

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

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS ASSOCIADAS
AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS E
BUSCA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS NATURAIS COM
ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Cristiane de Melo Cazal*

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

Orientador: Prof. Dr. João Batista Fernandes

* Bolsista CAPES

**São Carlos-SP
2011**

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

C386np

Cazal, Cristiane de Melo.

Nanopartículas poliméricas associadas ao controle de formigas cortadeiras e busca de novas substâncias naturais com atividade antitumoral / Cristiane de Melo Cazal. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

292 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Produtos naturais. 2. Nanopartículas poliméricas. 3. Formigas cortadeiras. 4. Antitumoral. 5. Trichilia. I. Título.

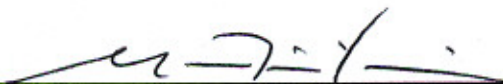
CDD: 547.3 (20^a)

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

Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata Cristiane de Melo Cazal, realizada em 21 de janeiro de 2011:



Prof. Dr. João Batista Fernandes



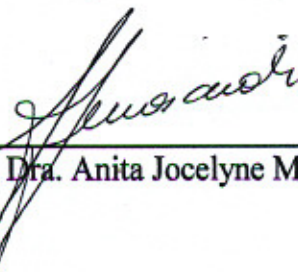
Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Profa. Dra. Ângela Regina Araújo



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos



Profa. Dra. Anita Jocelyne Marsaioli

A Deus, pela alegria da vida;

A Waldir e Dalva, meus pais, por todo amor e dedicação;

A Mariana, Erica e Wesley, meus irmãos, por tudo o que significam para mim;

Com amor

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Waldir e Dalva, aos meus irmãos Mariana, Érica, Wesley, pelo amor, carinho e incentivo constante na realização deste sonho.

Ao Waguinho, pelo grande apoio, amizade, amor, carinho e dedicação.

Ao professor Dr. João Batista Fernandes, meu orientador, exemplo de profissional e ser humano, pela confiança, ensinamentos e amizade.

Aos Professores, Dr. Paulo Cezar Vieira, Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, Dra. Arlene Gonçalves Corrêa, em especial ao Dr. Edson Rodrigues Filho pelos ensinamentos e grande colaboração.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim pelos ensinamentos, paciência, carinho e principalmente por sua amizade.

Aos técnicos Waldir, Dorai, Roberta, Pri, Paulo e Luciana pelo grande apoio e colaboração durante este trabalho.

Ao professor Dr. Odair Corrêa Bueno e as alunas Tais Garcia Freitas e Marcela Ceccato, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) - Rio Claro - SP, pela colaboração na realização dos ensaios no controle de formigas cortadeiras.

As alunas Ana Paula Terezan e Sonia P. Cardoso pela realização dos ensaios biológicos com o fungo simbiote.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica, Jaqueline e Vanessa, pela importante e indispensável colaboração nesse trabalho e acima de tudo pela excelente convivência e amizade.

A professora Dra. Quezia Bezerra Cass por ter me concedido a oportunidade do estágio sanduíche, muito obrigada.

À professora Dra. Madalena Maria de Magalhães Pinto, pelas sugestões e apoio.

Aos professores Carlos Maurício Gonçalves, Carmen Maribel Bento Teixeira e a Maria de São José Nascimento pelos aconselhamentos, amizade e ensinamentos que muito contribuíram para realização deste trabalho.

A professora Dra. Helena Vasconcelos e a aluna Kantima Choosang, pela colaboração na realização dos ensaios do perfil do ciclo celular.

Aos funcionários, estudantes e professores do CEQUIMED por toda a amizade, companheirismo, colaboração e pela agradável convivência.

À Nair e Rosa, pela paciência em me ensinar todas as bases que me permitiram caminhar, pela força e amizade.

Aos amigos Portugueses pelos bons momentos que passamos juntos e pelas amizades que conquistei, em especial a minha grande amiga Marta Perro pelo carinho, companheirismo, dedicação, paciência e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, em especial aqueles que gentilmente cederam os compostos para os ensaios em células humanas tumorais.

Às minhas queridas amigas de república, Silvéria, Keyllinha e Zi, pelo carinho, amizade e boa convivência.

Aos meus eternos amigos Marcelo, Diogo, Lia, Tatiani, Arine, Laelia, Lidiane, Paulinha, Paula, Joseane e Josie por tudo que significam para mim e pelo valor de uma verdadeira amizade.

Aos meus colegas do IF Goiano pelo apoio e amizade que foram muito importantes na reta final.

Aos amigos e professores dos laboratórios de CLAE, SÍNTESE, MASSAS, RMN e LSPN.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetona- d_6	Acetona deuterada
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
A/O/A	Água/óleo/Água
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	Correlated spectroscopy
<i>D</i>	Dubleto
<i>Dd</i>	Duplo-dubleto
<i>Ddd</i>	Duplo-duplo-dubleto
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EM	Espectrometria de massas
ESI	Electrospray
FA	Fase aquosa
FO	Fase orgânica
eV	Eletron volt
Glc	Glicose
H	Altura
Hex	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HSCCC	High-Speed Counter-Current Chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
IC_{50}	Concentração de composto que causou uma inibição de 50% no crescimento celular
IE	Impacto eletrônico
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>M</i>	Multiplete

MeOD	Metanol deuterado
Me	Grupo metil
Md	Sobrevivencia mediana das operarias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
MHz	Mega hertz
MS	Mass spectrometry
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCI	Instituto Nacional do Cancro (National Cancer Institute)
NC	Nanocápsulas
Nm	Nanômetro
NS	Nanoesferas
OCH ₃	Grupo metoxil
PBS	Tampão fosfato salino
P.F.	Ponto de fusão
CS	Quitosana
Rha	Rhaminose
RNase	Ribonuclease
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
r.p.m.	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio de cultura RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)1640
S	Singleto
SBF	Soro bovino fetal
Sl	Singleto largo
SRB	Sulforodamina B
T ₀	Tempo zero
T	Tripleto
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda
φ	diâmetro
δ	deslocamento químico
m/z	relação massa/carga
A/O	Água/Óleo
μm	Micrômetro

μM	Micromolar
K	Coeficiente de distribuição
$[^3\text{H}]$ -timidina	Timidina marcada com trítio radioactivo

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1.1: Estrutura do limonóide azadiractina.....	2
Figura 1.2: Estrutura dos triterpenos precursores dos limonóides.....	2
Figura 1.3: Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos dos limonóides isolados de Meliaceae.....	3
Figura 1.4: Folhas, frutos e galhos de <i>Trichilia elegans</i> ssp. <i>elegans</i> A. Juss (Fonte: http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=420,02/12/2010).....	5
Figura 1.5: Folhas, flores e frutos de <i>Trichilia catigua</i> A. Juss. (Fonte : http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=72,02/10/2010).....	6
Figura 1.6: Formigas cortadeiras (MARINHO <i>et al.</i> , 2006).....	6
Figura 1.7: Inseticida aldrin, dodecacloro e sulfuramida.....	10
Figura 1.8: Inseticida fipronil.....	10
Figura 1.9: Estrutura da lignana sesamina, das cumarinas xantiletina e rauianina e do alcalóide ricinina.....	11
Figura 1.10: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	12
Figura 3.1: Cromatograma da fração TFMA8c modo analítico.....	36
Figura 3.2: Cromatograma da fração TFMA8f modo analítico.....	36
Figura 3.3: Cromatograma da fração TFMA9e modo analítico.....	38
Figura 3.4: Cromatograma da fração TFMA12 modo analítico.....	39
Figura 3.5: High-speed counter-current chromatography (HSCCC). Fonte http://www.countercurrent-chromatography-publications.com/	47
Figura 3.6: Esquema de preparo de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.....	53
Figura 3.7: Esquema de preparo das nanocápsulas pelo método de dupla-Emulsão.....	57
Figura 3.8: Representação esquemática do método para nanopartículas de quitosana (CS).....	58

Figura 3.9: Representação esquemática do método de deposição interfacial/deslocamento do solvente para preparo das nanocápsulas.....	59
Figura 3.10: Esquema de preparo de micropartículas em pó.....	60
Figura 3.11: Determinação da quantidade de ricinina, xantiletina e rauianina encapsuladas.....	63
Figura 3.12: Câmara de envelhecimento acelerado por Ultravioleta.....	64
Figura 3.13: Representação esquemática da técnica de diálise inversa.....	65
Figura 4.1: Espectro de RMN ¹ H da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl ₃ , 200MHz).....	75
Figura 4.2: Espectro de RMN ¹³ C da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl ₃ , 50MHz).....	76
Figura 4.3: Cromatograma obtido no GC-MS.....	76
Figura 4.4: Espectro de massas do campesterol (1 , IE = 70 e.V).....	77
Figura 4.5: Espectro de massas do estigmasterol (2 , IE = 70 e.V).....	77
Figura 4.6: Espectro de massas do sitosterol (3 , IE = 70 e.V).....	77
Figura 4.7: Proposta de Fragmentação do sitosterol.....	78
Figura 4.8: Espectro de RMN ¹ H da substância 4 (200 MHz, CDCl ₃).....	79
Figura 4.9: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 4	80
Figura 4.10: Espectro de RMN ¹ H da substância 5 (200 MHz, MeOD)....	82
Figura 4.11: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 5	82
Figura 4.12: Proposta de fragmentação para a substância 5	83
Figura 4.13: Espectro de RMN ¹ H da substância 6 (200 MHz, CDCl ₃)....	84
Figura 4.14: Mapa de contorno de HMBC de 6 (400 MHz, CDCl ₃).....	85
Figura 4.15: Espectro de RMN ¹ H da substância 7 (200 MHz, CDCl ₃)....	87
Figura 4.16: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 7	88
Figura 4.17: Espectro de RMN ¹ H da substância 8 (200 MHz, CDCl ₃)....	89
Figura 4.18: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 8	90
Figura 4.19: Espectro de RMN ¹ H da substância 9 (200 MHz, MeOD)....	91
Figura 4.20: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 9	92
Figura 4.21: Espectro de RMN ¹ H da substância 10 (200 MHz, CDCl ₃)...	93
Figura 4.22: Espectro de RMN ¹³ C da substância 10 (100 MHz, CDCl ₃).	93

Figura 4.23: Mapa de contorno de HSQC da substância 10 (400 MHz, CDCl ₃).....	94
Figura 4.24: Mapa de contorno de HMBC da substância 10 (400 MHz, CDCl ₃).....	95
Figura 4.25: Espectro de RMN ¹ H da substância 11 (400 MHz, DMSO).	97
Figura 4.26: Espectro de RMN ¹³ C da substância 11 (100 MHz, DMSO).	97
Figura 4.27: Espectro de RMN ¹ H da substância 12 (200 MHz, DMSO).	99
Figura 4.28: Espectro de RMN ¹³ C da substância 12 (100 MHz, DMSO).	99
Figura 4.29: Espectro de RMN ¹ H da substância 13 (200 MHz, DMSO).	101
Figura 4.30: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 13	102
Figura 4.31: Espectro de RMN ¹ H da substância 14 (400 MHz, DMSO).	103
Figura 4.32: Espectro de RMN ¹³ C da substância 14 (100 MHz, DMSO).	103
Figura 4.33: Espectro de COSY ¹ H- ¹ H 45° da substância 14 (400 MHz, DMSO).....	106
Figura 4.34: Mapa de contorno de HSQC da substância 14 (400 MHz, DMSO).....	107
Figura 4.35: Mapa de contorno de HMBC da substância 14 (400 MHz, DMSO).....	107
Figura 4.36: Espectro de RMN ¹ H da substância 15 e 16 (400 MHz, DMSO).....	108
Figura 4.37: Espectro de RMN ¹³ C da substância 15 e 16 (100 MHz, DMSO).....	109
Figura 4.38: Espectro de COSY ¹ H- ¹ H 45° da substância 15 e 16 (400 MHz, DMSO).....	109
Figura 4.39: Mapa de contorno de HSQC da substância 15 e 16 (400 MHz, DMSO).....	111
Figura 4.40: Mapa de contorno de HMBC da substância 15 e 16 (400 MHz, DMSO).....	112
Figura 4.41: Espectro de RMN ¹ H da substância 17 (400 MHz, DMSO).	114
Figura 4.42: Espectro de RMN ¹ H da substância 17 (400 MHz, DMSO + 1 gota de D ₂ O).....	114
Figura 4.43: Espectro de RMN ¹³ C da substância 17 (100 MHz, DMSO).	115

Figura 4.44: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância 17 (400 MHz, DMSO).....	115
Figura 4.45: Mapa de contorno de HSQC da substância 17 (400 MHz, DMSO).....	116
Figura 4.46: Mapa de contorno de HMBC da substância 17 (400 MHz, DMSO).....	116
Figura 4.47: Espectro de RMN ^1H da substância 18 (400 MHz, DMSO).	119
Figura 4.48: Espectro de RMN ^{13}C da substância 18 (100 MHz, DMSO).....	120
Figura 4.49: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância 18 (400 MHz, DMSO).....	120
Figura 4.50: Mapa de contorno de HSQC da substância 18 (400 MHz, DMSO).....	121
Figura 4.51: Mapa de contorno de HMBC da substância 18 (400 MHz, DMSO).....	121
Figura 4.52: Espectro de RMN ^1H da substância 19 (400 MHz, DMSO).	126
Figura 4.53: Espectro de RMN ^{13}C da substância 19 (100 MHz, DMSO).	127
Figura 4.54: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância 19 (400 MHz, DMSO).....	127
Figura 4.55: Mapa de contorno de HSQC da substância 19 (400 MHz, DMSO).....	128
Figura 4.56: Mapa de contorno de HMBC da substância 19 (400 MHz, DMSO).....	128
Figura 4.57: Espectro de RMN ^1H da substância 20 (400 MHz, MeOD).	132
Figura 4.58: Espectro de RMN ^{13}C da substância 20 (100 MHz, DMSO).	133
Figura 4.59: Mapa de contorno de HSQC da substância 20 (400 MHz, DMSO).....	133
Figura 4.60: Mapa de contorno de HMBC da substância 20 (400 MHz, DMSO).....	134
Figura 4.61: Espectro de massas (ESI) no modo negativo $[\text{M}-\text{H}]^-$ como íon molecular da substância 20	136
Figura 4.62: Espectro de RMN ^1H da substância 21 (400 MHz, CDCl_3).	137
Figura 4.63: Espectro de RMN ^{13}C da substância 21 (100 MHz, CDCl_3).	138

Figura 4.64: Espectro de RMN ^1H da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).	142
Figura 4.65: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	142
Figura 4.66: Espectro de RMN ^{13}C da substância 22 (100 MHz, CDCl_3).	143
Figura 4.67: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	150
Figura 4.68: Mapa de contorno de HSQC da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	151
Figura 4.69: Ampliação do mapa de contorno de HSQC da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	151
Figura 4.70: Mapa de contorno de HMBC da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	152
Figura 4.71: Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	152
Figura 4.72: Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância 22 (400 MHz, CDCl_3).....	153
Figura 4.73: Espectro de massas (ESI) modo positivo da substância 22 .	153
Figura 4.74: Espectro de RMN ^1H da substância 23 (400 MHz, CDCl_3).	155
Figura 4.75: Espectro de RMN ^{13}C da substância 23 (100 MHz, CDCl_3).	155
Figura 4.76: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância 23 (400 MHz, CDCl_3).....	160
Figura 4.77: Mapa de contorno de HSQC da substância 23 (400 MHz, CDCl_3).....	161
Figura 4.78: Mapa de contorno de HMBC da substância 23 (400 MHz, CDCl_3).....	161
Figura 4.79: Espectro de massas (ESI) modo positivo da substância 23 .	162
Figura 4.80: Estrutura do alcalóide ricinina.....	163
Figura 4.81: Estrutura das cumarinas isoladas do extrato diclorometânico das raízes do enxerto de <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i> : xantiletina, suberosina, seselina, xantoxiletina.....	164

Figura 4.82: Estrutura das substâncias isoladas do extrato diclorometânico do caule de <i>Rauia resinosa</i> : rauianina, umbiliferona, acetato de murrangatina 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina, zantobungeanina, N-metilflindersina, 8-hidroxi-N-metilflindersina, esquimianina e 3,7,4'- trimetoxi-5-hidroxi flavona.....	166
Figura 4.83: Curva de calibração por padronização externa para análise de ricinina.....	168
Figura 4.84: Cromatograma da ricinina.....	170
Figura 4.85: Curva de calibração por padronização externa para análise de xantiletina.....	171
Figura 4.86: Cromatograma da xantiletina.....	174
Figura 4.87: Curva de calibração por padronização externa para análise de rauianina.....	175
Figura 4.88: Cromatograma da rauianina.....	177
Figura 4.89: Estrutura dos polímeros poli- ϵ -(caprolactona) (PCL), poli- β -(hidroxibutirato) (PHB) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).	181
Figura 4.90: Fotomicroscopias obtidas através da microscopia eletrônica de varredura, a partir das suspensões de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo xantiletina.....	190
Figura 4.91: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das suspensões de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo xantiletina.....	191
Figura 4.92: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das nanocápsulas secas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo xantiletina.....	192
Figura 4.93: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das suspensões de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo rauianina.....	193
Figura 4.94: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das nanocápsulas (A) secas e nanoesferas (B) de PCL contendo rauianina.....	193

Figura 4.95: Variação do diâmetro médio das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de rauianina (NCRaui), em nanocápsulas armazenadas a 4°C durante 4 meses.....	195
Figura 4.96: Variação do potencial zeta das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de rauianina (NCRaui), em nanocápsulas armazenadas a 4°C durante 4 meses.....	195
Figura 4.97: Variação do pH das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de rauianina (NCRaui), em nanocápsulas armazenadas a 4°C durante 4 meses.....	196
Figura 4.98: Estudo de degradação da luz da xantiletina livre (Xant. Livre) e encapsulada (NC de Xant).....	198
Figura 4.99: Estudo de degradação da luz da rauianina livre (Rau. Livre) e encapsulada (NC de Rau).....	198
Figura 4.100: Estudo de degradação da temperatura (65 °C) da xantiletina livre (Xant. Livre) e encapsulada (NC de Xant).....	199
Figura 4.101: Estudo de degradação da temperatura (65 °C) da rauianina livre (Rau. Livre) e encapsulada (NC de Rau).....	200
Figura 4.102: Perfil de liberação <i>in vitro</i> da xantiletina a partir da dispersão de nanocápsulas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica da dispersão é de 36 µg/mL. Cada ponto representa a média de três lotes diferentes de nanocápsulas.....	201
Figura 4.103: Perfil de liberação <i>in vitro</i> da rauianina a partir da dispersão de nanocápsulas seguida da sua difusão através do saco de diálise.....	202
Figura 4.104: Estrutura da quitosana.....	206
Figura 4.105: Estrutura do tripolifosfato (TPP).....	206
Figura 4.106: Fotomicroscopia de suspensões coloidais de nanocápsulas obtidas por MEV, contendo ricinina. As nanocápsulas foram obtidas pelo método proposto por deposição interfacial/deslocamento do solvente.....	208
Figura 4.107: Fotomicroscopia obtidas por MEV, a partir das nanocápsulas secas PCL contendo ricinina pelo novo método de deslocamento do solvente/deposição interfacial.....	208

Figura 4.108: Perfil de liberação <i>in vitro</i> de ricinina a partir da dispersão de nanocápsulas, pelo método proposto de deposição interfacial/deslocamento do solvente. A concentração teórica da dispersão é de 59 µg/mL. Cada ponto representa a média de três lotes diferentes de nanocápsulas.....	209
Figura 4.109: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com poli-ε-(caprolactona) (PCL 1) e oleato de isodecila (OIS 1).....	211
Figura 4.110: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com os tensoativos span 60 (S60 1) e Tween 80 (T80).....	211
Figura 4.111: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com xantiletina.....	213
Figura 4.112: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas de xantiletina em suspensão (NCXF) e nanocápsulas de xantiletina secas (NCXFseca).....	214
Figura 4.113: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com rauianina.....	214
Figura 4.114: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas de rauianina em suspensão (NCRF) e nanocápsulas de xantiletina secas (NCRFseca).....	215
Figura 4.115: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com ricinina.....	216
Figura 4.116: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas de ricinina em suspensão (NCP 53)...	216

