– INTRODUÇÃO.....	37
1.1 – Bagaço de laranja.....	37
1.2 – Flavonóides e suas aplicações.....	37
1.3 – Complexos metal-flavonóides.....	38
1.4– Rutênio.....	38
1.5 – Magnésio.....	39
1.6 – Platina.....	39
1.7 – Zinco.....	40
1.8 – Cobre.....	40
1.9 – Ferro.....	40
2– OBJETIVOS.....	42
3– PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
3.1 – Materiais utilizados.....	43
3.2 – Equipamentos.....	43
3.3 – Bagaço de laranja.....	43
3.4 – Síntese dos complexos.....	44
3.4.1 – Síntese do precursor do Metal ₁	45
3.4.2 – Síntese dos complexos com Metal ₁	46
3.4.3 – Síntese dos complexos do Metal ₂ em metanol.....	46
3.4.4 – Síntese dos complexos com Metal ₂ em etanol/água.....	47
3.5 – Caracterização por infusão direta no UPLC-HRMS (qTOF).....	47
3.6 – Espectros eletrônicos no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	47
3.7 – Luminescência dos complexos.....	47
3.8 – Ensaio Biológicos.....	48

3.8.1 – Testes “ <i>in vitro</i> ” de toxicidade dos Complexos em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	48
3.8.2– Ensaio biológico com o fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	49
4– RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 – Caracterização dos complexos	51
4.1.1 – Caracterização dos complexos por UPLC-HRMS (qTOF).....	51
4.1.2 – Caracterização dos complexos do metal ₁ por ultravioleta-visível (UV-Vis)....	56
4.1.3 – Propriedades luminescentes dos complexos do metal ₁	57
4.2 – Bioensaios	58
4.2.1– Toxicidade para operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	58
4.2.2 –Toxicidade para fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	59
5 – CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	71

APRESENTAÇÃO

A redação desta dissertação foi dividida em dois capítulos, sendo que o primeiro trata-se da pesquisa inicialmente proposta no projeto de mestrado, o qual descreve o estudo fitoquímico preliminar dos extratos metanólico de galhos e diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*, com a caracterização de substâncias e ensaios preliminares de toxicidade frente às formigas *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Já o capítulo seguinte, trata-se de um projeto que relata sínteses, caracterizações e ensaios biológicos de complexos metálicos, com dois metais M_1 e M_2 , tendo como matriz o bagaço de laranja, o qual gerou a redação de patente. Portanto, alguns dados e resultados obtidos foram omitidos.

CAPÍTULO 1

1. – INTRODUÇÃO

1.1 – *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

A tribo Atinni é constituída por 13 gêneros, onde as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (FIGURA 01), que são conhecidas respectivamente como saúvas e quenquéns, estão presentes.¹ As formigas são classificadas em espécies diferentes devido apresentarem divergências morfológicas, como pode ser visualizado na FIGURA 01.

Estes seres vivos estão classificados dentro da família Formicidae, e vivem em relação simbiótica com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual é quem produz o alimento necessário para a manutenção do formigueiro através da degradação de matéria orgânica.



FIGURA 01 - Formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex*. Disponível em: <https://myrmexinfinitus.blogspot.com/2016/10/diferencaentre-atta-e-acromyrmex-depois.html>

Estes animais são considerados uma das principais ameaças à produção agrícola brasileira, principalmente em florestas implantadas de *Pinus* e *Eucalyptus*.²⁻⁴

As formigas vivem em simbiose obrigatória com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, sendo que, através de material vegetal que é utilizado como substrato pelo fungo, ocorre a produção de enzimas que reduzem polissacarídeos em açúcares menores que servem de alimento para as formigas e sua larva. Em troca do alimento

produzido, proteção e dispersão do fungo para novos ninhos, são fornecidos pelas formigas em relação mutualística complexa.⁵⁻⁸

1.2 – Controle de formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras são consideradas pragas na agricultura, por isso, há uma busca constante por inseticidas para os seus controles, uma vez que eles precisam ter algumas características específicas, como por exemplo:

- Apresentar baixa mortalidade nos primeiros dias, para que assim o princípio ativo contamine toda colônia;
- É interessante que a mortalidade seja ocasionada por ingestão, pois estes insetos apresentam carapaça de quitina que forma uma barreira natural contra ataques externos, sendo assim, o princípio ativo pode estar em iscas;

Baseado no exposto, o controle das formigas cortadeiras é comumente realizado por métodos químicos, mecânicos e biológicos, sendo que o primeiro é o mais utilizado, através de produtos organoclorados, que são aplicados diretamente nos ninhos em formas de líquidos termonebulizáveis, gases tóxicos, pós secos e iscas granuladas.⁹⁻¹¹

Vale salientar que muitos inseticidas sintéticos utilizados no controle das pragas geram problemas de contaminação ao meio ambiente, resistência e não seletividade para morte de insetos específicos, e com isso, gera-se a necessidade de uma busca por substâncias naturais com propriedades inseticidas para o controle de pragas sem danos ao homem e ao meio ambiente.¹²

Além disso, atualmente uma alternativa utilizada para o controle das formigas cortadeiras consiste no combate e/ou inibição do fungo simbiote. Pois se o fungo morrer, conseqüentemente as formigas iriam morrer de fome, e com isso, há uma busca por substâncias que apresentem inibição ao fungo para assim produtos serem gerados no mercado.

1.3 – Importância de produtos naturais e metabólitos secundários

O Brasil apresenta uma extensa diversidade vegetal e animal, além de que, possui uma farmacopeia popular baseada em plantas medicinais, associada a diferentes locais do mundo.¹³⁻¹⁵

Através de conhecimentos repassados por gerações, a medicina popular busca tratar doenças através do consumo de ervas, frutos, raízes e cascas de árvores. Com isso, a fitoterapia surge derivando do grego *phyton* que significa “vegetal” e de *therapeia*, “tratamento”, consistindo no uso interno ou externo de vegetais para o tratamento de doenças, sejam eles “in natura” ou sob a forma medicamentos.¹⁶⁻²⁰

Os vegetais produzem nutrientes e substâncias ativas para viver e se proteger, principalmente através de seu metabolismo secundário, substâncias estas, que apresentam ação farmacológica denominadas de princípios ativos.²¹

Diante do exposto, muitos pesquisadores desenvolvem seus trabalhos buscando utilizar as substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos e para o tratamento de doenças.²²

Sendo assim, devido a diversidade de vegetais em nosso planeta, há uma grande variedade de metabólitos secundários ativos, os quais são de suma importância para proporcionar melhor qualidade de vida aos seres humanos.

1.4 – Ordem Picramniales

A ordem Picramniales inclui apenas a pequena família neotropical Picramniaceae. Nas filogenias atuais (FIGURA 02) essa ordem emerge como grupo-irmão do clado que contém a ordem Sapindales que é constituída por 15 famílias e outras três ordens, todas inseridas na superordem Rosanae/Malvidae.²³⁻²⁸

Dentro dessa classificação, o grupo de produtos naturais da Universidade Federal de São Carlos-UFSCar, estuda principalmente 4 famílias pertencentes a estas ordens, e são: Rutaceae, Meliaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae, onde já identificou e caracterizou diversas substâncias que apresentaram alguma atividade biológica.

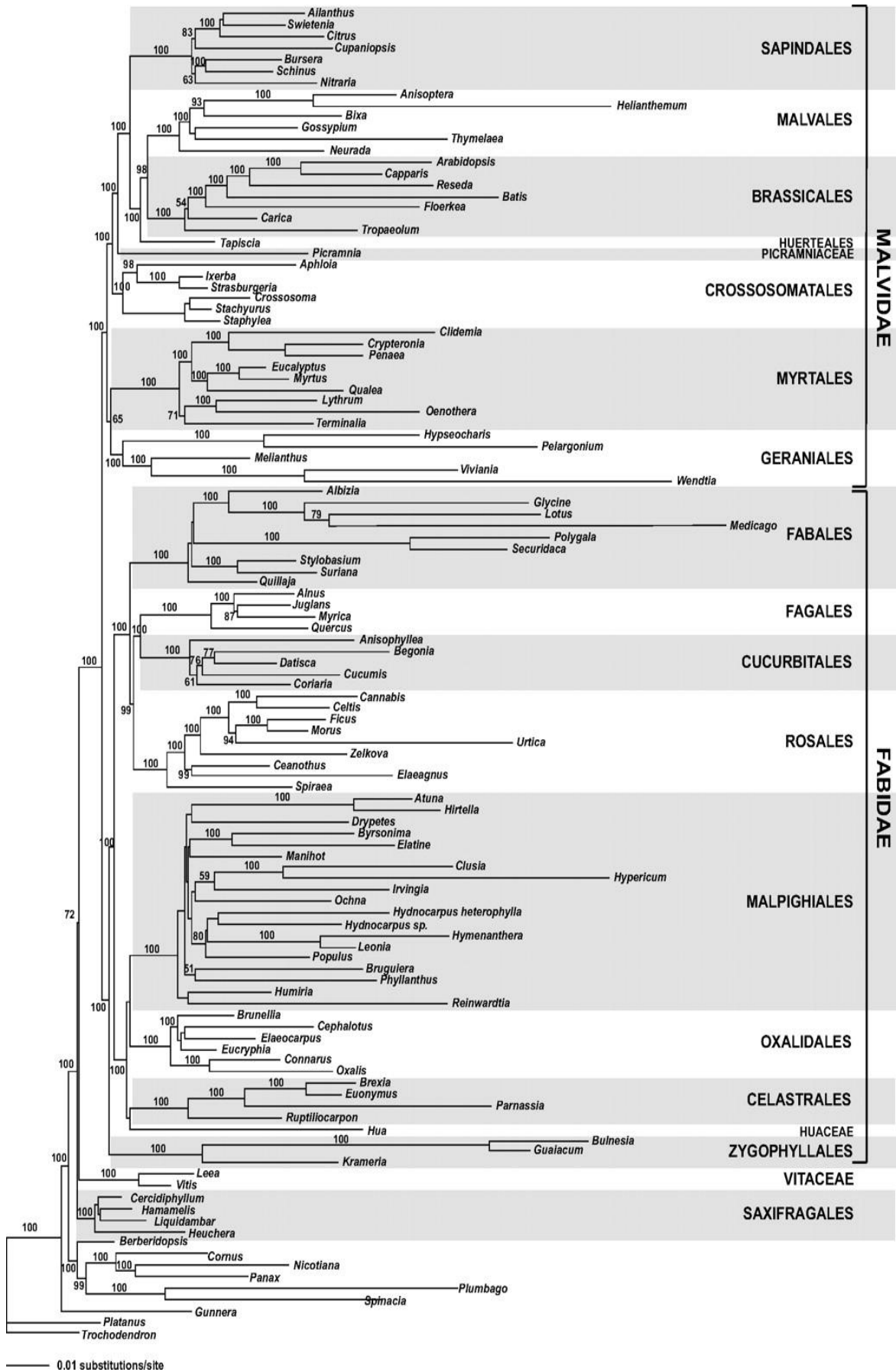


FIGURA 02 - Filogenia de espécies vegetais. adaptado de APG III²⁴ e APG IV²⁵

1.5 – Histórico de Picramniaceae e seus constituintes químicos

Picramniaceae engloba cerca de 50 espécies distribuídas nas Américas, das quais aproximadamente 20 estão presentes no Brasil. A família é oriunda de uma nova classificação proposta por FERNANDO e QUINN em 1995.²⁹ A mesma compreende três gêneros, sendo que dois deles *Alvaradoa* Liebm. e *Picramnia* Sw. pertenciam a família Simaroubaceae, e o terceiro, *Nothotalisia*, foi descrito recentemente por THOMAS 2014.³⁰

Morfologicamente, Picramniaceae é caracterizada por serem arbustos ou árvores, com folhas compostas pinadas e sem estípulas, apresentam inflorescências terminais ou raramente caulifloras, flores pouco vistosas, unissexuadas e frutos do tipo baga.^{31,32}

A maioria das espécies de *Picramnia* do Brasil são arvoretas do interior de florestas úmidas, frequentemente conhecidas como cafezinho-do-mato ou café-de-bugre.²⁸

Ao se tratar de metabólitos secundários, o gênero apresenta triterpenos, antraquinonas, oxantronas, esteroides, ácidos graxos e cumarinas, como visto na FIGURA 03 esqueletos básicos das classes.

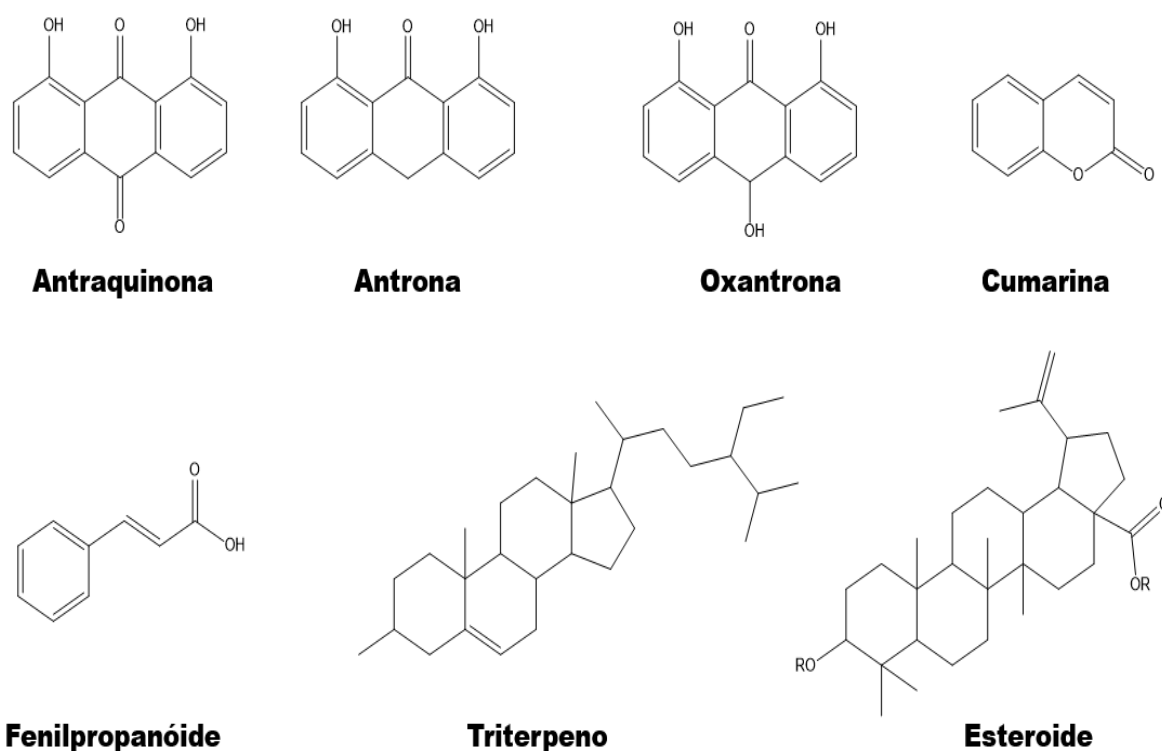


FIGURA 03 - Esqueletos básicos das substâncias presentes em *Picramnia glazioviana*.

Estas substâncias podem estar relacionadas com a utilização de *Picramnia* na medicina popular no combate à febre, sendo utilizada também como laxante, purgativo, emético e abortivo.³³⁻⁴¹

1.6 – *Picramnia glazioviana*

A espécie *Picramnia glazioviana* predomina desde o sudeste da Bahia até Rio de Janeiro e São Paulo, podendo até ser encontrada no interior de Minas Gerais. A planta é popularmente conhecida como "café-bravo" e "cafezinho-do-mato", devido aos frutos carnosos avermelhados (FIGURA 04), os quais são muito apreciados por aves.²⁸



FIGURA 04 - Folhas e frutos de *Picramnia Glazioviana*. Disponível em: <http://www.ufjf.br/floraserranegra/herbario-virtual/angiospermas/picramniaceae/picramnia-glazioviana-engl/>

Morfologicamente, caracteriza-se por ser dioica, apresentando-se como pequenas arvoretas que habitam o interior da floresta. Suas inflorescências são racemos pendentes, tipicamente terminais, sendo as estaminadas maiores e mais ramificadas que as pistiladas.⁴²

Ao se tratar de estudo fitoquímico da espécie, ao realizar constantes buscas na literatura, pode-se encontrar disponível apenas um estudo realizado por VIEIRA (1995)⁴¹, onde foram isolados e caracterizados do caule, cascas do caule e folhas substâncias pertencentes as classes de cumarinas, antraquinonas e esteroides.

1.7 – Cromatografia de Partição Centrífuga

A cromatografia por partição centrífuga – CPC (FIGURA 05) é uma técnica de separação líquido-líquido entre duas fases imiscíveis que permanecem em equilíbrio particionando os extratos através de força hidrostática criada por um campo centrífugo do rotor em uma coluna de um eixo.^{43,44,45}



FIGURA 05 - Equipamento de Cromatografia de Partição Centrífuga-CPC.

A coluna consiste em vários discos quase idênticos, que são montados um sobre o outro. Cada disco possui diversos canais conectados por dutos estreitos (FIGURA 06), e são separados por uma placa de vedação. Através da união da última cela de um disco com a primeira cela do próximo disco há a formação da coluna centrífuga de um eixo.⁴³



FIGURA 06 - Estrutura da coluna do CPC. Adaptado de BOJCZUK (2017)⁴³

Ao se tratar de princípio de funcionamento a fase estacionária é imobilizada por uma forte força centrífuga dentro da coluna, enquanto a fase móvel é bombeada através da fase estacionária, permitindo um processo de separação em por afinidade contínua das substâncias entre as duas fases atuando principalmente de forma isocrática.^{43,45}

O equipamento apresenta uma válvula que pode ser operada em duas formas, ascendente ou descendente, dependendo da densidade das fases utilizadas. O modo ascendente se caracteriza pela fase menos densa ser utilizada como fase móvel. Já no modo descendente a fase mais densa é usada como fase móvel.⁴³

Dentre as principais vantagens, a técnica de cromatografia de partição centrífuga oferece separações em larga escala, com até 100% de recuperação e 100% de rendimento da amostra. Além disso, as amostras antes de serem injetadas precisam passar apenas por um pré tratamento mínimo para o isolamento de vários alvos em uma só etapa de separação.⁴³⁻⁴⁶

Na literatura há uma diversidade de artigos científicos sobre a separação de compostos naturais usando CPC, como, por exemplo, NAM (2018)⁴⁴; SANTOS (2018)⁴⁵; KIM (2018)⁴⁶, porém, poucos trabalhos realizados no Brasil.

O grande número dos trabalhos para o isolamento e/ou purificação de matrizes naturais complexas se dão pelas várias vantagens proporcionadas pelo CPC.

2. – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em combater a atividade de formigas cortadeiras visando reduzir a sua ação como praga agrícola.

Para isso, alguns objetivos específicos foram determinados. São eles:

- Fracionar os extratos orgânicos ativos das plantas, visando o isolamento utilizando a Cromatografia de Partição Centrífuga-CPC
- Caracterizar as moléculas responsáveis pelas atividades através do uso combinado de UPLC-MS/MS e RMN tendo como alvo a prática da química verde,
- Determinar os efeitos tóxicos sobre formigas cortadeiras, seu fungo simbiote, leveduras presentes no formigueiro e efeito de inibição de enzimas de extratos orgânicos de plantas potencialmente tóxicas, de frações resultantes dos fracionamentos químicos destes extratos e dos compostos puros, isolados ou sintetizados com base nos resultados prévios,

3. – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais utilizados

- a) Material para cromatografia em camada delgada
 - Placas de CCD (MACHEREY-NAGEL) ALUGRAM® SIL G/UV₂₅₄ für die DC
 - Placas de sílica C18
- b) Colunas cromatográficas:
 - Coluna analítica PHENOMENEX Gemini 150 x 4,6 mm (5 µm)
- c) Solventes:
 - Solventes destilados no departamento de química;
 - Solventes grau HPLC: Tedia, J.T. Baker, HoneyWell e Panreac®;
 - Solventes PA Panreac®, Synth, Vetex;
 - Solventes deuterados MERCK® e ALDRICH® (98,0 – 99,9 %), para a obtenção dos espectros de RMN;
 - Água purificada em aparelho Milli-Q;

3.2 – Equipamentos

- a) Espectrômetro de RMN:
 - BRUKER AVANCE™ III NanoBay 9,4T (400 MHz para RMN ¹H e 100 MHz para RMN ¹³C).
- b) Espectrômetros de Massas:
 - UPLC-HRMS (qTOF) da WATERS
- c) Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC):
 - Agilent Technologies modelo 1200 equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A e detector UltraVioleta G1314B. Equipamento acoplado a uma interface G1369A, software EZChrom Elite;
 - Agilent Technologies modelo 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, degaseificador G1322A, amostrador automático G1329B e

detector UltraVioleta G1314B e compartimento termostaticado de coluna G1316A. Os cromatogramas foram registrados no software OpenLab.

- d) Balança analítica:
 - Shimadzu, modelo AY220;
 - Toledo, modelo 9094C/5;
- e) Centrífuga:
 - Eppendorf 5810 R;
- f) Filtro:
 - PTFE Millipore 0.20 µm.
- g) Cartuchos SPE C-18.

3.3– Análise e seleção dos extratos por CCD e RMN de ¹H

Os extratos metanólico de galhos e diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* foram selecionados após a realização de uma triagem em CCD com 21 extratos brutos presentes nos freezers do laboratório de produtos naturais, os quais já haviam passados por algum estudo fitoquímico preliminar por algum aluno do grupo; apresentaram ou não alguma atividade biológica preliminar ou até mesmo a pesquisa iniciou e por algum motivo foi abandonada sem resultados. Dessa forma, nos extratos brutos selecionados realizou-se RMN de ¹H para poder ter noção das possíveis classes de substâncias presentes.

Na cromatografia de camada delgada utilizou-se como modo de eluição Hexano/Acetato (9:1; 8:2; 7:3; 6:4), Hexano/Acetato/Metanol (7:2:1 e 5:3:2). Como reveladores, utilizou-se lâmpada de luz ultravioleta (λ de 254 e 310 nm) e soluções de vanilina sulfúrica.

3.4– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os extratos brutos foram analisados em fase reversa em cromatografia líquida. As análises foram realizadas em uma coluna analítica PHENOMENEX Gemini 150 x 4,6 mm (5 µm) com temperatura controlada de 25°C.

Primeiramente, pesou-se 26,1 mg do extrato CH₂Cl₂ e 25,8 mg do extrato MeOH, onde ambos foram solubilizados em metanol grau HPLC e submetidos a cartuchos SPE C-18 com 100% do solvente que estavam solubilizados, para retirar

interferentes que poderiam ficar retidos na coluna de fase reversa. Vale salientar que os cartuchos SPE foram previamente ativados com volume de três vezes superior ao seu volume morto.

Após essa etapa, os extratos foram secos e pesados para determinar os rendimentos. Para o primeiro extrato apenas 2,5 mg restou após o pré-tratamento, já o segundo 22,3 mg foi recuperada após SPE, sendo que ambos foram ressuspensos em metanol na concentração de 1 mg/mL e submetido ao filtro PTFE de 0,22 μm .

Como método, utilizou-se gradiente exploratório, com vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μL , nos comprimentos de onda 254, 280, 310 nm, partindo-se de MeOH-H₂O 1:19% para MeOH 100% em 30 min. A condição MeOH 100% foi mantida por 10 min. Então, houve outra mudança na composição da fase móvel, passando-se para MeOH-H₂O 1:19 em 5 min. Esta condição foi mantida por mais 10 min.

Após a análise exploratória dos extratos, optou-se primeiramente continuar o estudo no extrato metanólico por ser melhor para se trabalhar no modo reverso, testando também realizar a análise com acetonitrila. Com isso, o método de análise foi otimizado juntamente com o volume de injeção e realizou-se um fracionamento em HPLC analítico com coletor automático.

Com a otimização, ficou notório que ACN foi mais seletivo, ocasionando melhor resolução no cromatograma em comprimento de onda de 254 nm.

Para coleta, 81,5 mg do extrato bruto foram pesados, solubilizado em metanol e submetidos a SPE após ativado. Em seguida, a solução foi seca e pesada, restando 65 mg do extrato, o qual foi ressuspensionado em 4 mL de ACN/H₂O na proporção 1:1.

O método otimizado utilizado partiu de ACN-H₂O 2:23% para ACN-H₂O 1:1% em 20 minutos, após 5 minutos a rampa chega em ACN 100%, a qual perdura por mais 5 minutos. Após esses 30 minutos, ocorre a mudança de composição de fase móvel, passando para ACN-H₂O 2:23% em 3 minutos, a qual permanece por 8 minutos condicionando a coluna para uma nova injeção.

3.5 – Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)

O equipamento de cromatografia de partição centrífuga (CPC) do laboratório de produtos naturais não é completo, possui apenas a coluna de fase estacionária de 1 litro da marca Armen. Sendo assim, foi necessário o acoplamento

em um HPLC-Shimadzu com detector UV-DAD, para o total funcionamento. Onde as bombas do HPLC e detector são utilizados e a coleta é realizada manualmente.

Para a utilização da técnica foi necessário passar por um treinamento, onde foi gerado um passo a passo para melhor utilização, conservação e separação, conforme podemos ver na FIGURA 07.

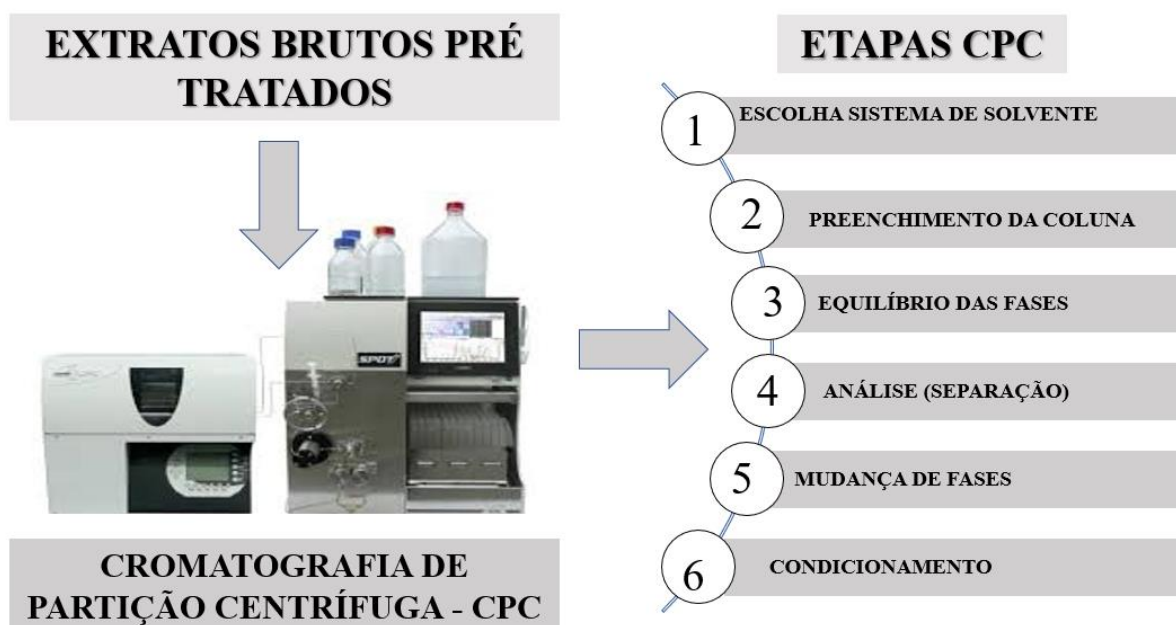


FIGURA 07: Esquema para utilização do CPC.

Após o treinamento, foram estipulados seis passos para a utilização do equipamento do laboratório, onde a primeira etapa é uma das mais importantes para o sucesso na separação, uma vez que o loop de injeção é de 30 mL e suporta até 30 gramas de extrato, além de que a coluna é de 1 litro de solvente e em uma análise cromatográfica a quantidade de solventes utilizados pode variar entre 6 a 12 litros.

A etapa de escolha de solvente é realizada em bancada, podendo ser rápida ou até durar 90% do tempo da pesquisa, onde deve ocorrer uma seleção de 2 ou mais solventes imiscíveis, onde serão colocados em tubos de ensaio com tampa, ou até mesmo tubos do tipo Falcon, serão agitados por 2 minutos para formação das fases e em seguida cerca de 20 ou mais mg de extrato bruto serão adicionados e agitado por mais 2 minutos, esperando a partição de forma homogênea em ambas fases.

Para uma melhor análise da partição, é recomendado separar as fases superior e inferior formadas com extrato bruto em frascos para pesar e assim calcular o coeficiente de partição, bem como, realizar a análise das fases superior e inferior

em CCD, comparando com o extrato bruto e por fim realizar análise em HPLC das fases para assim realizar uma comparação mais eficiente das substâncias nas fases.

As próximas etapas ocorrem no equipamento, sendo que o preenchimento da coluna é realizado com a injeção de fase estacionária para a coluna do equipamento com rotação de 500 rpm da coluna, já o equilíbrio ocorre com a mudança de fases de solvente e é realizado através da injeção de fase móvel e é acompanhada através da coleta em uma proveta com rotação acima de 1000 rpm da coluna, para assim saber quando as fases irão equilibrar através da formação de 2 fases na proveta. Após equilibrar as fases, a análise (corrida) é realizada com a injeção de fase móvel por tempo, fluxo e rotação da coluna determinado pela pessoa responsável pela análise.

Ao final do tempo estipulado na corrida, deve ocorrer a mudança de fases de solvente de móvel para estacionária para assim garantir que toda amostra será coletada. Esta etapa é conhecida com extrusão ou coleta de fase estacionária. No final da extrusão, a última etapa começa e é a injeção de 100% metanol na coluna, para assim conservar a mesma e evitar fungar.

3.6 – Ensaios Biológicos

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

O ensaio frente as formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – UNESP – Rio Claro/SP (FIGURA 08) sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.



FIGURA 08 - Vista geral do formigueiro de *Atta sexdens* mantido no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) – IBRC - UNESP.

Para a realização dos ensaios, 50 formigas foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório, sendo distribuídas em 5 placas de petri, contendo 10 formigas cada (FIGURA 09).



FIGURA 09 - Operárias de *Atta sexdens* submetidas ao tratamento com o ingrediente ativo incorporado em dieta artificial.

Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada uma dieta sólida constituída por: 5,0% de glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico e 100 mL de água destilada. Após serem misturados os constituintes, a dieta foi aquecida no forno de microondas por 4 minutos, em seguida foi autoclavada à 120°C e 1 atm por 15 minutos. A dieta ainda líquida foi entornada em placas de petri de 10 cm de diâmetro, que após resfriamento e solidificação foram embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subsequentes durante o período do experimento. Para a realização do teste foi estipulado um período máximo de 25 dias.⁴⁷

Por fim, as placas foram colocadas em estufa com temperatura de 25 ± 1 °C e umidade relativa acima de 70,0% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico log-rank ($p < 0,05$), utilizando-se o software GraphPad, aplicativo Prisma 3.0.