Figura 4.117: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas vazias em suspensão (NCP 62).....	217
Figura 4.118: Efeito da xantiletina (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	218
Figura 4.119: Imagens do fungo simbiote : na presença de xantiletina (100 µg/mL) (A) e controle (B).....	218
Figura 4.120: Efeito das nanocápsulas de xantiletina (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	219
Figura 4.121: Imagens do fungo simbiote: na presença de nanocápsulas xantiletina (100 µg/mL) (A) e controle (B).....	219
Figura 4.122: Efeito da rauianina (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	219
Figura 4.123: Imagens do fungo simbiote: na presença de rauianina (100 µg/mL) (A) e controle (B).....	220
Figura 4.124: Efeito das nanocápsulas de rauianina (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	220
Figura 4.125: Imagens do fungo simbiote: na presença de nanocápsulas de rauianina (100 µg/mL) (A) e controle (B).....	220
Figura 4.126: Efeito dos constituintes das nanocápsulas PCL (poli-ε-caprolactona), O (oleato de isodecila), SPA (span 60), TW (tween 80), mistura (mistura de todos os componentes) e o branco (nanocápsula vazia) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	222
Figura 4.127: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com extratos diclorometânico das folhas (TFD), caule (TCD), casca (TCAD), galhos (TGD) de <i>Trichilia elegans</i>	225
Figura 4.128: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com extratos metanólicos das folhas (TFM), caule (TCM), casca (TCAM), galhos (TGM) de <i>Trichilia elegans</i>	225

Figura 4.129: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com extratos hexânico (TAH), diclorometânico (TAD) e metanólico (TAM) do arilo de <i>Trichilia catigua</i>	226
Figura 4.130: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações do extrato diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i>	228
Figura 4.131: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com as substâncias puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i>	230
Figura 4.132: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações do extrato diclorometânico dos galhos de <i>Trichilia elegans</i>	232
Figura 4.133: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de <i>Trichilia elegans</i>	233
Figura 4.134: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações da partição líquido-líquido do extrato metanólicos das folhas de <i>Trichilia elegans</i>	235
Figura 4.135: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com as substâncias (9 , 13 e 14) puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i>	236
Figura 4.136: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com as substâncias (11 , 12 , 18 e 19) puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i>	237

Figura 4.137: Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com cedrelona isolada do extrato diclorometânico e Hexânico do arilo de <i>Trichilia catigua</i>	237
Figura 4.138: Efeito de cedrelona (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	238
Figura 4.139: Imagens do fungo simbiote: na presença de cedrelona (100 µg/mL) (A) e controle (B).....	238

PARTE II

Figura 4.1: Fotografias obtidas em microscópio das linhagens celulares, MCF-7, adenocarcinoma da mama (A); NCI-H460, cancro das células não pequenas do pulmão (B) e A375-C5, melanoma (C).....	267
Figura 4.2: Estrutura química dos triterpenos e esterol.....	269
Figura 4.3: Estrutura química dos limonóides.....	272
Figura 4.4: Estrutura química dos flavonóides.....	275
Figura 4.5: Estrutura química dos alcalóides.....	278
Figura 4.6: Estrutura química das cumarinas.....	281
Figura 4.7: Ciclo celular.....	282
Figura 4.8: Distribuição do ciclo celular de células NCI-H460 após 48 horas de tratamento sem compostos (controle), DMSO (solvente como controle) ou na presença dos compostos 4 , 11 , 14 ou 15 na concentração GI ₅₀ específica para cada um dos compostos.....	283
Figura 4.9: Distribuição do ciclo celular de células NCI-H460 após 48 horas de tratamento sem compostos (controle), DMSO (solvente como controle) ou na presença dos compostos 25 , 30 ou 48 na concentração GI ₅₀ específica para cada um dos compostos.....	284

LISTA DE TABELAS

PARTE I

Tabela 3.1: Extratos brutos das folhas, cascas, caule e galhos de <i>Trichilia elegans</i>	20
Tabela 3.2: Extratos brutos do arilo, sementes e exocarpo de <i>Trichilia catigua</i>	21
Tabela 3.3: Sistemas de solventes testados e suas proporções.....	28
Tabela 3.4: Extratos brutos das raízes de <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i>	45
Tabela 3.5: Extratos brutos do caule de <i>Rauia resinosa</i>	46
Tabela 3.6: Sistemas de solventes testados e suas proporções.....	49
Tabela 3.7: Condições para análise cromatográfica de ricinina, xantiletina e rauianina.....	50
Tabela 3.8: Composição das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.....	53
Tabela 3.9: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2^3 centrado na média.....	54
Tabela 3.10: Planejamento fatorial 2^3 centrado na média.....	55
Tabela 3.11: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2^2	55
Tabela 3.12: Planejamento fatorial 2^2	55
Tabela 3.13: Composição das nanocápsulas preparadas pelo método de Dupla-Emulsão.....	57
Tabela 3.14: Composição das suspensões preparadas pelo Método de deposição interfacial/deslocamento do solvente.....	60
Tabela 3.15: Parâmetros operacionais Mini <i>Spray-Dryed</i>	61
Tabela 4.1: Dados de RMN ^1H da escopoletina (4).....	80
Tabela 4.2: Dados de RMN ^1H da arscontina (5).....	83
Tabela 4.3: Dados de RMN ^1H da substância 6.....	86
Tabela 4.4: Dados de RMN ^1H da substância 7.....	88
Tabela 4.5: Dados de RMN ^1H da substância 8.....	90
Tabela 4.6: Dados de RMN ^1H da substância 9.....	92

Tabela 4.7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 10	96
Tabela 4.8: Dados de RMN ^1H da substância 11	98
Tabela 4.9: Dados de RMN ^1H da substância 12	100
Tabela 4.10: Dados de RMN ^1H da substância 13	102
Tabela 4.11: Dados de RMN ^1H da substância 14	105
Tabela 4.12: Dados de RMN ^{13}C da substância 14	106
Tabela 4.13: Dados de RMN ^1H da substância 18	122
Tabela 4.14: Dados de RMN ^{13}C da substância 18	123
Tabela 4.15: Dados de RMN ^1H da substância 19	129
Tabela 4.16: Dados de RMN ^{13}C da substância 19	129
Tabela 4.17: Dados de RMN ^1H da substância 20	134
Tabela 4.18: Dados de RMN ^{13}C da substância 20	135
Tabela 4.19: Dados de RMN ^1H da substância 21	139
Tabela 4.20: Dados de RMN ^{13}C da substância 21	140
Tabela 4.21: Dados de RMN ^1H da substância 22	144
Tabela 4.22: Dados de RMN ^{13}C da substância 22	145
Tabela 4.23: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 23	156
Tabela 4.24: Sistemas de solventes testados e <i>k</i> calculado.....	165
Tabela 4.25: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.....	168
Tabela 4.26: Precisão [DPR (%)] de amostras de ricinina usadas na validação do método analítico.....	169
Tabela 4.27: Exatidão (%) de amostras de ricinina usadas na validação do método analítico.....	169
Tabela 4.28: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.....	172
Tabela 4.29: Tabela 4.29: Precisão [DPR (%)] de amostras de xantiletina usadas na validação do método analítico.....	173
Tabela 4.30: Exatidão (%) de amostras de xantiletina usadas na validação do método analítico.....	173
Tabela 4.31: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.....	175

Tabela 4.32: Precisão [DPR (%)] de amostras de rauianina usadas na validação do método analítico.....	176
Tabela 4.33: Exatidão (%) de amostras de rauianina usadas na validação do método analítico.....	176
Tabela 4.34: Coeficientes de partição ($\log P$) Octanol, Myritol [®] 812 e Miristato de isopropila /água para xantiletina.....	178
Tabela 4.35: Coeficientes de partição ($\log P$) Octanol, Miristato de isopropila/água para rauianina.....	178
Tabela 4.36: Coeficientes de partição ($\log P$) Octanol, Myritol [®] 812 e Miristato de isopropila /água para a ricinina.....	179
Tabela 4.37: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial .	183
Tabela 4.38: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 11 ensaios de nanopartículas de xantiletina.....	183
Tabela 4.39: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 11 ensaios de nanopartículas de rauianina.....	184
Tabela 4.40: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da xantiletina tendo como resposta a eficiência de encapsulação.....	185
Tabela 4.41: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da xantiletina tendo como resposta a diâmetro de partícula.....	185
Tabela 4.42: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da rauianina tendo como resposta a eficiência de encapsulação.....	186
Tabela 4.43: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da rauianina tendo como resposta a diâmetro de partícula	186
Tabela 4.44: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 4 ensaios de nanocápsulas de xantiletina.....	189

Tabela 4.45: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 4 ensaios de nanocápsulas de rauianina.....	189
Tabela 4.46: Resultados de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para as nanocápsulas de ricinina pelo novo método de deposição interfacial/deslocamento do solvente.....	207
Tabela 4.47: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com os constituintes das nanocápsulas.....	210
Tabela 4.48: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com as substâncias puras e encapsuladas.....	213
Tabela 4.49: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com os extratos diclorometânico das folhas (TFD), caule (TCD), casca (TCAD), galhos (TGD) extratos diclorometânico das folhas (TFD), caule (TCD), casca (TCAD), galhos (TGD) de <i>Trichilia elegans</i> e extratos hexânico (TAH), diclorometânico (TAD) e metanólico (TAM) do arilo de <i>Trichilia catigua</i>	224
Tabela 4.50: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações dos extratos diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i>	227
Tabela 4.51: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das substâncias puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i>	229

Tabela 4.52: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações do extrato diclorometânico dos galhos de <i>Trichilia elegans</i>	231
Tabela 4.53: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de <i>Trichilia elegans</i>	233
Tabela 4.54: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações da partição líquido-líquido do extrato do extrato metanólicos das folhas de <i>Trichilia elegans</i>	234
Tabela 4.55: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com as substâncias (9, 11, 12, 13, 14, 18 e 19) puras isoladas da partição acetato do extrato metanólicos das folhas de <i>Trichilia elegans</i>	236

PARTE II

Tabela 4.1: Efeito dos triterpenos e esterol no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas.....	270
Tabela 4.2: Efeito dos limonóides no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas.....	273
Tabela 4.3: Efeito dos flavonóides no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas.....	276
Tabela 4.4: Efeito dos alcalóides no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas.....	279
Tabela 4.5: Efeito das cumarinas no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas.....	281
Tabela 4.6: Indução de apoptose em células de NCI-H460 após 48 horas de tratamento com os compostos 4 , 11 , 14 , 15 , 25 , 30 e 48 na concentração de GI ₅₀	285

LISTA DE FLUXOGRAMAS

PARTE I

Fluxograma 3.1: Fracionamento de TCD.....	22
Fluxograma 3.2: Fracionamento de TCD 10.....	23
Fluxograma 3.3: Fracionamento de TCD 11.....	23
Fluxograma 3.4: Fracionamento de TCD 13.....	24
Fluxograma 3.5: Fracionamento de TCD 14.....	25
Fluxograma 3.6: Fracionamento de TCD 15.....	26
Fluxograma 3.7: Fracionamento de TCD 16.....	27
Fluxograma 3.8: Esquema da junção das frações obtidas em HSCCC para o extrato TCM.....	29
Fluxograma 3.9: Partição líquido-líquido extrato metanólico das folhas de <i>Trichilia elegans</i> (TFM).....	30
Fluxograma 3.10: Fracionamento de TFMD.....	31
Fluxograma 3.11: Fracionamento da partição TFMA.....	32
Fluxograma 3.12: Fracionamento de TFMA7.....	33
Fluxograma 3.13: Fracionamento de TFMA8.....	34
Fluxograma 3.14: Fracionamento de TFMA9.....	37
Fluxograma 3.15: Fracionamento de TFMA12.....	38
Fluxograma 3.16: Fracionamento de TGD.....	39
Fluxograma 3.17: Partição líquido-líquido dos extratos metanólico do caule de <i>Trichilia elegans</i> (TGM).....	40
Fluxograma 3.18: Esquema da junção das frações obtidas em HSCCC para o extrato TAD.....	41
Fluxograma 3.19: Fracionamento de TAD9.....	42
Fluxograma 3.20: Fracionamento de TTAD9n.....	43
Fluxograma 3.21: Fracionamento de TAD9n5.....	44

RESUMO

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS ASSOCIADAS AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS E BUSCA DE NOVAS SUBSTÂNCIAS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

PARTE I: Nanopartículas poliméricas e estudo fitoquímico biomonitorado de *Trichilia elegans* e *Trichilia catigua* (Meliaceae) associados ao controle de formigas cortadeiras.

As formigas cortadeiras são conhecidas por serem uma séria praga para a agricultura e vários compostos diferentes têm sido propostos para o controle destas, tais como, organofosforados, piretróides e sulfluramidas. No entanto, problemas com animais não-alvo e contaminações ambientais são extremamente comuns e assim novas estratégias de controle desses insetos se fazem necessárias. Nesse contexto, este trabalho envolveu o estudo biomonitorado de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae) e também o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas, contendo ricinina, xantiletina ou rauianina para o controle de formigas cortadeiras. O estudo fitoquímico dos extratos e frações ativas permitiu o isolamento de 23 compostos (3 inéditos), incluindo esteróides, cumarinas, compostos fenólicos, derivado de oxazole, flavonóides e limonóides. O composto 3-(4'-hidroxifenil)-2-propenoato de 4''-carboxilfenil (**14**), isolado de *Trichilia elegans* apresentou alta atividade contra formigas cortadeiras. O limonóide cedrelona isolado de *T. catigua* foi ativo contra fungo simbiote (*L. gongylophorus Leucoagaricus*) da formiga cortadeira. O método de nanoprecipitação se mostrou eficiente para encapsulação de xantiletina e rauianina. Em adição um método novo, aqui denominado deposição interfacial/deslocamento do solvente, foi desenvolvido visando à encapsulação de ricinina. Estes formicidas naturais foram encapsulados pela primeira vez e os resultados aqui observados demonstraram maior atividade, dispersão em meio aquoso e estabilidade das nanopartículas em comparação aos compostos livres.

PARTE II: Busca de novas substâncias naturais com atividade antitumoral

A utilização de produtos naturais no tratamento de câncer vem de longa data e têm fornecido atualmente diversos agentes antitumorais, tais como vinblastina, vincristina, etopósido, teniposide e palitaxel. Além disso, muitos medicamentos aprovados para o tratamento de câncer são de origem natural ou derivados. No

presente trabalho, oito triterpenos (**1-8**), um esterol (**9**), dez limonóides (**10-19**), quinze flavonóides (**20-34**), treze alcalóides (**35-47**) e sete cumarinas (**48-55**) foram avaliadas frente a três linhagens de células tumorais humanas: MCF-7, adenocarcinoma da mama; A375-C5, melanoma e NCI-H460, câncer de células não pequenas de pulmão. A relação estrutura-atividade foi analisada e discutida. Além disso, avaliou-se o efeito dos compostos mais ativos no perfil do ciclo celular bem como suas influências na indução da apoptose na tentativa de elucidar os mecanismos de ação. Oito compostos, odoratol (**4**), gedunina (**11**), 6 α -acetoxi-14 β ,15 β -epoxiazadrona (**14**), cedrelona (**15**), 3-dimetoxiflavona (**25**), 2,3',4,4',5',6-hexametoxichalcona (**30**), 5',6'-[5-metil-5,5-(7-indol-5"-iletano-6,7-diil)-3-(metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diilindol (**43**) e siderina (**48**), foram os mais potentes na inibição do crescimento das células tumorais estudadas. Sete compostos (**4**, **11**, **15**, **25**, **30**, **43** e **48**) causaram interrupção do ciclo celular e três compostos (**11**, **15** e **30**) foram considerados potentes indutores de apoptose. Em conclusão, estes compostos mostraram-se extremamente promissores para estudos posteriores com o intuito de se investigar seu potencial como agentes antitumorais e ainda para avaliação da toxicidade celular.

ABSTRACT

POLYMERIC NANOPARTICLES FOR THE CONTROL OF LEAF-CUTTING ANTS AND SEARCH FOR NOVEL NATURAL SUBSTANCES WITH ANTITUMOR ACTIVITIES

PART I: Polymeric nanoparticles and bioassay-guided phytochemical investigation of *Trichilia elegans* e *Trichilia catigua* (Meliaceae) for the control of leaf-cutting ants

Leaf-cutting ants are known as severe agricultural pests. Several compounds have been proposed for their control such as organophosphorus, pyrethroids and sulfluramid insecticides. However, non-target animals and environmental contamination are common problems and therefore new strategies to control these pests have been requested. In this context, this work involved the bioassay-guided study of *T. elegans* e *T. catigua* (Meliaceae) and also the development and characterization of three different nanoparticles, containing either ricinine, xanthyletin or rauianin for the control of leaf-cutting ants. Phytochemical investigations from active extracts and fractions have allowed to isolate 23 compounds (3 new), including sterols, coumarins, phenolic compounds, oxazol derivative, flavonoids and limonoids. The compound 3-(4'-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid (4''-carboxyl)-phenyl ester (**14**), from *T. elegans*, showed high biologic activity against leaf-cutting ants. Additionally, the limonoid cedrelone, from *T. catigua*, was active against the symbiotic fungus of leaf-cutting ants (*L. Leucoagaricus gongylophorus*). The solvent displacement technique adopted here showed to be very efficient for the preparation of nanoparticle formulations containing either xanthyletin or rauianin. In addition, a novel method was developed for the encapsulation of ricinine. These natural insecticides were nanoencapsulated for the first time and the results observed here showed a better activity, more water dispersivity and stabilization of nanoparticles if compared to free compounds.

PART II: Looking for new natural substances with antitumor activities

Natural products have been extensively used in the treatment of cancer and have provided several effective and currently anticancer agents such as vinblastine, vincristine, etoposide, teniposide, and paclitaxel. In addition, many approved drugs

for cancer treatment have been from natural origin, being either natural compounds or their derivatives. Here, eight triterpenes (**1-8**), one sterol (**9**), ten limonoids (**10-19**), fifteen flavonoids (**20-34**), thirteen alkaloids (**35-47**) and seven coumarins (**48-55**) were evaluated for their capacity to inhibit the growth of three human tumor cell lines, representing different models of human tumors, namely as breast adenocarcinoma (MCF-7), non-small cell lung cancer (NCI-H460) and melanoma (A375-C5). The relationship between the structures of compounds and their growth inhibitory activity was also analyzed and discussed. Moreover, in order to further elucidate the mechanisms involved in the growth arrest, the effect on the cell cycle profile and apoptosis of the more active compounds were investigated. Eight compounds [odoratol (**4**), gedunin (**11**), 6 α -acetoxi-14 β ,15 β -epoxiazadriona (**14**), cedrelone (**15**), (3-hydroxyflavone (**25**), 2,3',4,4',5',6-hexamethoxychalcone (**30**), 5',6'-[5-methyl-5,5-(7-indole-5"-yl-ethane-6,7-indiyl)-3-(methylprop-2-en-2-yl)]-cyclopentane-5',6'-diylindole (**43**) and siderin (**48**) were very potent growth inhibitors of all human tumour cell lines tested. Seven compounds (**4**, **11**, **15**, **25**, **30**, **43** and **48**) caused cell cycle arrest and three compounds (**11**, **15** and **30**) were very potent inducers of apoptosis. In conclusion, further studies using these very promising compounds have still required in order to full elucidate their potential as antitumor agents and also to evaluate their cellular toxicity.

SUMÁRIO

PARTE I

1	Introdução	1
	1.1 - A família Meliaceae	1
	1.2- O gênero <i>Trichilia</i>	4
	1.3 - <i>Trichilia elegans</i> ssp. <i>elegans</i> A. Juss	4
	1.4 - <i>Trichilia catigua</i> A. Juss	5
	1.5- Formigas cortadeiras	6
	1.6 - Métodos de controle de formigas cortadeiras	9
	1.7- Nanopartículas Poliméricas	12
2	Objetivo	15
3	Procedimento Experimental	16
	3.1 – Materiais e Métodos	16
	3.2 – Equipamentos	16
	3.3 - Material botânico	20
	3.4 - Obtenção dos extratos de <i>Trichilia elegans</i>	20
	3.5 - Obtenção dos extratos de <i>Trichilia catigua</i>	21
	3.6 - Estudos dos extratos brutos de <i>Trichilia elegans</i>	21
	3.6.1 - Estudo do extrato diclorometânico do caule de <i>Trichilia elegans</i> (TCD)	21
	3.6.1.1 - Estudo da fração TCD6	22
	3.6.1.2 - Estudo da fração TCD10	22
	3.6.1.3 - Estudo da fração TCD11	23
	3.6.1.4 - Estudo da fração TCD13	24
	3.6.1.5 - Estudo da fração TCD14	25
	3.6.1.6 - Estudo da fração TCD15	26
	3.6.1.7 - Estudo da fração TCD16	27
	3.6.2 - Estudo do extrato metanólico do caule de <i>Trichilia elegans</i> (TCM)	27
	3.6.3 - Estudo do extrato metanólico da folha de <i>Trichilia elegans</i> (TFM)	29

3.6.3.1 - Estudo do extrato metanólico das folhas de <i>Trichilia elegans</i> partição diclorometânica (TFMD)	30
3.6.3.2 - Estudo do extrato metanólico das folhas de <i>Trichilia elegans</i> partição acetato de etila (TFMA)	31
3.6.3.2.1 - Estudo da fração TFMA7	32
3.6.3.2.2 - Estudo da fração TFMA8	34
3.6.3.2.3 - Estudo da fração TFMA9	37
3.6.3.2.4 - Estudo da fração TFMA12	38
3.6.4 - Estudo do extrato diclorometânico do galho de <i>Trichilia elegans</i> (TGD)	39
3.6.5 - Estudo do extrato metanólico do galho de <i>Trichilia elegans</i> (TGM)	40
3.7 - Estudos dos extratos brutos de <i>Trichilia catigua</i> .	41
3.7.1 - Estudos do extrato diclorometano do arilo de <i>Trichilia catigua</i> .	41
3.7.1.1 - Estudo da fração TAD9	42
3.7.1.2 - Estudo da fração TAD9n	42
3.7.1.2.1- Estudo da fração TAD9n5	44
3.8 – Preparo dos extratos e Isolamento das substâncias encapsuladas: ricinina, xantiletina e rauianina	45
3.8.1 - Obtenção dos extratos bruto das folhas de <i>Ricinus communis</i> L.	45
3.8.2 - Obtenção dos extratos bruto das raízes de <i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i>	44
3.8.3 - Obtenção dos extratos brutos do caule de <i>Rauia resinosa</i>	46
3.9 - Isolamento de ricinina, xantiletina e rauianina por HSCCC	46
3.9.1- Isolamento de ricinina	48
3.9.2- Isolamento de xantiletina	48
3.9.3- Isolamento de xantiletina	48
3.10- Análise cromatográfica de ricinina, xantiletina e rauianina	50
3.10.1- Validação do método analítico para quantificação de ricinina, xantiletina e rauianina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	50

3.10.1.1- Preparo das soluções padrões para construção da Curva analítica	51
3.10.1.2- Preparo das soluções padrões para determinação da exatidão e precisão do método	51
3.10.1.3- Limites de Detecção e quantificação do método analítico	51
3.11- Coeficiente de partição	52
3.12- Método de preparo das Nanopartículas	52
3.12.1- Preparo das nanopartículas de xantiletina e rauianina	52
3.12.1.1- Método de nanoprecipitação	52
3.12.2 - Preparo das nanopartículas de ricinina	56
3.12.2.1- Método de nanoprecipitação	56
3.12.2.2- Método de Dupla-Emulsão	56
3.12.2.3- Gelificação iônica: nanoesferas de quitosana	57
3.12.2.4- Método deposição interfacial/deslocamento do solvente	58
3.13- Preparo dos produtos secos por aspersão	60
3.14 - Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas	61
3.14.1-Determinação do pH	61
3.14.2 - Diâmetro médio	61
3.14.3 - Potencial zeta	62
3.14.4 - Determinação da quantidade total de ricinina, xantiletina e rauianina	62
3.14.5 - Determinação da quantidade de ricinina, xantiletina e rauianina encapsuladas	62
3.14.6 - Morfologia	63
3.14.7 - Estudos de estabilidade	63
3.14.7.1- Tempo de armazenamento	63
3.14.7.2- Degradação acelerada pela luz UV	64
3.14.7.3- Degradação térmica (65 °C)	64
3.14.8 - Estudos de liberação	65
3.15 - Metodologia dos ensaios Biológicos	66
3.15.1 - Ensaio biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras	66
3.15.2 - Ensaio Biológicos com o Fungo Simbionte	67

4	Resultados e discussão	68
	4.1- Substâncias isoladas	68
	4.2- Esteróides	74
	4.2.1- Identificação estrutural do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3)	74
	4.3- Cumarinas	78
	4.3.1- Determinação Estrutural da Substância 4	78
	4.3.2- Determinação Estrutural da Substância 5	81
	4.4- Compostos fenólicos	83
	4.4.1- Determinação Estrutural da Substância 6	83
	4.4.2- Determinação Estrutural da Substância 7	86
	4.4.3- Determinação Estrutural da Substância 8	88
	4.4.4- Determinação Estrutural da Substância 9	90
	4.4.5- Determinação Estrutural da Substância 10	92
	4.4.6- Determinação Estrutural da Substância 11	96
	4.4.7- Determinação Estrutural da Substância 12	98
	4.4.8- Determinação Estrutural da Substância 13	100
	4.4.9- Determinação Estrutural da Substância 14	102
	4.4.10- Determinação Estrutural das Substâncias 15 e 16	108
	4.5- Derivado de oxazole	112
	4.5.1- Determinação Estrutural da Substância 17	112
	4.6- Flavonóides	117
	4.6.1- Determinação Estrutural da Substância 18	117
	4.6.2- Determinação Estrutural da Substância 19	124
	4.6.3- Determinação Estrutural da Substância 20	130
	4.7- Limonóides	136
	4.7.1- Determinação Estrutural da Substância 21	136
	4.7.2- Determinação Estrutural da Substância 22	141
	4.7.3- Determinação Estrutural da Substância 23	154
	4.8- Estudos do Sistema de solvente, fase móvel e da identificação de ricinina, xantiletina e rauianina isoladas por HSCCC para o microencapsulamento.	162

4.8.1- Sistema de solvente, fase móvel e a identificação de ricinina isolada por HSCCC	162
4.8.2- Sistema de solvente, fase móvel e a identificação de xantiletina isolada por HSCCC	163
4.8.3- Sistema de solvente, fase móvel e a identificação de rauianina isolada por HSCCC	164
4.9- Análise cromatográfica de ricinina, xantiletina e rauianina	167
4.9.1- Validação do método analítico para quantificação de ricinina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	167
4.9.2- Validação do método analítico para quantificação de xantiletina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	171
4.9.3- Validação do método analítico para quantificação de rauianina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).	174
4.10- Coeficiente de partição	177
4.11- Caracterização físico-química das Nanopartículas	179
4.11.1- Nanopartículas de xantiletina e rauianina	180
4.11.1.1 - Morfologia	190
4.11.1.2- Estudos de estabilidade:	193
4.11.1.2.1- Tempo de armazenamento	194
4.11.1.2.2- Degradação acelerado na luz UV	197
4.11.1.2.3- Degradação térmica (65 °C)	199
4.11.1.3- Estudo da liberação <i>in vitro</i>	200
4.11.2- Nanopartículas de ricinina	202
4.12- Ensaio Biológicos	210
4.12.1- Ensaio biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras: Nanopartículas poliméricas	210
4.12.2- Ensaio Biológicos com o Fungo Simbionte: Nanopartículas poliméricas	217
4.12.3- Ensaio biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras: <i>Trichilia elegans</i> e <i>Trichilia catigua</i>	223
4.12.3.1- Efeito das frações e substâncias puras do extrato diclorometânico do caule	226
4.12.3.2- Efeito das frações do extrato diclorometânico dos galhos	230

4.12.3.3-	Efeito das frações do extrato metanólico dos galhos	232
4.12.3.4-	Efeito das frações do extrato metanólico das folhas	234
4.12.3.5-	Efeito da cedrelona isolada do extrato diclorometânico e Hexânico do arilo de <i>Trichilia catigua</i> .	237
4.12.4 –	Ensaio Biológicos com o Fungo Simbionte: <i>Trichilia catiguá</i>	238
5	Conclusões	239
6	Referências Bibliográficas	241

PARTE II

1	Introdução	257
2	Objetivo	261
3	Procedimento Experimental	262
	3.1-Materiais	262
	3.1.1-Reagentes	262
	3.1.2- Equipamentos	262
	3.1.3- Compostos estudados	263
	3.1.4- Linhagens celulares	263
	3.2 Métodos	263
	3.2.1 Culturas Celulares	263
	3.2.2 Avaliação da viabilidade celular e obtenção de células em crescimento exponencial	264
	3.2.3 Ensaio SRB (Sulforodamina B)	264
	3.2.4- Análise do perfil do ciclo celular por citometria de fluxo e dos níveis de apoptose	266
4	Resultados e discussão	267
	4.1- Efeito dos compostos sobre o crescimento das linhagens celulares tumorais humanas	267
	4.2- Avaliação dos efeitos dos compostos mais potentes na distribuição do ciclo celular e na indução da apoptose em células de NCI-H460	282
5	Conclusões	286
6	Referências Bibliográficas	287

PARTE I

Nanopartículas polimérica e estudo fitoquímico biomonitorado de *Trichilia elegans* e *Trichilia catigua* (Meliaceae) associado ao controle de formigas cortadeiras.

1- Introdução

1.1 - A família Meliaceae

A família Meliaceae pertencente à ordem Rutales, é composta de 51 gêneros e aproximadamente 1400 espécies (BANERJI & NIGAN, 1984). No Brasil são encontrados os gêneros *Cabralea*, *Cedrela*, *Guarea*, *Swietenia*, *Carapa* e *Trichilia* (PENNINGTON & STYLES, 1975).

As plantas da família Meliaceae são geralmente árvores de grande porte, entre estas estão algumas de valor econômico como a madeira do cedro-rosa (*Cedrela* sp.), do mogno (*Swietenia* sp.) (BANERJI & NIGAN, 1984) e dos extrativos químicos do neem (*Azadirachta indica*) (MORGAN, 2009).

Nesta família são encontradas substâncias químicas características da mesma e conhecidas como meliacinas ou limonóides. Os limonóides podem apresentar vários tipos de atividades biológicas como, anticancerígena, antiparasitária, antimalárica, antifúngica, antibacteriana, antiviral e principalmente atividade contra insetos (CHAMPAGNE *et al.*, 1992, KOUL *et al.*, 2004, MANEERAT *et al.*, 2008, MANNERS, 2007, PUDHOM *et al.*, 2010). A atividade biológica sobre insetos de alguns limonóides isolados de espécies de *Trichilia* vem sendo investigada e resultados promissores foram encontrados (KUBO & KLOCKE, 1982, NAKATANI *et al.*, 1981, 1985, RODRÍGUEZ *et al.*, 2003, SIMMONDS *et al.*, 2001).

A química dos limonóides de Meliaceae começou em 1960, com o isolamento da gedunina de *Entandrophragma angolense* (TAYLOR, 1984). O interesse pela atividade inseticida dos limonóides intensificou-se com o isolamento do limonóide azadiractina (Figura 1.1) de *Azadirachta indica* (BUTTERWORTH & MORGAN, 1968). Essa substância tem um grande potencial inseticida, apresentando atividade frente a mais de 600 espécies consideradas pragas agrícolas (LEE *et al.*, 1991, MARTINEZ, 2002, REMBOLD, 1989, MORGAN, 2009).

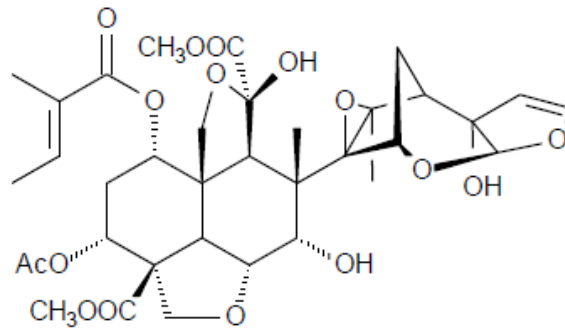


Figura 1.1: Estrutura do limonóide azadiractina.

Os limonóides são derivados dos triterpenos tetracíclicos, eufol ou tirucalol (Figura 1.2), onde após várias oxidações, perda de quatro carbonos e rearranjos, leva à formação de diferentes tipos estruturais (CONNOLLY, 1983).

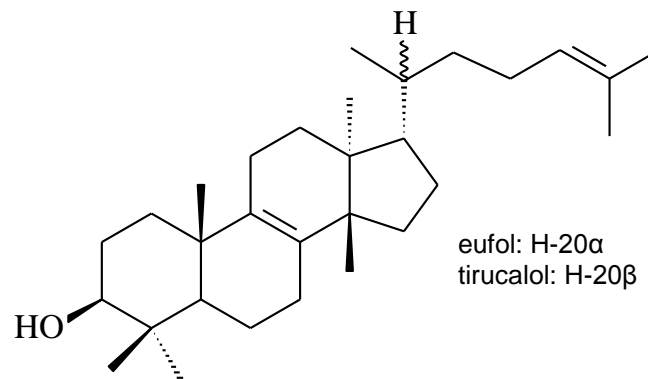


Figura 1.2: Estrutura dos triterpenos precursores dos limonóides.

A Figura 1.3 mostra as substâncias que representam os principais tipos de esqueletos dos limonóides isolados de Meliaceae (TAYLOR, 1984, RASAGA *et al.*, 1997).

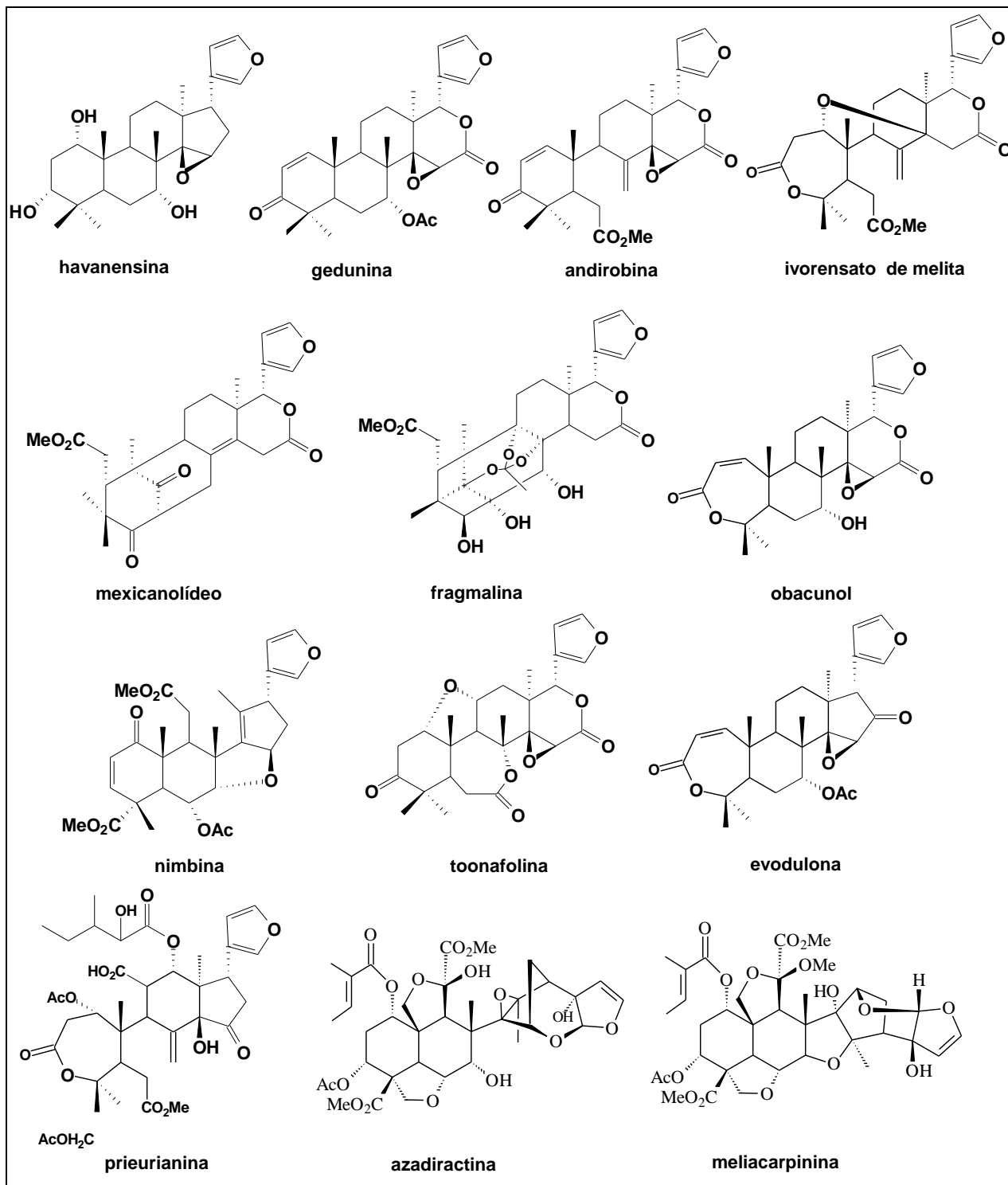


Figura 1.3: Substâncias que representam os principais tipos de esqueletos dos limonóides isolados de Meliaceae.

1.2- O gênero *Trichilia*

O gênero *Trichilia* apresenta aproximadamente 230 espécies (RAMÍREZ *et al.*, 2000) e tem ocorrência na América tropical, África e região Indo-Malaio. É um dos gêneros que possui o maior número de espécies na família e também o que apresenta um maior número de características anatômicas de Meliaceae.

De acordo com a classificação morfológica de PENNINGTON & STYLES (1975), o gênero *Trichilia* encontra-se na mesma sub-família que os gêneros *Melia* e *Azadirachta* e, portanto, existe a possibilidade de se isolar de *Trichilia* substâncias semelhantes às isoladas de *Melia* e *Azadirachta*.

Os limonóides são os principais metabólitos secundários isolados no gênero, mas já foram isolados também triterpenos, fitoesteróides, esteróides pregnanos, cumarinas, lignanas, γ -lactonas, sesquiterpenos e aminoácidos (CHAURET *et al.*, 1996, CORTEZ *et al.*, 1998, GARCEZ *et al.*, 1996, 1997a e b, INADA *et al.*, 1994, JOLAD *et al.*, 1981a e b, KETWARU *et al.*, 1993, MATOS *et al.*, 2009, OLUGBADE & ADESANYA *et al.*, 2000, PIZZOLATTI *et al.*, 2002; 2004, RAMÍREZ *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2008).

Espécies do gênero *Trichilia* vêm sendo apontadas como promissoras por possuírem substâncias com atividade inseticida comparável à da azadiractina, mas possivelmente com estrutura molecular mais simples e, portanto, com síntese economicamente viável (MIKOLAJCZAK & REED 1987, RAMÍREZ *et al.*, 2000, XIE *et al.*, 1994, WHEELER *et al.*, 2001a e b).

1.3 - *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss

Trichilia elegans ssp. *elegans* A. Juss., conhecida popularmente como “Cachuá” ou “pau-de-ervilha”, produz madeira resistente e durável, sendo a casca empregada em curtumes. É uma planta apícola, cuja floração é observada de outubro a dezembro e os frutos observados no período de janeiro a março. Estes se apresentam como cápsulas trivalvares ovaladas e pubescentes, medindo cerca de 6 mm de comprimento, enquanto as sementes, pretas, são parcialmente envoltas por um arilo de coloração alaranjada (Figura 1.4) (POTT, 1994).

Possui ampla dispersão no país, sendo encontrada desde Goiás até Santa Catarina e, em Mato Grosso do Sul, ocorre em matas semidecíduas, apresentando-se como uma arvoreta de três a seis metros de altura.



Figura 1.4: Folhas, frutos e galhos de *Trichilia elegans* ssp. *elegans* A. Juss (Fonte: http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=420, 02/12/2010)

1.4 - *Trichilia catigua* A. Juss

Trichilia catigua é popularmente conhecida como catuaba, catiguá, caatiguá, cedrinho, mangalô-catigá e angelim-rosa. São árvores com cerca de 10 m de altura e ocorrem de São Paulo até o Rio Grande do Sul. Suas flores são branco-amareladas e os frutos avermelhados (Figura 1.5). Suas flores são encontradas no período de setembro a outubro e os frutos de dezembro a janeiro.

Popularmente, da casca produz-se uma tintura amarelada que é usada externamente contra reumatismo, hidropsia e, ainda é inseticida, purgativa e em dores moderadas e tônicas. O óleo da casca é empregado, com muito bom resultado, no tratamento de eczemas rebeldes, de psoríasis e herpes.



Figura 1.5: Folhas, flores e frutos de *Trichilia catigua* A. Juss. (Fonte : http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=72, 02/10/2010).