3.6.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

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

O fungo foi isolado de um ninho de formigas cortadeiras *A. sexdens rubropilosa* e mantido em condições de laboratório por passagens mensais no meio

de cultura constituído por extrato de malte (20 g/L), peptona (5 g/L) extrato de levedura (2 g/L) e ágar (20 g/L).

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

Os testes com as amostras foram preparados em quintuplicata, sendo que, o tempo de incubação foi de aproximadamente 30 dias, a 25°C (± 2), onde após isso foram realizados os cálculos das áreas do crescimento micelial do fungo simbiote em cada amostra. As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbiote dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbiote.

4. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Análise dos extratos por CCD, RMN ¹H e separação no HPLC

A partir da triagem de 21 extratos brutos (TABELA 01), com auxílio de cromatografia de camada delgada (FIGURA 10, apresentando 7 extratos brutos, sendo que o 1 é extrato diclorometânico das folhas e 7 o extrato metanólico dos galhos de *Picramnia Glazioviana*), os extratos brutos foram selecionados para o desenvolvimento do trabalho da dissertação de mestrado baseados na distribuição das substâncias em CCD de sílica C18 e sílica normal, visando selecionar extrato que apresentasse substâncias de média e alta polaridade.

TABELA 01: Triagem dos extratos brutos do laboratório de produtos naturais

EXTRATOS	SOLVENTE	PARTE DA PLANTA
<i>Picramnia riedelli</i>	METANOL	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	HEXANO	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	DICLORO	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	METANOL	GALHOS
<i>Picramnia riedelli masculino</i>	DICLORO	FOLHAS
<i>Picramnia riedelli feminina</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Picramnia riedelli feminina</i>	ÉTER DE PETRÓLEO	FOLHAS
<i>Picramnia glazioviana</i>	METANOL	GALHOS
<i>Picramnia glazioviana</i>	DICLORO	FOLHAS
<i>Picramnia parvifolia</i>	DICLORO	CAULE
<i>Picramnia parvifolia</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Picramnia parvifolia</i>	METANOL	CAULE
<i>Picramnia ciliata</i>	ETANOL	GALHOS
<i>Picramnia ciliata</i>	ETANOL	FOLHAS
<i>Picramnia sellowii</i>	ETANOL	GALHOS
<i>Picramnia sellowii</i>	HEXANO	GALHOS
<i>Picramnia orática</i>	ETANOL	GALHOS
<i>Picramnia sp</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Toona ciliata</i>	HEXANO	FOLHAS
<i>Toona ciliata</i>	METANOL	FOLHAS
<i>Picramnia guilherminiana</i>	DICLORO	FOLHAS

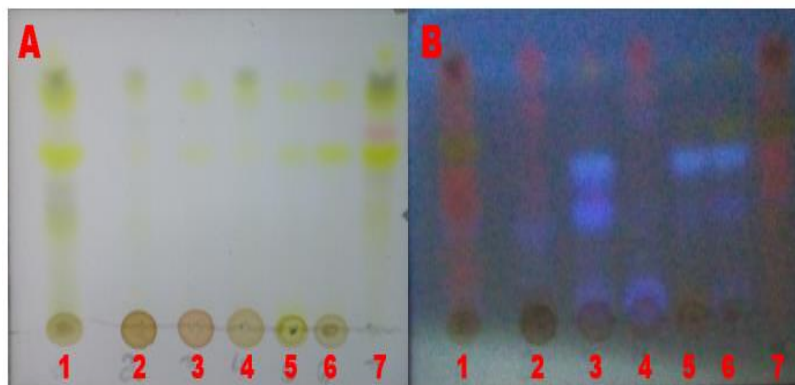


FIGURA 10 – Triagem dos extratos brutos através de CCD. Sendo que: **A**: 7 extratos brutos eluídos em CCD de sílica C18; **B**: 7 extratos brutos eluídos em CCD de sílica C18 revelados em UV de λ 254 nm;

Após seleção dos extratos, ocorreu a análise em RMN de ^1H (FIGURAS 11 e 12) para obter informações de possíveis classes de substâncias através dos deslocamentos químicos na região dos sinais e prótons aromáticos, como também na região de açúcares, que podem indicar compostos glicosilados e também deslocamentos acima de 10 ppm que podem ser referentes a aldeídos e ácidos carboxílicos.

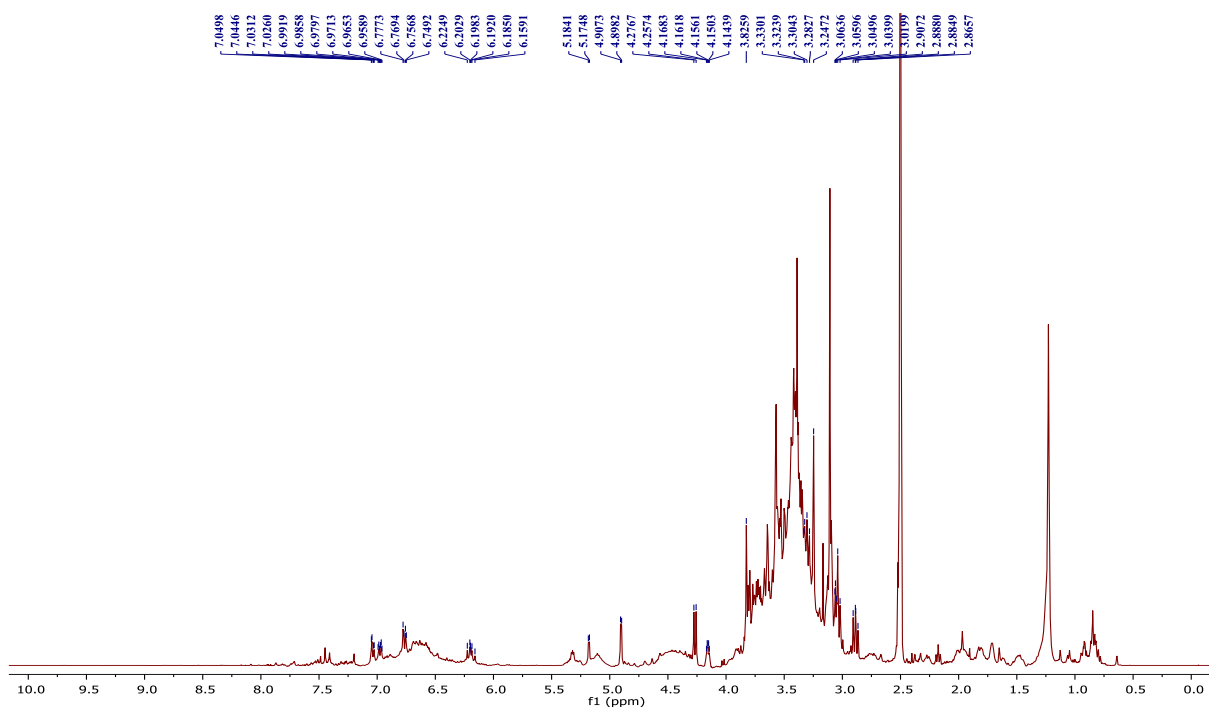


FIGURA 11 – RMN de ^1H do extrato metanólico dos galhos em DMSO- d_6 em equipamento de 9,4 T.

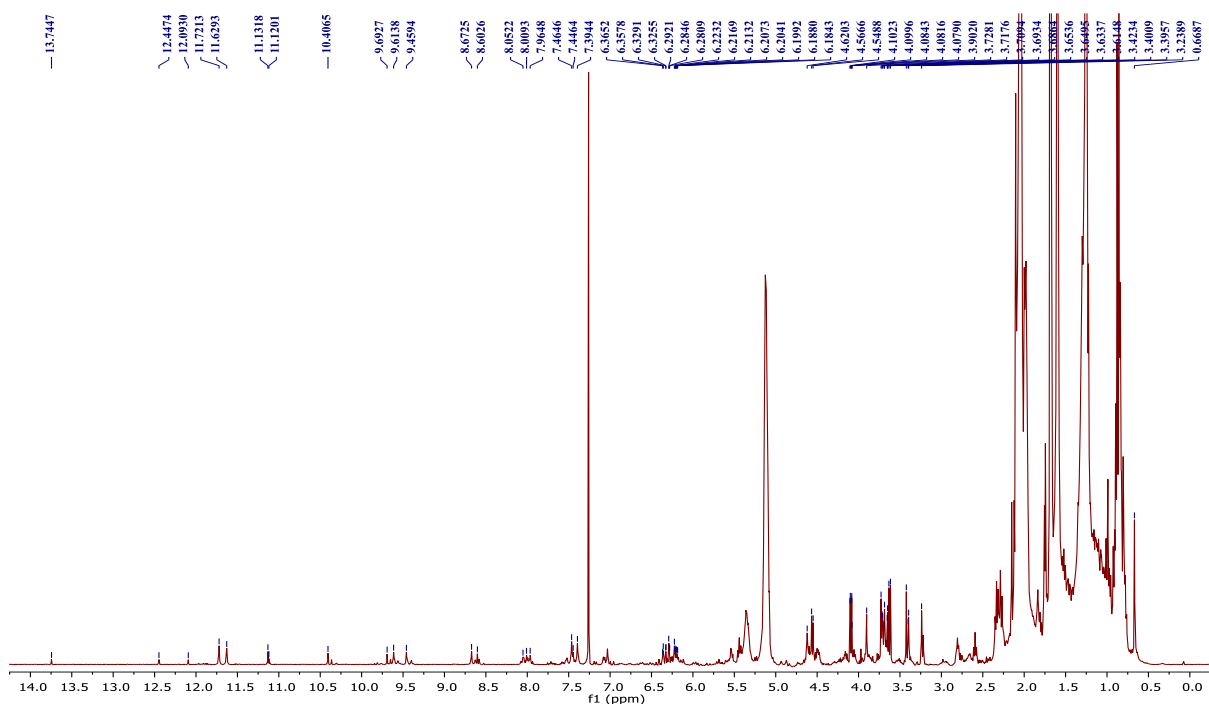


FIGURA 12 – RMN de ^1H do extrato diclorometânico das folhas em CDCl_3 em equipamento de 9,4 T.

Nos espectros de RMN podemos notar deslocamentos químicos característicos de antraquinonas, cumarinas, triterpenos, ácidos carboxílicos e aldeídos.

Por fim, ocorreu a análise de um gradiente exploratório dos extratos brutos em questão no HPLC analítico, conforme FIGURA 13, e posteriormente o método exploratório foi otimizado para o extrato metanólico dos galhos, devido os equipamentos do laboratório trabalharem com colunas de fase reversa, e assim um fracionamento foi realizado no equipamento.

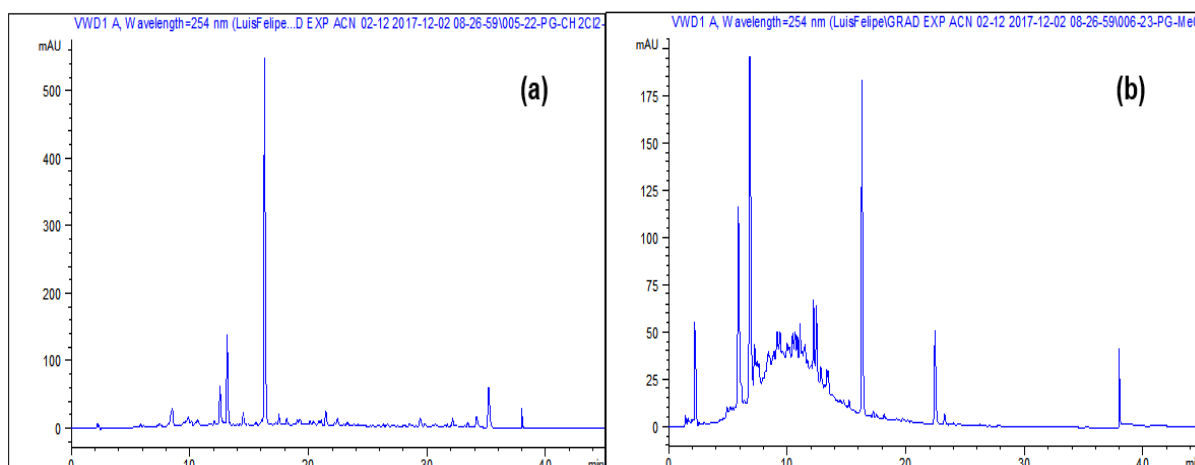


FIGURA 13 – Cromatogramas do gradiente exploratório dos extratos de *Picramnia glazioviana*. (a) Extrato diclorometânico de folhas; (b) Extrato metanólico de galhos. Sendo que ambos estão em comprimentos de onda de 254 nm e passaram pelo método descrito no item 3.4 da página 11.

Com o fracionamento realizado foram coletadas 19 frações, com 42 repetições sucessivas. A TABELA 02, apresenta as massas obtidas das frações e posteriormente quais substâncias foram identificadas.

TABELA 02 - Massa das frações obtidas do extrato metanólico dos galhos de *Picramnia glazioviana* no HPLC

FRAÇÕES	MASSA (mg)
1	0,6
2	1,5
3	1,2
4	2,1
5	1,3
6	2,1
7	1,3
8	1,8
9 – Crisofanol-8-glucoside	2,8
10	1,8
11	1,9
12	1,2
13	1,4
14	1,5
15	1,6
16	1,4
17	2,5
18 – Crisofanol	3,0
19 – Aloe-Emodina	3,5

Das frações coletadas do extrato bruto metanólico dos galhos, através de RMN de ^1H foi observado que apenas 3 substâncias apresentaram maior pureza e massa para análises de RMN e, dessa forma, foram caracterizadas comparando com dados da literatura.

4.2 – Substâncias isoladas e identificadas no extrato metanólico dos galhos de *Picramnia glazioviana*

Através da coleta realizada no HPLC analítico do extrato metanólico dos galhos de *Picramnia glazioviana*, três substâncias puderam ser identificadas por RMN e HRMS-MS/MS, onde o esqueleto base das estruturas pode ser visto na FIGURA 14 abaixo.

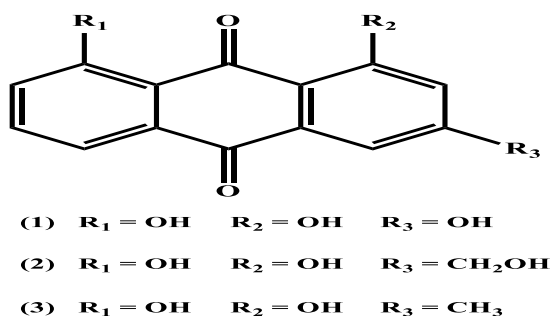


FIGURA 14 – Substâncias identificadas no extrato metanólico de galhos de *Picramnia glazioviana*.

4.2.1 – Caracterização da substância **1** (Aloe-emodina)

A substância **1** (Aloe-Emodina) (FIGURA 15) foi caracterizada a partir da análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C juntamente com a comparação destes dados com aqueles reportados na literatura.⁴⁸

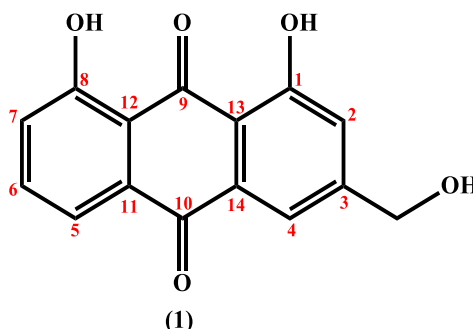


FIGURA 15 - Substância aloe-emodina identificada no extrato metanólico de galhos de *Picramnia glazioviana*

A análise do espectro de RMN de ^1H de **1** (ANEXO 1) revelou a presença de cinco sinais de deslocamento químico na região de hidrogênios aromáticos e/ou olefínicos com padrões de substituição característico de antraquinonas, com os deslocamentos químicos de hidrogênio na região de δ 8,00 a δ 7,30, além de um sinal em δ 4,62 que integra para dois hidrogênios sugerindo assim a presença de hidrogênios oxi-metilênicos.

No espectro de RMN de ^{13}C de **1** (ANEXO 2) foi possível identificar 15 carbonos, sendo eles cinco carbonos aromáticos ligados a hidrogênios, cinco carbonos aromáticos totalmente substituídos, dois carbonos aromáticos oxigenados e dois carbonos acílicos.

A partir da análise dos desses dados (TABELA 03), juntamente com a comparação destes com aqueles descritos na literatura⁴⁸, foi possível caracterizar **1** como sendo aloe-emodina.

A análise do espectro de massas para **1** (ANEXO 3) revelou que a partir do cálculo do erro 0,5 juntamente com a proposta de fragmentação (FIGURA 16) para essa substância foi determinado a fórmula molecular como sendo $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$ a partir do íon precursor $[\text{M}-\text{H}]^- = 269,0450$.

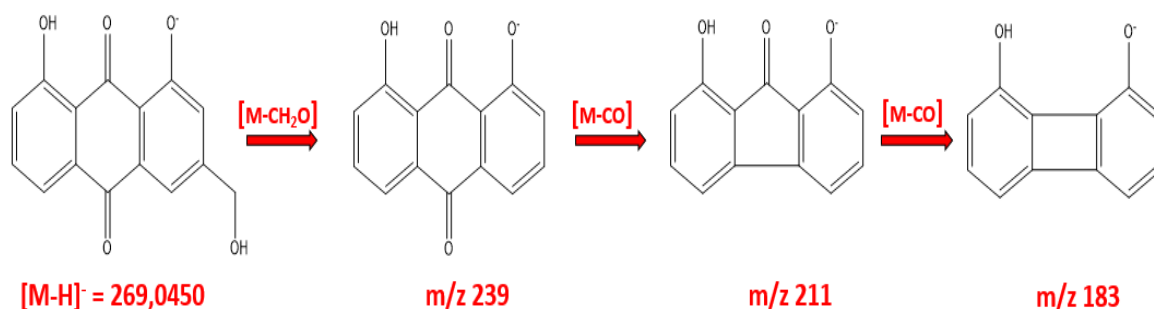


FIGURA 16 - Proposta de fragmentação de **1** (Aloe-emodina) por HRMS-MS/MS

TABELA 03 - Dados de RMN de 1H e de ^{13}C de **1** (Aloe-emodina) (DMSO- d_6 , 14,1 T).

Posição	δ_H de 1	δ_H de Aloe-emodin ⁴⁸	δ_C de 1	δ_C de Aloe-emodin ⁴⁸
1	-	-	161,9	161,5
2	7,29 (<i>d</i> , 1,4 Hz)	7,30 (<i>d</i> , 1,7 Hz)	121,1	120,6
3	-	-	153,9	153,6
4	7,69 (<i>d</i> , 1,5 Hz)	7,71 (<i>d</i> , 1,7 Hz)	117,4	117,0
5	7,72 (<i>dd</i> , 1,2 e 7,5 Hz)	7,73 (<i>dd</i> , 1,2 e 7,6 Hz)	119,7	119,2
6	7,80 (<i>dd</i> , 7,5 e 8,4 Hz)	7,81 (<i>dd</i> , 7,6 e 8,3 Hz)	137,7	137,2
7	7,37 (<i>dd</i> , 1,2 e 8,4 Hz)	7,38 (<i>dd</i> , 1,2 e 8,3 Hz)	124,8	124,2
8	-	-	161,6	161,2
9	-	-	191,9	191,5
10	-	-	181,9	181,4
11	-	-	133,6	133,3
12	-	-	116,2	116,8
13	-	-	114,8	114,4
14	-	-	133,4	133,1
CH ₂ OH	4,62 (<i>sl</i> , 3,4 Hz)	4,63 (<i>sl</i>)	62,4	62,0

* - Ambos os dados de RMN de 1H e ^{13}C estão no mesmo solvente

A substância aloe-emodina já tem relatado na literatura grande potencial para aplicações biológicas, apresentando atividade inseticida, fungicida, mutagênica.

4.2.2 – Caracterização da substância **2** (Crisofanol)

A caracterização da substância **2** (FIGURA 17) deu-se a partir da análise dos espectros de RMN de 1H e de ^{13}C , bem como da similaridade dos dados desta com aquelas já discutidas anteriormente para **1**, além da comparação com aqueles já relatados na literatura.⁴⁹

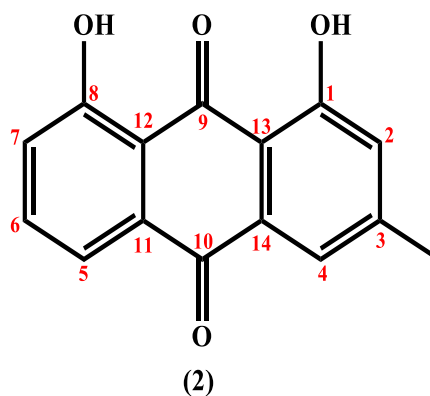


FIGURA 17 – Substância crisofanol identificada no extrato metanólico de galhos de *Picramnia glazioviana*.

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H de **2** (ANEXO 4), evidenciou a presença da mesma quantidade de sinais de deslocamentos químicos na região de hidrogênios aromáticos, diferindo apenas no sinal do hidrogênio oximetilênico, para um hidrogênio metílico.

A presença de um grupo metílico também pode ser verificada pela ausência do sinal em δ 62,7 e o aparecimento de um sinal de δ 21,9 conforme observado no mapa de contornos HSQC (ANEXO 5).

A análise do mapa de contornos HMBC (ANEXO 6) revelou a ligação do grupo metílico entre dois carbonos aromáticos (δ 149,8; 124,8 e 121,2) comprovando assim a proposta da posição deste grupo.

Além disso, a análise do espectro de massas de alta resolução HRMS-MS/MS (ANEXO 7) revelou a partir do cálculo do erro 1,58 ppm e da fórmula molecular que confirma a caracterização da substância como sendo crisofanol (**2**).

4.2.3 – Caracterização da substância **3** (Crisofanol-8-glucoside)

A caracterização da substância **3** (FIGURA 18) deu-se principalmente pela análise dos espectros de RMN de ^1H , HSQC, HMBC, e de HRMS-MS/MS, assim como a partir da comparação destes dados com aqueles reportados na literatura.⁴⁹

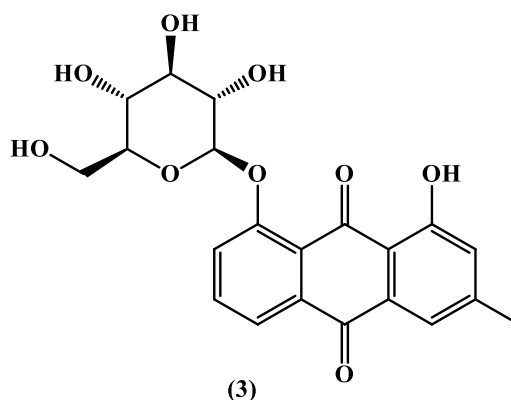


FIGURA 18 – Substância crisofanol-8-glucoside identificado no extrato metanólico de galhos de *Picramnia glazioviana*.

A partir da análise do espectro de RMN de ^1H (ANEXO 8) foi possível verificar o mesmo sistema de acoplamento observado para (2) e com isso foi possível sugerir uma substância muito similar ao crisofanol. Com o sinal do hidrogênio aromático em δ 7,87 enquanto para o crisofanol tem-se δ 7,37, evidenciou um efeito de desblindagem γ .

Os sinais referentes à aglicona puderam ser melhor evidenciados quando analisado o mapa de contornos HSQC (ANEXO 9), quando pode-se determinar os carbonos desta unidade (δ 100,2; 73,0; 76,4; 69,3; 77,1 e 60,4), em consonância com aqueles descritos na literatura.⁵⁰

A posição de ligação do glicosídeo com a unidade de crisofanol foi confirmada pela correlação chave do experimento de HMBC (ANEXO 10) entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,16 com o carbono em 158,3.

A partir do espectro de massas do íon extraído 415,1027 $[\text{M}-\text{H}]^-$ teve sua fórmula calculada $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$ sendo crisofanol-8-glucoside com um erro de 0,48 ppm (ANEXO 11). Pode-se confirmar a unidade de açúcar também pela perda desta quando observado o fragmento $[\text{M}-\text{Glu}]^- = 253$ e a partir deste íon filho a perda de $[\text{M}-\text{CO}]^- = 225$, sendo uma perda característica na classe das antraquinonas.

4.3 – Separação do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* utilizando o CPC

Após realizar diversas tentativas de se encontrar um sistema de solvente ideal para separação dos extratos metanólico de galhos e diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*, dois sistemas foram selecionados, conforme FIGURA 19.

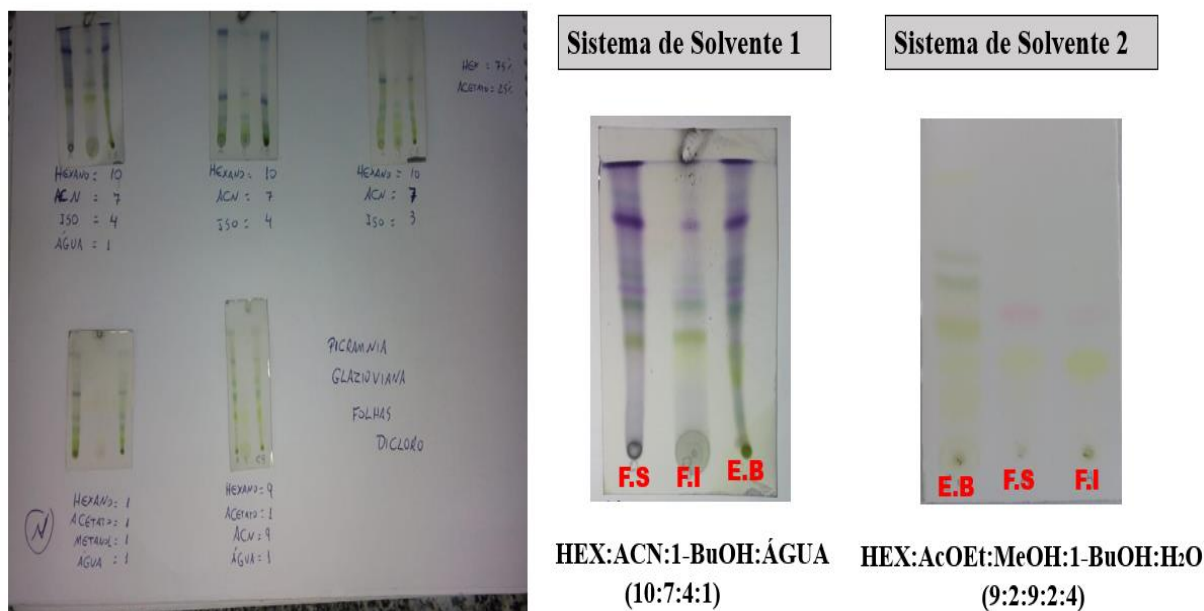


FIGURA 19 - CCD para escolha do sistema de solvente ideal para o CPC dos constituintes do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* eluídos em CCD de sílica normal com HEX/Acetato (7:3). Sendo que: E.B: Extrato bruto. F.S: Fase Superior. F.I: Fase Inferior.

Os sistemas de solventes foram analisados por CCD e HPLC (FIGURA 20), e foi realizado o cálculo de distribuição para o extrato nas fases imiscíveis do sistema de solvente escolhido.

CCD DO SISTEMA DE SOLVENTE 2



HEX:AcOEt:MeOH:N-BuOH:H₂O (9:2:9:2:4)

CROMATOGRAMA DAS FASES ALTA E BAIXA

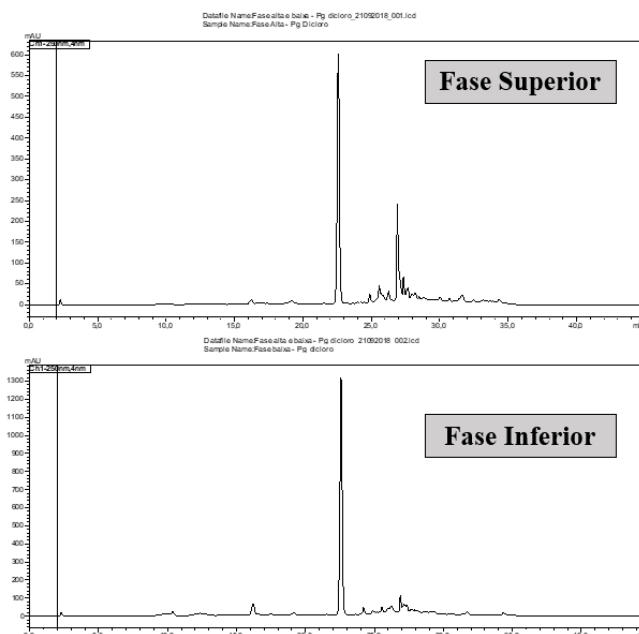


FIGURA 20 - Escolha do sistema de solventes 2, baseado em CCD eluídos sílica normal com HEX/Acetato (7:3) e HPLC para a CPC dos constituintes do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*. Sendo que: E.B: Extrato bruto. F.S: Fase Superior. F.I: Fase Inferior.

Após análise da separação acima, ocorreu somente a separação com o sistema de solvente 1 (FIGURA 21), onde em 30 mL do sistema de solvente tentou-se solubilizar 3 gramas de extrato bruto, no entanto, apenas cerca de 1.1 grama de extrato diclorometânico das folhas foram solubilizados, ocorrendo assim o fracionamento, gerando 55 frações na análise (TABELA 04), as quais foram comparadas por CCD e RMN de ^1H . Vale salientar que ocorreu a corrida cromatográfica com apenas 1 sistema de solvente devido o tempo curto que ainda restava de mestrado, bem como, a minha dificuldade para caracterização de algumas substâncias.

A partir da análise das cromatoplasmas da fase móvel reveladas com vanilina sulfúrica (FIGURA 21) foi possível verificar algumas classes de substâncias como antraquinonas, cumarinas e/ou fenilpropanoides e triterpenos.