1.5- Formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras (Figura 1.6) pertencem à Classe Insecta, Ordem Hymenoptera, Família Formicidae, subfamília Myrmicinae, tribo Attini. São consideradas formigas cortadeiras todas as espécies dos gêneros *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas, *Acromyrmex*, conhecidas como quenquéns e também algumas dos gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma* (JUSTI-JUNIOR *et al.*, 1996).



Figura 1.6: Formigas cortadeiras (MARINHO *et al.*, 2006).

Os gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) representam o ápice evolutivo da tribo em relação à filogenia das Attini. São caracterizadas por possuírem colônias bem desenvolvidas, polimorfismo funcional das operárias e uma distinta casta de soldados nas espécies do gênero *Atta* (STRADLING, 1991).

O Brasil é o país da América do Sul com maior número de espécies de formigas cortadeiras. As saúvas são encontradas principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul, Goiás e Paraná (LITTLEDYKE & CHERRETT, 1976).

As espécies *Atta laevigata*, *Atta sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex disciger*, *Acromyrmex niger* e *Acromyrmex crassipinus* destacam-se como as principais pragas de florestas implantadas de *Pinus* e de *Eucalyptus*, principalmente nas fases de pré-corte e imediatamente após o plantio ou no início da condução de brotação (FORTI & BOARETTO, 1997).

As plantas cortadas pelas formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são utilizadas como substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

O fungo simbiote constitui a base alimentar da colônia, mas não é a única fonte alimentar, pois as operárias adultas ingerem seiva diretamente das plantas no momento do corte e recorte do material (FORTI & ANDRADE, 1999, LITTLEDYKE & CHERRETT, 1976, QUINLAN & CHERRETT, 1979). De acordo com BASS & CHERRET (1995), 9 % das necessidades energéticas das operárias adultas são provenientes diretamente do fungo.

O fungo *Leucoagaricus gongylophorus* apresenta atividade de polissacaridasas, fornecendo às formigas enzimas que digerem celulose, xilana, amido, pectina e proteínas como pectinase, amilase, xilanase, β -glicosidase e manosidase (FEBVAY & KERMARREC, 1981, MARICONI, 1974). Estudos relatados sobre a atividade celulásica no fungo cultivado pela formiga *Atta sexdens rubropilosa*, mostraram suas diferentes atividades metabólicas, a qual degradou em maior quantidade o polissacarídeo pectina, seguido de amido, xilana, carboximetilcelulose e celulose (SIQUEIRA *et al.*, 1998). A atividade das formigas traz também benefícios aos fungos, uma vez que estas produzem compostos antimicrobianos que reduzem o crescimento de outros fungos e bactérias contaminantes dos ninhos (FOWLER *et al.*, 1986). A glicose é a principal fonte energética dessas formigas, proveniente da digestão extracelular do fungo simbiote, sendo responsável por 50 % de suas necessidades nutricionais (SILVA *et al.* 2003).

Além desse fungo simbiote, outros microrganismos têm sido encontrados no jardim de fungo dos formigueiros (PAGNOCCA *et al.*, 1996). Nesta interação existem também um parasita do gênero *Escovopsis* e um actinomiceto (bactéria filamentosa). Segundo CURRIE *et al.*, (1999), o *Escovopsis* é patógeno que tenta suprimir o crescimento do fungo simbiote e das formigas (KOST *et al.*, 2007,

REYNOLDS & CURRIE, 2004), enquanto o actinomiceto mantém uma relação mutualista com a formiga. Essas actinobactérias são de grande interesse, uma vez que, são mutualistas metabólicos de diversos organismos, principalmente na fixação de nitrogênio e produção de antibióticos (MUELLER *et al.*, 2008). As espécies de *Pseudonocardia* presentes neste ambiente são produtoras de antibióticos e aparentemente são responsáveis pela inibição do crescimento deste parasita (CURRIE *et al.*, 1999; KOST *et al.*, 2007), pois produzem compostos que inibem o *Escovopsis* (REYNOLDS & CURRIE, 2004).

Apesar da convivência entre formigas, fungo mutualista e actinobactéria ser pacífica (CURRIE *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2008), eventualmente o parasitismo pode levar as formigas e fungo à morte (CURRIE *et al.*, 2006).

As formigas cortadeiras quando em ambientes ecologicamente equilibrados, dispersam sementes, contribuindo para o reflorestamento de muitos ecossistemas; promovem a germinação de sementes, pois removem a polpa dos frutos; fazem a poda de algumas plantas, promovendo seu crescimento vegetativo; exercem importante papel na aeração do solo; incorporam matéria orgânica à terra, tornando-a fértil, rica em carbono, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes; e, são predadoras de diversos artrópodes, muitos deles pragas agrícolas, além de serem predadoras de outras espécies de formigas.

Entretanto, algumas formigas estão destacadas como pragas severas de culturas, pastagens naturais ou cultivadas agrícolas e aos programas de reflorestamento e silvicultura brasileira, assim sendo consideradas como o inseto que mais causa danos a agricultura, uma vez que, são animais herbívoros dominantes em muitos ecossistemas.

A introdução de monoculturas agrícolas e florestais causa um desequilíbrio ecológico que fornece condições ideais de proliferação e estabelecimento das colônias de formigas cortadeiras (CHERRETT, 1986).

De acordo com CHERRETT (1986), estas formigas causam danos a diversas culturas como café, cana-de-açúcar, laranja, dentre outras, sendo que os principais alvos econômicos são as espécies de *Eucalyptus* e *Pinus*. As formigas cortadeiras são responsáveis por 75% do custo e do tempo total gasto utilizado no controle de pragas nos reflorestamentos (VILELA, 1986).

Para todas as culturas, apesar de não haver dados conclusivos sobre as perdas, pode-se dizer que quando as plantas são novas, os prejuízos podem chegar a 100% (FORTI & BOARETTO, 1997).

Além dos prejuízos na área agrícola, tais formigas podem causar danos a prédios, pontes, estradas de rodagem e de ferro, pois as galerias e painéis dos formigueiros são susceptíveis ao peso dessas construções (MARICONI, 1970).

1.6 - Métodos de controle de formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras podem ser controladas através de métodos mecânicos, culturais, biológicos e químicos. O controle químico é o mais freqüentemente utilizado, sendo o produto químico tóxico aplicado em formas de líquidos termonebulizáveis, gases tóxicos, pós seco e iscas granuladas.

O método mais empregado é com iscas granuladas, pois oferecem maior segurança ao operador, dispensam mão-de-obra e equipamentos especializados que permitem a aplicação em formigueiros localizados em áreas de difícil acesso (LOECK & NAKANO, 1984). As iscas granuladas são constituídas de óleo de soja como veículo, um substrato atrativo e um ingrediente ativo como princípio tóxico. O substrato atrativo efetivo e amplamente utilizado é a polpa cítrica desidratada, embora outros materiais orgânicos já tenham sido utilizados, como por exemplo, milho, folha de eucalipto, farinha de mandioca, farelo de soja, farinha de trigo, bagaço e melaço de cana.

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

As primeiras iscas tóxicas continham aldrin como princípio ativo que posteriormente foi substituído por dodecacloro por ser mais eficiente. Devido aos seus efeitos prejudiciais ao meio ambiente, houve conseqüentemente proibição de inseticidas clorados e o dodecacloro foi então substituído pela sulfluramida (N-etilperfluorooctano-sulfonamida), pertencente ao grupo das sulfonas fluoroalifáticas (BOARETTO & FORTI, 1997). A Figura 1.7 mostra as estruturas desses inseticidas.

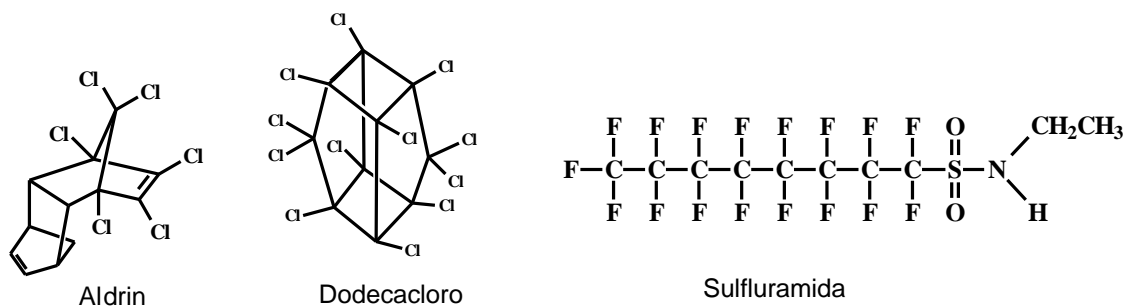


Figura 1.7: Inseticida aldrin, dodecacloro e sulfluramida.

O fipronil (Figura 1.8) destaca-se nos novos grupos químicos utilizados no controle de formigas cortadeiras. Esse inseticida é um fenilpirazol que atua no sistema nervoso central, especificamente no sistema GABA (ácido gama-aminobutírico), o qual se apresenta ativo principalmente por ingestão (BOARETTO & FORTI, 1997).

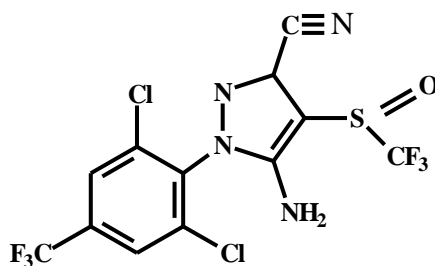


Figura 1.8: Inseticida fipronil.

Os compostos naturais mais utilizados como inseticida atualmente são as piretrinas obtidas de *Chrysanthemum* (Asteraceae). Elas deram origem aos compostos sintéticos baseados nas mesmas com menor custo de obtenção e com baixo impacto ao meio ambiente. Azadirachtina, um limonóide obtido de *Azadirachta indica*, foi o composto com maior impacto obtido recentemente. O uso deste composto puro ou do óleo que o contém (óleo de Neem) vem sendo aplicado comercialmente.

Desde a proibição do uso de inseticidas clorados, a busca de métodos alternativos no controle de formigas cortadeiras tem crescido consideravelmente. Neste contexto, visando à busca de inseticidas mais seletivos e menos prejudiciais ao meio ambiente, o Grupo de Produtos Naturais do DQ/UFSCar, juntamente com o Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da UNESP de Rio Claro-SP tem

estudado o efeito de plantas potencialmente tóxicas para *Atta sexdens rubropilosa* e o seu fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus* e inibidoras de pectinases.

Os primeiros estudos realizados foram com plantas popularmente conhecidas como tóxicas a formiga. A lignana sesamina (Figura 1.8), obtida de *Virola sebifera* (Miristicaceae) e do *Sesamum indicum* (Pedaliaceae), a xantiletina (Figura 1.8) presente na maioria dos cítricos; a rauianina (Figura 1.8) obtida das folhas de *Rauia* sp (Rutaceae) e ácidos graxos isolados de folhas de sesame, inibiram o crescimento do fungo simbionte em meio de cultura (GODOY *et al.*, 2005, MORINI *et al.*, 2005, PAGNOCCA *et al.*, 1996, PEÑAFLORES *et al.*, 2004, RIBEIRO *et al.*, 1998;). Os ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* alimentados diariamente com folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) mostraram gradual decréscimo no volume do jardim de fungo e aumento da velocidade de morte de formigas, com extinção total dos ninhos após seis semanas de tratamento (FACCHINI, 2005, HEBLING *et al.*, 1996;). O fracionamento biomonitorado desse extrato levou ao isolamento do alcalóide ricinina (Figura 1.9), responsável pela ação tóxica desta planta frente às saúvas (BIGI *et al.*, 2004). *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) e *Canavalia ensiformis* (Fabaceae) causaram efeitos deletérios para os ninhos e para formigas operárias (HEBLING *et al.*, 2000a e b, MONTEIRO *et al.*, 1998).

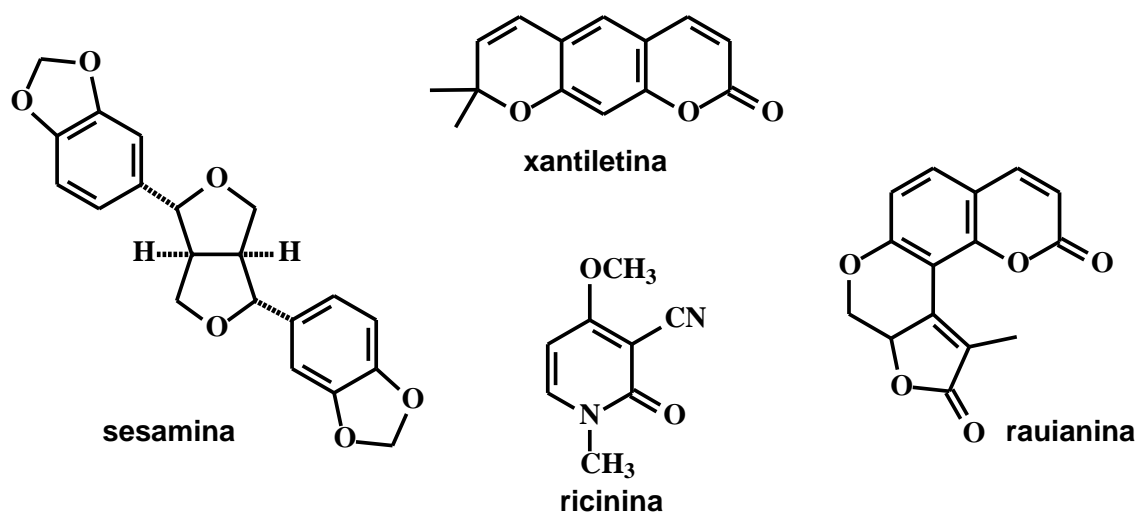


Figura 1.9: Estrutura da lignana sesamina, das cumarinas xantiletina e rauianina e do alcalóide ricinina.

1.7- Nanopartículas Poliméricas

A nanotecnologia tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico.

A encapsulação é a tecnologia de empacotamento que, com finas camadas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, formam partículas denominadas micro ou nanocápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (SPARKS, 1981). As nanopartículas quando comparadas com outros sistemas coloidais apresentam maior estabilidade em fluídos biológicos e ao armazenamento devido às matérias-primas empregadas na sua produção (DOMINGUES & GUTERRES, 2008).

As nanopartículas poliméricas, nanocápsulas e nanoesferas são sistemas carreadores que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . As nanocápsulas são constituídas por uma parede polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o princípio ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas não contém óleo em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, onde o princípio ativo encontra-se homoganeamente disperso ou solubilizado no interior da matriz (ALLÉMANN *et al.*, 1993a e b, PUISIEUX *et al.*, 1994, SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003, VAUTHLER-HOLTZSCHERER *et al.*, 1991). A Figura 1.10 ilustra a diferença morfológica entre a forma das nanoesferas (sistema polimérico matricial) e as nanocápsulas (sistema polimérico do tipo reservatório).

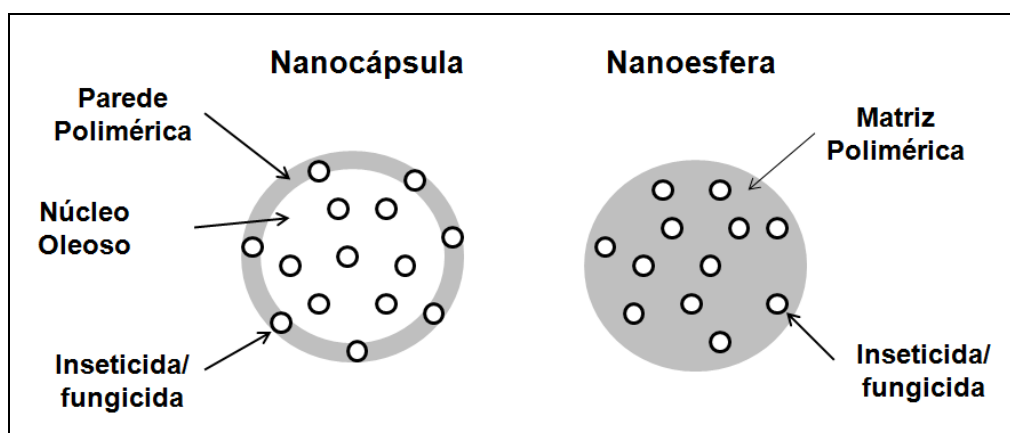


Figura 1.10: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.

A preocupação com o meio ambiente tem aumentado o interesse em reduzir a quantidade de agrotóxico aplicado por hectare e aumentar a segurança dos pesticidas. Isso pode ser conseguido através da encapsulação dos agrotóxicos.

Os agrotóxicos encapsulados têm sua atividade prolongada através da liberação controlada do princípio ativo e reduz a necessidade de altas doses iniciais ou múltiplas aplicações (SEAMAN, 1990; THOMAS, 1990; GREENE *et al.*, 1992). Os agrotóxicos também são encapsulados para impedir o reconhecimento de compostos ativos por parte dos insetos e reduzem a toxicidade em mamíferos, além de aumentar a estabilidade do princípio ativo, protegendo da degradação ambiental, aumentar a solubilidade em água e a redução da volatilização e da fitotoxicidade (OHTSUBO *et al.*, 1991).

No âmbito farmacêutico, esses sistemas têm demonstrado ainda muitas potencialidades no aumento da eficácia de fármacos (DOMINGUES & GUTERRES, 2008, SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003).

Atualmente, diversos agrotóxicos contendo ingredientes ativos em escala nanométrica já estão no mercado. Muitas das principais companhias de agroquímicos do mundo estão realizando pesquisa e desenvolvimento para obter novas formulações de agrotóxicos em escala nanométrica (GRUPO ETC, 2005, MEDEIROS & MATTOSO, 2006;).

A Syngenta, a maior companhia de agroquímicos do mundo e a terceira maior produtora de sementes, já comercializam agrotóxicos formulados como emulsões. Por exemplo, o regulador de crescimento de plantas, Primo MAXX, e seu fungicida, Banner MAXX são agrotóxicos com base oleosa, misturada com água e depois aquecida para criar uma emulsão. Segundo a Syngenta, são inúmeras as vantagens desses produtos, entre os quais o tamanho extremamente pequeno das partículas, cerca de 100 nm, evita que entupam os filtros dos tanques de aspersão. Além disso, estes produtos químicos misturam-se na água e não se separam no tanque por um período de até um ano, enquanto fungicidas contendo ingredientes com partículas maiores geralmente devem ser agitados a cada duas horas para evitar aplicação incorreta e entupimento do tanque. De acordo com a Syngenta, ele é absorvido sistemicamente pela planta e não pode ser arrastado pela chuva ou irrigação. Um produto similar microencapsulado da Syngenta está sendo

aplicado em sementes, como tratamento para controlar pragas do solo na germinação. Esta empresa desenvolveu também inseticida encapsulado para pragas domésticas como baratas, formigas e besouros, bem como um repelente de longa duração contra mosquitos.

A Bayer Crop Science da Alemanha, a segunda maior companhia de agrotóxicos do mundo, patenteou um agroquímico na forma de emulsão, com partículas que variam entre 10 e 400 nm. A companhia refere-se à invenção como um “concentrado de microemulsão”, com vantagens tais como redução da quantidade aplicada e atividade de longo prazo prolongada. A BASF da Alemanha, a quarta corporação mundial de agroquímicos, está realizando pesquisa básica e requereu patente para uma formulação de agrotóxico - “Nanopartículas como parte de um agente de proteção de cultivos”, que envolve um ingrediente ativo cujo tamanho ideal de partícula fica entre 10 e 150 nm.

Existem vários métodos descritos na literatura para o preparo das nanopartículas, a escolha do método é determinada principalmente pela solubilidade do princípio ativo e estabilidade molecular. As técnicas mais utilizadas para o preparo das nanopartículas a partir de polímeros pré-formados são: a técnica de nanoprecipitação/deslocamento do solvente (FESSI *et al.*, 1989, FRIEDRICH *et al.*, 2008), emulsificação-evaporação do solvente (dupla emulsão-evaporação do solvente) (COHEN-SELA *et al.*, 2009, WATTS *et al.*, 1990), emulsificação-difusão do solvente (LEROUX *et al.*, 1995, MORA-HUERTAS *et al.*, 2010) e o *salting-out* (ALLÉMANN *et al.*, 1993a e b SONG *et al.*, 2008).

As principais caracterizações das nanopartículas envolvem a determinação do pH das suspensões, potencial zeta das partículas, quantidade de substâncias ativas associadas às nanoestruturas (eficiência de encapsulação), a distribuição de massa molar do polímero, diâmetro das partículas das suspensões coloidais, avaliação morfológica, estudo de degradação (luz e temperatura), avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento e estudo de liberação. O conjunto de informações obtidas pela caracterização destes sistemas pode conduzir à proposição de modelos que descrevam a organização das nanopartículas em nível molecular, que será dependente da composição qualitativa das formulações.

2- Objetivo

Os objetivos desse trabalho foram o estudo fitoquímico de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae) biomonitorado por ensaios em formigas *Atta sexdens rubropilosa* e seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* visando o isolamento e a caracterização dos compostos bioativos.

Desenvolvimento de nanopartículas a partir de polímeros biodegradáveis, para nanoencapsulação de ricinina, xantiletina e rauianina, visando sua aplicação no controle de formigas cortadeiras.

3- Procedimento Experimental

3.1 – Materiais e métodos

Solventes :

- Solventes comerciais BRENTAGLA, SINTH, VETEC, LABSYNTH e outros destilados na sala de destilação do Departamento de Química da UFSCar.
- Solventes grau CLAE da J.T. BAKER, TEDIA[®].
- Solventes deuterados da ALDRICH CHEMICAL COMPANY, ACROS ORGANICS, CIL - CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES.

Fases estacionárias utilizadas para cromatografia em coluna (CC) :

- Sílica gel 60 (70-230 Mesh) da ACROS ORGANICS
- Sílica gel 60 (230-400 Mesh) da ACROS ORGANICS
- Sephadex[®] LH 20 da Amersham Pharmacia Biotech AB
- Florisil (200 Mesh) da ALDRICH

Cromatografia em camada delgada (CCDC) :

- Cromatoplaça de sílica F₂₅₄, AITLC 20 x 20 cm em alumínio da Merck.

Reveladores:

- Radiação na região do UV (254 e 363 nm)
- Vanilina em ácido sulfúrico.

3.2 – Equipamentos

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:

- BRUKER DRX 400 MHz (9,4 Tesla)
- BRUKER ARX 200 MHz (4,7 Tesla)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

- Cromatógrafo: Shimadzu SCL-10Avp (preparativo), equipado com válvula de reciclo, válvula de injeção Rheodyne 7725i, alça de amostragem (*loop*) de 200, 500 e 2000 µL, bombas Shimadzu LC-6AD e detector: UV-VIS, Shimadzu SPD-10vvp.

- Cromatógrafo: Shimadzu SCL-10Avp (analítico), equipado com: degaseificador de membrana Shimadzu DGU-14A, duas bombas Shimadzu LC-10ADvp e detectores de Foto-diodo Shimadzu SPDM10Avp.
- Cromatógrafo: Agilent Technologies modelo 1200 (analítico), equipado com: bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, auto-injetor G1329A, forno para coluna G1316A e detector de Ultravioleta G1314B. O equipamento está acoplado a uma interface G1369A e os cromatogramas foram registrados através do *software* Agilent EZCrom SI.

HSCCC(High-Speed Counter-Current Chromatography):

- CCC Quik Prep/Lab Prep MK 5

CG-EM:

- GC – 17A Shimadzu, CG-EM – QP 5000 Shimadzu
- Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm) filme = 0,25 µm
- Ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V)

Todas as análises via CG-EM foram realizadas utilizando:

- Temperatura do injetor: 250 °C
- Temperatura do detector: 280 °C
- Modo: split
- Volume de injeção: 1 µL

Programações de temperaturas utilizadas nas análises:

- Mistura de Esteróides: 150 °C (3 min); 6 °C/min até 280 °C; 280 °C (20 min).
- Cumarinas: 100 °C (3 min); 10 °C/min até 280 °C; 280 °C (10 min).

Espectrômetro de CL-EM

- MICROMASS QUATTRO LC
- Modo de ionização: Eletrospray (ESI)
Substância **20** (modo negativo)
Substância **22** e **23** (modo positivo)

As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LABIOMMI) - DQ/UFSCar.

Balança analítica

- SARTORIUS modelo BP210S
- Bel Engineering Mod. Mark 210A

Balança semi-analítica

- Bel Engineering Mod. Mark 500;

Potenciômetro

- Qualxtron Mod. 8010;

Liofilizador

- Liofilizador modelo E.C. Modulyo-Pump Savant VLP 80

Evaporadores Rotativos

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

Centrífuga

- Centrífuga Eppendorf 5810R.

Vórtex

- Vórtex PHOENIX AP56.

Banho de ultrassom

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

SPEEDVAC

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

Diâmetro BI-FOQELS

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

Potencial Zeta

- ZetaPlus, Zeta Potencial Analyzer –Brookhaven Instruments Corporation

Microscópico Eletrônico de Varredura (MEV)

- Philips XL 30 FEG, 30 KV, resolução máxima de 2nm.

Câmara de envelhecimento acelerado

- Câmara construída com conjunto de lâmpadas especiais que simulam a radiação no espectro do UV-A, UV-B e UV-C com comprimentos de onda entre 400-320, 320-280 e 280-100 nm, respectivamente.

Spray-Dryer

- Mini *Spray-dryer* Büchi Mod. B290;

Banho termostaticado

- Banho com controle de temperatura, circulação de água e agitador magnético da Arsec (equipamento construído sob encomenda);

Balança semi-analítica

- Bel Engineering Mod. Mark 500;

Ultra-turrax[®]

- IKA T 10 basic

3.3 - Material botânico

As folhas, cascas, caule e galhos de *Trichilia elegans* foram coletados em Muriaé-MG (outubro de 1989) e identificadas pelo Dr José Rubens Pirani n.2532.

Os frutos de *T. catigua* foram coletados em Piracicaba-SP (novembro de 2009) na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e identificadas pelo Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Rodriguez.

3.4 - Obtenção dos extratos de *Trichilia elegans*

As folhas, cascas, caule e galhos de *Trichilia elegans* foram secas em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 48 horas e pulverizadas em um moinho tipo Willey. Em seguida os pulverizados foram extraídos à temperatura ambiente e em repouso com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol) durante 3 dias, repetindo-se o processo por 3 vezes.

Os extratos foram concentrados em rotaevaporadores. As partes vegetais utilizadas no preparo dos extratos, as quantidades de extratos, assim como as quantidades de extrato obtidas para cada uma delas estão descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Extratos brutos das folhas, cascas, caule e galhos de *Trichilia elegans*

<i>Trichilia elegans</i>	Extrato	Massa (g)	Código
Galho 1811 g	Hexânico	9,06	TGH
	Diclorometânico	36,48	TGD
	Metanólico	38,37	TGM
Folhas 521 g	Hexânico	9,35	TFH
	Diclorometânico	27,06	TFD
	Metanólico	28,35	TFM
Cascas 305 g	Hexânico	2,36	TCAH
	Diclorometânico	5,16	TCAD
	Metanólico	5,85	TCAM
Caule 1681 g	Hexânico	2,84	TCH
	Diclorometânico	2,97	TCD
	Metanólico	28,43	TCM

Os extratos obtidos foram analisados via RMN ^1H e através de placas de cromatografia em camada delgada comparativas, assim reuniu-se as frações de diclorometano e hexano de cada extrato, que será tratado durante o texto apenas como diclorometano.

3.5 - Obtenção dos extratos de *Trichilia catigua*

Os frutos de *T. catigua* foram secos em estufa de circulação de ar a 40 °C, por aproximadamente 7 dias. Foram então separados em arilo, sementes e exocarpo. Os arilos (36,0) moídos foram submetidos à extração à temperatura ambiente com 900 mL de solvente em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol), de 3 a 5 vezes (ultra-turrax, repouso, filtração). Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos brutos (Tabela 3.2)

Tabela 3.2: Extratos brutos do arilo, sementes e exocarpo de *Trichilia catigua*.

<i>Trichilia elegans</i>	Extrato	Massa (g)	Código
Arilo 36 g	Hexânico	5,51	TAH
	Diclorometânico	2,19	TAD
	Metanólico	15,08	TAM

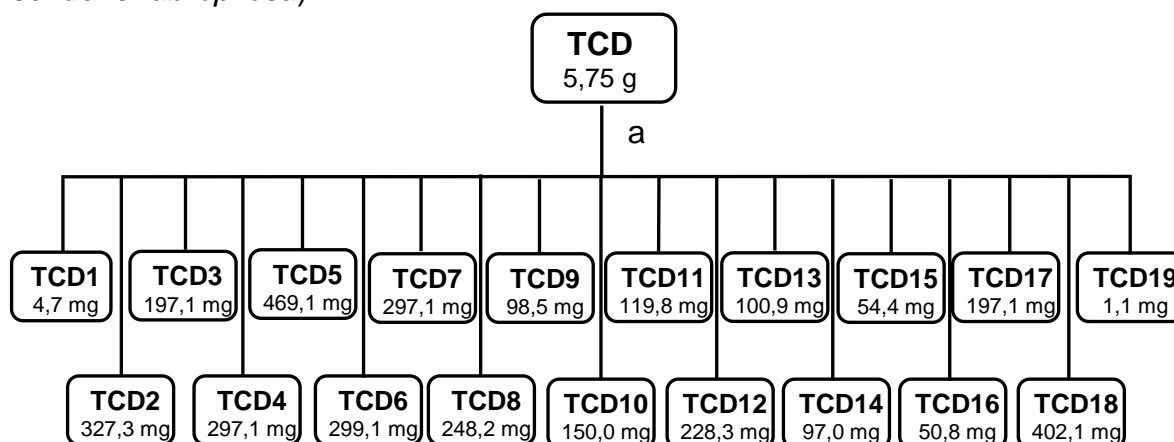
Os extratos obtidos foram analisados via RMN ^1H e através de placas de cromatografia em camada delgada comparativa. Não foi observado diferenças entre os extratos de diclorometano e hexano, sendo agrupados.

3.6 - Estudos dos extratos brutos de *Trichilia elegans*.

3.6.1 - Estudo do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* (TCD)

O extrato bruto diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* (TCD, 5,75 g), foi fracionado utilizando-se sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade como demonstrado resumidamente no Fluxograma 3.1. Foram obtidas 103 frações de 150 mL, as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC e/ou RMN ^1H , foram reunidas em 19 frações.

Devido as pequenas quantidades de massas das frações, estas não foram enviadas para ensaio por ingestão sobre as formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa*).



Fluxograma 3.1: Fracionamento de TCD.

a: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 4,0 \times 26,0$ cm)

- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh)

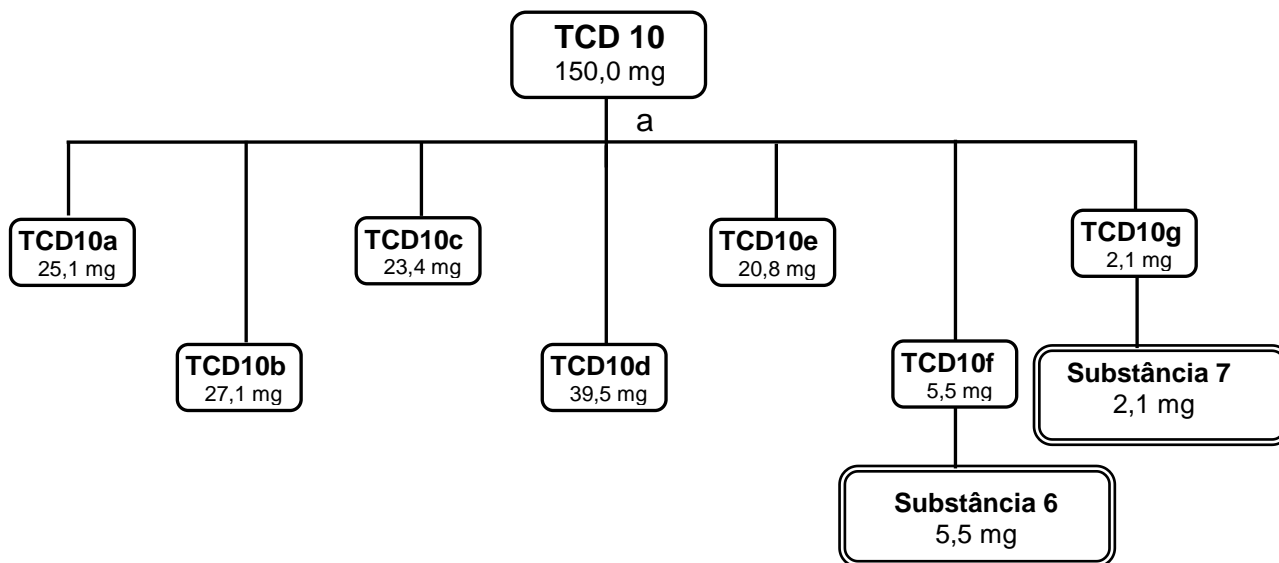
- gradiente de eluição: hex 100%, Hex: CH_2Cl_2 (4,9: 0,1/4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), CH_2Cl_2 100%, CH_2Cl_2 :AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, AcOEt:MeOH (2:1/ 1:1), MeOH 100% (103 frações de 150 mL, reunidas após CCDC).

3.6.1.1 - Estudo da fração TCD6

A fração **TCD6** foi submetida a CG-EM, a qual possibilitou a identificação da mistura dos esteróides (**1**, **2** e **3**). Foi utilizado o GC – 17A Shimadzu, CG-EM – QP 5000 Shimadzu, Coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm) filme = 0,25 μm , Ionização por impacto eletrônico (IE) (70 e.V). Temperatura do injetor: 250 $^\circ\text{C}$, temperatura do detector: 280 $^\circ\text{C}$, modo: split e volume de injeção: 1 μL . Utilizou-se as programações de temperaturas: 150 $^\circ\text{C}$ (3 min); 6 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 260 $^\circ\text{C}$; 260 $^\circ\text{C}$ (25 min).

3.6.1.2 - Estudo da fração TCD10

O fracionamento das frações **TCD10**, **TCD11**, **TCD13**, **TCD14**, **TCD15** e **TCD16** levaram ao isolamento das substâncias **4-8**, **10** que tiveram suas estruturas identificadas por CG-EM, RMN de ^1H e ^{13}C e 2D. Os fluxogramas 3.2 - 3.7 mostram de forma resumida o processo realizado.

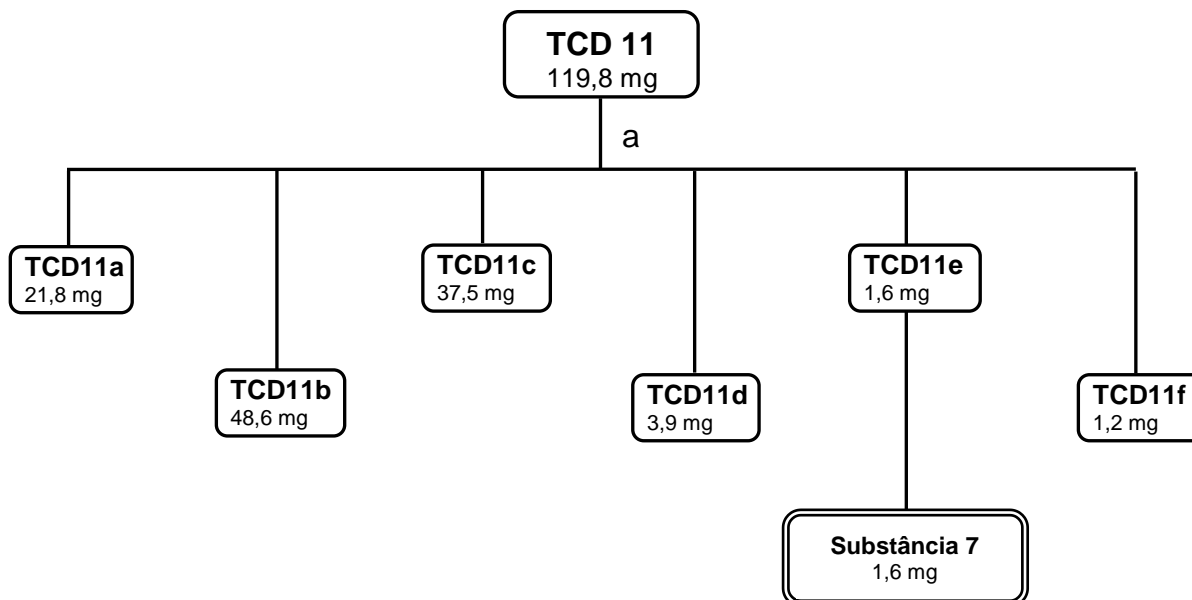


Fluxograma 3.2: Fracionamento de TCD 10.

a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo:

- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 10 μ m
- eluição isocrática: MeOH:CH₂Cl₂ 1:1
- fluxo: 4 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

3.6.1.3 - Estudo da fração TCD11



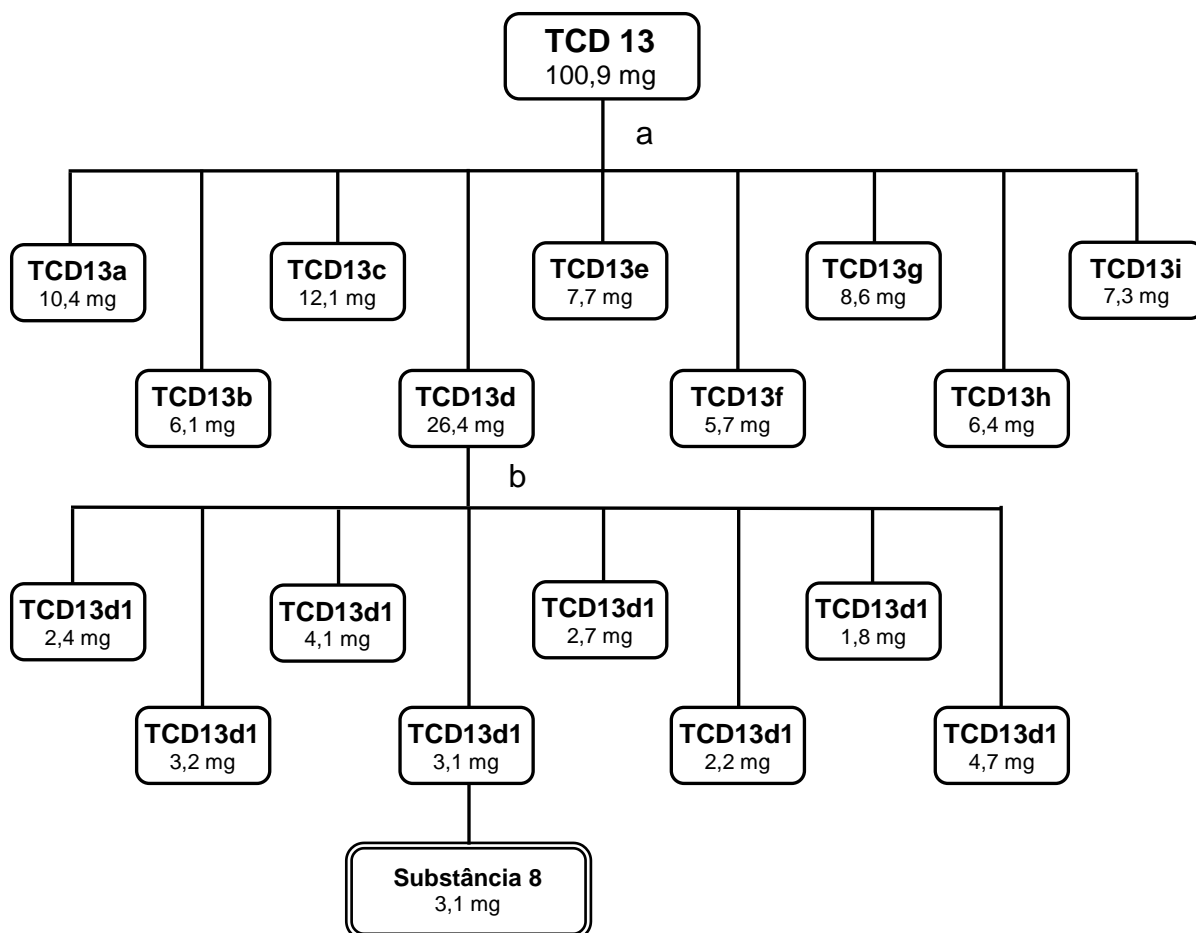
Fluxograma 3.3: Fracionamento de TCD 11.

a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo :

- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 10 μ m
- eluição isocrática: MeOH:CH₂Cl₂ 1:1
- fluxo: 4 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

3.6.1.4 - Estudo da fração TCD13

O fracionamento da fração **TCD13** levou a 43 frações que foram reunidas em 13 frações de acordo com as semelhanças apresentadas nas análises por CCDC e/ou RMN ¹H.