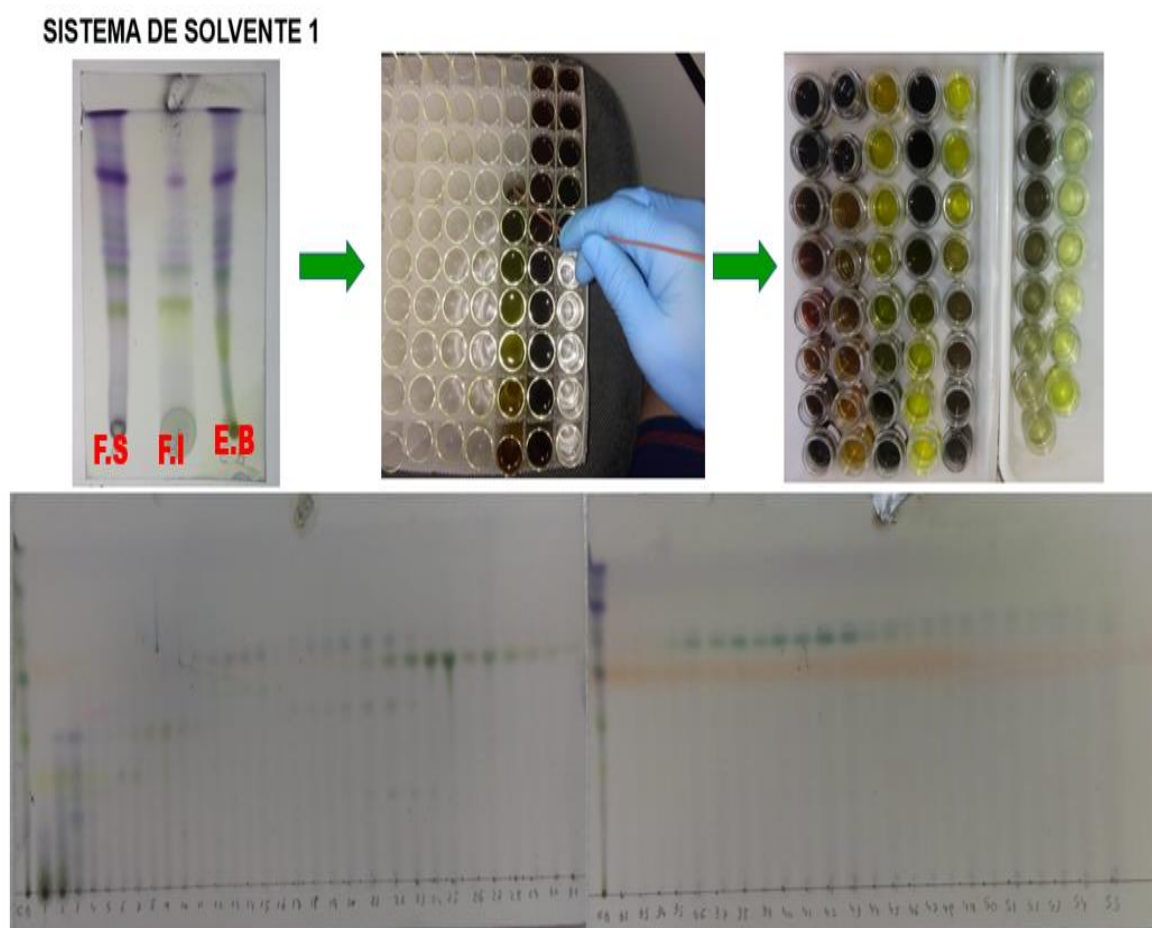


FIGURA 21 - Separação do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* acompanhado por CCD eluído em HEX/ACETATO (7:3), revelado em vanilina sulfúrica. Sendo que: E.B: Extrato bruto. F.S: Fase Superior. F.I: Fase Inferior.

TABELA 04 - Massas das frações obtidas na corrida do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* no CPC

FRAÇÕES	MASSA (mg)	FRAÇÕES	MASSA (mg)	FRAÇÕES	MASSA(mg)
1	89,3	21	3,7	41	4,3
2	105,8	22	4,6	42	3,9
3	32,1	23	5,7	43	3,5
4	17,4	24	7,1	44	3,3
5	13,4	25	9	45	2,9
6	10,6	26	8,2	46	3,1
7	10,2	27	6,7	47	2,7
8	12,4	28	4,4	48	2,8
9	13,2	29	3,2	49	2,7
10	7,4	30	2,3	50	2,9
11	4,8	31	2	51	2,7
12	4,6	32	3,1	52	2,8
13	5,4	33	3,5	53	2,5
14	5,5	34	3,9	54	2,2
15	4,6	35	3,5	55	3,7
16	3,7	36	4,1		
17	3,2	37	4,1		
18	2,6	38	3,9		
19	2,6	39	4,5	TOTAL:	489,6 mg
20	3,3	40	4		

Além da coleta da fase móvel, ocorreu a coleta da fase estacionária com 34 frações contabilizando 412,8mg de extrato, a qual foi acompanhada por CCD e RMN de ^1H , comprovando a também separação, conforme FIGURA 22.

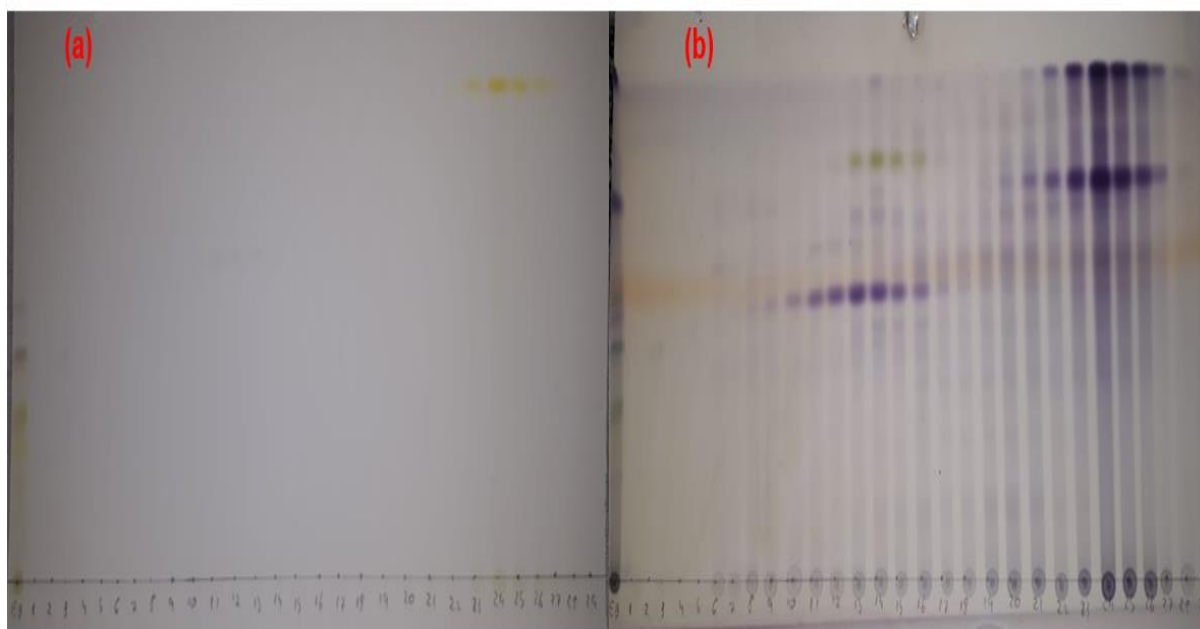


FIGURA 22 - Separação da extrusão do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* acompanhado por CCD eluídos sílica normal com HEX/Acetato (7:3). (a) CCD sem revelação; (b) CCD revelada com vanilina sulfúrica.

Com isso, houve a seleção de algumas frações da corrida e da extrusão para a realização de CCD (FIGURA 23) e RMN de ^1H , comprovando a separação das substâncias, bem como, seleção de algumas frações para trabalhos futuros.

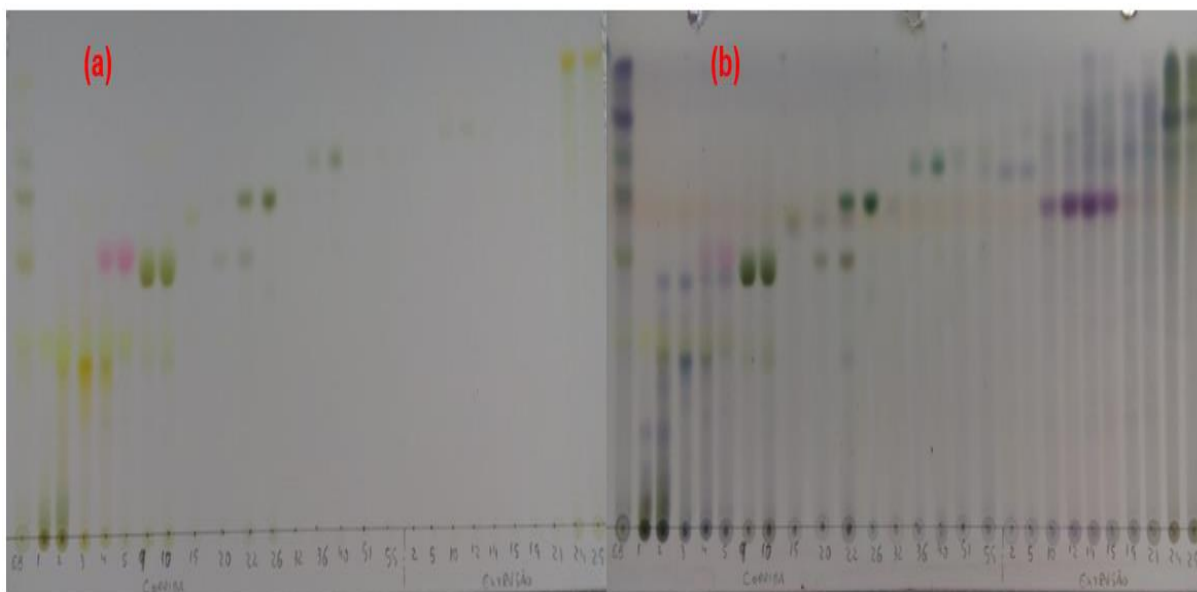


FIGURA 23 - Comparação através de CCD eluídos sílica normal com HEX/Acetato (7:3) da separação das fase móvel (corrida) e fase estacionária (extrusão) do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*, sendo que, do total analisado o primeiro refere-se ao extrato bruto, as 16 frações seguintes a corrida e as 10 últimas a extrusão. (a) CCD sem revelação; (b) CCD revelada com vanilina sulfúrica.

Sendo assim, a técnica de cromatografia de partição centrífuga pode ser eficiente em separação de extratos/substâncias em grande escala, bem como, apresenta um ótimo rendimento de recuperação de extrato comparadas com algumas técnicas de cromatografia mais tradicionais.

4.3.1 – Análise das Frações da Separação da Fase Móvel por RMN de ^1H (CORRIDA)

Algumas frações resultantes do fracionamento por CPC da fase móvel foram selecionadas e analisadas por RMN de ^1H . Sendo assim, os espectros de RMN ^1H das frações 3 e 5 oriundas do CPC (ANEXO 12 e ANEXO 13) apresentaram sinais semelhantes e característicos de antraquinonas já identificadas e relatadas anteriormente, com os deslocamentos químicos de hidrogênio na região de δ 8,00 a δ 7,30, além de sinais na região em torno de 6,30 e de δ 7.70 característicos de cumarinas, e outros sinais na região de hidrogênios alifáticos, característicos de

triterpenos (vários singletos na região δ 0,80 a δ 1,2), que já foram descritos para este gênero.^{51,52}

Os espectros das frações 9, 10, 15 (ANEXOS 14 a 16, respectivamente) da referida corrida, além de sinais característicos de clorofila singletos na região de δ 10,92 (relativo a função aldeído) a δ 8,30 e δ 6,00 a δ 6,40, ambas as frações apresentam sinais de metilas e de hidrogênios metilênicos característicos de estruturas de triterpenos. Estas frações apresentam ainda sinais de deslocamentos químicos de hidrogênio idênticos da antraquinona já isolada (Crisofanol, discutido no item 4.2.1 e 4.2.2) diferindo apenas em relação ao efeito de blindagem do sinal de hidrogênio da posição 7, e a presença de sinais de hidrogênios nas regiões de δ 4,00 e δ 5,10 que são características de antraquinonas mono e di-glicosiladas^{51,52}. Estas frações apresentam também sinais característicos de hidrogênio quelados das antraquinonas na região acima de δ 11,0.

A partir dos espectros de RMN de ^1H das frações 20, 26 e 32 (ANEXOS 17 a 19), verificou-se semelhanças com as frações 9, 10 e 15, porém aparecem alguns sinais de deslocamentos químicos de hidrogênio que poder-se-ia inferir pertencer a estruturas de triterpenos e a ausência δ característicos de antraquinonas na fração 26.

As frações 40 e 50 (ANEXOS 20 e 21), a partir do espectro de RMN de ^1H , indica a presença de clorofila na fração 40, como discutido nas frações anteriores e ambas apresentam sinais de deslocamento químicos majoritários característicos de triterpenos mais oxidados (vários singletos na região δ 0,80 a δ 1,2 e multipletos nas regiões de δ 2,2 a δ 2,6 e δ 4,1 a δ 4,8) corroborando com as informações que o grupo de pesquisa tem alcançado no isolamento de triterpenos.^{51,52}

4.3.2 – Análise das Frações da Separação da Fase Estacionária por RMN de ^1H (EXTRUSÃO)

A partir da análise dos espectros de RMN de ^1H das frações da CPC da fase estacionária, algumas foram selecionadas para discussão quanto às classes de substâncias, sendo que as mesmas classes foram encontradas na CPC da fase móvel.

Nas frações 12 e 15 provenientes da extrusão possuem majoritariamente sinais de deslocamentos químicos de triterpenos. Pode-se observar a partir da fração 12 e 15 (FIGURAS 24 e 25), 3 sinais em δ 3,3 e δ 3,7 que são

característicos de hidrogênios ligados a carbono carbinólicos, normalmente atribuídos à posição 3 de triterpenos e esteróides, e posição 4 dos triterpenos. Além disso, é evidente a presença de grupos olefínicos que possuem deslocamentos químicos em δ 5,32 e δ 5,39 característicos de olefinas entre os carbonos 11 e 13 de triterpenos. Enquanto, na região de deslocamento químico de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , é possível verificar a presença de grupos metílicos, através dos sinais de deslocamentos químicos na faixa de δ 0,70 e δ 1,20, além daqueles ligados a dupla ligação, entre δ 2,54 e δ 2,20.

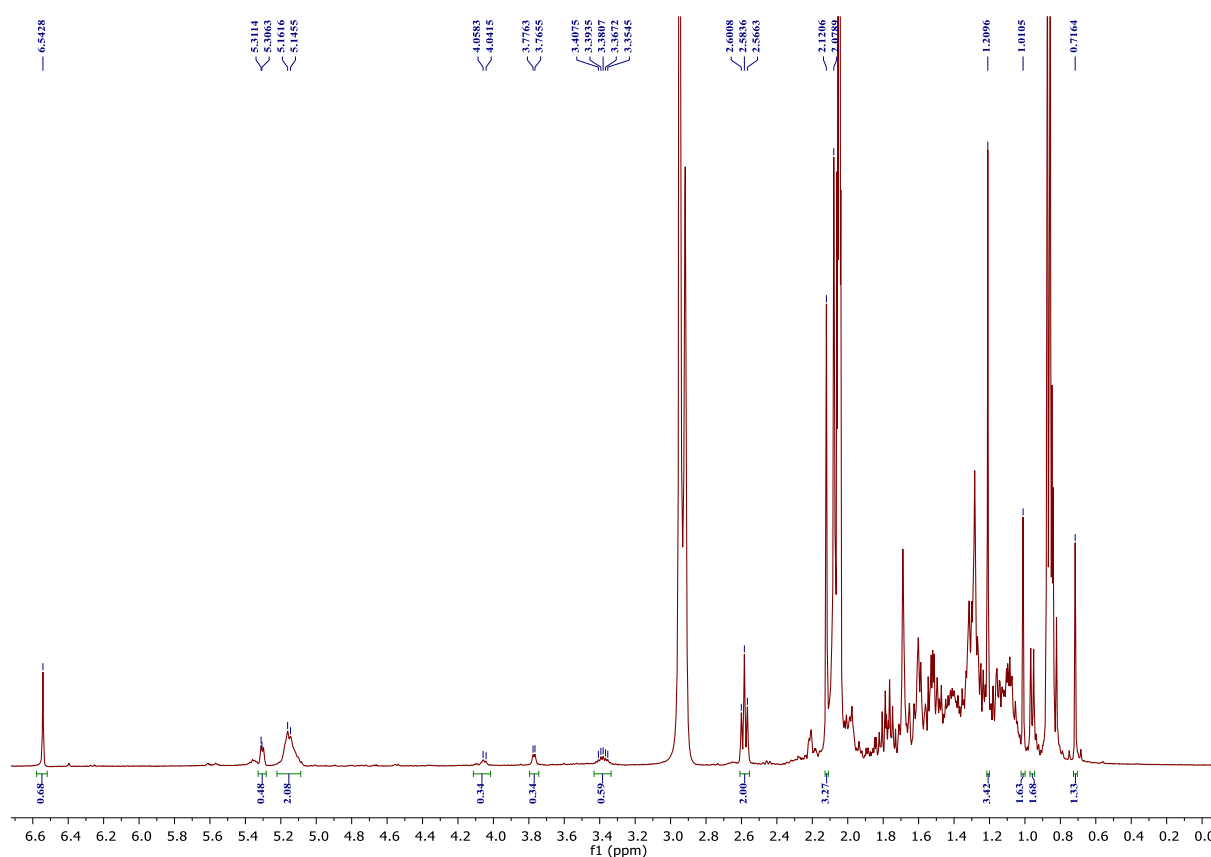


FIGURA 24 - Espectro de RMN de 1H da fração 15 da extrusão do CPC [(CD_3) $_2CO$, 9,4 T]

Assim, quando comparado o espectro de RMN da fração 15 com a fração 12 (FIGURA 25), observou-se poucas diferenças, como mudanças no deslocamento químico de hidrogênios metilênicos, além de pequenas alterações nos deslocamentos dos sinais referentes às metilas.

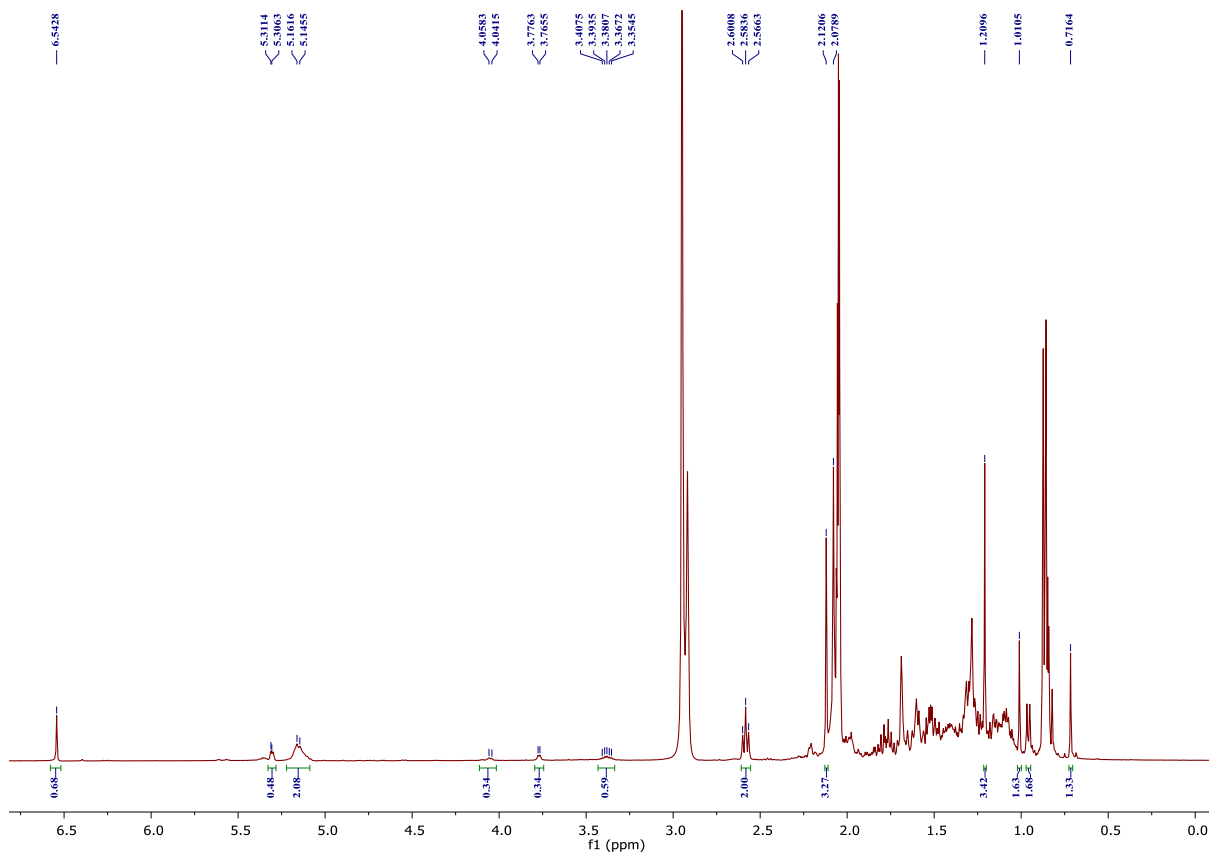


FIGURA 25 - Espectro de RMN de ^1H da fração 12 da extrusão do CPC $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}, 9,4 \text{ T}]$

A partir da análise dos sinais de RMN de ^1H das frações 23 e 26 da extrusão, (FIGURA 26), verificou-se pequenas diferenças de deslocamento de sinais na região de hidrogênios alifáticos. Contudo, a comparação dos deslocamentos dos sinais na região de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos e/ou olefínicos foi evidente, conforme destacado na FIGURA 26.

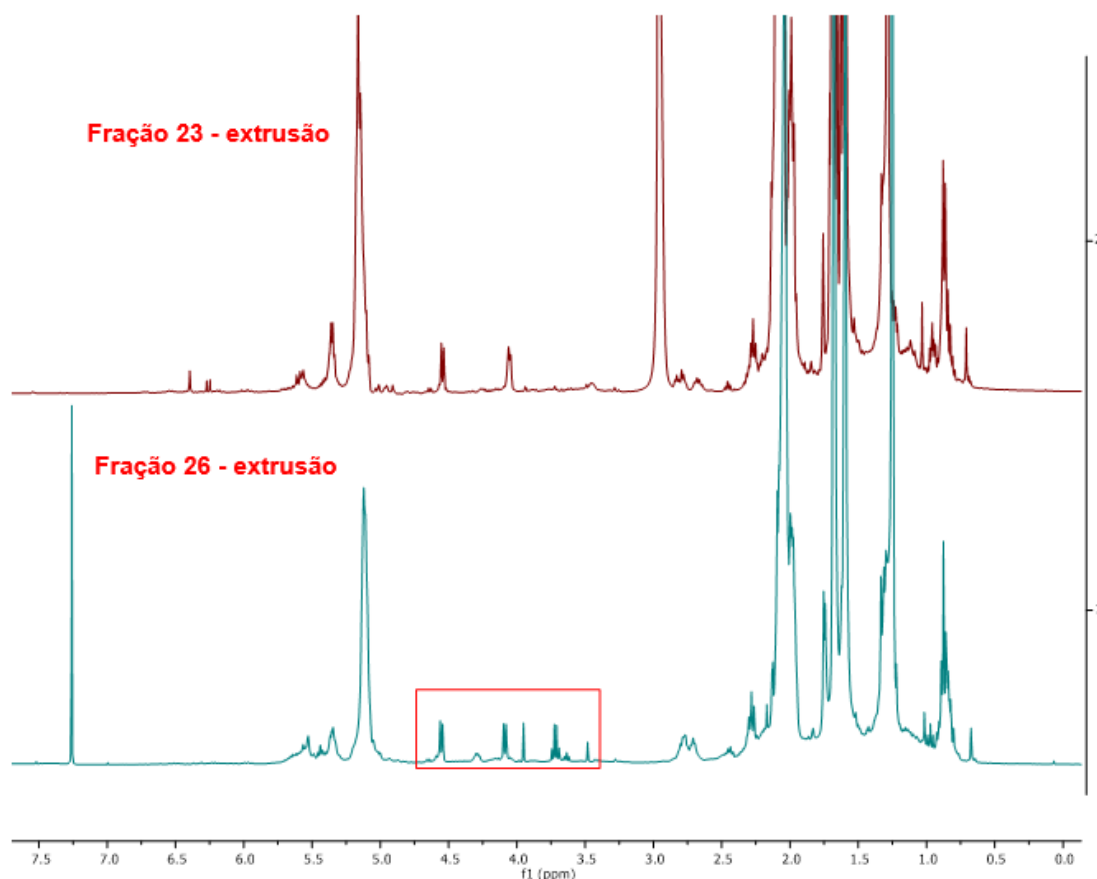


FIGURA 26 - Comparação dos espectros de RMN de ^1H das frações 23 e 26 da extrusão, respectivamente.

Sendo assim, através da análise de RMN da separação obtida no CPC, podemos verificar frações que apresentam classes de substâncias bem distintas ao longo da corrida, e assim, a técnica de separação de CPC pode ser muito útil na separação de extratos brutos para conseguir frações enriquecidas e/ou substâncias puras de interesse.

4.4 – Ensaios biológicos

Os resultados obtidos com os extratos brutos de *Picramnia glazioviana* frente as formigas cortadeiras e o fungo simbiote revelam serem promissores para continuidade de trabalhos futuros e serão separados em dois subtópicos para melhor compreensão e entendimento.

4.4.1 – Ensaio de toxicidade frente as formigas cortadeiras

Ao analisar a FIGURA 27 e TABELA 05 pode-se observar a atividade dos extratos brutos frente as formigas. Os códigos PG231 e PG232 referem-se ao

extrato diclorometânico das folhas, e os códigos PG031 e PG032 referem-se ao extrato metanólico dos galhos.

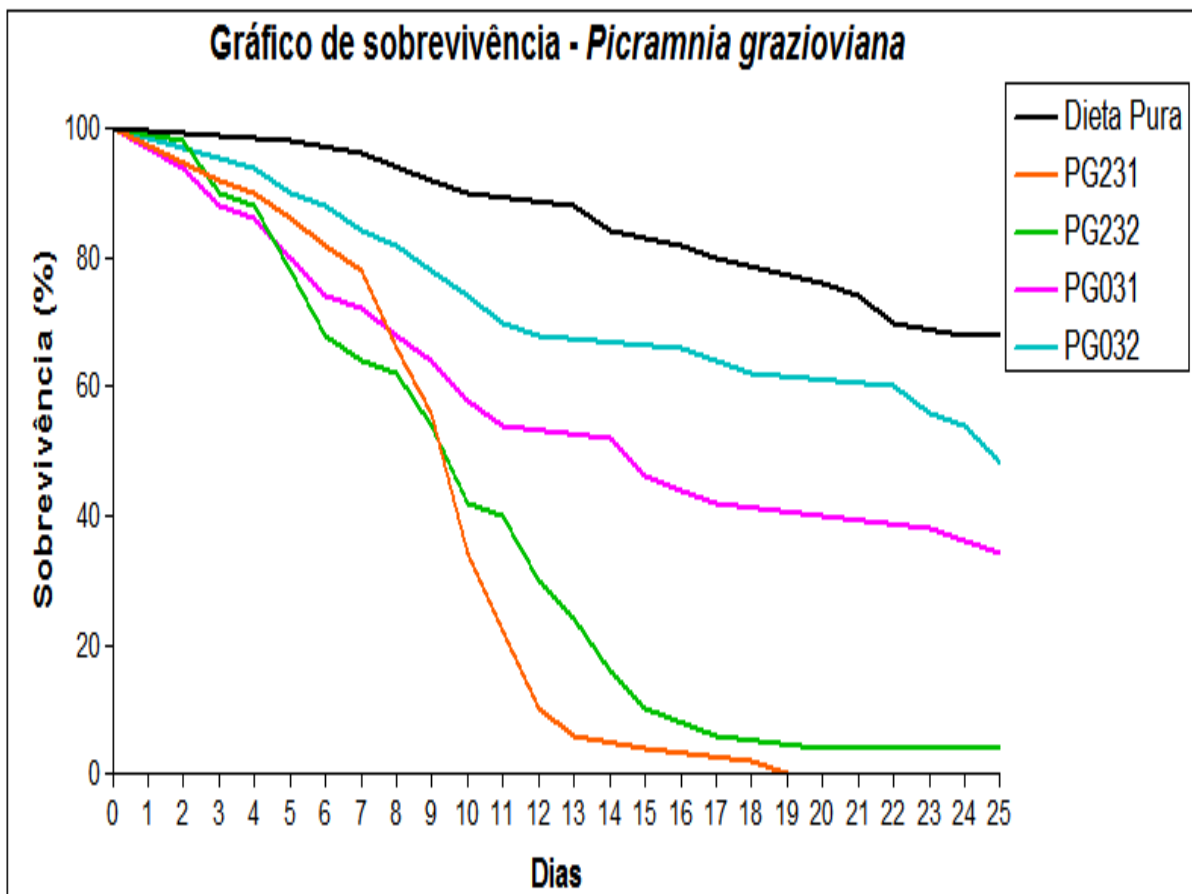


FIGURA 27 - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia glaziioviana* nas concentrações PG231 0,003mg/mL, PG232 0,002mg/mL, PG031 0,003mg/mL e PG032 0,002mg/mL.

TABELA 05 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com *Picramnia glaziioviana* nas concentrações PG231 0,003mg/mL, PG232 0,002mg/mL, PG031 0,003mg/mL e PG032 0,002mg/mL

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Dieta Pura	0	0	0	2	4	10	16	20	26	32	25 ^a
PG231 0,003mg/mL	0	0	8	18	34	66	94	96	100	100	10 ^b
PG232 0,002mg/mL	0	2	10	32	38	58	84	94	96	96	10 ^b
PG031 0,003mg/mL	0	6	12	26	32	42	48	58	60	66	15 ^b
PG032 0,002mg/mL	0	0	0	12	18	26	32	36	38	52	25 ^b

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

Através da análise da Tabela 5, fica notório que o extrato diclorometânico apresenta substância(s) naturais que são tóxicas as formigas, pois como inseticida

ideal, o efeito tem que ser retardado nos primeiros dias e ter alta mortalidade após uma semana, com isso, trabalhos futuros de biomonitoramento serão interessantes, para assim saber qual(is) metabólitos secundários apresenta(m) certa atividade, além de que, a atividade pode ser melhorada através da complexação com metais ou até mesmo nanoencapsulamento dos metabólitos ativos.

4.4.2 – Ensaio de toxicidade frente ao fungo simbiote

Após 30 dias de experimento, o extrato que melhor apresentou inibição foi o diclorometânico das folhas, com 53% e o extrato metanólico dos galhos com 41%. Baseado nos dados obtidos de inibição e/ou controle frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus* com os extratos metanólico dos galhos e diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*, os mesmos não apresentaram significativa inibição e com isso os dados foram plotados e do extrato diclorometânico das folhas são apresentados na FIGURA 28, devido apresentar melhor inibição entre os dois extratos.

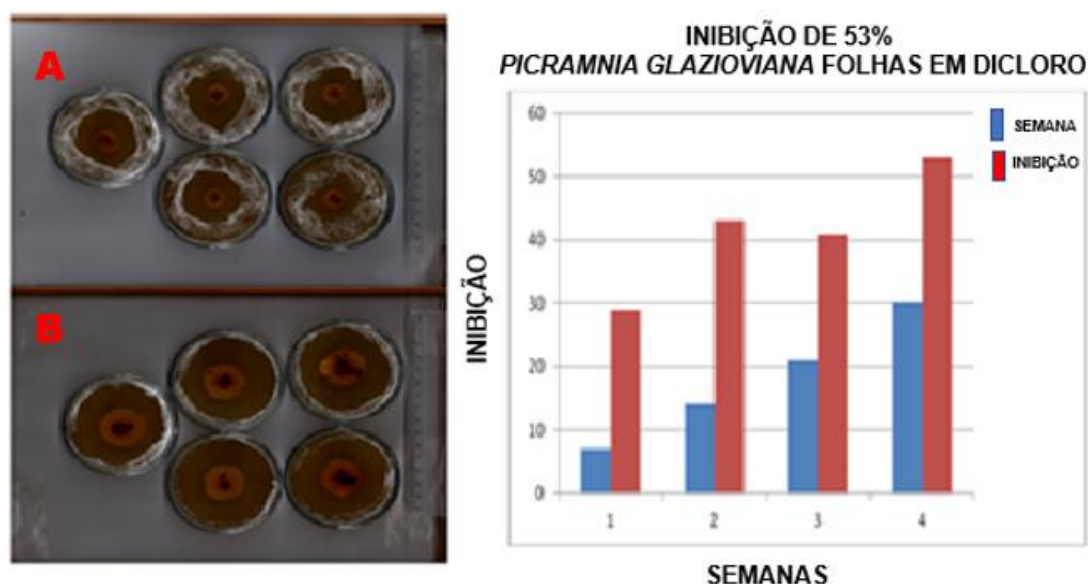


FIGURA 28 - Ensaio de inibição do extrato diclorometânico das folhas frente ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias de experimento. Sendo que, A: Inibição do extrato diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana*; B: Controle.