Fluxograma 3.4: Fracionamento de TCD 13.

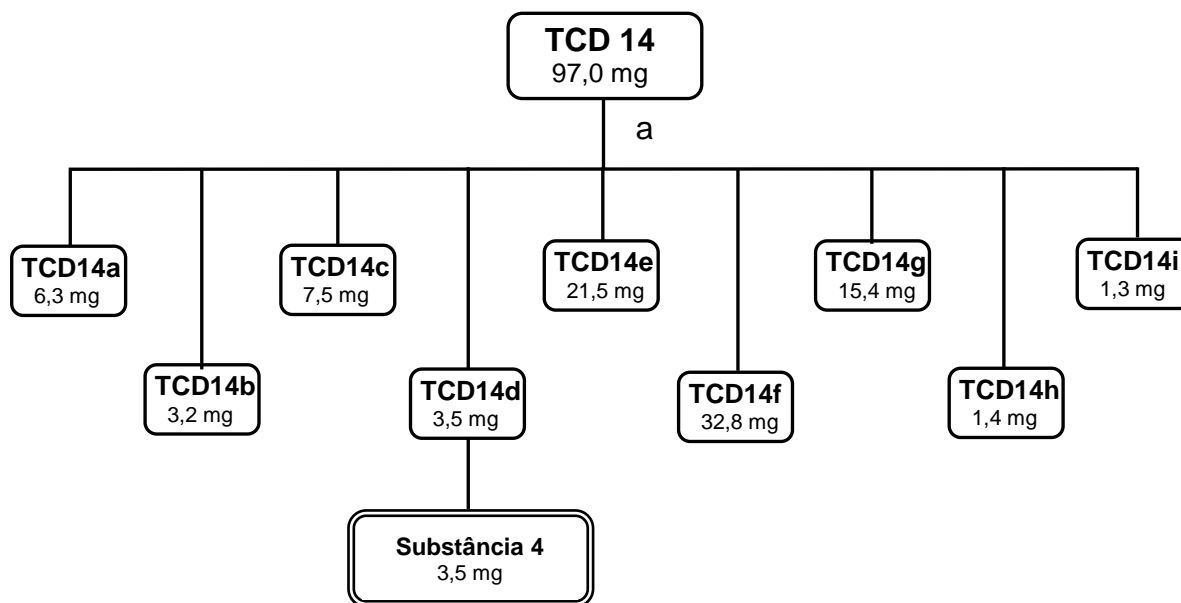
a: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)
- eluição isocrática: hex: CH_2Cl_2 : Acetona (4:2:1)

b: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo:

- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 10 μm
- eluição isocrática: MeOH: CH_2Cl_2 1:1
- fluxo: 4 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

3.6.1.5 - Estudo da fração TCD14

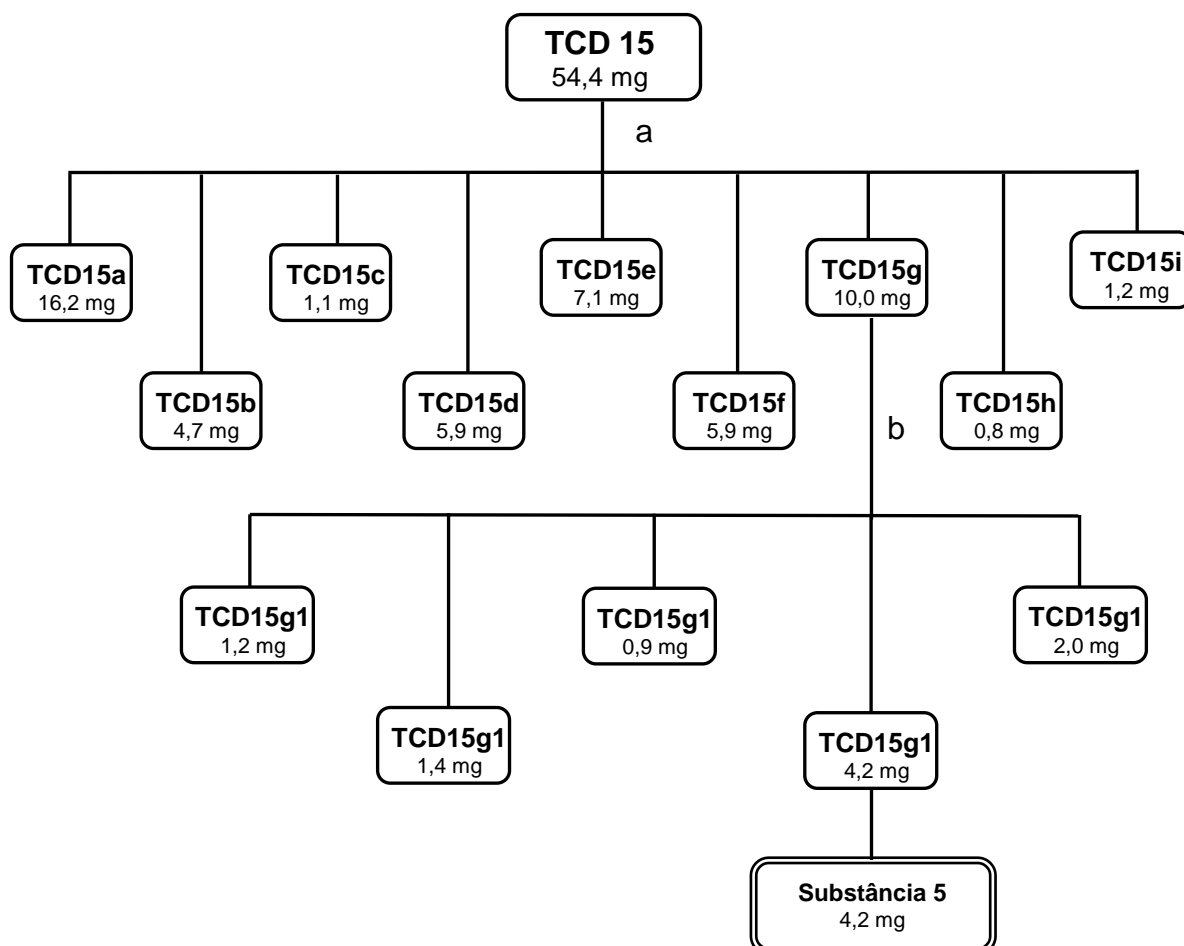


Fluxograma 3.5: Fracionamento de TCD 14.

- a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo:
- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 10 μ m
 - eluição isocrática: MeOH:CH₂Cl₂1:1
 - fluxo: 4 mL/min
 - detector UV 254, 217 nm

3.6.1.6 - Estudo da fração TCD15

Do fracionamento da fração **TCD15** foram obtidas 58 frações as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas nas análises por CCDC e/ou RMN ^1H , foram reunidas em 15 frações.



Fluxograma 3.6: Fracionamento de TCD 15.

a: cromatografia por adsorção:

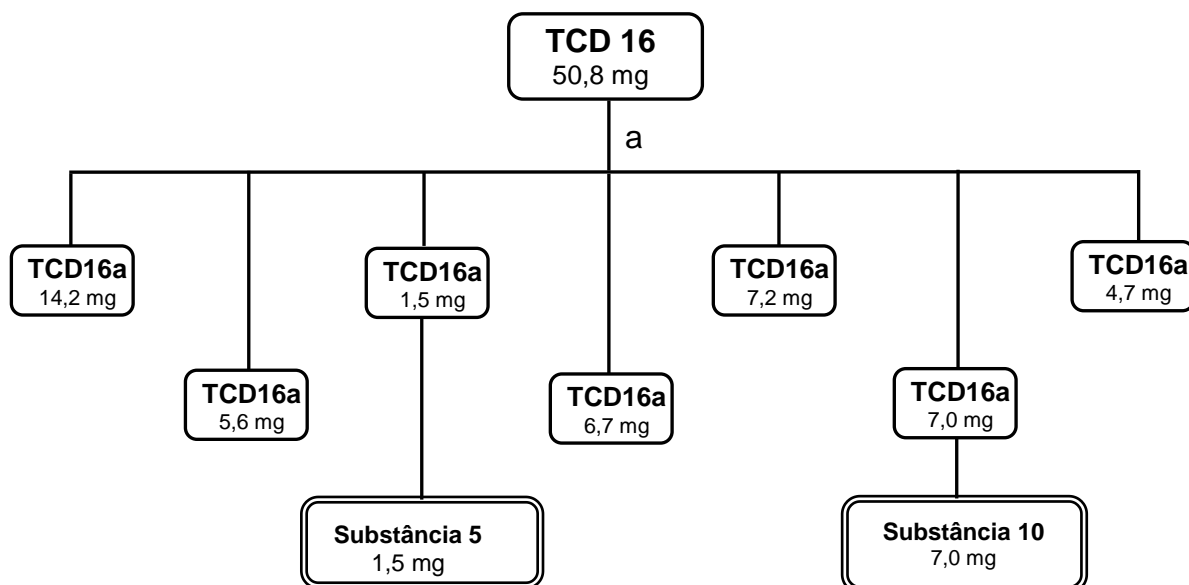
- coluna de vidro ($\varphi \times h = 1,5 \times 20,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)
- eluição isocrática: Hex: CH_2Cl_2 : AcOEt (5:3:2)

b: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo:

- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 10 μm
- eluição isocrática: MeOH: CH_2Cl_2 1:1
- fluxo: 4 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

3.6.1.7 - Estudo da fração TCD16

A fração **TCJ16** foi submetida a cromatografia por adsorção e desta foram obtidas 38 frações. Estas foram reunidas, de acordo com as semelhanças apresentadas nas análises por CCDC e/ou RMN ¹H, em 7 frações. Sendo a fração 3 (**TCJ16c**) composta pela cumarina **5** e a fração 6 (**TCD16f**) composta pelo composto fenólico **10**.



Fluxograma 3.7: Fracionamento de TCD 16.

a: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,0 \times 30,0$ cm)

- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)

- eluição gradiente: Hex 100%, Hex: CH₂Cl₂ (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂:Acetona (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), Acetona 100%, MeOH 100%

3.6.2 - Estudo do extrato metanólico do caule de *Trichilia elegans* (TCM)

O extrato metanólico do caule de *Trichilia elegans* (TCM) foi fracionado utilizando a cromatografia líquido-líquido, *High-speed counter-current chromatography* (HSCCC).

Os sistemas de solventes testados foram baseados na consulta de lista de solventes encontrados na literatura (CHEN *et al.*, 2009) ou baseados em experiências do nosso grupo de pesquisa. Foram testados dez sistemas de solventes sendo descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Sistemas de solventes testados e suas proporções.

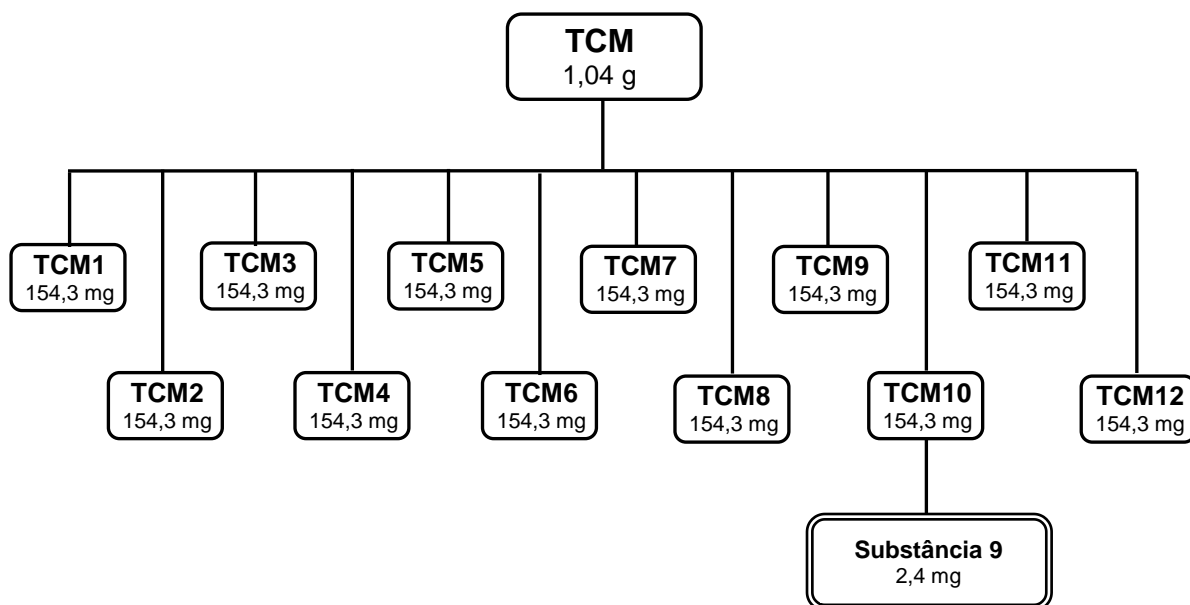
Sistemas de solventes	Proporções (v/v)	Referências
CHCl ₃ / MeOH/H ₂ O	5:4:3	
CH ₂ Cl ₂ / MeOH/H ₂ O	4:5:3	
Hex/ ACN /MeOH	8:5:2	
Hex/EtOH/H ₂ O	6:5:5	
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:8:1:1	
Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	1:1:1:1	
Hex/AcOEt/MeOH/H ₂ O	3:7:5:5	CHEN <i>et al.</i> , 2009
Hex/EtOH/ACN/H ₂ O	10:7:10:8	
Hex/EtOH/ACN/H ₂ O	10:10:9:11	
Hex/ CHCl ₃ / MeOH/H ₂ O	3:6:3:2	

Os sistemas foram testados colocando-se as misturas de solventes em tubos de ensaios e agitando em agitador tipo Vortex, para observar a formação ou não de emulsão. Aos sistemas que obtiveram formação de duas fases, solubilizaram-se cerca de 10,0 mg de extrato bruto para cada 4,0 mL de sistema de solvente [2,0 mL da FO (fase orgânica) e 2,0 mL da FA (fase aquosa)]. Em seguida, separou-se a FO da fase FA e desenvolveu-se com ambas as fases, cromatografia em camada delgada analítica, eluída no sistema adequado, que neste caso foi Hex/AcOEt (6:4).

O extrato **TCM** (1,0 g) foi filtrado e dissolvido em 5,0 mL do sistema de solvente Hex/AcOEt/MeOH/H₂O 1:1:1:1 (v/v), o melhor testado. Utilizou-se a fase orgânica (fase superior) como fase móvel e a fase aquosa (inferior) como fase estacionária. O modo de aplicação foi cauda - cabeça. Inicialmente a coluna foi preenchida com a fase estacionária e em seguida, o equipamento foi submetido à rotação de 800 rpm, enquanto a fase móvel foi bombeada para a coluna a um fluxo de 3,0 mL/min. Utilizou-se o aparelho CCC Quik Prep/Lab Prep MK 5 com quatro colunas.

Foram coletadas alíquotas de 20,0 mL totalizando 77 frações. Todas as frações obtidas foram analisadas por cromatografias em camada delgada analítica

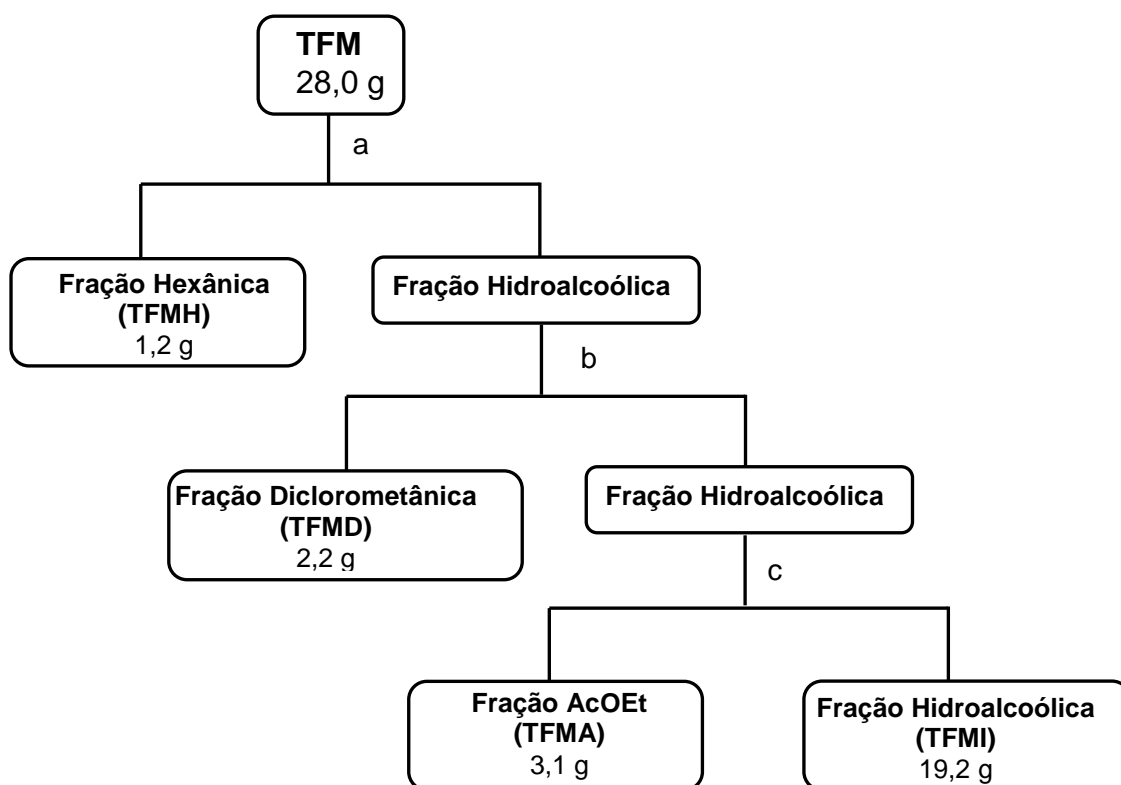
(CCDA) e/ou RMN ^1H . Posteriormente foi feita a reunião das frações semelhantes. O estudo dessas frações levou o isolamento da substância **9**. O Fluxograma 3.8 mostra resumidamente este estudo.



Fluxograma 3.8: Esquema da junção das frações obtidas em HSCCC para o extrato TCM.

3.6.3 - Estudo do extrato metanólico da folha de *Trichilia elegans* (TFM)

Os extratos **TFM** (28,0 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando como fase hidroalcoólica, MeOH:H₂O (1:3). Em um funil de separação adicionou-se o extrato solubilizado em 100 mL de metanol e 300 mL de água. Em seguida as extrações foram feitas com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila) conforme mostra o Fluxograma 3.9.

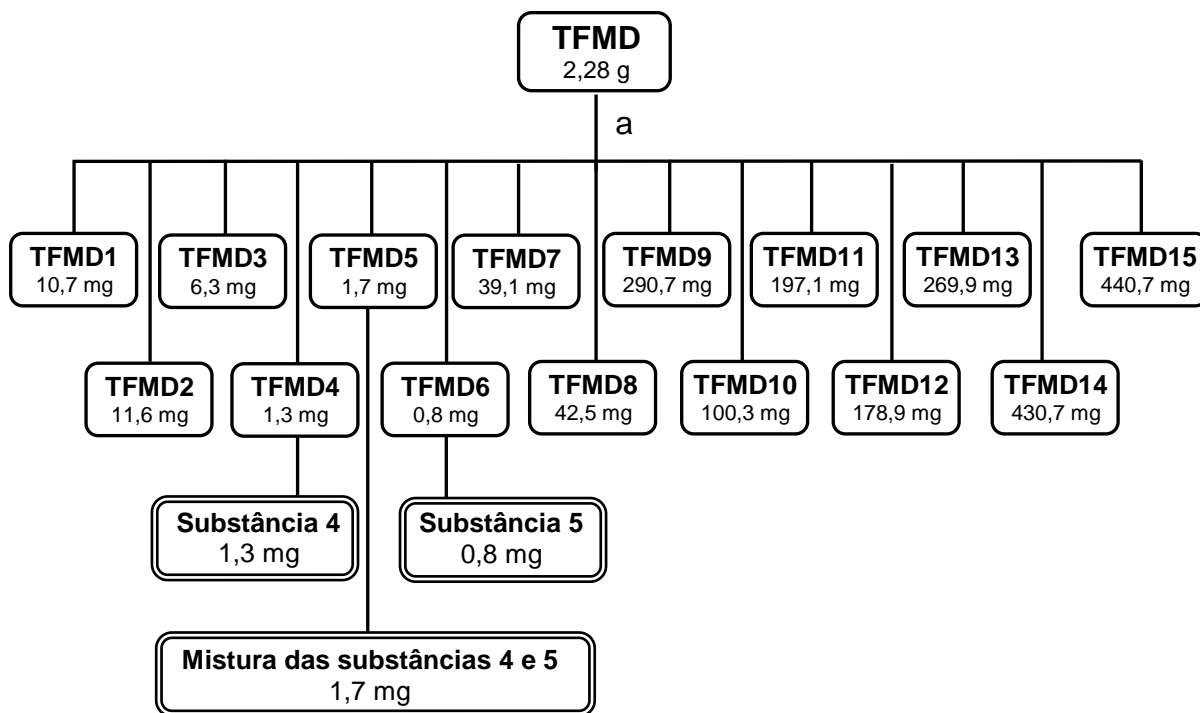


Fluxograma 3.9: Partição líquido-líquido extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans* (TFM).