Sendo assim, ambos não são muito indicados ao combate do fungo simbiote da formiga. No entanto, pode ser interessante a realização de trabalho biomonitorado para saber qual(is) substância(s) apresenta(m) inibição, e assim, tentar

melhorar a atividade através de complexação com metais ou até mesmo através de processos sintéticos.

CAPÍTULO 2

1. – INTRODUÇÃO

1.1 – Bagaço de laranja

A laranja (*Citrus sinensis*) é característica de clima subtropical, sendo que o Brasil é considerado o maior produtor mundial, juntamente com subprodutos industrializados, como por exemplo, sucos concentrados e polpas congeladas.^{53,54} Ao se tratar de composição química, o fruto apresenta substâncias como flavonóides, principalmente flavonóides polimetoxilados, carotenóides, terpenóides, e óleos voláteis.⁵⁵

Após a realização da extração do suco, um percentual grande de resíduo é gerado, o qual é denominado bagaço de laranja. Este produto gerado é constituído de casca, sementes e resíduos de membranas.⁵⁶

Devido à grande produção gerada de bagaço, algumas finalidades são direcionadas ao mesmo, destacando-se os “pellets de polpa cítrica”, para serem utilizados como ração animal,⁵⁷ como também a fertilização de solos e produção de etanol 2G.⁵⁸

1.2 – Flavonóides e suas aplicações

Os flavonóides estão divididos em nove subclasses, que são diferenciadas entre si por variações no arranjo estrutural e posições dos grupos funcionais em seu esqueleto básico (FIGURA 29). Essas substâncias agrupam mais de 10 mil estruturas já identificadas.^{59- 62}

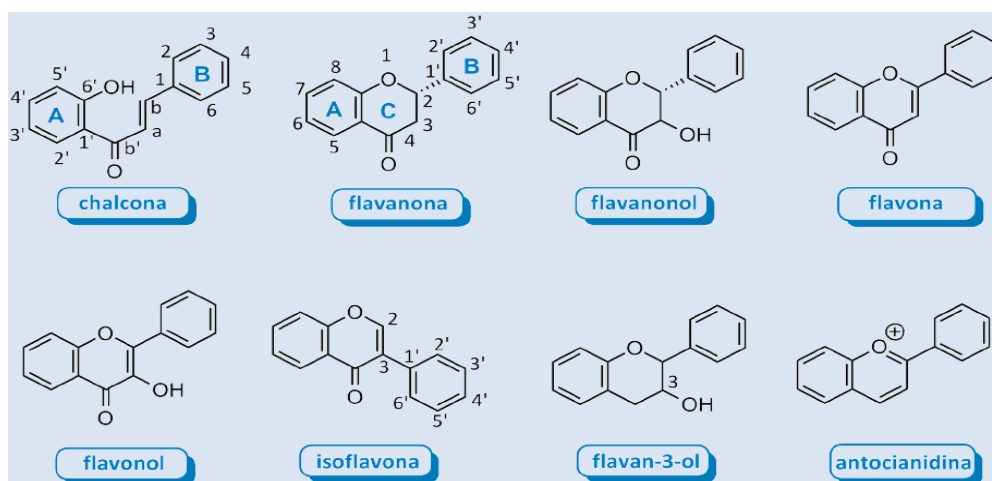


FIGURA 29 – Esqueleto básico das classes de Flavonóides. Adaptado de COUTINHO (2009)⁶²

O esqueleto base dos flavonóides é composto por dois anéis aromáticos, sendo que ocorre uma junção destes com três átomos de carbono, originando um sistema benzopirânico, o qual é a partir dele é iniciada a numeração dos carbonos e determinada a nomenclatura sistemática oficial IUPAC. Além disso, é comum ocorrer substituições por unidades glicosídicas nos esqueletos flavonoídicos, aumentando assim a diversidade de flavonóides existentes.⁶³

Ao se tratar de flavonóides em *Citrus* um trabalho realizado no grupo de produtos naturais na UFSCAR por BELETTE (2018)⁶⁴ demonstrou formas de extração os principais flavonóides presentes nos frutos que colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao se tratar de aplicação, estes metabólitos secundários apresentam forte poder antioxidante, além de atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antivirais e antimicrobianas comprovadas.⁶⁵⁻⁶⁷

1.3 – Complexos metal-flavonóides

Muitos trabalhos a partir dos anos 80 relatam que ao quelar um metal em uma substância orgânica, como por exemplo, flavonoides, é notório que suas atividades biológicas melhoram, ao serem comparadas com os metabólitos livres.^{68,69}

Diante disso, muitas pesquisas estão se desenvolvendo como objetivo principal de sintetizar complexos metálicos para melhores atividades objeto-alvo. Sendo assim, as indústrias químicas, agrícolas e principalmente farmacêuticas buscam produtos inovadores envolvendo produtos naturais complexados com metais.⁷⁰

Portanto, a utilização de complexos metálicos com substâncias ativas está sendo amplamente utilizados em diversas áreas, bem como, as atividades de interesse estão sendo potencializadas quando complexados a íons metálicos, justificando a utilização de complexos com íons metálicos como inseticidas na agricultura.⁷¹

1.4 – Rutênio

O rutênio é um metal raro, duro, brilhante, resistente à corrosão, de densidade ($12,45 \text{ g cm}^{-3}$) e ponto de fusão elevado. Possui configuração eletrônica $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$, sendo que na tabela periódica, localiza-se no bloco *d*, grupo 8, quinto

período, apresentando boa condutividade elétrica e excelentes propriedades catalíticas.⁷²

Os complexos mais comuns são em estado de oxidação +II e +III, com compostos hexacoordenados devido as configurações eletrônicas d^6 e d^5 .⁷³

1.5 – Magnésio

O magnésio pertence ao terceiro período e ao grupo dos alcalinos terrosos na representação periódica, apresentando distribuição eletrônica $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2$. Ao estarem em soluções aquosas, os cátions Mg^{2+} são coordenados com seis ligantes de maneira octaédrica ou tetracoordenado.^{74,75}

Os complexos de magnésio além de apresentarem diversas aplicações, apresentam baixa toxicidade ao ecossistema⁷⁶, estão presentes em diversas funções e sistemas da vida, como, por exemplo, nas clorofilas⁷⁷, interagem em sequências de nucleotídeos, onde podemos salientar o complexo $MgATP^{2-}$, conhecido como “combustível da vida”, o qual possui papel catalítico na hidrólise do ATP em ADP.⁷⁸⁻⁸⁰

Portanto, complexar íons de magnésio em uma substância ativa de interesse é de suma importância, pois pode melhorar significativamente a atividade, devido a ação de íons magnésio em sistemas biológicos.

1.6 – Platina

A platina é um elemento químico denso, maleável, dúctil, com pouca reatividade, com coloração prata branqueada, sendo considerada um metal de transição, de símbolo Pt, com número atômico 78, massa igual a 195,1 u. Os estados de oxidação mais comuns são o Pt^{+2} e Pt^{+4} .⁸¹

A platina é um metal nobre bastante escasso na crosta terrestre (5 ng/kg) que tem seu preço ligado não só à sua aparência e durabilidade, mas também à sua utilidade. Quando combinada, exibe vários estados de oxidação que vão de 0 a 6.⁸²

Como aplicação, complexos de platina são utilizados com fins terapêuticos, sendo o $cis[(diaminodicloro)platina(II)]$, $cis[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ um complexo muito importante de platina, o qual é comumente chamado de “cisplatina”. A cisplatina é um complexo com geometria quadrado plano, apresenta propriedades antitumorais e é atualmente muito utilizado contra o câncer de testículo e ovário.^{81,82}

1.7 – Zinco

O zinco é um elemento químico de símbolo Zn, número atômico 30 com massa atômica 65, distribuição eletrônica $3d^{10} 4s^2$. À temperatura ambiente, o zinco encontra-se no estado sólido, e seu estado de oxidação é 2^+ .

O zinco é um dos elementos presentes no corpo humano, participando em enzimas envolvidas na síntese protéica. Este metal tem todos os orbitais *d* preenchidos, de forma que compostos de Zn(II), são diamagnéticos e em grande parte incolores. O zinco pode formar um grande número de complexos estáveis. Na literatura, os compostos encontrados são testados na maioria das vezes contra células tumorais.^{83,84}

1.8 – Cobre

O cobre é um elemento químico de símbolo Cu, número atômico 29, de massa atômica 63,54u, com distribuição eletrônica $3d^{10}4s^1$ e estados de oxidação de 1^+ e 2^+ .

Cobre apresenta sua forma mais estável no estado de oxidação 2^+ , concedendo a possibilidade de gerar complexos com diversas geometrias, como tetraédrica, quadrática planar, piramidal de base quadrada, bipiramidal trigonal e também octaédrica, dependendo do ligante utilizado.⁸⁵⁻⁸⁷ Além da vasta aplicação industrial, este metal também desempenha papéis cruciais nos sistemas biológicos, devido as suas propriedades redox, as quais possibilitam se ligar reversivelmente ao oxigênio molecular, ativar oxigênio molecular e realizar transferência de elétrons, executando papéis semelhantes ao do ferro no organismo.⁸⁶

1.9 – Ferro

O ferro é um elemento químico de símbolo Fe, número atômico 26, massa atômica 56 u, distribuição eletrônica $4s^23d^6$, é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre, perdendo somente para o alumínio.

Além de possuir influência em processos biológicos, ele é encontrado na maioria dos seres vivos, devido participar de variadas funções, como por exemplo, ser centro ativo da hemoglobina.⁸⁸

Devido à importância deste metal e a sua presença natural no organismo, tem-se estudado também espécies contendo ferro como centro metálico,

dentre os compostos de coordenação com finalidade biológica, tanto para tratamento de câncer, quanto para o tratamento da tuberculose.^{88,89}

2. – OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em sintetizar e caracterizar complexos do Metal₁ e Metal₂ com flavonóides presentes no bagaço de laranja, como também testar suas atividades frente as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* visando reduzir a ação das formigas cortadeiras como praga agrícola e formação de recursos humanos.

Para isso, alguns objetivos específicos foram determinados. São eles:

- Síntese e caracterização dos complexos do Metal₁ com o bagaço;
- Síntese e caracterização dos complexos do Metal₂ com o bagaço;
- Investigar as atividades inseticidas e fungicidas frente as formigas cortadeiras das espécies *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

3. – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais utilizados

a) Solventes:

- Solventes destilados no departamento de química;
- Solventes grau HPLC: Tedia, J.T. Baker, HoneyWell e Panreac®;
- Solventes PA Panreac®, Synth, Vetex;
- Água purificada em aparelho Milli-Q;

3.2 – Equipamentos

- a. Rotaevaporador Tecnal (TE 120)
- b. Rotaevaporador Buchi 461- water bath (EL 131)
- c. Balança analítica:
 - Shimadzu, modelo AY220;
 - Toledo, modelo 9094C/5;
- d. Centrífuga Eppendorf 5810 R
- e. Estufa com Circulação e Renovação de Ar:
 - Tecnal, modelo TE 394/3
- f. Moinho manual:
 - IKA, modelo A11B

3.3 – Bagaço de laranja

O material de estudo dessa etapa (bagaço), foi cedido por uma empresa de citricultura da região, pertencente ao grupo Cambuhy Citrus LTDA. Primeiramente, a biomassa foi separada em sacos plásticos e armazenadas em freezers das geladeiras do laboratório de produtos naturais da UFSCar em temperatura média de -18°C.

Para o preparo do material de partida, 7,560 Kg de bagaço foram secos em estufa em temperatura de 40°C por 36 horas, sendo que foi necessário ao longo

do período ficar revirando o material para que o mesmo não fungasse até secar completamente.

Após o tempo de secagem realizou-se um processo de moagem do bagaço em um moinho manual. Por fim, o produto foi pesado, resultando 1,774 Kg de bagaço, armazenados em sacos plásticos e armazenados no freezer em temperatura média de -18°C .

3.4 – Síntese dos complexos

Em um sistema contendo um balão de três bocas com fundo redondo, acoplado a um condensador e a uma linha com gás nitrogênio, além de que um controlador de temperatura e um agitador magnético os novos complexos metálicos foram sintetizados.

Os novos complexos do Metal_1 foram sintetizados utilizando o complexo precursor Metal_1 (FIGURA 30). Após a síntese do precursor utilizando 1,10-fenantrolina (Phen), cloreto de lítio em DMF a 80°C por 8 horas é adicionado em solução etanólica (etanol/água – proporção 1:1) contendo o bagaço, em atmosfera de nitrogênio e previamente desprotonado com trietilamina (TEA).

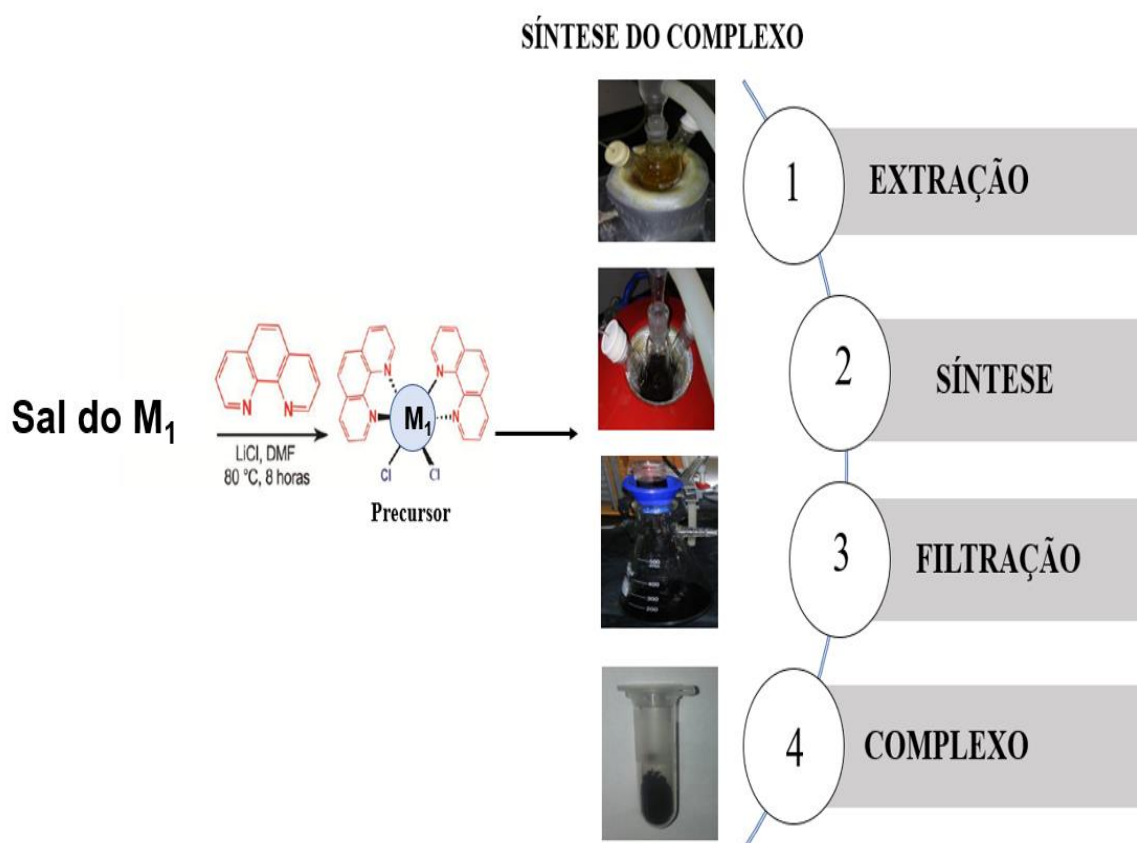


FIGURA 30 - Esquema da síntese dos complexos do Metal_1 .

Já os novos complexos com $Metal_2$ foram sintetizados de duas formas (FIGURA 31). A primeira, ocorreu adição do sal do $Metal_2$ seguida do ligante 1,10-fenantrolina na solução metanólica com bagaço em atmosfera de nitrogênio e previamente desprotonado com trietilamina. Já a segunda síntese, diferenciou-se pelo fato que ocorreu a adição do sal do $Metal_2$ seguida do ligante 1,10-fenantrolina em solução etanólica (etanol/água – proporção 1:1) contendo o bagaço em atmosfera de nitrogênio e previamente desprotonado com trietilamina (TEA).

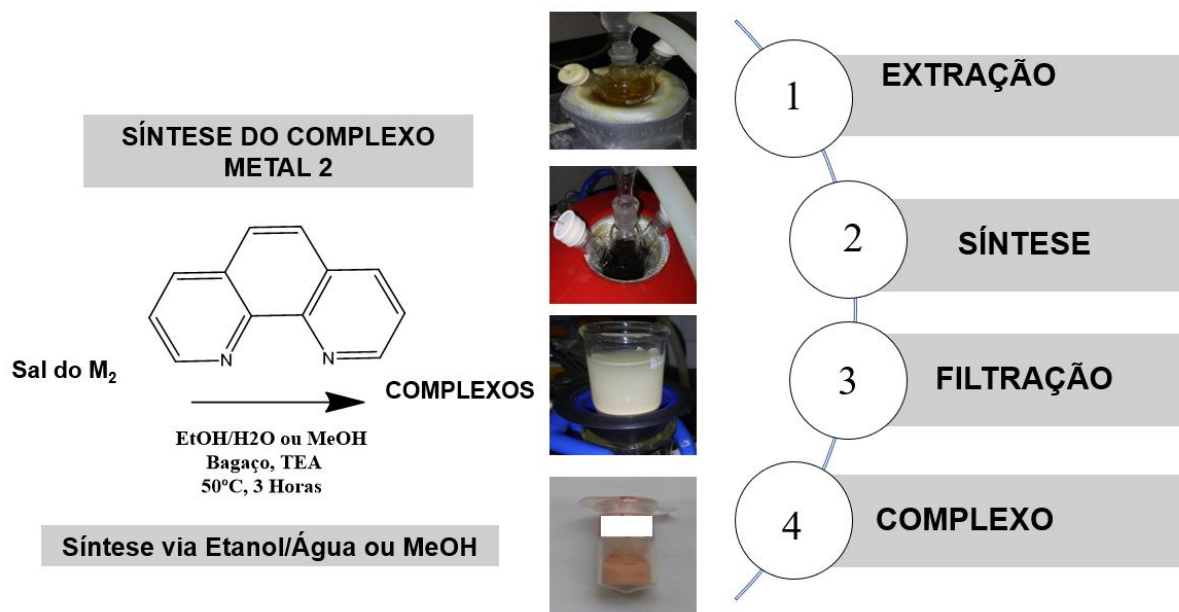


FIGURA 31 - Esquema da síntese dos complexos do $Metal_2$.

3.4.1 – Síntese do precursor do $Metal_1$

Em um sistema contendo um balão de três bocas com fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador, além de que um controlador de temperatura e um agitador magnético, adicionou-se 20 mL de N,N-dimetilformamida (DMF), deixando por vinte minutos sob agitação e desaeração em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 217 mg do sal de $Metal_1$, 298 mg de 1,10 fenantrolina e 198 mg de LiCl, sempre sob agitação, desaeração e aquecimento de aproximadamente 50°C. Após o início do refluxo, a reação permaneceu por oito horas com coloração roxa. Após o fim da reação, adicionou-se 200 mL de acetona gelada na solução e deixou-se durante a noite no congelador para que o precursor precipitasse. No dia seguinte, o precipitado preto gerado foi filtrado, lavado com cerca de 50 a 100 mL de água destilada (até que a coloração do líquido fique translúcida) e após isso foi seco a vácuo.

3.4.2 – Síntese dos complexos com Metal₁

Em um sistema contendo um balão de três bocas com fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador, além de que um controlador de temperatura e um agitador magnético, adicionou-se 30 mL de solução etanólica (etanol/água – proporção 1:1), deixando por dez minutos sob agitação e desaeração em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se 520 mg de bagaço, 130 µL de trietilamina (TEA) para desprotonar as substâncias de interesse (flavonóides) e após dez minutos adicionou-se 100 mg do precursor sintetizado sempre sob agitação, desaeração e aquecimento de aproximadamente 50°C.

Com o início do refluxo, a reação permaneceu por oito horas com coloração roxo escuro. Após o fim da reação, a solução é filtrada para retirar o bagaço e no sobrenadante é adicionado 40 mg de NH₄PF₆. Esta solução ficou em repouso durante a noite no congelador para que ocorresse a precipitação. No dia seguinte, como não houve formação de precipitado, foi necessário rotaevaporar a solução até que restasse cerca de 10 mL, forçando assim a precipitação. Com isso, a solução permaneceu por mais uma noite no congelador e no dia seguinte o precipitado preto gerado foi filtrado e lavado com 30 mL de água e após isso seco a vácuo.

3.4.3 – Síntese dos complexos com Metal₂ em metanol

Em um sistema contendo um balão de três bocas com fundo redondo de 250 mL, acoplado a um condensador, um controlador de temperatura e um agitador magnético, adicionou-se 50 mL de metanol, deixando por dez minutos sob agitação e desaeração em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se, sequencialmente, 106,4 mg do sal Metal₂, 91,7 mg de 1'10-fenantrolina, 1.603 mg bagaço e 500 µL de trietilamina (TEA) para desprotonar as substâncias de interesse (flavonóides) sempre sob agitação, desaeração e aquecimento de aproximadamente 50°C.

Após o início do refluxo, a síntese permaneceu por três horas com coloração amarelada. Com o fim da reação a solução foi filtrada para retirar o bagaço, e o remanescente foi centrifugado em eppendorfs para retirar completamente algum interferente. Por fim, o sobrenadante foi rotaevaporado até aproximadamente 5 mL e em seguida foi adicionada 15 mL de água gelada e a solução foi mantida em repouso no congelador por uma noite. Como não ocorreu precipitação, adicionou-se 40 mg de NH₄PF₆ e o precipitado bege formado foi filtrado e lavado com 30 mL de água gelada e seco a vácuo.

3.4.4 – Síntese dos complexos com Metal₂ em etanol/água

Em um sistema contendo um balão de três bocas com fundo redondo de 250 mL, acoplado a um condensador, um controlador de temperatura e um agitador magnético, adicionou-se 50 mL de solução etanólica (etanol/água – proporção 1:1), deixando por dez minutos sob agitação e desaeração em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, adicionou-se, respectivamente, 358 mg do sal de Metal₂, 301 mg de 1'-10-fenantrolina, 1.974 mg bagaço e 550 µL de trietilamina (TEA) para desprotonar as substâncias de interesse (flavonóides) sempre sob agitação, desaeração e aquecimento de aproximadamente 50°C.

Após o início do refluxo, a síntese permaneceu por três horas com coloração caramelo, tendendo a alaranjado. Com o fim da reação a solução foi filtrada para retirar o bagaço, e o remanescente foi centrifugado em eppendorfs para retirar completamente algum interferente. Por fim, o sobrenadante foi rotaevaporado até aproximadamente 5 mL e em seguida foi adicionada 15 mL de água gelada e a solução foi mantida em repouso no congelador por uma noite. No dia seguinte, adicionou-se 40 mg de NH₄PF₆ e o precipitado alaranjado claro formado foi filtrado e lavado com 30 mL de água gelada e seco a vácuo.

3.5 – Caracterização por infusão direta no UPLC-HRMS (qTOF)

A caracterização foi realizada em um equipamento UPLC-HRMS (qTOF) da WATERS, sendo que 0,5 mg eram solubilizados em 2 mL de acetonitrila e injetados manualmente na fonte através de uma seringa de vidro.

3.6 – Espectros eletrônicos no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) utilizando-se um espectrofotômetro AGILENT 8453, com celas de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

3.7 – Luminescência dos complexos.

Os espectros de emissão foram obtidos utilizando-se um espectrofluorímetro Shimadzu Modelo RF-5301PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150 W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

3.8 – Ensaios Biológicos

3.8.1 – Testes “*in vitro*” de toxicidade dos complexos em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

As operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg, foram coletadas de formigueiros mantidos em laboratório no Centro de Estudos de Insetos Sociais - UNESP - *Campus* Rio Claro. Para a manutenção desses formigueiros, diariamente foram oferecidas folhas de *Eucaliptus* sp., flocos de aveia e, ocasionalmente, outras plantas palatáveis às saúvas como *Hibiscus* sp., *Ligustrum* sp., ou folhas e pétalas de roseiras.

Para a manutenção das formigas isoladas do formigueiro, consequentemente na ausência do fungo simbiote e de folhas considerados seus alimentos, foi utilizada uma dieta artificial sólida, preparada com 5 g de glicose, 1 g de peptona bacteriológica, 0,1 g de extrato de levedura e 1,5 g de ágar bacteriológico, dissolvidos em 100 mL de água destilada.

Após a mistura das substâncias, a dieta foi levada ao forno de micro-ondas para melhor solubilização dos ingredientes e, posteriormente auto clavada a 120°C e 1 atm por 15 minutos. Em seguida foi vertida ainda quente em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, previamente esterilizadas em estufa a 180°C e, após o resfriamento e a solidificação, foi embrulhada em filme de PVC e mantida em geladeira, sendo utilizada nos dias subsequentes, durante o período do experimento.³⁷

No bioensaio por ingestão foi utilizado apenas o controle da dieta artificial, cujo objetivo do controle é verificar a interferência do manuseio na sobrevivência das formigas.

Os complexos foram incorporados na dieta utilizando o método dry-mix, que consiste em acrescentar o princípio ativo à glicose e aos demais ingredientes secos da dieta básica e, posteriormente, a água destilada. Neste caso, não é utilizado solvente. Os complexos foram incorporados na concentração de 25 mg/mL.

Em todos os bioensaios as formigas foram retiradas dos formigueiros e distribuídas em lotes de 50 operárias para cada concentração testada, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 5 placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro. Essas placas foram colocadas em estufa para B.O.D. com temperatura de 24°C +/- 1°C e umidade relativa acima de 70%. As placas foram examinadas diariamente para a retirada e anotação do número de formigas mortas, durante um período de 20 dias.

A dieta para manutenção das formigas (controle) ou dieta acrescida dos ingredientes ativos (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade aproximada de 0,4 g a 0,5 g por placa. A cada 24 horas a dieta foi renovada e sempre que necessário, os papéis filtro (que geralmente são cortados pelas formigas) foram trocados a fim de se evitar o desenvolvimento de fungos contaminantes bem como manter o ambiente limpo para as formigas.

Foi estipulado um período máximo de 20 dias para a realização dos experimentos de toxicidade, levando-se em conta o período normal de sobrevivência das formigas mantidas com dieta artificial.⁴⁷

A análise gráfica foi realizada através das determinações das porcentagens acumuladas de formigas vivas por dia para cada tratamento. Posteriormente, o tempo de sobrevivência mediana foi determinado e as curvas de sobrevivência foram comparadas por meio do teste não paramétrico “log rank”, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Graph-Pad, aplicativo Prisma 3.0.

3.8.2 – Ensaio biológico com o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*

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

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

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbiote foram incorporadas ao meio de cultura e solubilizadas em água destilada. Em seguida, em cada tubo de ensaio foram adicionados 10 mL de meio de cultura/extrato. Os tubos de ensaio com o meio de cultura/extrato e placas de Petri (80 X 15 mm) foram autoclavados nas condições 120°C, 1 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central

com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbiote *L. gongylophorus*.

Os testes com as amostras foram preparados em quintuplicata, sendo que, o tempo de incubação foi de aproximadamente 30 dias, a 25°C (± 2), onde após isso foram realizados os cálculos das áreas do crescimento micelial do fungo simbiote em cada amostra. As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbiote dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbiote.

4. – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta seção irão ser divididos em caracterização por técnicas de espectroscopia e atividades de bioensaio frente as formigas e seu fungo simbionte, para assim obtermos melhor entendimento e compreensão.

4.1- Caracterização dos complexos

4.1.1 - Caracterização dos complexos por UPLC-HRMS (qTOF)

Por se tratar de mistura de substâncias químicas, a técnica mais apropriada para propor a estrutura dos complexos foi por meio da infusão direta no espectrômetro de massas de alta resolução no modo positivo, com fragmentações de íons selecionados sendo comparadas ao padrão isotópico predito, uma vez que já tinha um conhecimento de substâncias de interesse que poderiam complexar. Dessa forma, através do full scan dos complexos do Metal₁ (ANEXO 22) foram caracterizados 5 complexos com Metal₁ (FIGURA 32) com substâncias de interesse, que eram flavonóides.

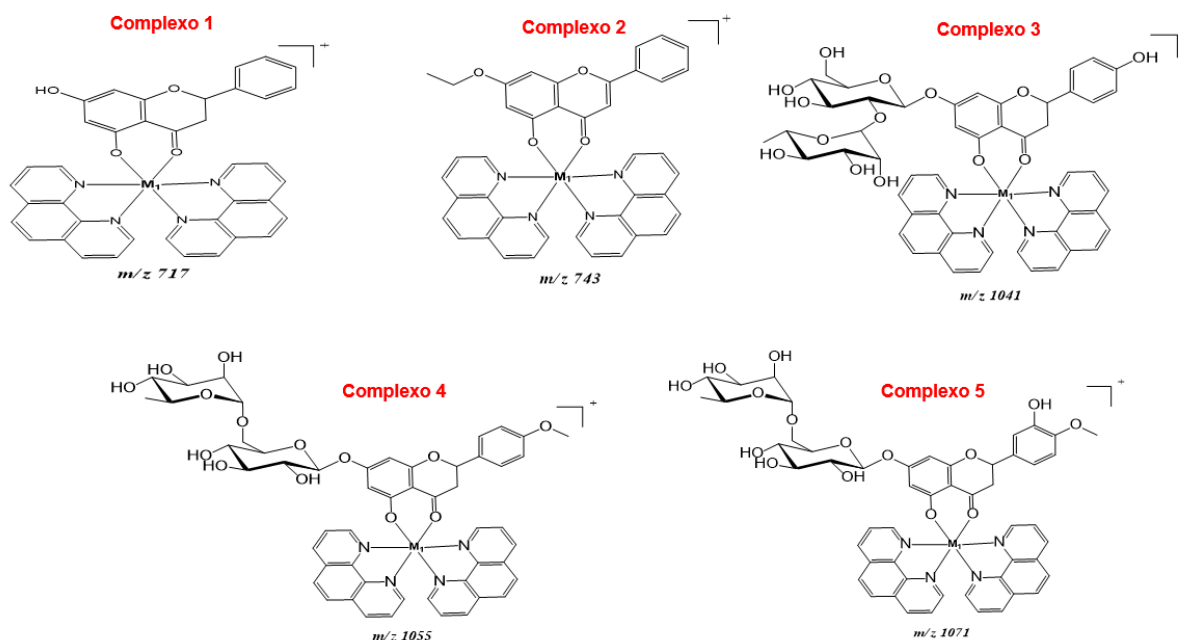


FIGURA 32 - Propostas dos complexos com Metal₁.

As substâncias formadas apresentaram relação massa/carga (m/z) de 717,2924 ($C_{39}H_{27}N_4O_4M_1$, calculado 717.10758); 743,2249 ($C_{41}H_{29}N_4O_4M_1$, calculado 743.1232); 1041,2458 ($C_{51}H_{47}N_4O_{14}M_1$, calculado 1041.21322); 1055,2615

($C_{52}H_{49}N_4O_{14}M_1$, calculado 1055.22887); 1071,2581 ($C_{52}H_{49}N_4O_{15}M_1$, calculado 1071.22379) correspondentes aos íons moleculares $[M]^+$. Através da fragmentação por íon selecionado as propostas de estruturas se dão pelas FIGURAS 33 - 37.

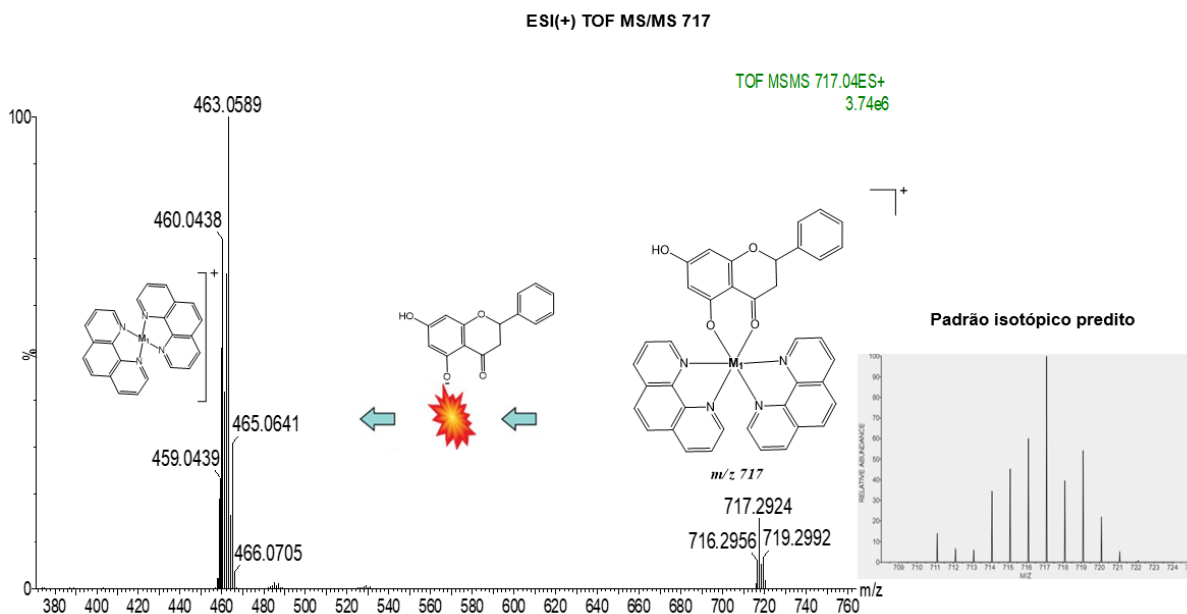


FIGURA 33 - Proposta de fragmentação do complexo 1 do metal₁

Através da FIGURA 33, pode-se notar a fragmentação da relação m/z 717 $[M]^+$, onde podemos propor a estrutura complexada de uma flavanona com o Metal₁ e duas fenantrolina (Phen), pois ao adicionarmos energia para fragmentar, um íon de 463 foi formado, o qual pertence ao metal₁ e duas phen, obtendo assim, a perda da flavanona.

A FIGURA 34 retrata a proposta de fragmentação do complexo 2, cuja relação m/z é 743 $[M]^+$, onde podemos propor a complexação de uma flavona com metal₁ e duas fenantrolinas. Ao fragmentar, primeiramente ocorre a perda da flavona, gerando o fragmento 463 característico do metal₁ ligado em duas phen.

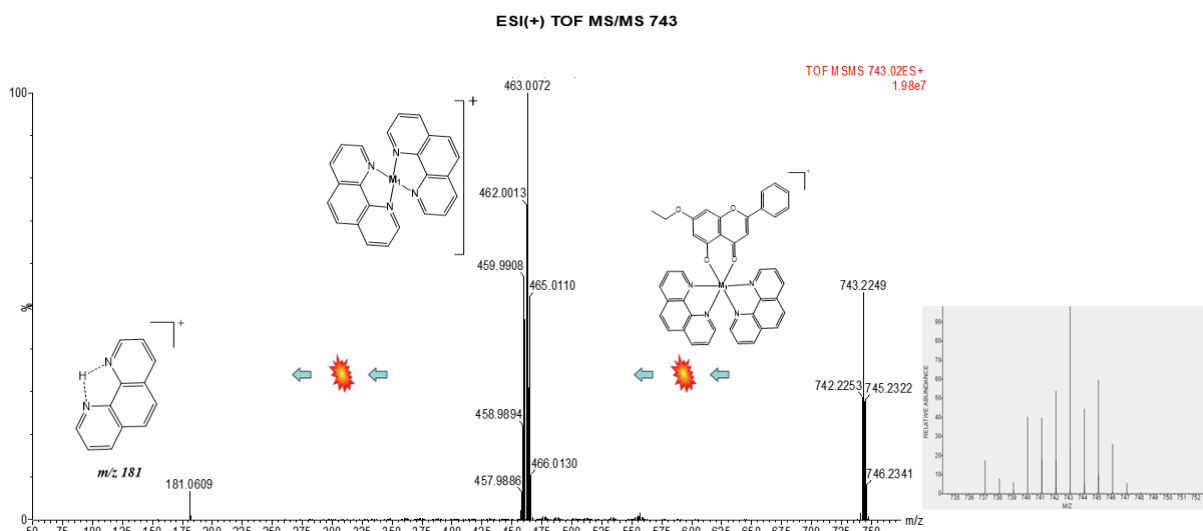


FIGURA 34 - Proposta de fragmentação do complexo 2 metal₁.

A FIGURA 35 retrata a proposta do complexo 3 com relação m/z 1041 $[M]^+$, onde através da interpretação da análise, podemos propor a formação do complexo com um flavonóide naringina ligada ao metal₁ e duas fenantrolinas. Ao ocorrer a fragmentação, primeiro ocorre a perda de glicose, formando um íon de pico molecular de m/z 733, e posterior ocorre outra fragmentação gerando o íon 463 característico do metal₁ ligado em duas phen.

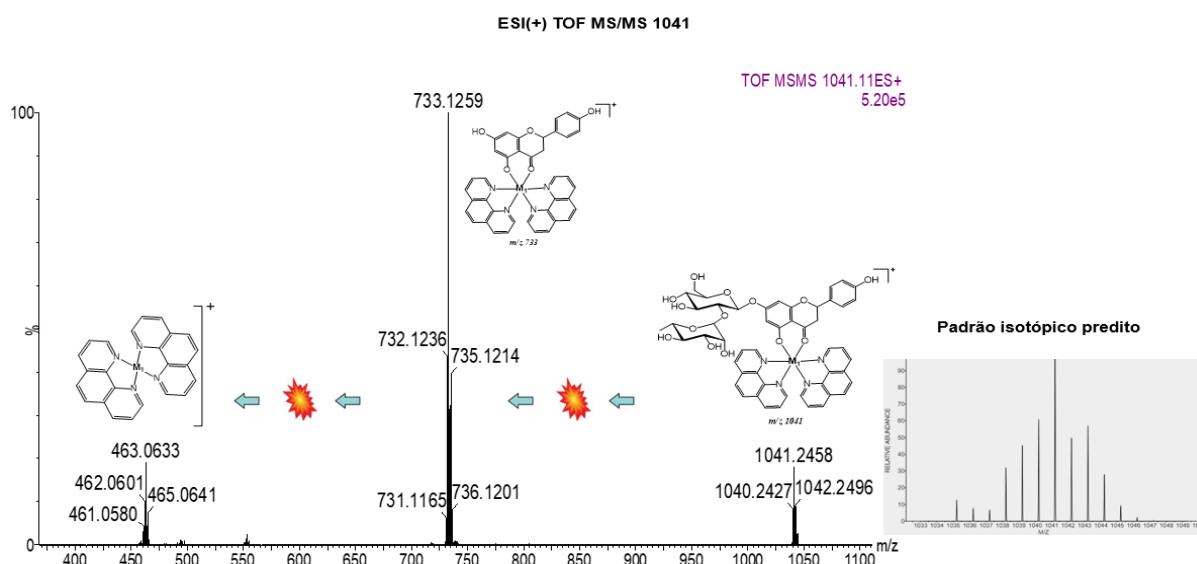


FIGURA 35 - Proposta de fragmentação do complexo 3 do metal₁.

Através da FIGURA 36 abaixo, o complexo 4 com relação m/z 1055 $[M]^+$ é proposto com a ligação de um flavonóide didymina ou neoponcirina [(S)-5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavanone-7- β -rutinoside, Isosakuranetin 7-O-rutinoside] ligada

ao metal₁ e duas fenantrolinas. Ao fragmentar, primeiramente ocorre perda de glicose, obtendo-se o íon de relação m/z 747, que logo em seguida é fragmentado gerando o fragmento 463 característico do metal₁ ligado em duas phen.

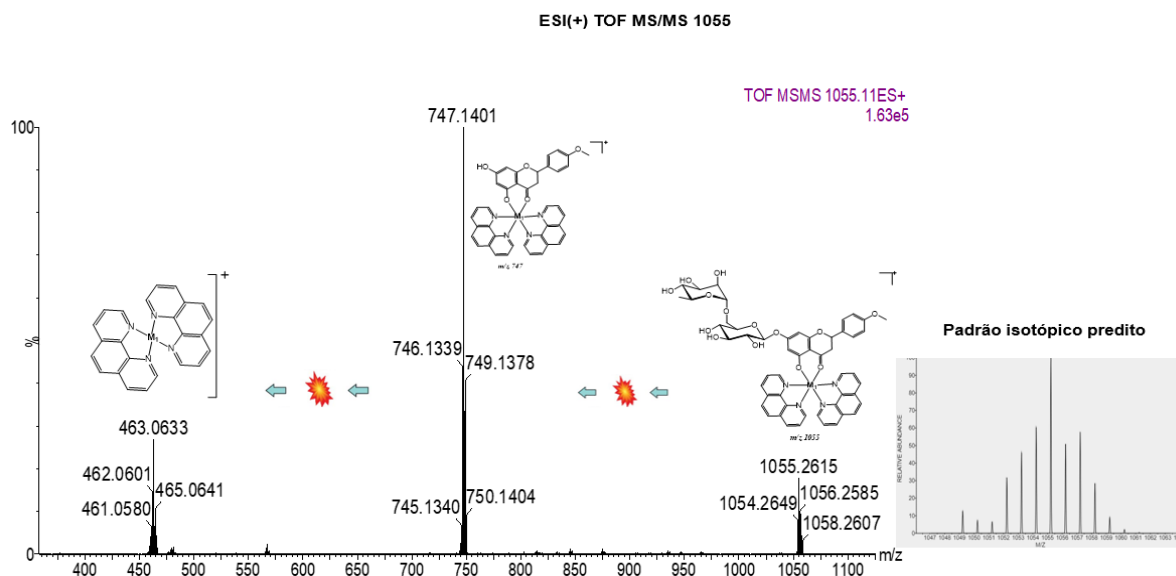


FIGURA 36 - Proposta de fragmentação do complexo 4 do metal₁.

A FIGURA 37 retrata a proposta de fragmentação do complexo 5, cuja relação m/z é 1071 [M]⁺, onde podemos propor a complexação de um flavonóide hesperidina com metal₁ e duas fenantrolinas. Ao fragmentar, primeiramente ocorre perda de glicose, obtendo-se o íon de pico m/z 763, que logo em seguida é fragmentado gerando o fragmento 463 característico do metal₁ ligado em duas phen.

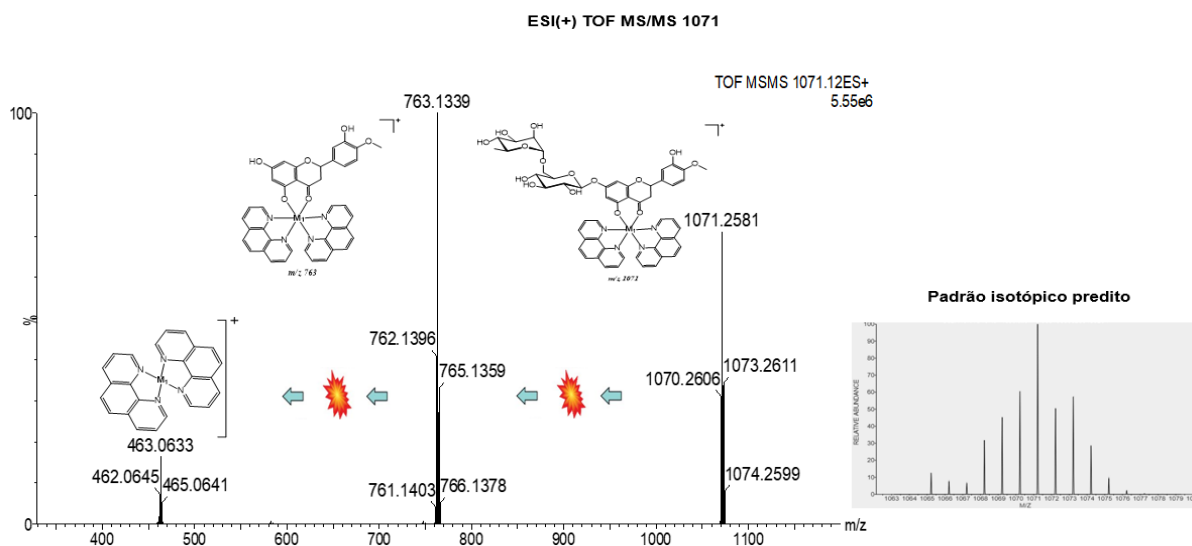


FIGURA 37 - Proposta de fragmentação do complexo 5 do metal₁.

Ao se tratar dos novos complexos com metal₂, através da síntese via EtOH/H₂O, foram caracterizados 4 complexos com flavonóides de interesse, como visto na FIGURA 38, onde algumas relações massa/carga vista no full scan (ANEXO 23) estão sendo tratadas e confirmadas as propostas para a solicitação da patente. Sendo assim, as fragmentações e propostas dos outros complexos não serão demonstradas na dissertação.

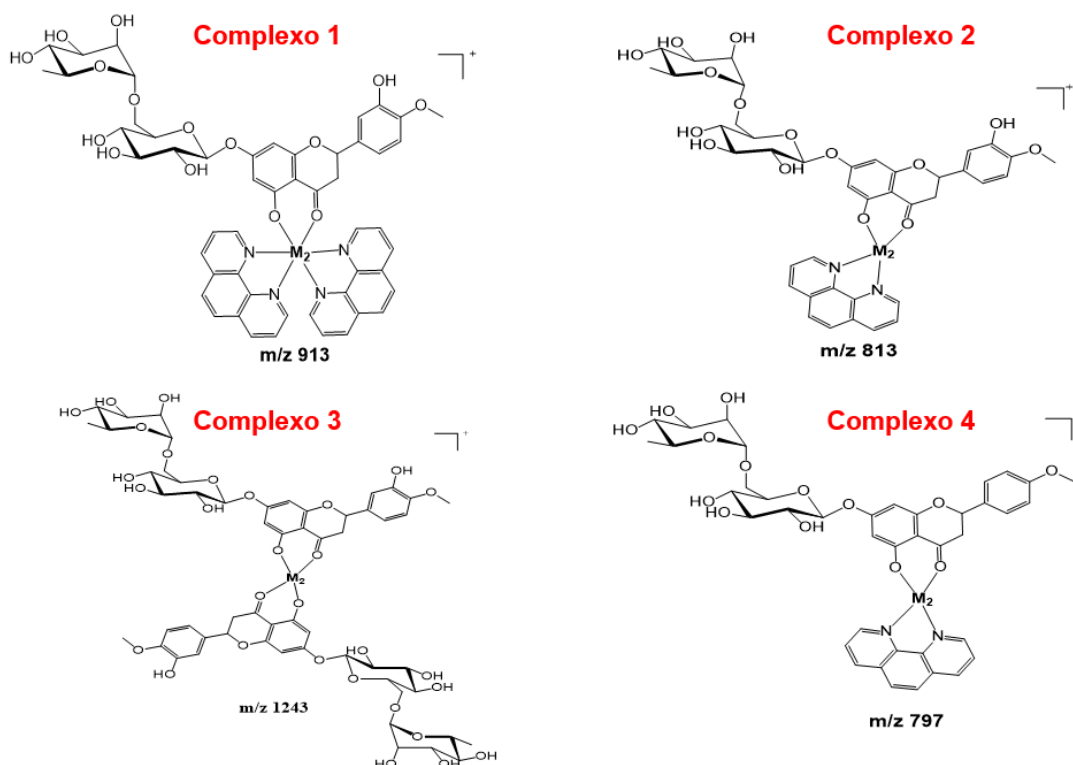


FIGURA 38 - Propostas dos complexos com Metal₂.

Por não haver a sintetização de precursores para o metal₂, pode-se ter diversas formas de complexação de substâncias de interesse com o metal. Propostas estas que são ratificadas através da fragmentação do íon selecionado.

Ao verificar os complexos propostos, há formação de compostos com duas fenantrolinas, o metal₂ e um flavonoide naringina, como também ocorre a formação de complexos com dois flavonoides ligados ao metal e complexos com uma fenantrolina ligadas ao metal₂ e flavonoides, como ocorre nos complexos 2 e 4. Vale salientar que todos os complexos gerados foram comparados com padrões isotópicos preditos.

Através da análise realizada com os complexos, podemos concluir que podemos obter complexos metálicos com flavonoides de maneira simples a partir do bagaço de laranja, sem a necessidade de separação e purificação do extrato bruto. Dessa forma, processos são simplificados e produtos de interesse são formados de forma mais rápida e com menores custos financeiros, gerando assim, novas oportunidades de pesquisa, extração, síntese e reaproveitamento de resíduos provenientes da indústria.

4.1.2 - Caracterização dos complexos do metal₁ por ultravioleta-visível (UV-Vis)

Os espectros de absorção eletrônica de UV-vis da mistura dos complexos obtidos, bem como, do complexo precursor são mostrados na FIGURA 39. Ao comparar os espectros de UV-vis do precursor (obtido em CH₂Cl₂) e dos complexos do metal₁ (obtido em ACN) podemos inferir a formação dos novos complexos, uma vez que ocorre o deslocamento da absorção máxima em 552 nm do precursor para a formação de uma banda larga com máximo ao redor de 483 nm nos complexos na região do visível. As análises foram realizadas em solventes diferentes devido a solubilidade dos complexos e precursor.

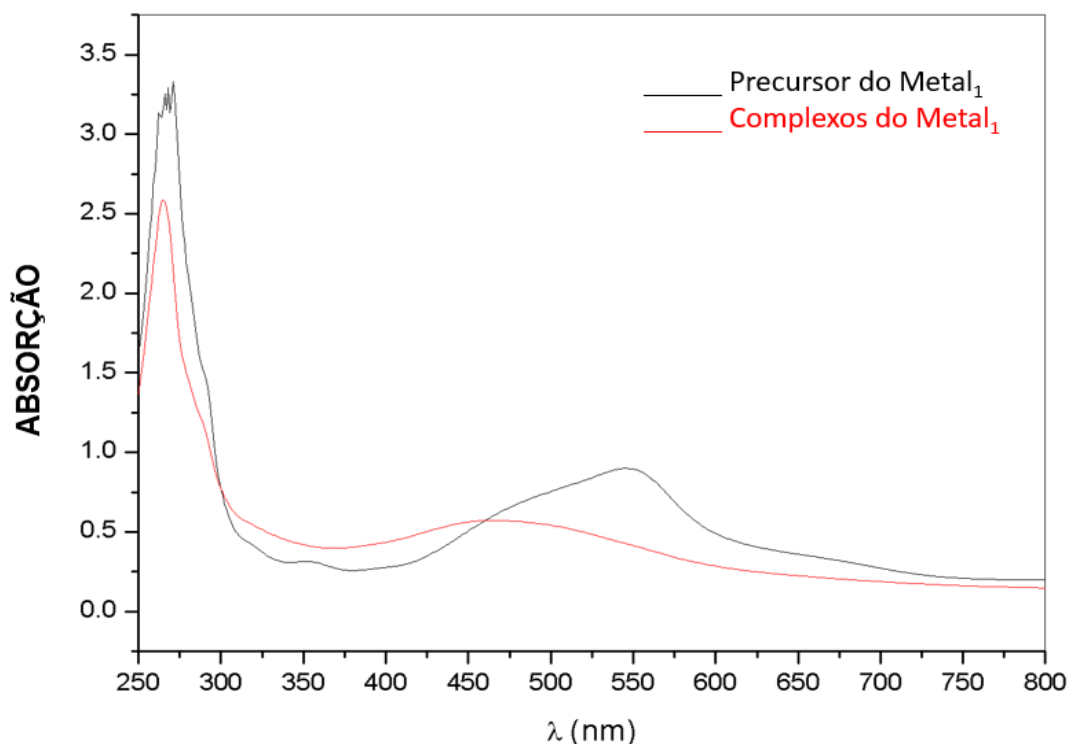


FIGURA 39 - Comparação de absorção no UV-vis do precursor com os complexos do metal₁

Vale salientar que mesmo as análises serem realizadas em solventes diferentes a formação dos complexos é atribuída pelo alargamento da banda comparada a absorção do precursor.

4.1.3 - Propriedades luminescentes dos complexos do metal₁

Através de análises realizadas de luminescência no complexo do metal₁, fica notório a complexação do metal com os flavonóides. Uma vez que, ao realizar extração das substâncias do bagaço de laranja, as mesmas emitem luminescência. Já ao realizar a luminescência dos complexos do metal₁, os mesmos não apresentam emissão, conforme podemos ver na FIGURA 40.

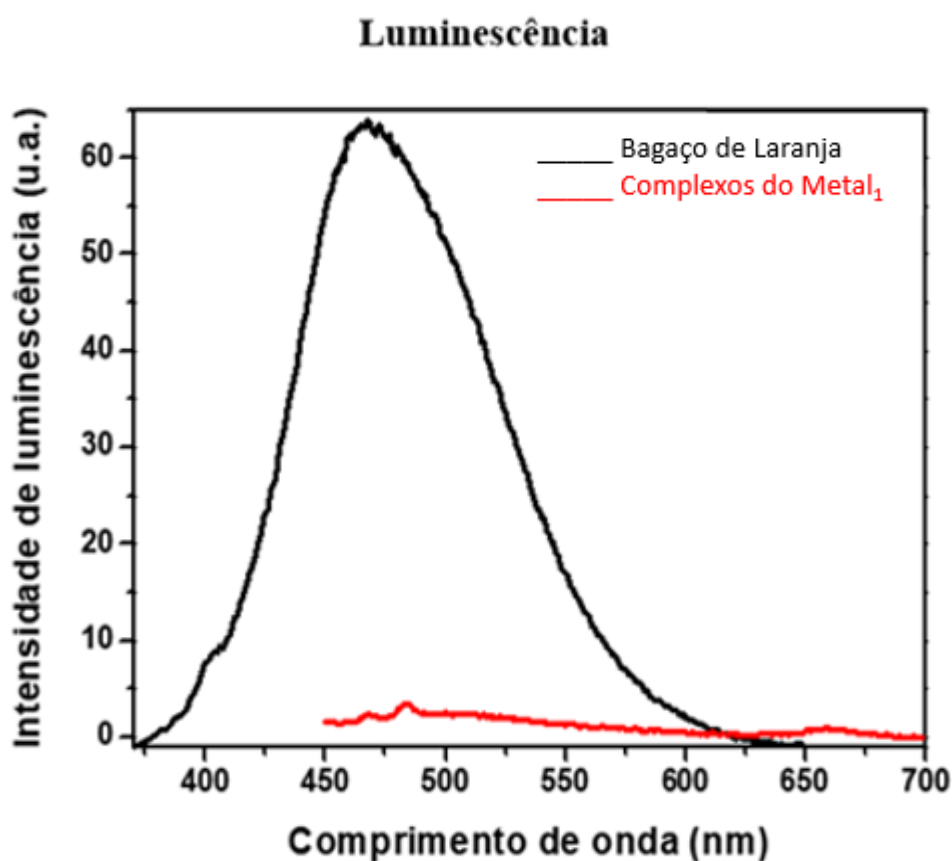


FIGURA 40 - Comparação dos espectros de emissão dos complexos do metal₁ com o bagaço de laranja em EtOH-H₂O com excitação entre 325 e 375 nm.

Este efeito de ausência de luminescência nos novos complexos ocorre devido as ligações do metal₁ com os átomos de oxigênio do flavonóide, que antes estavam livres na solução do bagaço de laranja.

4.2- Bioensaios

Os resultados obtidos frente as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote são promissores, uma vez que a atividade de inibição é alta e assemelha-se a inseticidas comerciais conforme vistos em trabalhos anteriores de alunos que já passaram no departamento de Química, como por exemplo, tese de OLIVEIRA (2012)⁹⁰. Sendo assim, os resultados estão em forma de gráficos e tabelas para melhor compreensão.

4.2.1 Toxicidade para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

O resultado obtido do bioensaio está apresentado através das análises gráficas das curvas de sobrevivência e da tabela que resume as porcentagens acumuladas de mortalidade diária, o tempo de sobrevivência mediana ($S_{50} = Md$), conforme FIGURA 41 e TABELA 06.

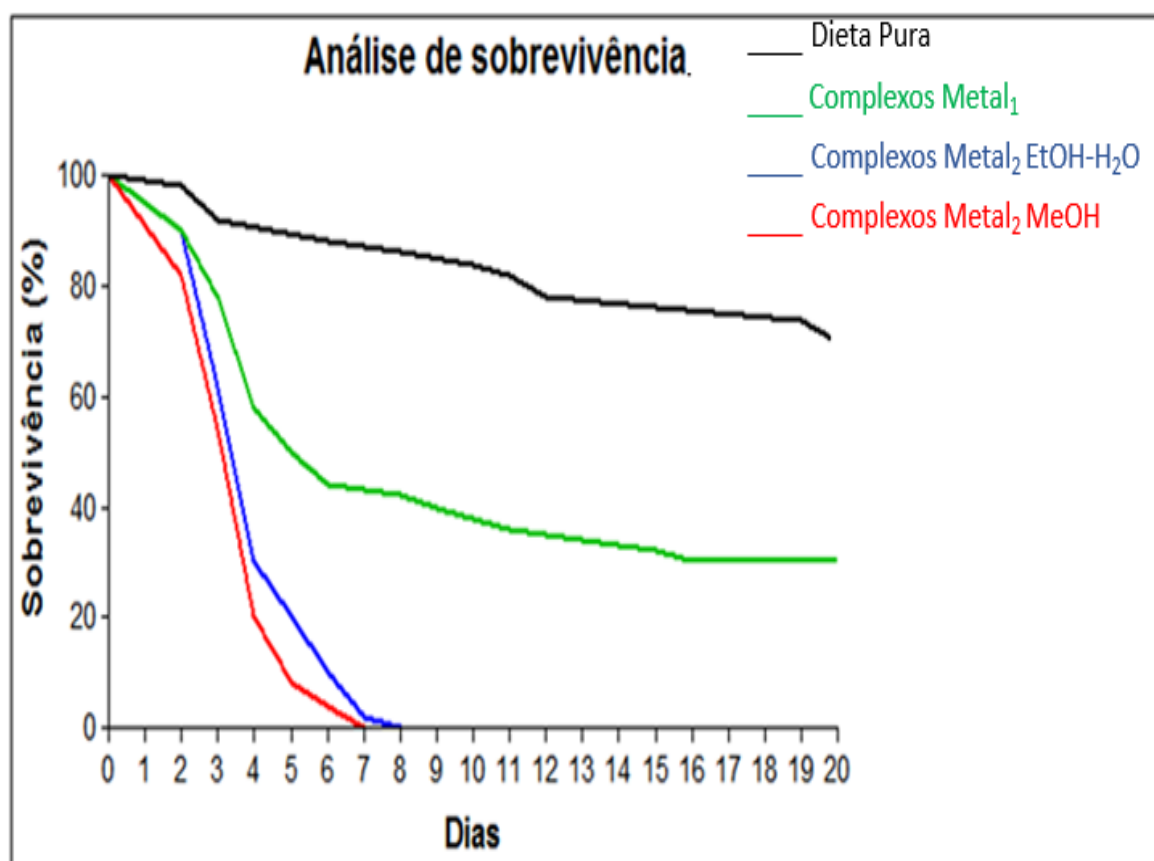


FIGURA 41 - Curvas de sobrevivência de operárias *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os complexos na concentração de 25 mg/mL.

TABELA 06 - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial com os Complexos na concentração de 25mg/mL.

Tratamento	% acumulada de mortalidade por dia										Md *
	1	2	3	6	8	10	12	14	18	20	
Dieta Pura	0	2	8	12	14	16	22	22	24	30	>25 ^a
Complexo Metal₁	0	10	22	56	58	60	64	66	70	70	5.5 ^b
Complexo Metal₂ EtOH-H₂O	0	10	38	90	100	100	100	100	100	100	4 ^b
Complexo Metal₂ MeOH	0	18	46	96	100	100	100	100	100	100	4 ^b

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

Como pode ser observado na TABELA 06, os complexos do metal₁ chegaram a apresentar 70% de mortalidade em 18 dias, o que justifica a não utilização dos mesmos como inseticidas para o combate a formigas cortadeiras, uma vez que, inseticidas devem apresentar mortalidade de no mínimo 90% até o 10^o dia. Com isso, seria interessante em trabalhos futuros testar atividade em outros alvos, pois complexos do metal₁ são amplamente utilizados na área médica, até mesmo pelo fato do metal₁ apresentar um preço alto para utilização na agricultura.

Por outro lado, os complexos de metal₂ apresentaram excelente atividade inseticida, com pouca mortalidade nos dois primeiros dias e 100% de mortalidade até o oitavo dia, assemelhando até o modo de controle do inseticida comercial sulfuramida, como visto no trabalho de OLIVEIRA (2012)⁹⁰. Dessa forma, os complexos de metal₂ precisam continuar sendo estudados, para saber a toxicidade frente ao solo, água e até mesmo outros animais.

4.2.2 Toxicidade para fungo *Leucoagaricus gongylophorus*

Através da análise dos dados de inibição obtidos frente ao fungo *L. gongylophorus* com os complexos do metal₁ e seu precursor, os mesmos não apresentaram significativa atividade como pode-se observar na TABELA 07.