- (a) Extração com hexano (cinco extrações de 200 mL cada).
 (b) Extração com diclorometano (cinco extrações de 200 mL cada).
 (c) Extração com acetato de etila (cinco extrações de 200 mL cada).

3.6.3.1 - Estudo do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans* partição diclorometânica (TFMD)

A fração diclorometânica obtida do particionamento do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans* (TFMD) foi fracionada por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica do tipo “flash” (230-400 mesh) e como fase móvel um sistema gradiente de eluição como demonstrado resumidamente no Fluxograma 3.11. Obteve-se 41 frações (10 mL) as quais de acordo com as semelhanças apresentadas nas análises por CCDC e/ou RMN ¹H foram reunidas em 15 frações. Das frações 4 e 6 foram isoladas as cumarinas **4** e **5** respectivamente.



Fluxograma 3.10: Fracionamento de TFMD.

a: cromatografia por adsorção:

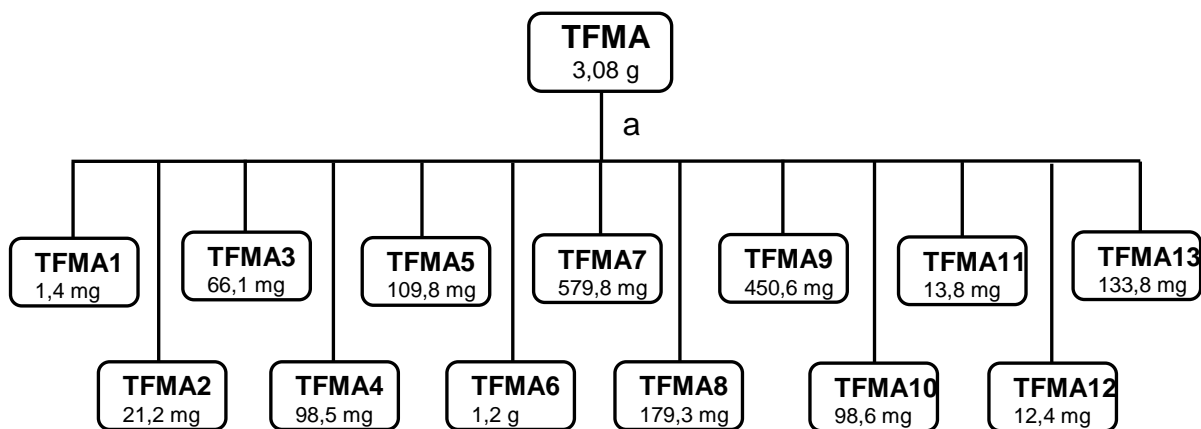
- coluna de vidro ($\varphi \times h = 4,0 \times 26,0$ cm)

- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)

- gradiente de eluição: Hex 100%, Hex: CH_2Cl_2 (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), CH_2Cl_2 100%, CH_2Cl_2 : Acetona (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), Acetona 100%, MeOH 100%

3.6.3.2 - Estudo do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans* partição acetato de etila (TFMA)

A fração de acetato de etila obtida do particionamento do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans* (TFMA) foi estudada utilizando diversas técnicas cromatográficas. Obteveram-se 22 frações as quais de acordo com as semelhanças apresentadas nas análises por CCDC e/ou RMN ^1H foram reunidas em 13 frações. O fracionamento levou ao isolamento das substâncias 11- 20. Os Fluxogramas 3.11 - 3.15 mostram de forma resumida como este estudo foi realizado.



Fluxograma 3.11: Fracionamento da partição TFMA.

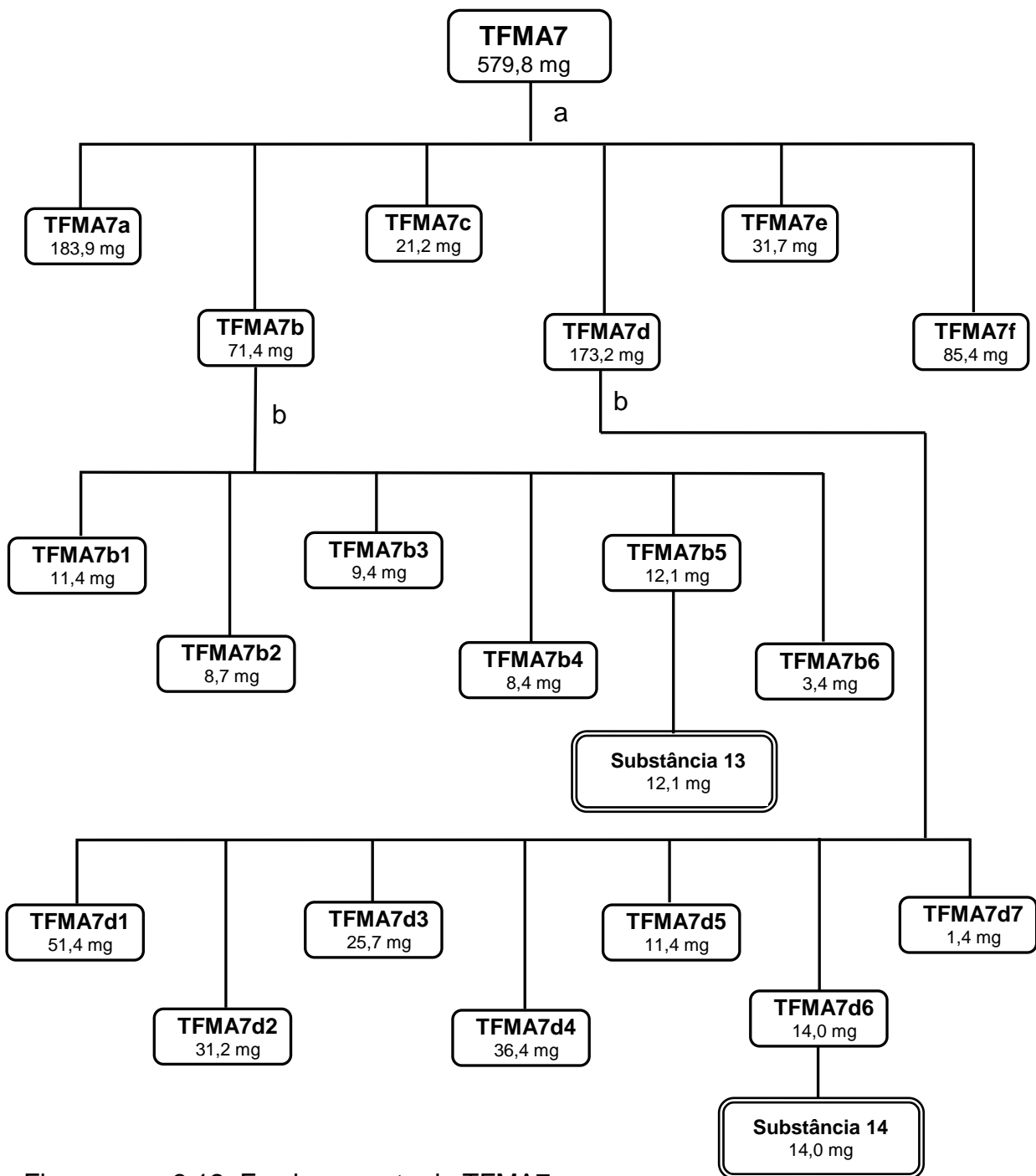
a: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 4,0 \times 77,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH 100%

3.6.3.2.1 - Estudo da fração TFMA7

A fração **TFMA7** foi submetida a cromatografia por exclusão e foram obtidas 6 frações. As frações 2 e 4 foram fracionada utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência e fase reversa (C18). Destas frações foram isoladas as substâncias **13** e **14**.

O Fluxograma 3.13 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



Fluxograma 3.12: Fracionamento de TFMA7.

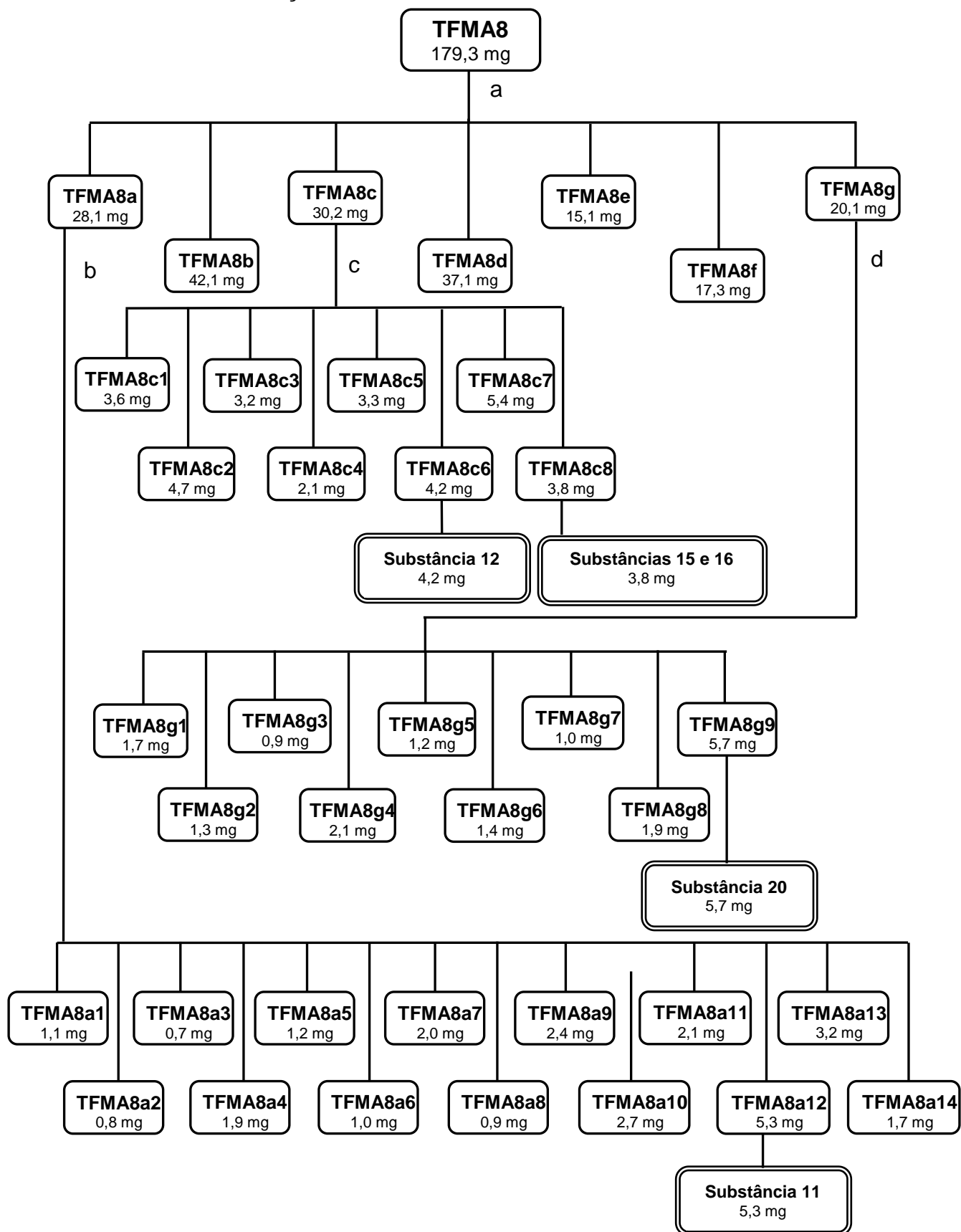
a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo :

- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 10 µm
- eluição isocrática: MeOH 100%
- fluxo: 3 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

b: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- coluna C18 Phenomenex-Luna 10 µm (φ x h = 1,0 x 29,0 cm)
- eluição isocrática: MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético
- fluxo: 3,0 mL/min
- detector UV 217, 254 nm

3.6.3.2.2 - Estudo da fração TFMA8



Fluxograma 3.13: Fracionamento de TFMA8.

a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo:

- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 5µm
- eluição isocrática: MeOH 100%
- fluxo: 4 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

b: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 1,7 \times 11,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)
- gradiente isocrática: AcOEt:Acetona (2:3)

c: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 3.1)

- coluna C18 Phenomenex-Luna 10 µm ($\varphi \times h = 1,0 \times 29,0$ cm)
- eluição isocrática: MeOH:H₂O (2:8) com 0,1% de ácido acético
- fluxo: 3,0 mL/min
- detector UV 330, 254 nm

d: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 3.2)

- coluna C18 Phenomenex-Luna 10 µm ($\varphi \times h = 1,0 \times 29,0$ cm)
- eluição isocrática: MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético
- fluxo: 3,0 mL/min
- detector UV 330, 254 nm

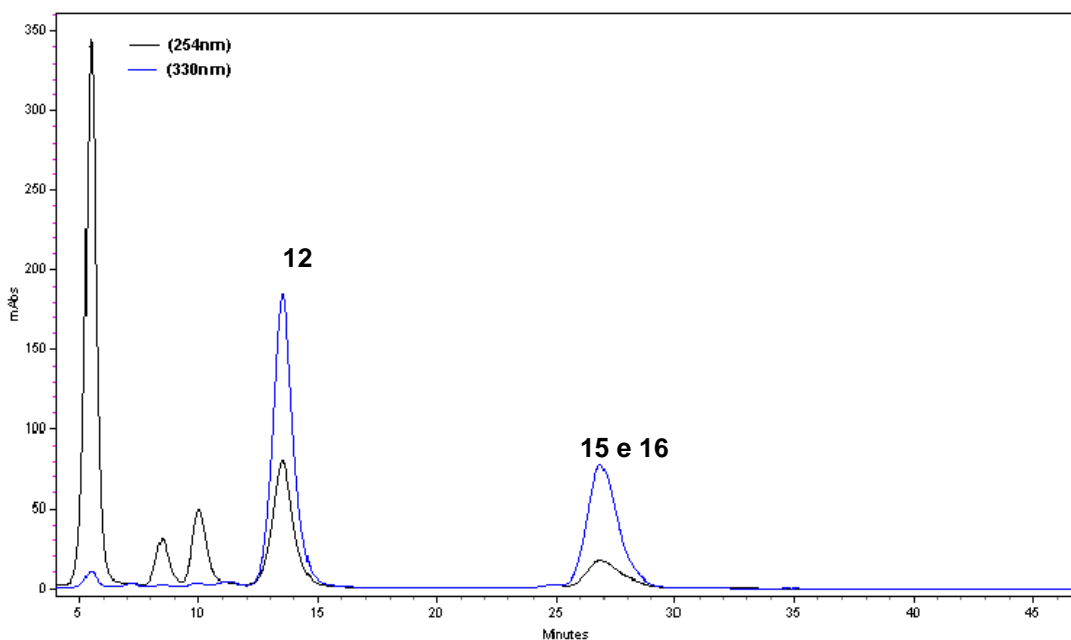


Figura 3.1: Cromatograma da fração TFMA8c modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex®-Luna (150 x 4,6 mm, 5 µm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 µm), fase móvel MeOH:H₂O (2:8) com 0,1% de ácido acético; vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 254 e 310 nm.

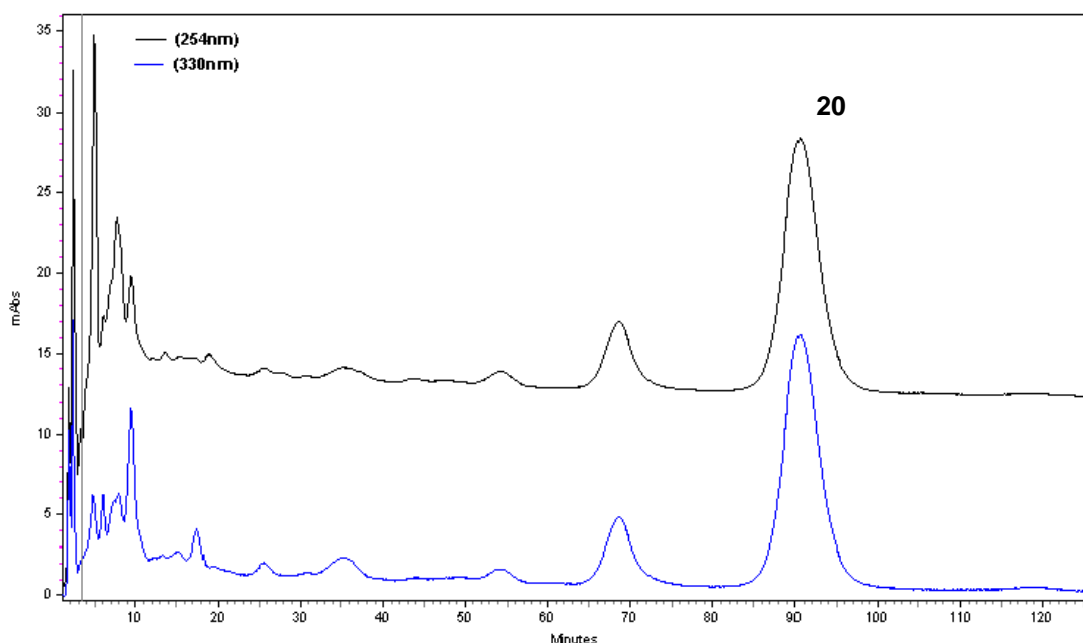
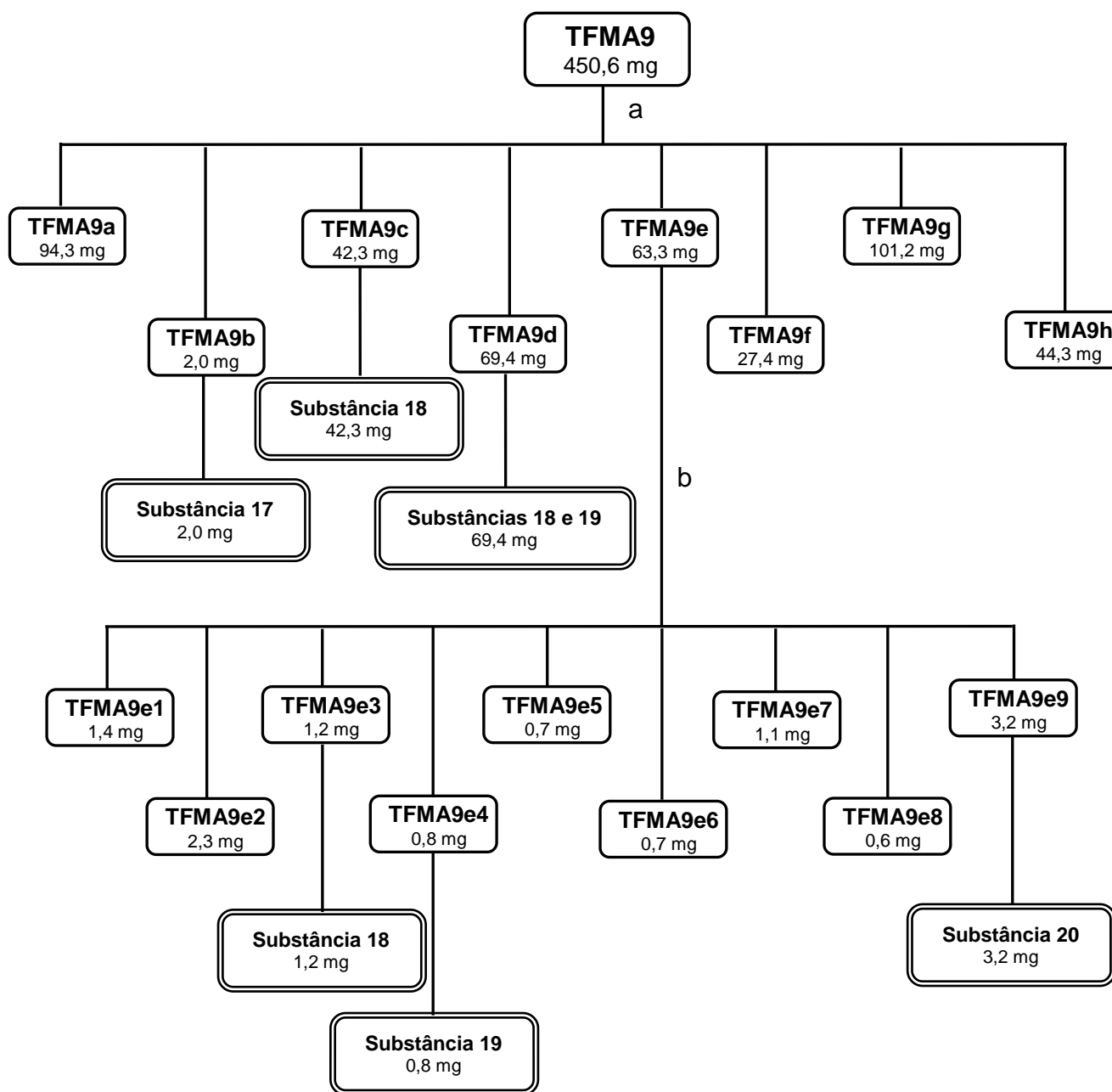


Figura 3.2: Cromatograma da fração TFMA8g modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex®-Luna (150 x 4,6 mm, 5 µm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 µm), fase móvel MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético; vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 254 e 310 nm.