TABELA 07 - Médias das áreas do crescimento micelial e porcentagem de inibição do complexo do metal₁ frente ao crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* após 30 dias do experimento

Ensaio	Área dos complexos do Metal ₁	Área do precursor do Metal ₁	Área do controle Metanol (500 µL)
1	9,18	9,84	11,33
2	9,07	8,97	12,06
3	6,42	8,97	11,33
4	-	9,07	12,06
5	-	9,29	12,06
Média	8,22	9,23	11,77
SD	1,56	0,36	0,40
RSD	19,01	3,96	3,38
Inibição	30%	22%	-

*Controles, 100% Metanol_500 µL; SD = Desvio Padrão; RSD = Desvio Padrão Relativo

Como pode ser observado em 30 dias de experimento, os complexos do metal₁ apresentaram 30% de inibição, um pouco mais do que seu precursor e com isso, não são indicados ao controle do fungo simbionte da formiga. Sendo assim, é necessário a realização de ensaios biológicos frente a outros problemas, principalmente na área medicinal.

Por outro lado, ao comparar os resultados de inibição obtidos com os complexos do metal₂ (FIGURA 42) tanto da síntese em metanol, quanto em etanol/água, a inibição foi de 100% frente ao fungo em 7 dias de experimento quando comparadas ao controle.

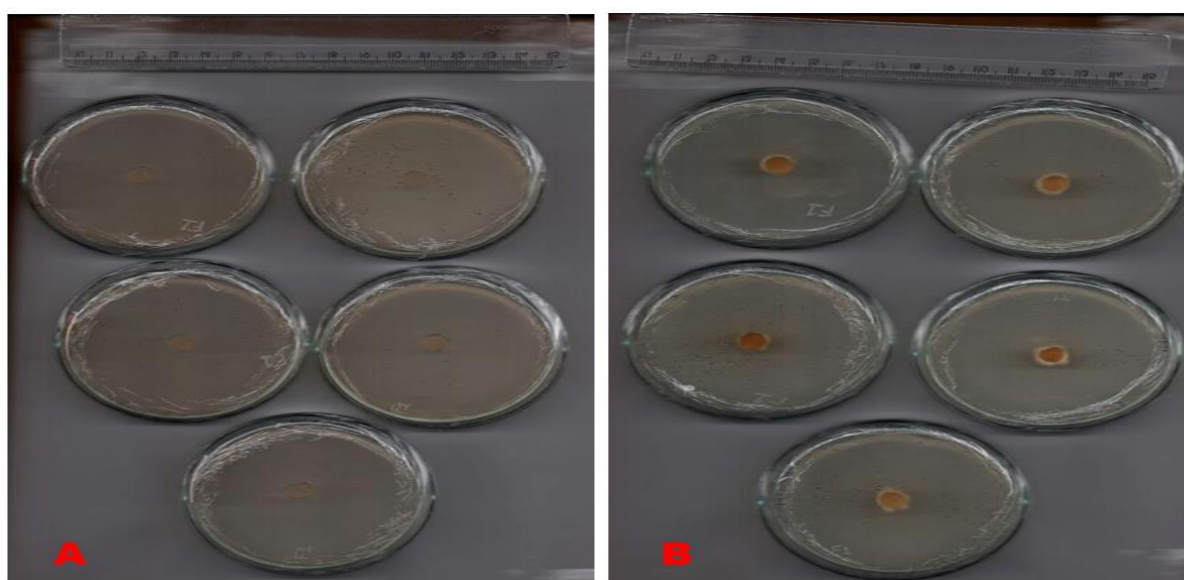


FIGURA 42 - Inibição dos complexos do metal₂ frente ao fungo simbionte da formiga com 7 dias de experimento. (A) Inibição dos complexos via de síntese em EtOH/H₂O; (B) Controle.

A FIGURA 42 na parte “A” demonstra como ficaram as placas após 7 dias de experimento, sendo visível a morte do fundo na parte central, pois o controle (parte “B”) é notório o desenvolvimento do fungo no período citado.

Este resultado é de suma importância, uma vez que os complexos ao apresentarem inibição frente ao fungo e formigas, portanto, produtos podem ser gerados no mercado como forma de fungicida e/ou inseticida.

5. – CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico realizado frente aos extratos metanólico dos galhos e diclorometânico das folhas de *Picramnia glazioviana* possibilitou o isolamento e identificação de substâncias já conhecidas no gênero e espécie, como crisofanol e aloe-emodina, as quais podem ser as possíveis responsáveis pela atividade inseticida apresentada, de acordo com os dados já obtidos em trabalhos do grupo de pesquisa, como, por exemplo, KITAMURA (2012).⁵¹

O trabalho trouxe a separação de extratos brutos complexos com a utilização de uma técnica pouco utilizada no Brasil, que é a cromatografia de partição centrífuga-CPC, a qual pode se tornar um aliado na separação de extratos brutos, pelo fato de trabalhar apenas com solventes, apresentar alto índice de recuperação de amostra e obter separação em larga escala.

Os resultados com os novos complexos metálicos advindos de substâncias presentes no bagaço de laranja são promissores, tanto pelo fato de não haver relatos na literatura da maneira como ocorreu o processo geral da síntese, quanto pelo fato da formação de novos complexos com substâncias de interesse (flavonóides uma classe de metabólitos com atividades biológicas comprovadas), apresentando atividade inseticida e fungicida.

Os complexos com Metal₂ apresentaram inibição frente ao fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e ação inseticida frente a formigas cortadeiras, *Atta sexdens rufopilosa*, gerando a redação de uma patente.

Portanto, a aplicação de uma abordagem de separação (CPC) pouco utilizada no Brasil para extratos complexos, auxiliado pela resposta das atividades biológicas proeminentes geraram possibilidade de futuras aplicações dos resultados, como também oportunidades para novos trabalhos no grupo de pesquisa. Além disso, a complexação de substâncias de interesse advindas de extratos complexos em metais, geraram a redação de uma patente com os resultados obtidos, contribuindo assim para abordagens inovadoras na Química de Produtos Naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERNÁNDEZ, F. A new myrmicine ant genus from Malaysia with uncertain affinities (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa*, **341**: 1–6, 2003.
2. SOUTO, L. S.; GUERRA, M. B. B.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; SILVA, W. L. “Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado”. *Revista Árvore*, **31**:163-167, 2007.
3. SOUZA, A.; ZANETTI, R.; CALEGARIO, N. Economic damage level for leaf-cutting ants in function of the productivity index of eucalyptus plantations in an atlantic forest region. *Neotropical Entomology*, **40**:483–488, 2011.
4. ZANETTI, R., ZANUNCIO, J., SANTOS, J., DA SILVA, W., RIBEIRO, G., & LEMES, P. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. *Forests*, **5**:439–454, 2014
5. CAFARO, M.J.; POULSEN, M.; LITTLE, A.E.F.; PRICE, S.L.; GERARDO, N.M.; WONG, B.; STUART, A.E.; LARGET, B.; ABBOT, P.; CURRIE, C.R. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London B*. **278**:1814–1822, 2011
6. ESTRADA, C.; WCISLO, W.T.; VAN BAEL, S.A. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist*. **198**:241–251, 2013.
7. HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. The Ants. *Harvard University Press, Cambridge*. p.: 732. 1990.
8. SILVA, A.; BACCI JR, M.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, **49**: 307–313, 2003.
9. BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de Formigas Cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, **11**:31-46, 1997.
10. SILVA, F. F.; PAZINI, J. B. “Combatendo as formigas cortadeiras em cultivos florestais”. *Revista Campo e Negócios*, **1**: 30-32, 2012.
11. PETERNELLI, E.F.O., T.M.C. DELLA LUCIA, L.A. PETERNELLI & N.C. MOREIRA. Seed transport and removal of the elaiosome of *Mabea fistulifera* by

workers of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, **53**:275-290, 2009

12. DELLA LUCIA, T. C. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. "Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges". *Pest Management. Science*, **70**:14-23, 2014.

13. ARAUJO, C. A. C.; LEON L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**:723-728, 2001.

14. ENGELKE, F. "Fitoterápicos e Legislação." *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, **1**: 10-15, 2003.

15. GRUPO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS-LAPACIS/FCM/UNICAMP. Cartilha de Plantas Mediciniais. Campinas-SP, 1ªEd.:p.54, 2018.

16. CASSILETH, B.; YEUNG, K.S.; GUBILI, J. Herbs and Other Botanicals in Cancer Patient Care. *Current Treatment Options in Oncology*, **9**:109-116, 2008.

17. ALVES A.R.; SILVA, M.J.P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. *Revista Escola de Enfermagem, USP*, **37**:85-91, 2003.

18. BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª edição. ANVISA, p.160, 2018.

19. MACHADO, C.A.; VARGAS, J.F.R. Plantas medicinais do jardim botânico de Porto Alegre. Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul. Escola de Saúde Pública, p.110 , 2018.

20. BUENO, M.J.A.; MARTÍNEZ, B.B.; BUENO, J.C. Manual de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos Utilizados na Cicatrização de Feridas. Universidade do Vale do Sapucaí-UNIVÁS. Pouso Alegre. p.145, 2016.

21. VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G., Gênero *Baccharis* (Asteraceae): "Aspectos químicos, econômicos e biológicos.", *Química Nova*, **28**: 85-94, 2005.

22. BRUNETON, J. "Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants". p. 1136, 1999.

23. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP - APG III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**:105-121, 2009.

24. CHASE, M.W. e JAMES L. REVEAL, J.L. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**:122–127, 2009.
25. ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP - APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **181**:1-20, 2016.
26. WANG, H.; MOORE, M.J.; SOLTIS, P.S.; BELL, C.D.; BROCKINGTON, S.F.; ALEXANDRE, R.; DAVIS, C.C.; LATVIS, M.; MANCHESTER, S.R.; SOLTIS, D.E. Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *PNAS*, **106**:3853-3858, 2009
27. CRONQUIST, A.J. "The evolution and classification of flowering plants". *The New York Botanical Garden*, Bronx, New York. 1988.
28. PIRANI, J.R; SILVA-LUZ, C.L. Check-list de Picramniales e Sapindales (exceto Sapindaceae) do estado de Mato Grosso do Sul, Iheringia, Série Botânica, Porto Alegre, **73**(supl.):301-307, 2018.
29. FERNANDO E.S.; QUINN, C.J. "Picramniaceae, a new family, and circumscription of Simaroubaceae". *Taxon*, **44**:177-181. 1995.
30. BURIL, M.T., THOMAS, W.W.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu-PE: Rutaceae, Simaroubaceae e Picramniaceae. *Rodriguésia*, **65**: 701-710. 2014
31. SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. *Instituto Plantarum*, p.: 768, 2012.
32. PIRANI, J. R. *Picramniaceae*. In: Berry, P.E.; Yatskievych, K. & Holst, B.K. Flora of the Venezuelan Guayana. *Missouri Botanical Garden Press*, **9**: 177-186, 2005b.
33. HERZ, W., SANTHANAM, P.S., WAHLBERG, I. 3-epi-Betulinic acid, a new triterpenoid from *Picramnia pentandra*. *Phytochemistry*, **11**:3061-3063, 1972.
34. POPINIGIS, I., MOREIRA, E.A., NAKASHIMA, T., KRAMBECK, R., MIGUEL, O.G. Pharmacognostic study of *Picramnia parvifolia*. Engler. Simaroubaceae, **48**:24-43, 1980
35. DIAZ, F.; CHAI, H.B.; MI, Q.; SU, B.N.; VIGO, J.S.; GRAHAM, J.G.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTTO, J.M.; SWANSON, S.M. & KINGHORN, A.D. "Anthrone and oxanthrone C-glycosides from *Picramnia latifolia* collected in Peru". *Journal of Natural Products*, **67**:352-356, 2004

36. HERNANDEZ-MEDEL, M.D.R.; LOPEZ-MARQUEZ, O.; SANTILLAN, R.; TRIGOS, A. "Mayoside, an oxanthrone from *Picramnia hirsute*". *Phytochemistry*, **43**:279- 281, 1996.
37. HERNANDEZ-MEDEL, M.D.R.; GARCIA-SALMONES, I.; SANTILLAN, R.; TRIGOS, A. "An anthrone from *Picramnia antidesma*". *Phytochemistry*, **49**:2599- 2601, 1998.
38. HERNANDEZ-MEDEL. M.D.R.; RAMIREZ-CORZAS, C.O.; RIVERA-DOMINGUEZ, N.; RAMIREZ-MENDEZ, J.; SANTILLAN, R.; ROJAS-LIMA, S. "Diastereomeric C-glycosyloxantrones from *Picramnia antidesma*". *Phytochemistry*, **50**:1379- 1383, 1999.
39. RODRIGUES, F. E. Estudo Fitoquímico de *Picramnia riedeli* e *Picramnia bahiensis*: Uma Contribuição à Quimiosistemática da Família Simaroubaceae. São Carlos. Programa de Pós-graduação em Química da UFSCar. 1989. Dissertação de mestrado.
40. RODRIGUEZ-GAMBOA, T. Estudo Químico de *Picramnia teapensis*, *Picramnia latifolia* e *Ipomoea batatas* em Associação ao Controle de Formigas-Cortadeiras *Atta sexdens* e seu Fungo Simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2001. Tese de doutorado.
41. VIEIRA, I.J.C. Uma Contribuição à Química da Família Simaroubaceae. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 1995, 318p.
42. PIRANI, J.R. Revisão taxonômica de *Picramnia* Sw.(Simaroubaceae) no Brasil. São Paulo. Universidade de São Paulo – USP, 1989. Tese de doutorado.
43. BOJCZUK, M.; DOROTA, Z.; HODUREK, P. Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references. *Journal of Separation Science*, **40**:1597:1609, 2017.
44. NAM, B.; PAUDEL, S.B.; KIM, J.B.; JIN, C.H.; LEE, D.; NAM, J.W.; HAN, A.R. Preparative Separation of Three Monoterpenes from *Perilla frutescens* var. *crispa* Using Centrifugal Partition Chromatography. *International Journal of Analytical Chemistry*, **2019**:1-7, 2018.
45. SANTOS, J.H.P.M.; ALMEIDA, M.R; MARTINS, C.I.R; DIAS, A.C.R.V.; FREIRE, M.G.; COUTINHO, J.A.P.; VENTURA, S.P.M. Separation of phenolic compounds by centrifugal partition chromatography. *Green Chemistry*, **20**:1906-1916, 2018.

46. KIM, M.I.; KIM, J.H.; SYED, A.S.; KIM, Y.M.; CHOE, K.K.; KIM, C.Y. Application of Centrifugal Partition Chromatography for Bioactivity-Guided Purification of Antioxidant-Response-Element-Inducing Constituents from *Atractylodis Rhizoma Alba*. *Molecules*, **23**, 2274-2284, 2018.
47. BUENO, F.C.; GODOY, M.P.; LEITE, A.C.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; HEBLING, M.J.A.; BACCI JR., M.; VIEIRA, P.C. & SILVA, M.F.G.F. "Toxicity of *Cedreia fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus". *Sociobiology*, **45**: 389-399, 2005.
48. KAMETANI, S. *et al.* Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on ehrlich ascites tumor cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **71**: 1220–1229, 2007.
49. WU, D.-W. *et al.* New isocoumarin and stilbenoid derivatives from the tubers of *Sparganium stoloniferum* (Buch.-Ham.). *Natural Product Research*, **31**:131–137, 2017.
50. YANG, F. *et al.* Anthraquinones and biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Chemistry of Natural Compounds*, **47**: 627–629, 2011.
51. KITAMURA, R.O.S. Estudo Fitoquímico Biomonitorado em *Picramnia Bahiensis* e *Thyrsodium Schomburgkianum* – Inseticidas, Fungicidas E Microencapsulação. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2013. Tese de doutorado, 343 p.
52. RODRÍGUEZ-GAMBOA, T.; FERNANDES, J.B.; RODRIGUES-FILHO, E.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; BARRIOS, M.; CASTRO-CASTILLO, O.; VICTOR, S.R.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C; HEBLING, M.J.A. Triterpene Benzoates from the Bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **12**: 386-390, 2001.
53. LIMA, U. A. Matérias-primas dos alimentos. São Paulo: Blucher, 2010.
54. CYPRIANO, D. Z.; SILVA, L. L.; MARINO, M.A.; TASIC, L. A biomassa da laranja e seus subprodutos. *Revista Virtual de Química*, **9**, 2017.
55. BERMEJO, A., LLOSA, M.J., CANO, A., Analysis of Bioactive Compounds in Seven Citrus Cultivars, *Food Science and Technology International*, **17**: 55-62, 2011.
56. WIDMER, W., ZHOU, W., GROHMANN, K. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation, *Bioresource Technology*, **101**: 5242-9, 2010.

57. TAHERZADEH, M.J., POURBAFRANI, M., LOHRASBI, M., NIKLASSON, C. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products, *Bioresource Technology*, **101**: 7382–7388, 2010.
58. SARKAR, N., GHOSH, S.K., BANNERJEE, S., AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview, *Renewable Energy*, **37**:19-27, 2012.
59. AGATI, G.; AZZARELO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. "Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance". *Plant Science*, **196**: 67-76, 2012.
60. LIN, L.; CHEN, P. e HARNLY, J. M. "New phenolic components and chromatographic profiles of green and fermented teas". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, **56**: 8130-8140, 2008.
61. WANG, S.; HUANG, K. "Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis". *Journal of Chromatography A*, **1032**: 73-179, 2004.
62. COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Quimica*, **1**:241-256, 2009.
63. HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. The Flavonoids: Advances in Research, Chapman & Hall, London, p. 744, 1982.
64. BELLETE, B.S.; RAMIN, L.Z.; PORTO, D.; RIBEIRO, A.I.; FORIM, M.R.; ZUIN, V.G.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. An Environmentally Friendly Procedure to Obtain Flavonoids From Brazilian Citrus Waste. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **00**: 1-7, 2018.
65. BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. "Flavonoids: New roles for old molecules". *Journal of Integrative Plant Biology* **52**: 98-111, 2010.
66. HE, J.; GIUSTI, M. M. "Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties". *Annual Review of Food Science and Technology*, **1**: 163-187, 2010.
67. PROCHAZKOVA, D.; BOUSOVA, I.; WIHELMOVA, N. "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids". *Fitoterapia*. **82**: 513-523, 2011.
68. GRAZUL, M.; BUDZISZ, E. "Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones". *Coordination Chemistry Reviews*, **253**: 2588-2598, 2009.
69. DE SOUZA, R. F. V.; DE GIOVANI, W. F. "Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions". *Redox Report*, **9**: 97-104, 2004.

70. KUMAR, S.; DHAR, D. N.; SHAXENA, P. N. "Applications of metal complexes of schiff bases-A review". *Journal of Scientific and Industrial Research*, **68**: 181-187, 2009.
71. HARRISA, R. J.; ETHERIDGE, N. D. "Comparison of baits containing fipronil and sulfluramid for the control of *Vespula* wasps". *New Zealand Journal of Zoology*, **45**: 39-48, 2001.
72. SILVA, P.P.; GUERRA, W. Rutênio. *Química Nova na Escola*, **34**: 99-100, 2012.
73. SEDDON, E. A., The chemistry of ruthenium. *Elsevier*, 1984.
74. SHANNON, R. D. "Revised effective ionic-radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides". *Acta Crystallographica Section A*, **32**: 751-767, 1976.
75. BOCK, C. W.; KAUFMAN, A.; GLUSKER, J. P. "Coordination of water to magnesium cations". *Inorganic Chemistry*, **33**: 419-427, 1994.
76. MUIR, K. W. "Therapeutic potential of magnesium in the treatment of acute". *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases*, **9**: 257-267, 2000.
77. COX, P. A., Instant Notes. *Inorganic Chemistry*. Second Edition ed.; Taylor & Francis: London, 2004.
78. CARUGO, O.; DJINOVIC, K.; RIZZI, M. "Comparison of the coordinative behavior of calcium(ii) and magnesium(ii) from crystallographic data". *Dalton Transactions - Royal Society of Chemistry*. 2127-2135, 1993.
79. BEHBEHANI, G. R.; SABOURY, A. A. "A thermodynamic study on the binding of magnesium with human growth hormone - Consideration of the new extended coordination model solvation parameters". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **89**: 857-861, 2007.
80. FRAKES, M. A.; RICHARDSON, L. E. "Magnesium sulfate therapy in certain emergency conditions". *American Journal of Emergency Medicine*, **15**: 182-187, 1997.
81. SILVA, P.P.; GUERRA, S. Platina. *Química Nova na Escola*, **32**: 128-129, 2010.
82. NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de Platina(II) na Terapia do Câncer. *Revista Virtual de Química*, **3**: 196-209, 2011.
83. LI, M.-X.; ZHANG, L.-Z.; YANG, M.; NIU, J.-Y.; ZHOU, J. Synthesis, crystal structures, in vitro biological evaluation of zinc(II) and bismuth(III) complexes of 2-acetylpyrazine *N*(4)- phenylthiosemicarbazone. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*

Letters, **22**: 2418- 2423, 2012.

84. ENYEDY, É. A.; ZSIGÓ, É.; NAGY, N. V.; KOWOL, C. R.; ROLLER, A.; KEPPLER, B. K.; KISS, T. Complex-formation ability of salicylaldehyde thiosemicarbazone towards Zn^{II}, Cu^{II}, Fe^{II}, Fe^{III} and Ga^{III} ions. *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2012**: 4036-4047, 2012.

85. LOBANA, T. S.; KUMARI, P.; HUNDAL, G.; BUTCHER, R. J.; CASTINEIRAS, A.; AKITSU, T. Metal derivatives of N1-substituted thiosemicarbazones: Synthesis, structures and spectroscopy of nickel(II) and cobalt(III) complexes. *Inorganica Chimica Acta*, **394**: 605–615, 2013.

86. JANSSON, P. J.; SHARPE, P. C.; BERNHARDT, P. V.; RICHARDSON, D. R. Novel thiosemicarbazones of the ApT and DpT series and their copper complexes: identification of pronounced redox activity and characterization of their antitumor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**: 5759-5769, 2010.

87. ZEGLIS, B. M.; DIVILOV, V.; LEWIS, J. S. Role of metalation in the topoisomerase II α inhibition and antiproliferation activity of a series of α -heterocyclic-N(4)-substituted thiosemicarbazones and their Cu(II) complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*, **54**: 2391-2398, 2011.

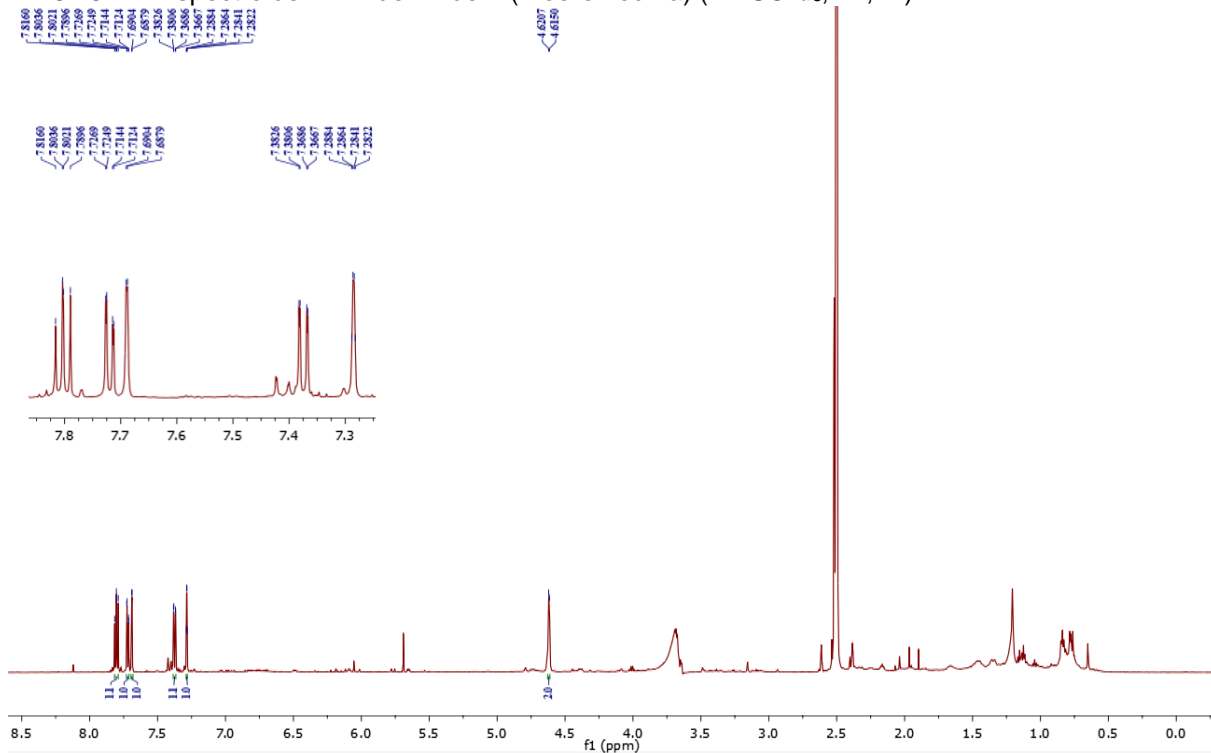
88. TARALLO, M. B.; URQUIOLA, C.; MONGE, A.; COSTA, B. P.; RIBEIRO, R. R.; COSTA-FILHO, A. J.; MERCADER, R. C.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q. F.; TORRE, M. H.; GAMBINO, D. Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **104**: 1164-1170, 2010.

89. ATASEVER, B.; ÜLKÜSEVEN, B.; BAL-DEMIRCI, T.; ERDEM-KURUCA, S.; SOLAKOĞLU, Z. Cytotoxic activities of new iron(III) and nickel(II) chelates of some S-methyl-thiosemicarbazones on K562 and ECV304 cells. *Investigational New Drugs*, **28**: 421-432, 2010.

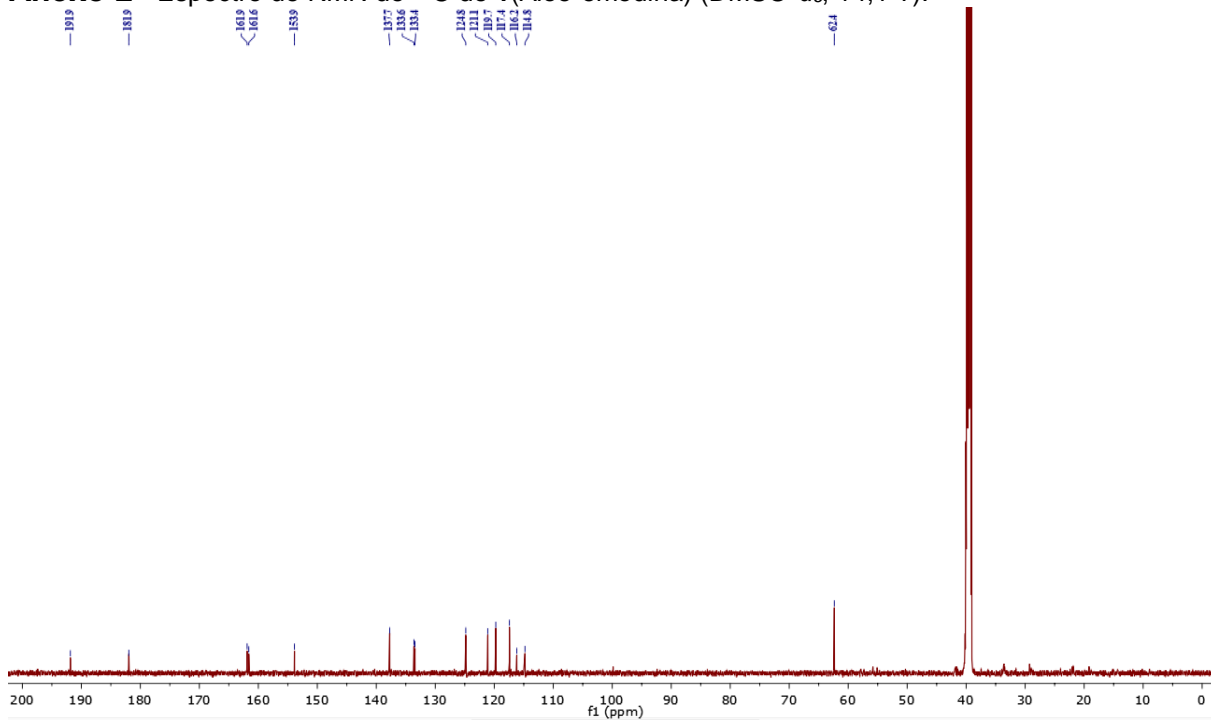
90. OLIVEIRA, R. M. M. Novos Complexos de Ru(II) e Mg (II) com Flavonoides: Atividade Tóxica, Sítios Ativos e Mecanismos de Ação. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2012. Tese de doutorado, 187 p.

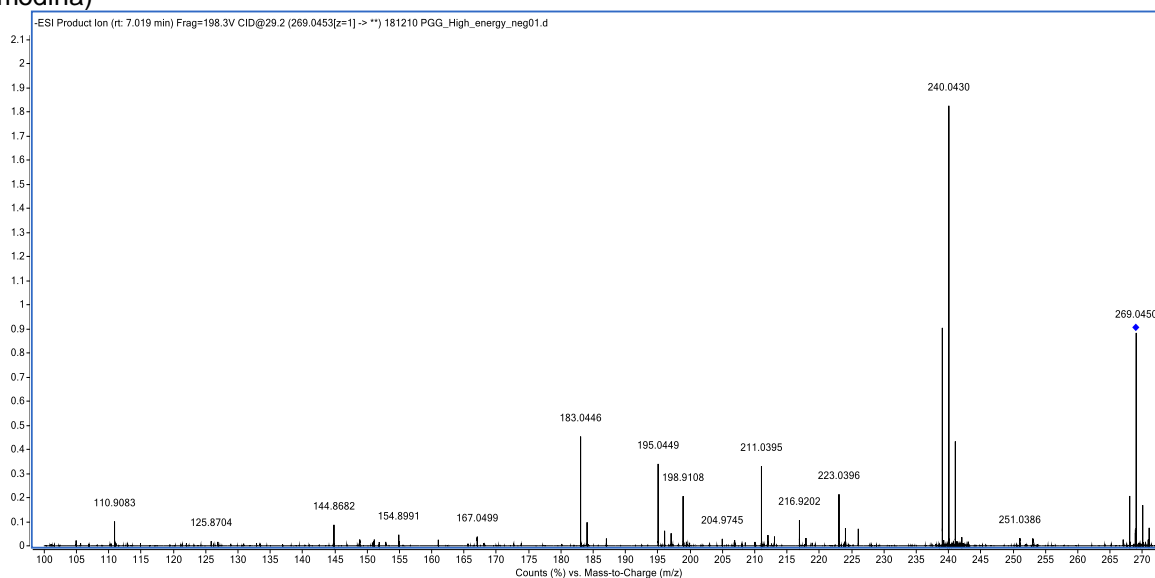
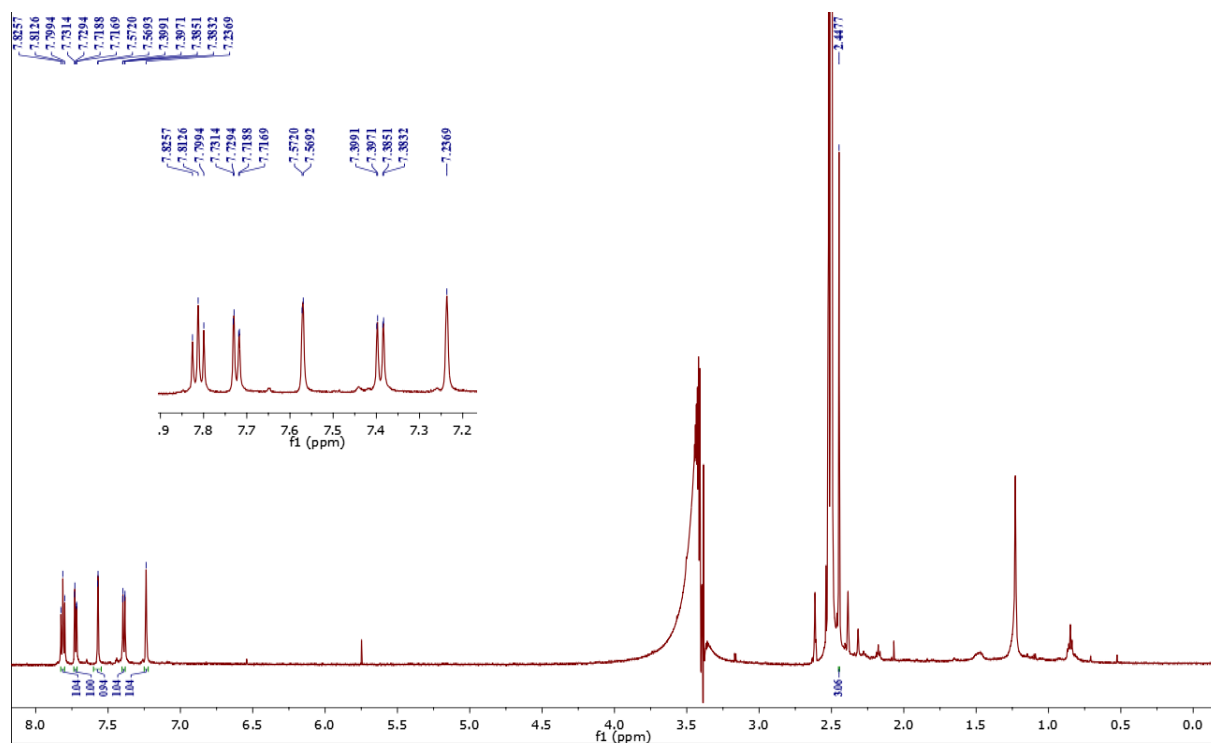
ANEXOS

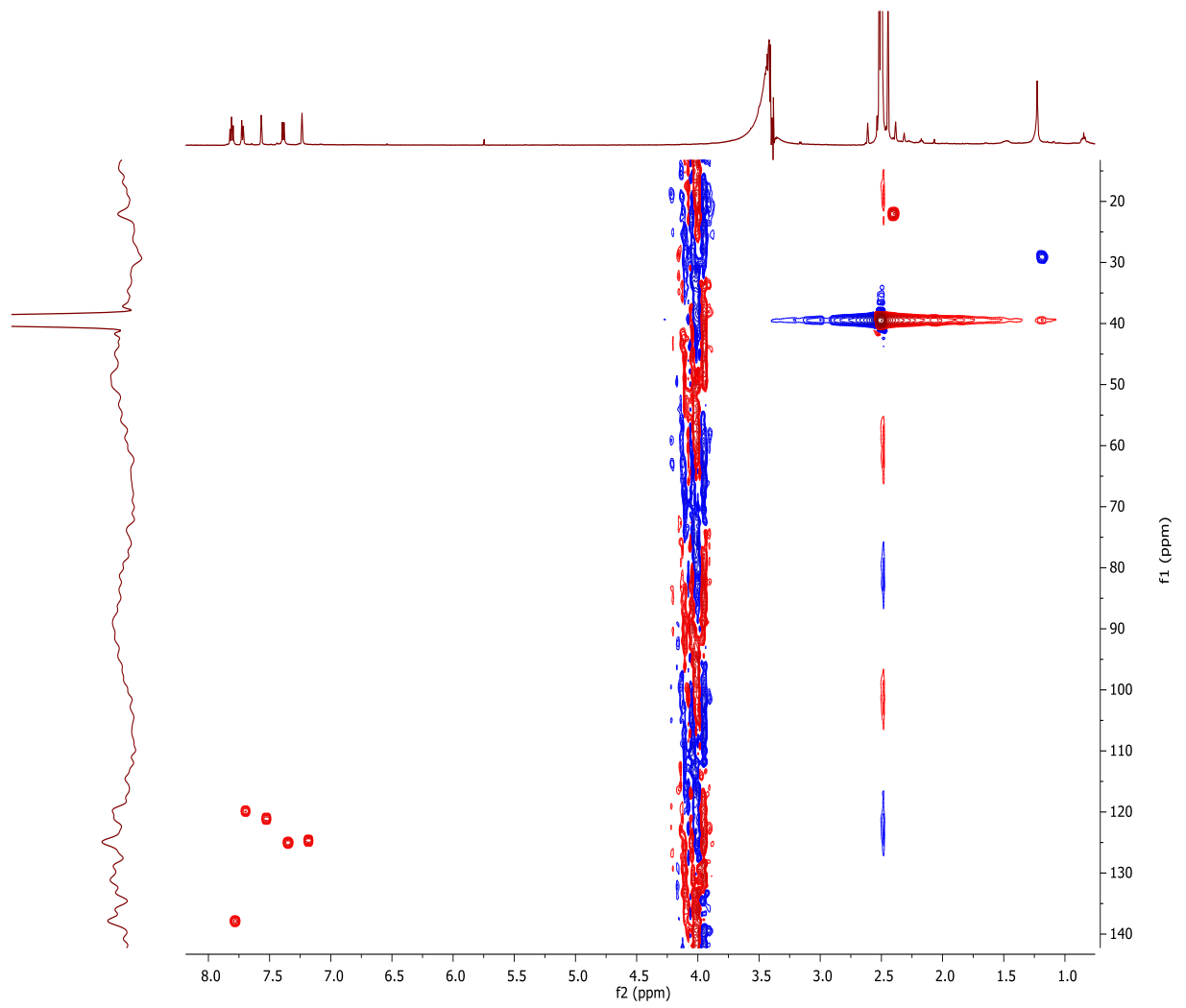
Anexo 1 - Espectro de RMN de ^1H de **1** (Aloe-emodina) ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1T).

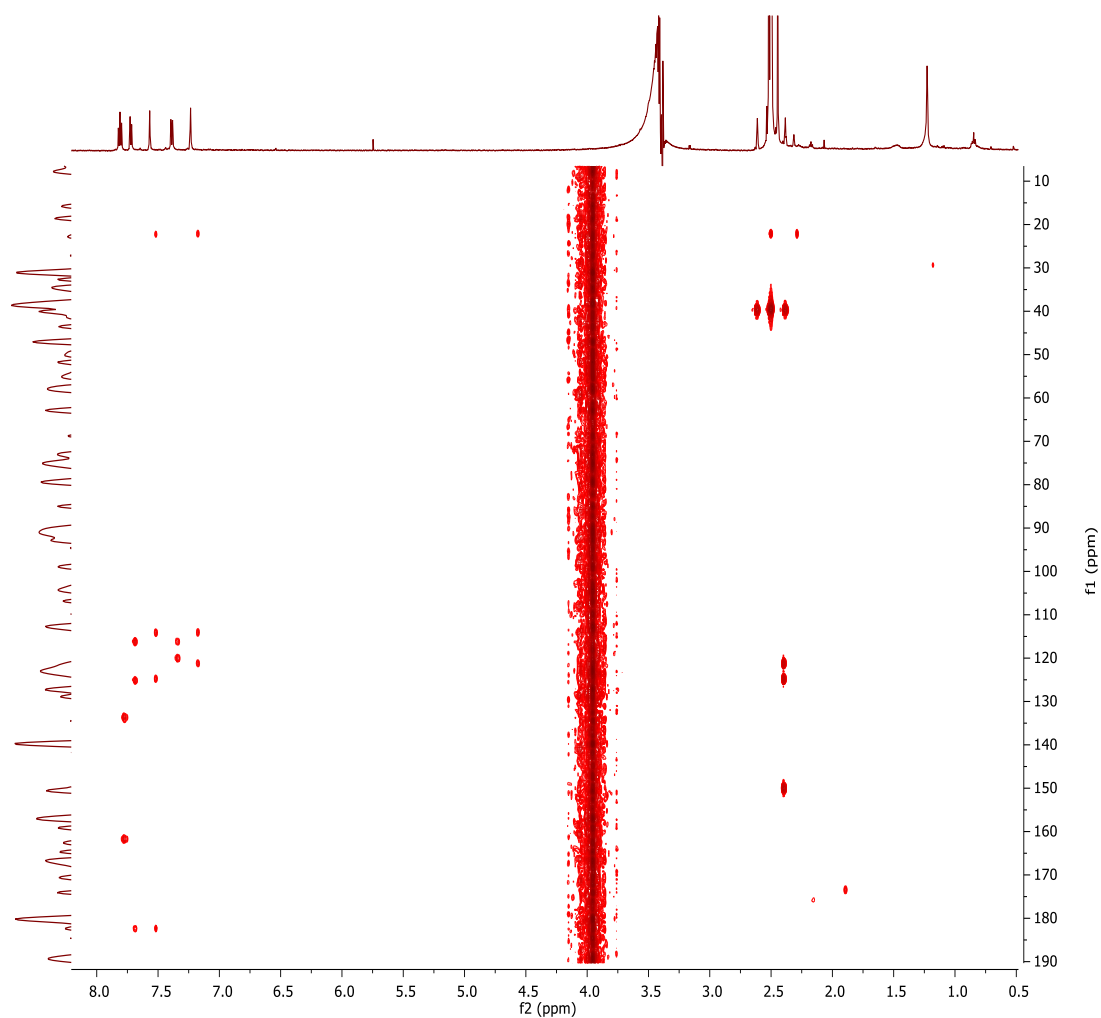
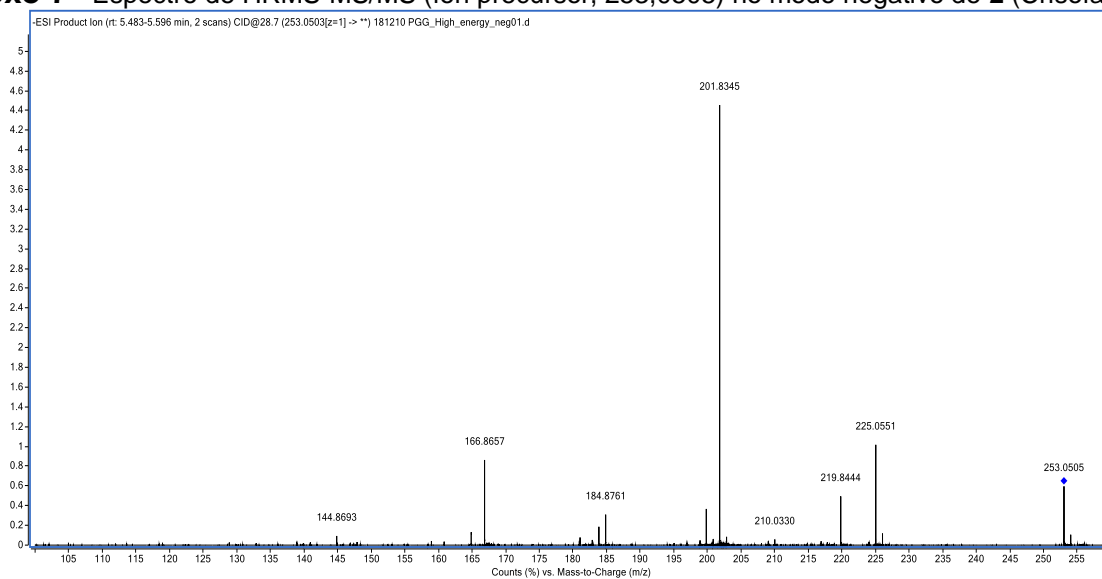


Anexo 2 - Espectro de RMN de ^{13}C de **1** (Aloe-emodina) ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T).

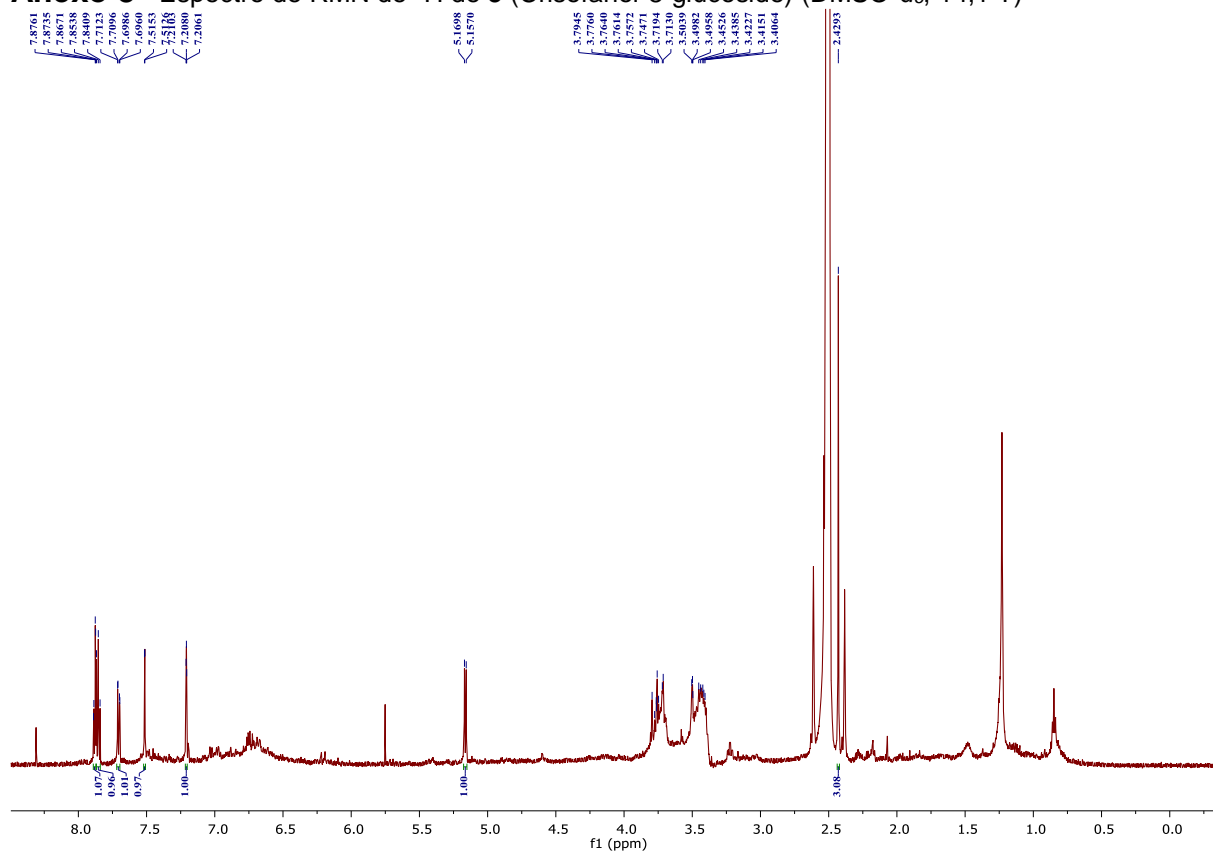


Anexo 3 - Espectro de HRMS-MS/MS (ión precursor, 269,0450) no modo negativo de **1** (Aloe-emodina)**Anexo 4** - Espectro de RMN de ^1H de **2** (Crisofanol) ($\text{DMSO-}d_6$, 14,1 T).

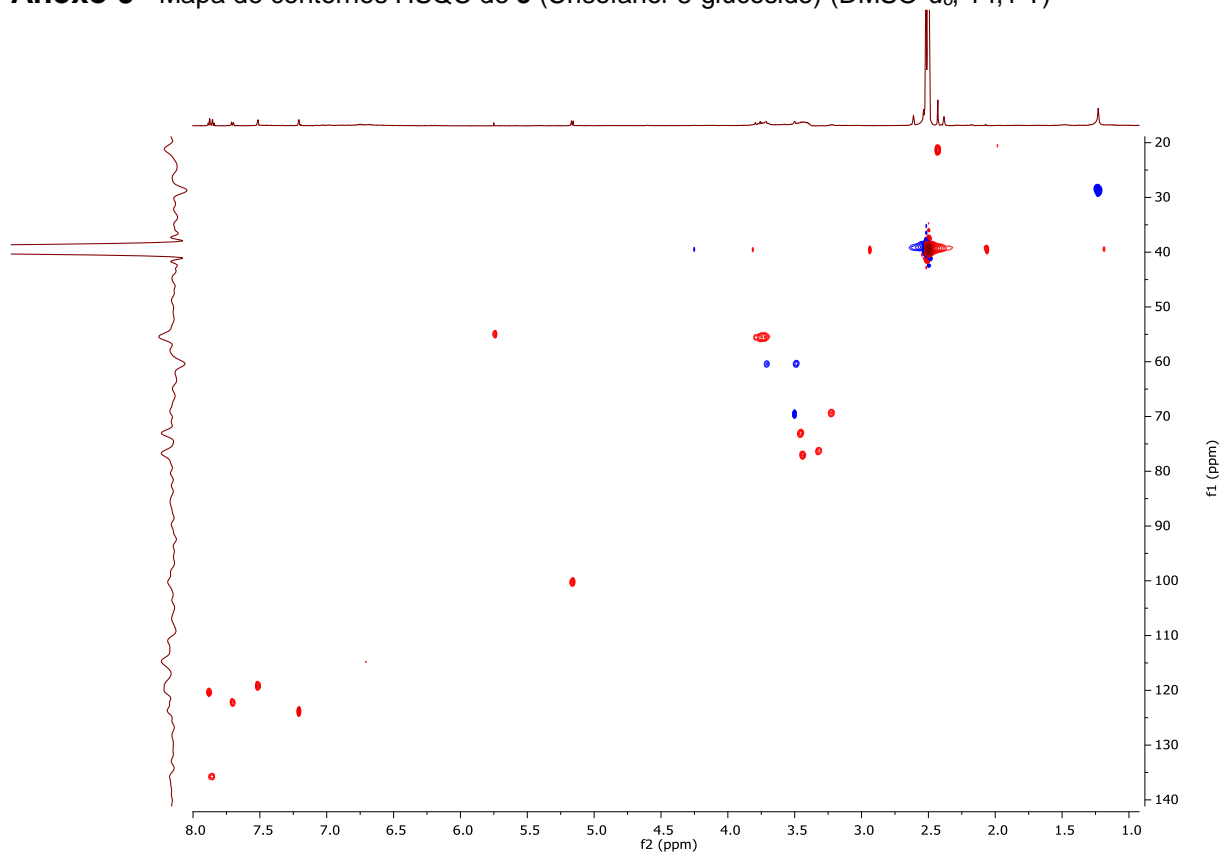
Anexo 5 - Mapa de contornos HSQC de **2** (Crisofanol) (DMSO- d_6 , 14,1 T)

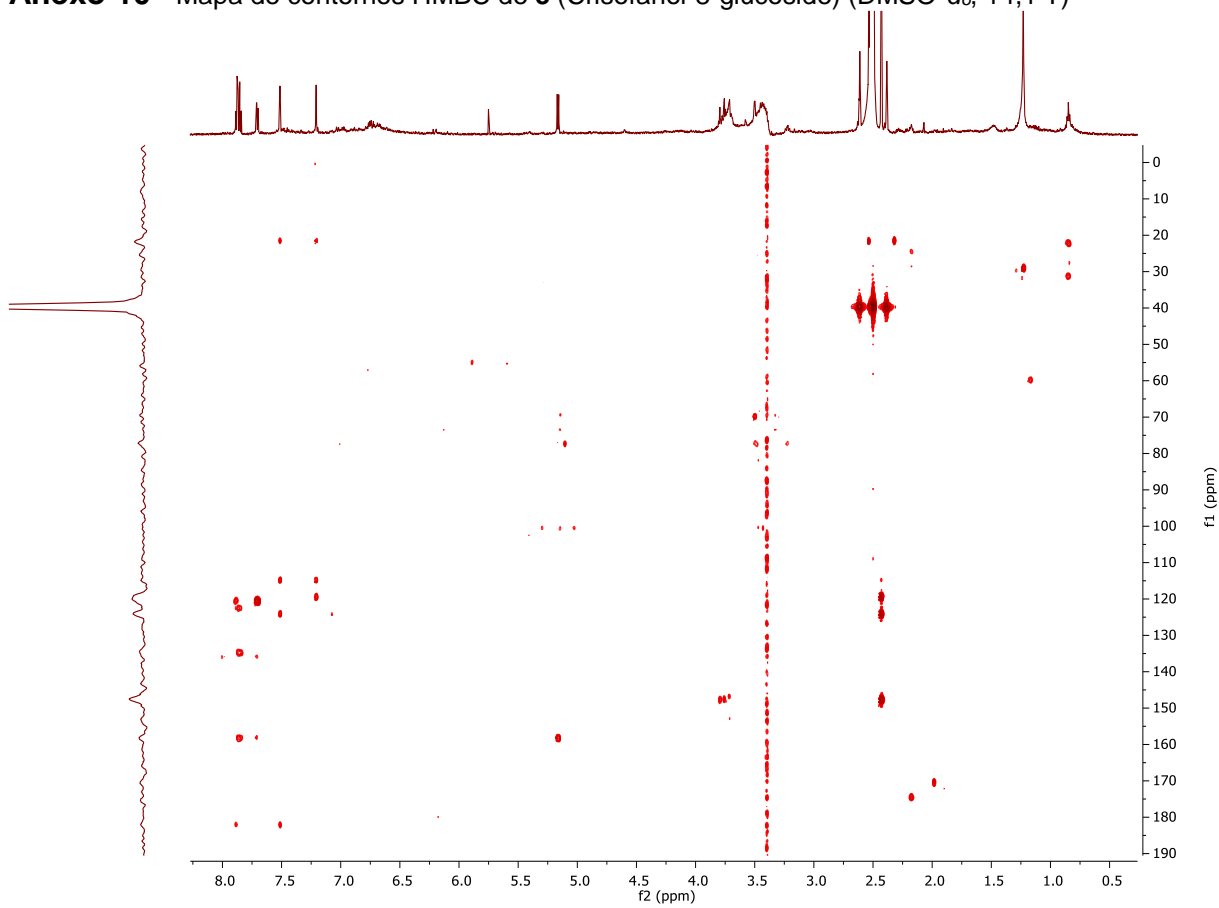
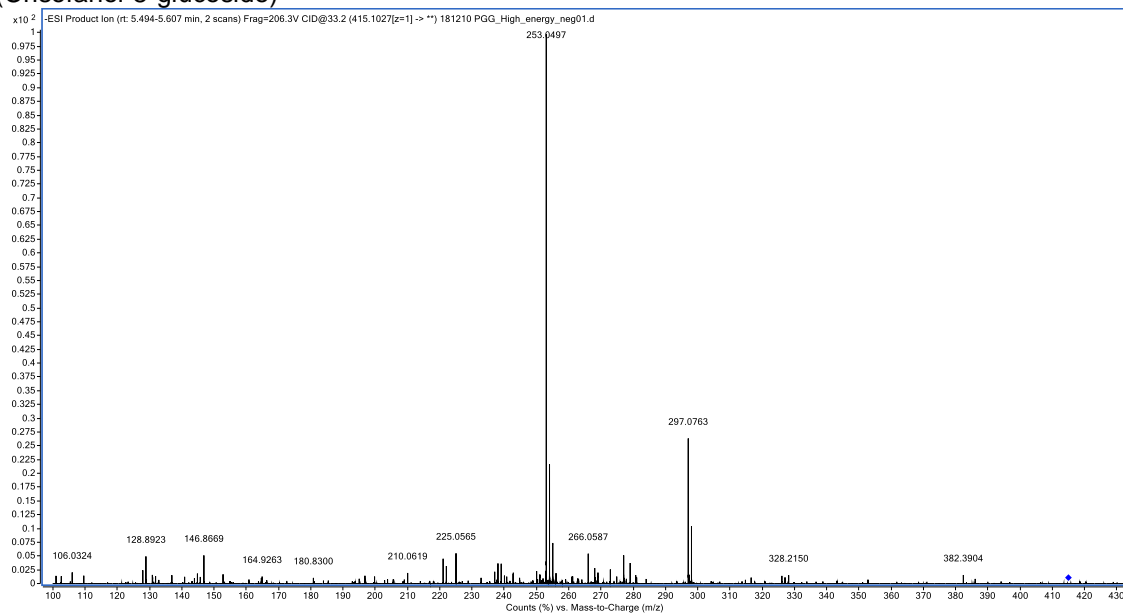
Anexo 6 - Mapa de contornos HMBC de 2 (Crisofanol) (DMSO-*d*₆, 14,1 T)**Anexo 7 - Espectro de HRMS-MS/MS (ión precursor, 253,0505) no modo negativo de 2 (Crisofanol)**

Anexo 8 - Espectro de RMN de ^1H de 3 (Crisofanol-8-glucoside) (DMSO- d_6 , 14,1 T)

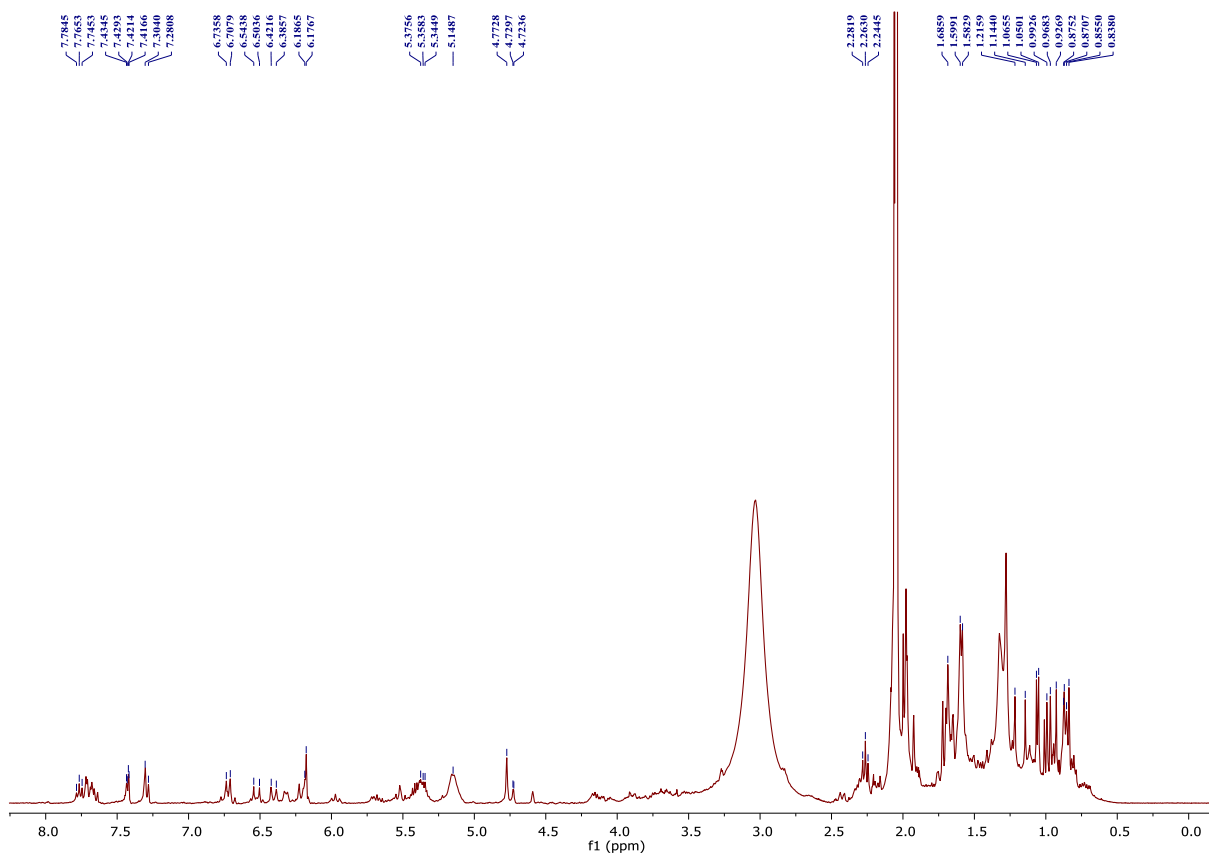


Anexo 9 - Mapa de contornos HSQC de 3 (Crisofanol-8-glucoside) (DMSO- d_6 , 14,1 T)

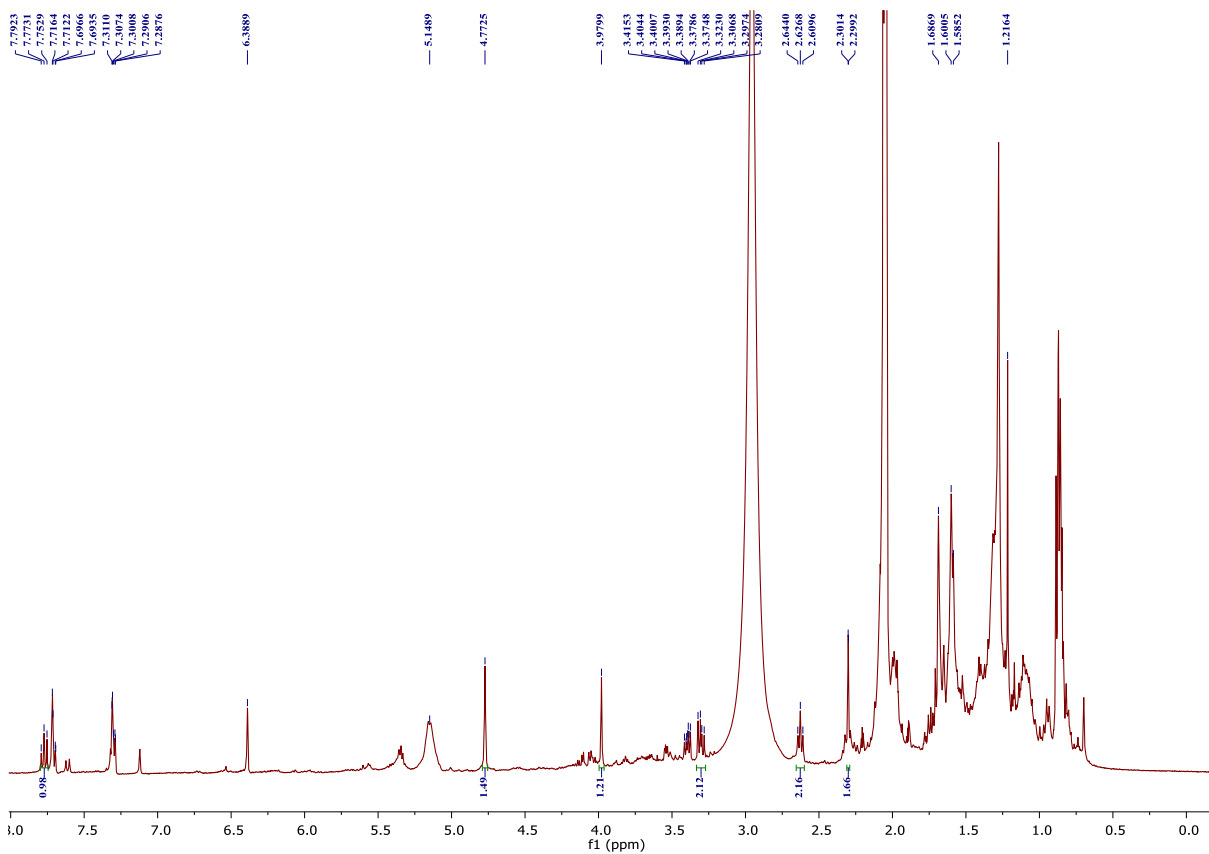


Anexo 10 - Mapa de contornos HMBC de **3** (Crisofanol-8-glucoside) (DMSO-*d*₆, 14,1 T)**Anexo 11** - Espectro de HRMS-MS/MS (ión precursor, 415,1027) no modo negativo de **3** (Crisofanol-8-glucoside)

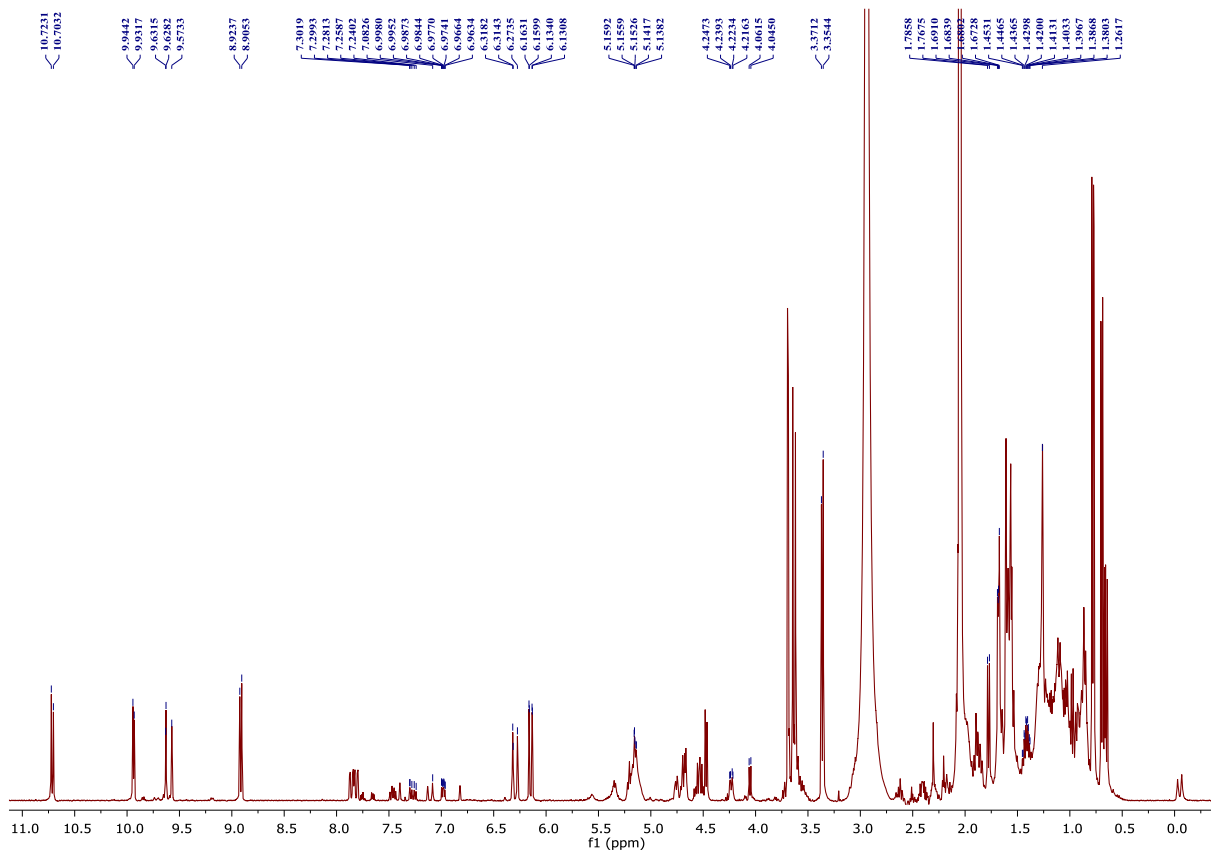
Anexo 12 - Espectro de RMN de ^1H da posição 3 - Corrida



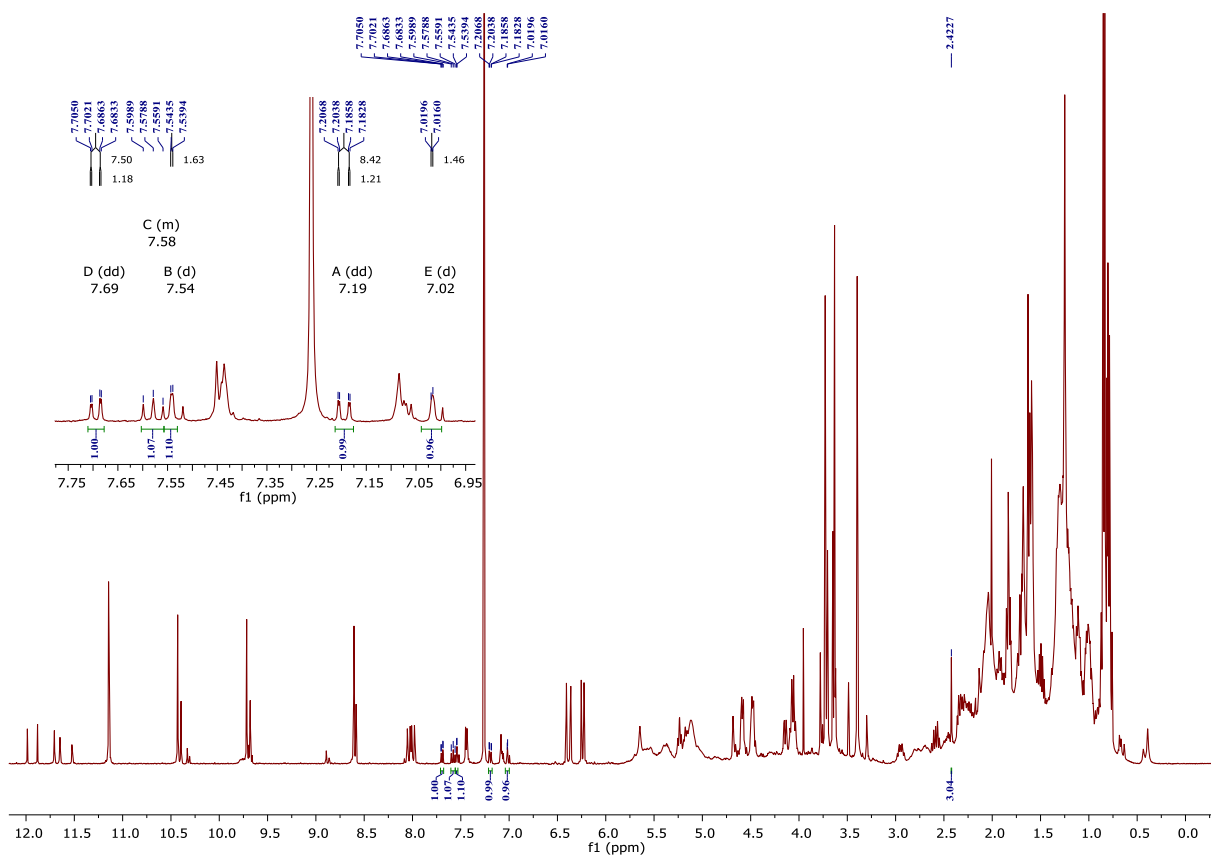
Anexo 13 - Espectro de RMN de ^1H da posição 5 - Corrida



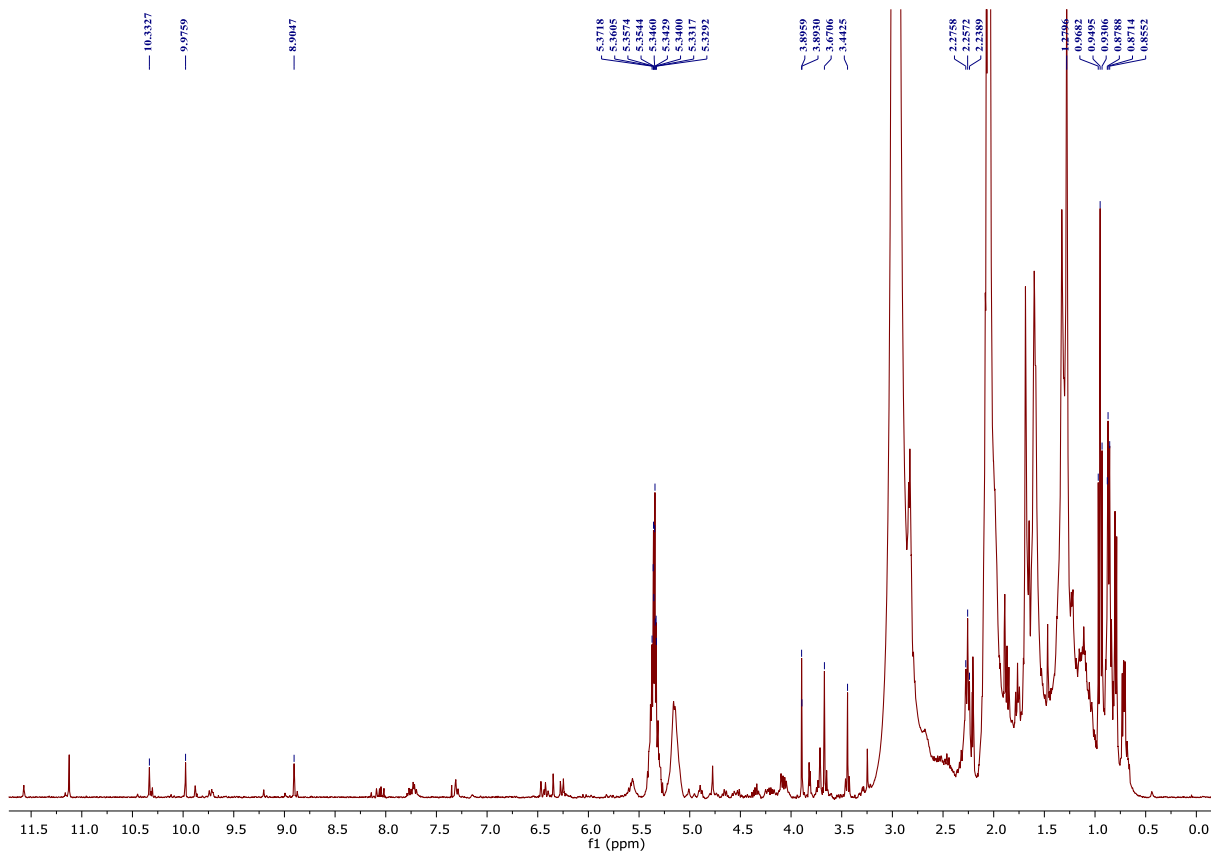
Anexo 14 - Espectro de RMN de ^1H da posição 9 - Corrida



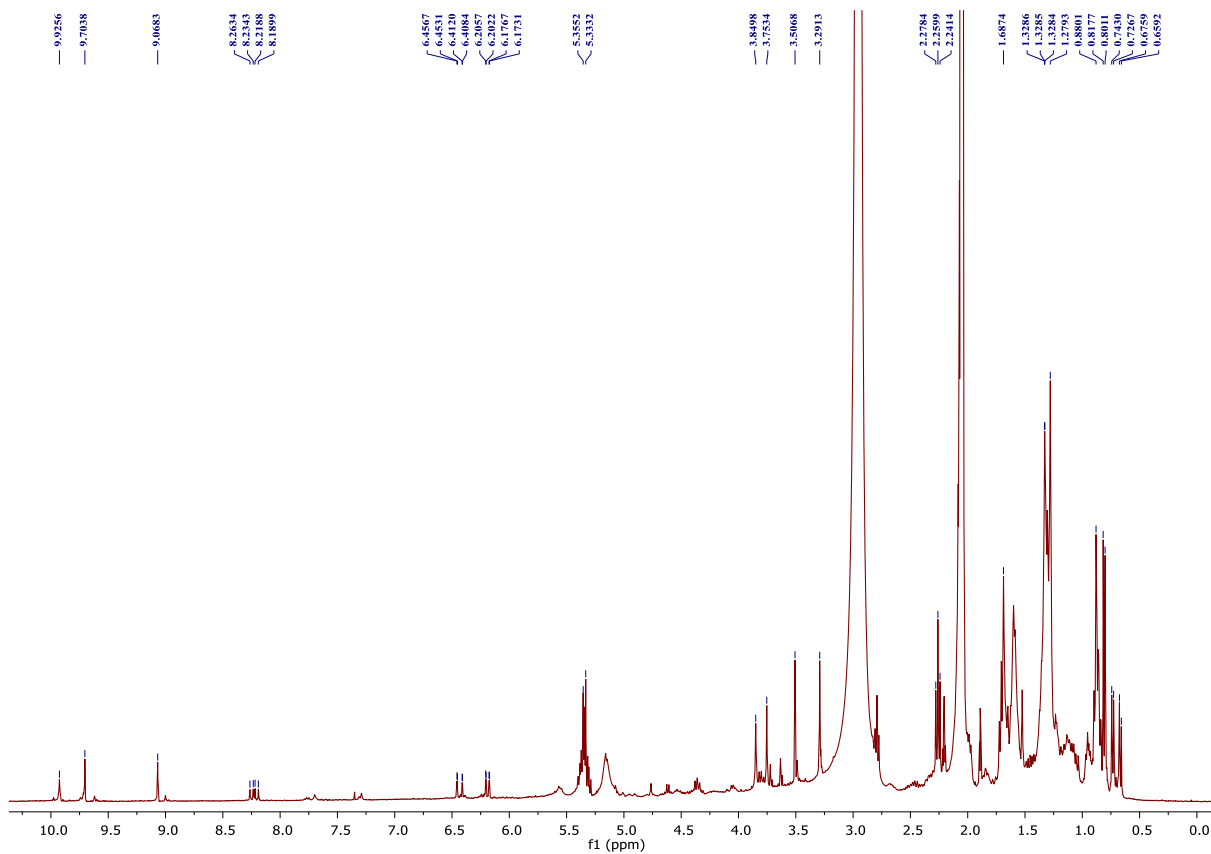
Anexo 15 - Espectro de RMN de ^1H da posição 10 – Corrida



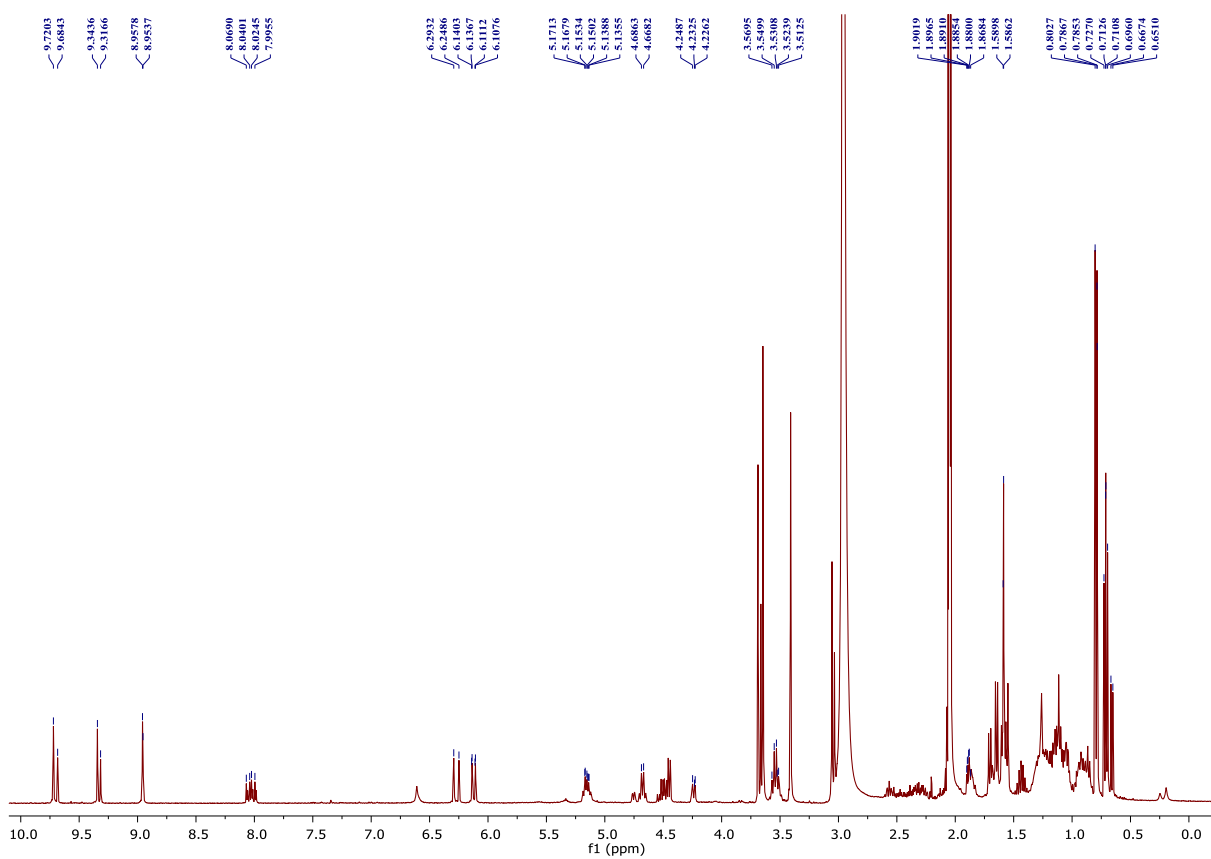
Anexo 16 - Espectro de RMN de ^1H da posição 15 – Corrida



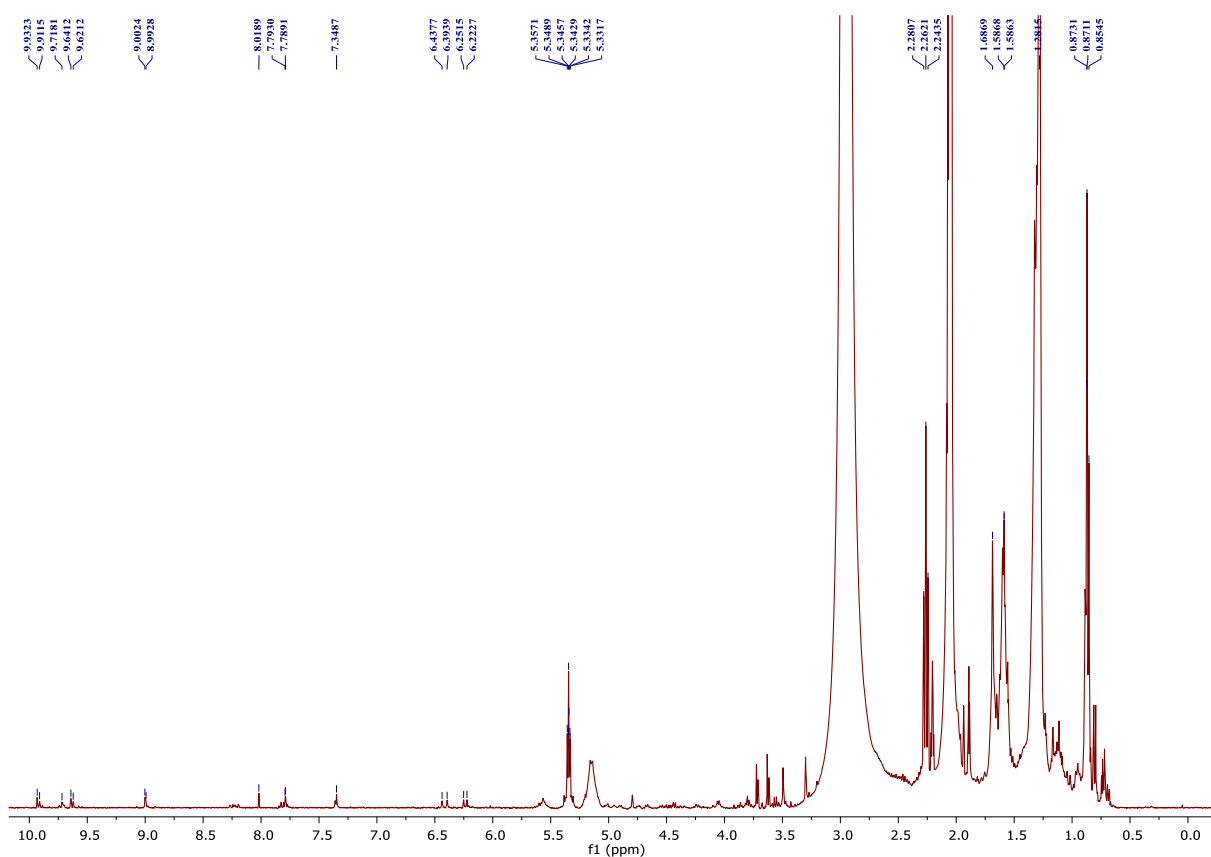
Anexo 17 - Espectro de RMN de ^1H da posição 20 – Corrida



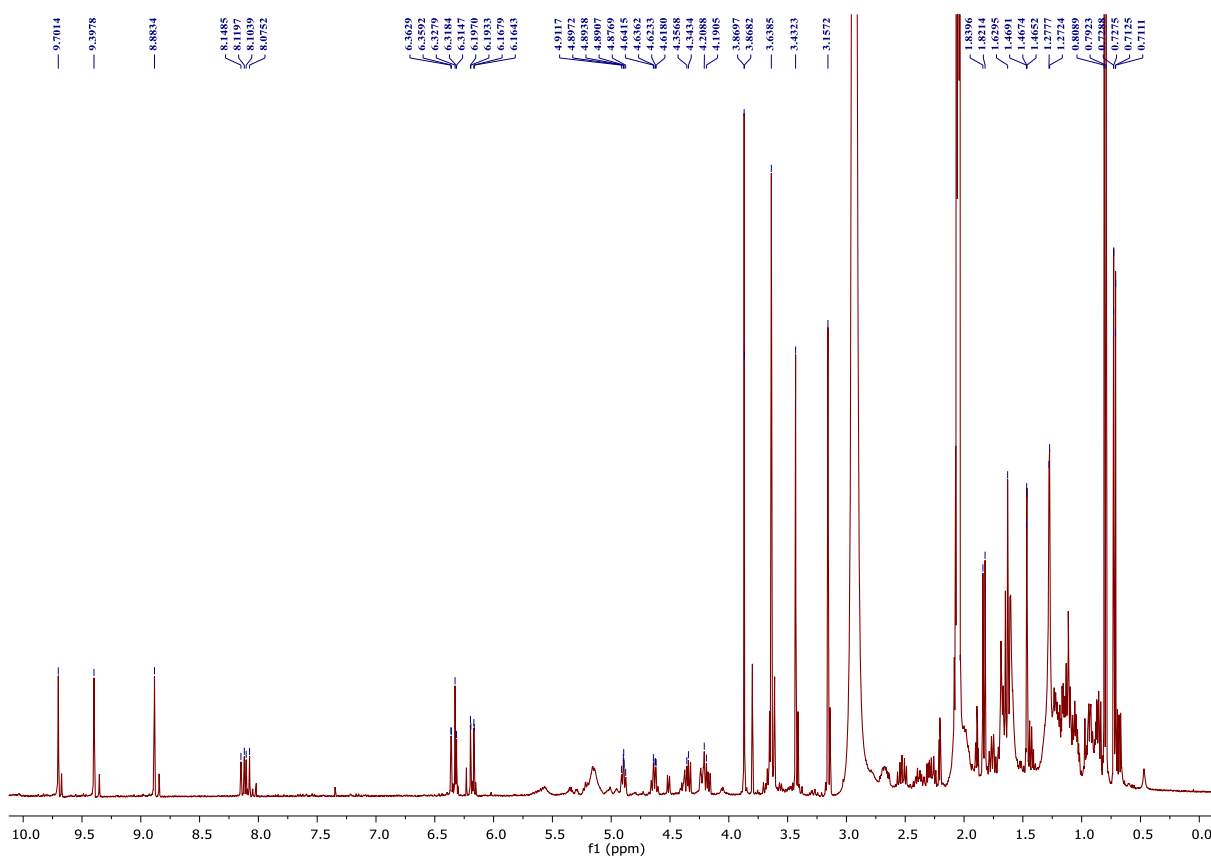
Anexo 18 - Espectro de RMN de ^1H da posição 26 – Corrida



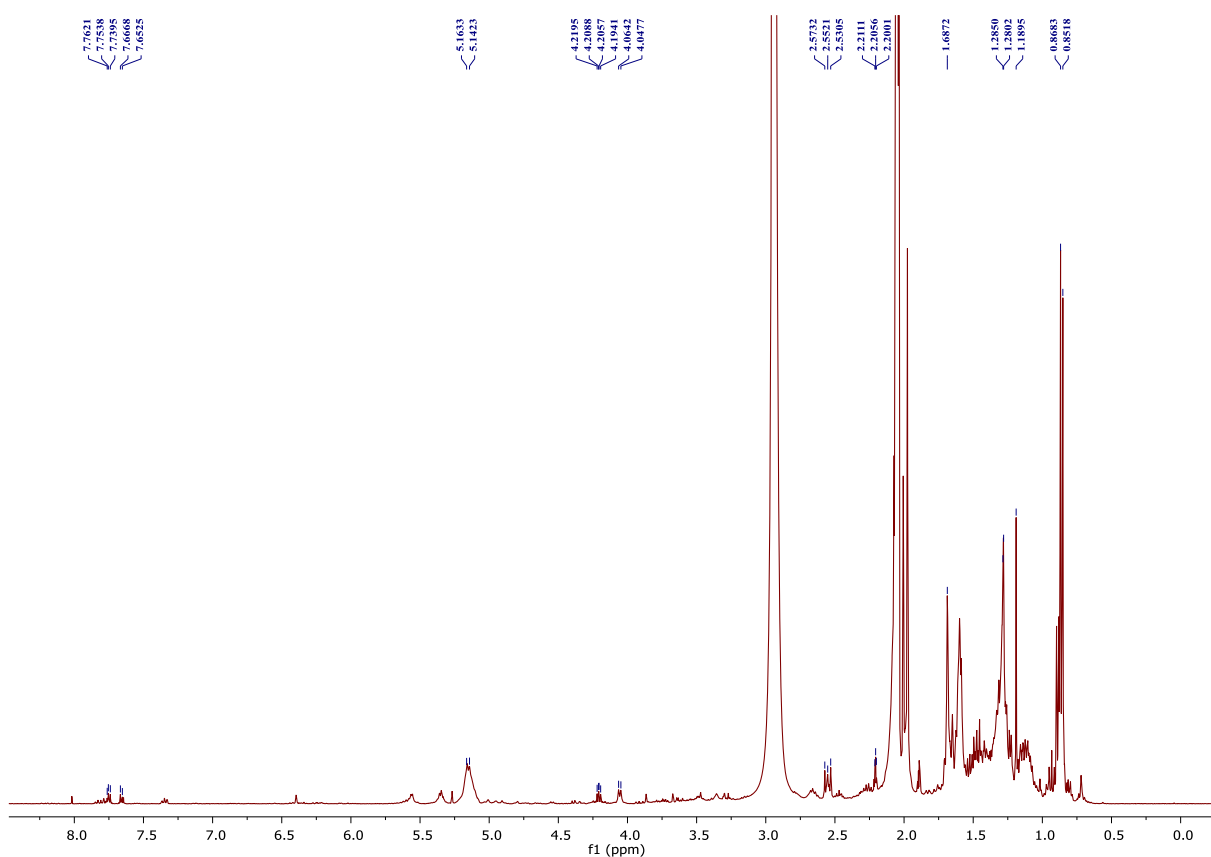
Anexo 19 - Espectro de RMN de ^1H da posição 32 – Corrida

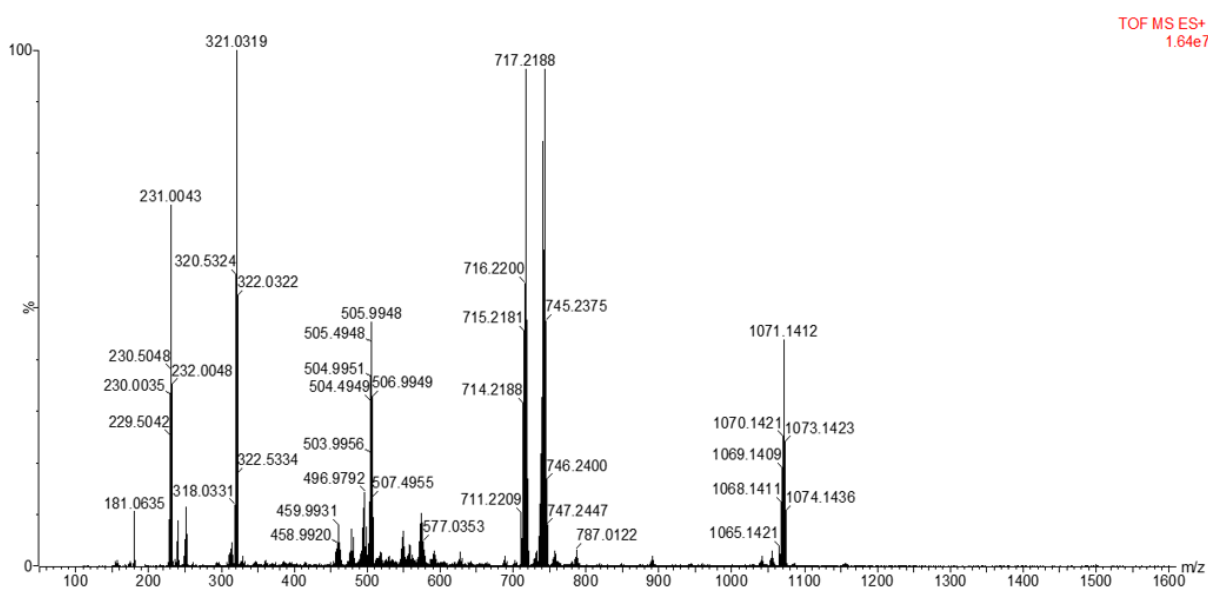


Anexo 20 - Espectro de RMN de ^1H da posição 40 – Corrida



Anexo 21 - Espectro de RMN de ^1H da posição 50 – Corrida



Anexo 22 – Full scan dos complexos do metal₁ no modo positivo**Anexo 23** – Full scan dos complexos do metal₂ via síntese EtOH/H₂O no modo positivo