3.6.3.2.3 - Estudo da fração TFMA9



Fluxograma 3.14: Fracionamento de TFMA9.

a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com reciclo:
- coluna polimérica Shodex Asahipak GS-310 2Ga, 400 x 25 mm, 5µm
- eluição isocrática: MeOH 100%
- fluxo: 4 mL/min
- detector UV 254, 217 nm

b: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 3.3)
- coluna C18 Phenomenex-Luna 10µm (φ x h = 1,0 x 29,0 cm)
- eluição isocrática: MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético
- fluxo: 3,0 mL/min
- detector UV 330, 254 nm

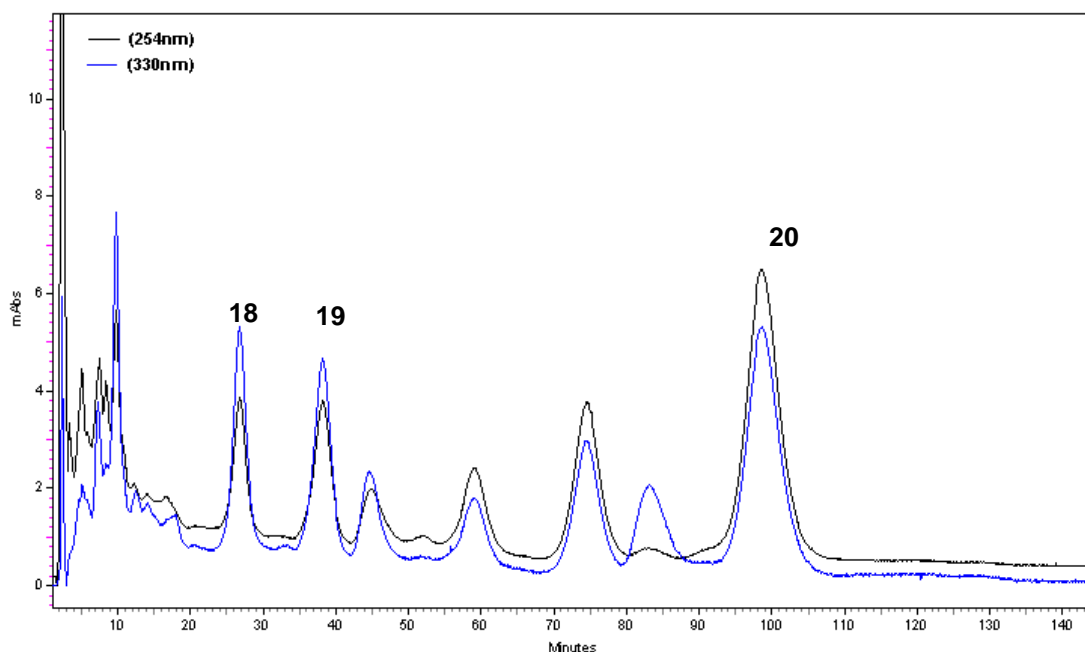
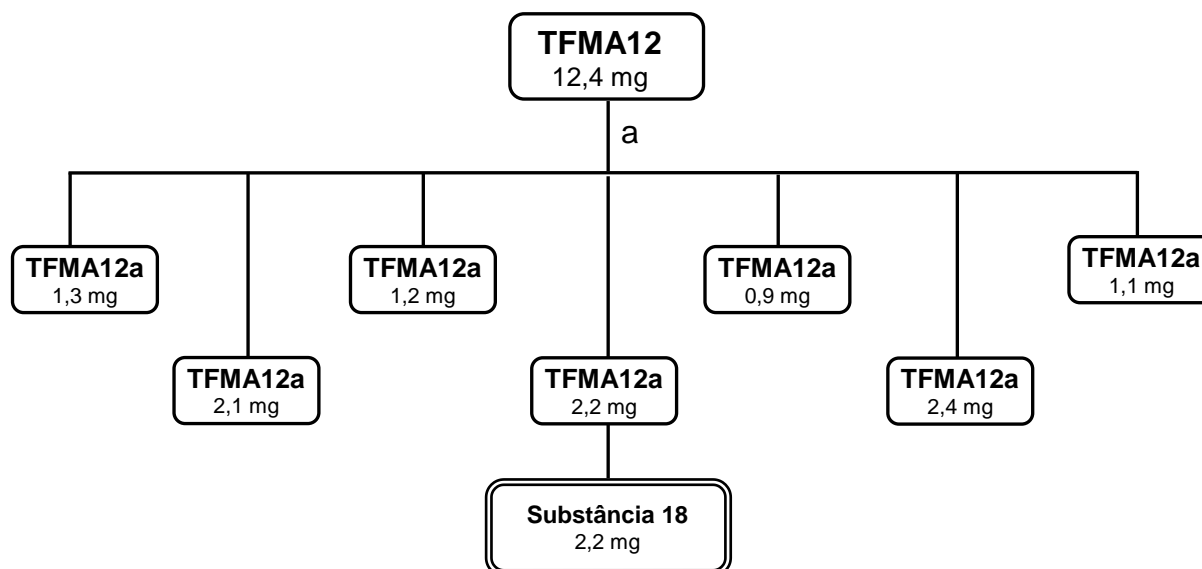


Figura 3.3: Cromatograma da fração TFMA9e modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex-Luna (150 x 4,6mm, 5 μ m) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 μ m), fase móvel MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético; vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 254 e 310 nm.

3.6.3.2.4 - Estudo da fração TFMA12



Fluxograma 3.15: Fracionamento de TFMA12.

- a: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)(Figura 3.4)
- coluna C18 Phenomenex-Luna 10 μ m (φ x h = 1,0 x 29,0 cm)
 - eluição isocrática: MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético
 - fluxo: 3,0 mL/min
 - detector UV 254 nm

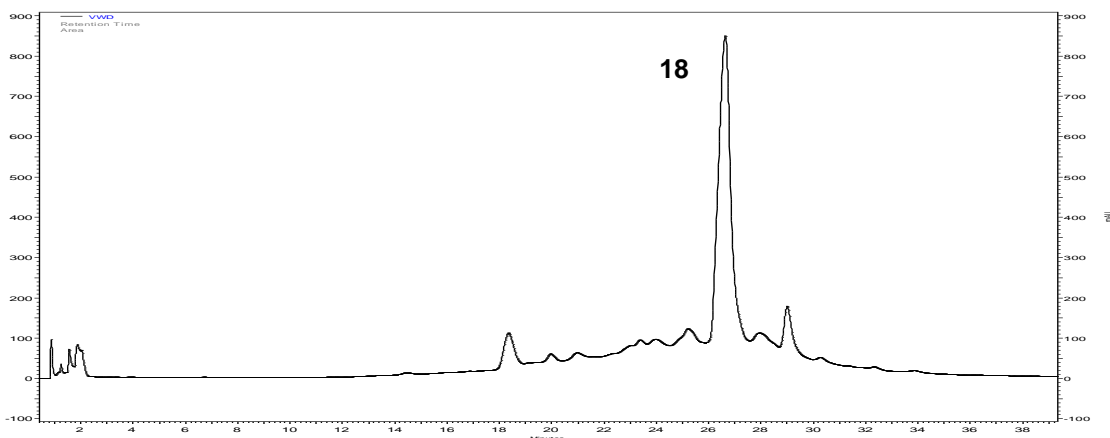
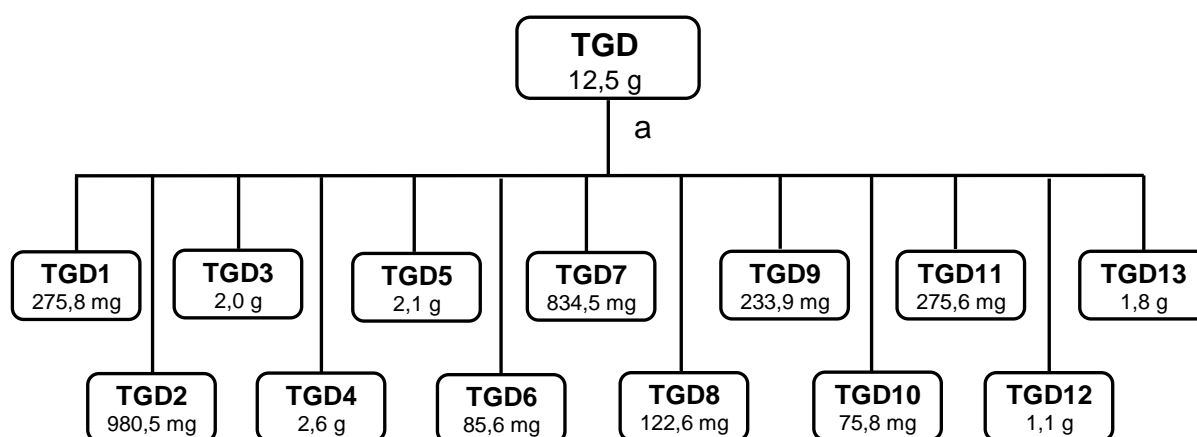


Figura 3.4: Cromatograma da fração TFMA12 modo analítico. Equipamento Cromatográfico: Shimadzu, coluna C18 Phenomenex-Luna (150 x 4,6mm, 5µm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 µm), fase móvel MeOH:H₂O (3:7) com 0,1% de ácido acético; vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 254 e 310 nm.

3.6.4 - Estudo do extrato diclorometânico do galho de *Trichilia elegans* (TGD)

O extrato diclorometânico do galho de *Trichilia elegans* (TGD) foi fracionado por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica do tipo “flash” (230-400 mesh) e como fase móvel um sistema gradiente de eluição como demonstrado resumidamente no Fluxograma 3.16. Obteve-se 36 frações de 150 mL, as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC foram reunidas em 13 frações.



Fluxograma 3.16: Fracionamento de TGD.

a: cromatografia por adsorção:

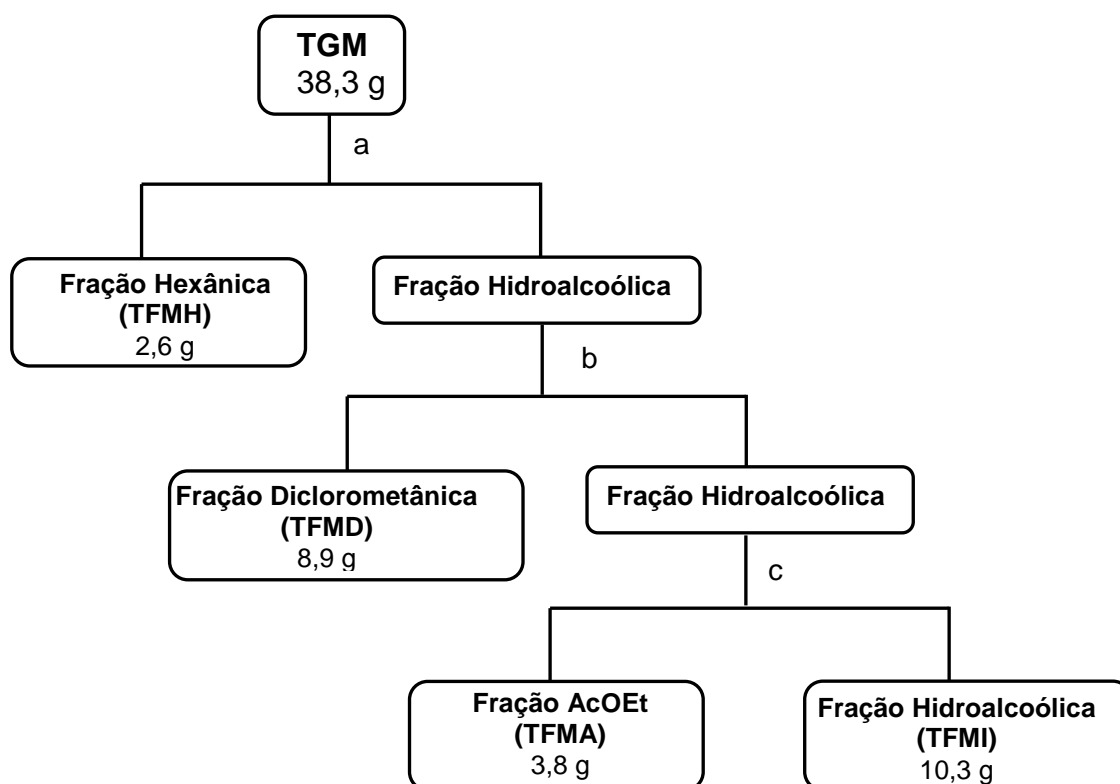
- coluna de vidro ($\varphi \times h = 5,0 \times 32,0$ cm)

- fase estacionária: sílica comum (70-230 mesh)

- gradiente de eluição: Hex 100%, Hex: CH₂Cl₂ (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂: AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

3.6.5 - Estudo do extrato metanólico do galho de *Trichilia elegans* (TGM)

O extrato **TGM** (38,3 g) foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando como fase hidroalcoólica, MeOH:H₂O (1:3). Em um funil de separação adicionou-se o extrato solubilizado em 200 mL de metanol e 600 mL de água. Em seguida as extrações foram feitas com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila). Ao final de cada extração, as frações obtidas foram concentradas em rotaevaporadores obtendo-se quatro frações, conforme mostra o Fluxograma 3.17.



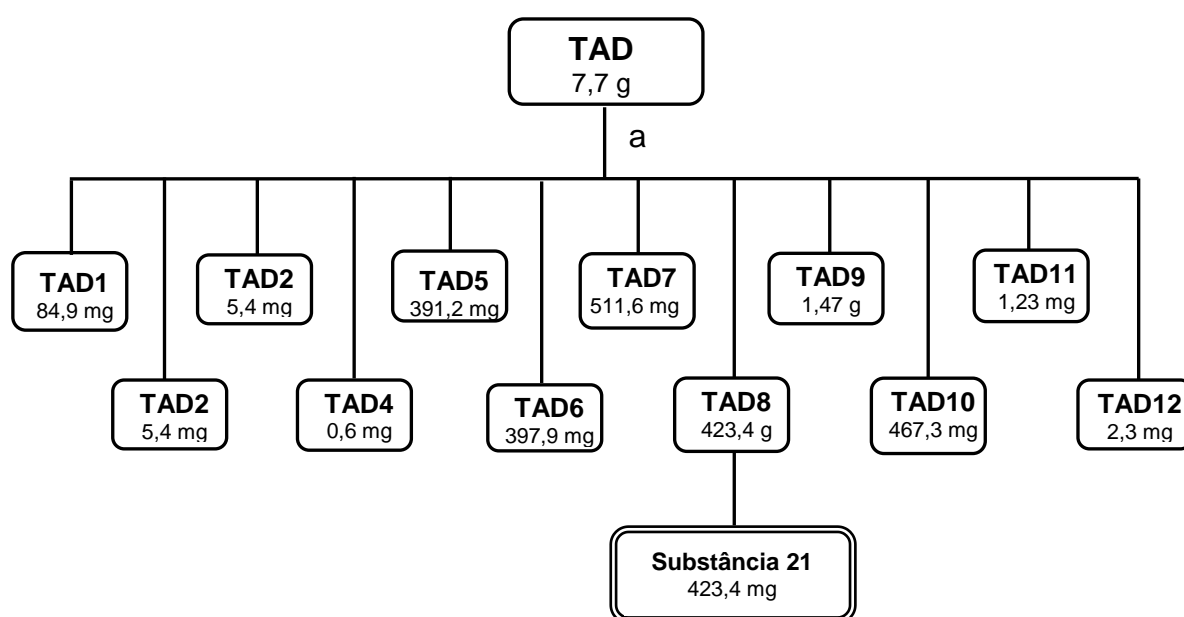
Fluxograma 3.17: Partição líquido-líquido dos extratos metanólico do caule de *Trichilia elegans* (TGM)

- (a) Extração com hexano (cinco extrações de 300 mL cada).
- (b) Extração com diclorometano (cinco extrações de 300 mL cada).
- (c) Extração com acetato de etila (cinco extrações de 300 mL cada).

3.7 - Estudos dos extratos brutos de *Trichilia catigua*.

3.7.1 - Estudos do extrato diclorometano do arilo de *Trichilia catigua*.

O extrato bruto diclorometânico do arilo de *Trichilia catigua* (TAD) foi fracionado utilizando-se sílica gel 230-400 mesh como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade, como mostra resumidamente no Fluxograma 3.18. Foram obtidas 96 frações de 100 mL, as quais, de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC e/ou RMN ¹H, foram reunidas em 12 frações. A fração TAD8 foi recristalizada obtendo-se 323,4 mg do limonóide cedrelona puro.



Fluxograma 3.18: Fracionamento de TAD.

a: cromatografia por adsorção:

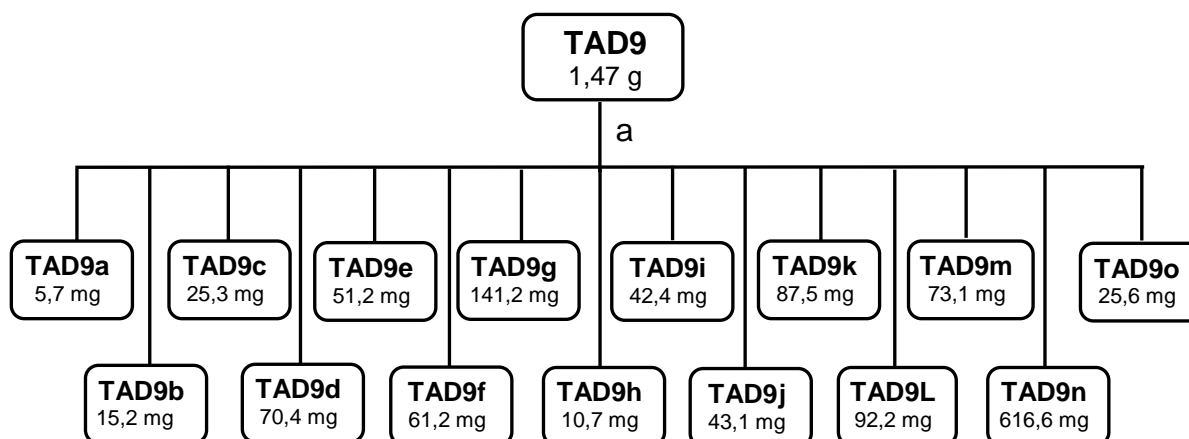
- coluna de vidro ($\phi \times h = 5,0 \times 20,0$ cm)

- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)

- gradiente de eluição: Hex 100%, Hex: CH₂Cl₂ (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂: AcOEt (4:1/ 3:1/ 2:1/ 1:1), AcOEt 100%, MeOH 100%

3.7.1.1 - Estudo da fração TAD9

A fração 9 (**TAD9**) foi submetida à cromatografia por exclusão em coluna de vidro utilizando Sephadex[®] LH-20 como fase estacionária e MeOH:CH₂Cl₂ (1:1) como fase móvel (Fluxograma 3.19).



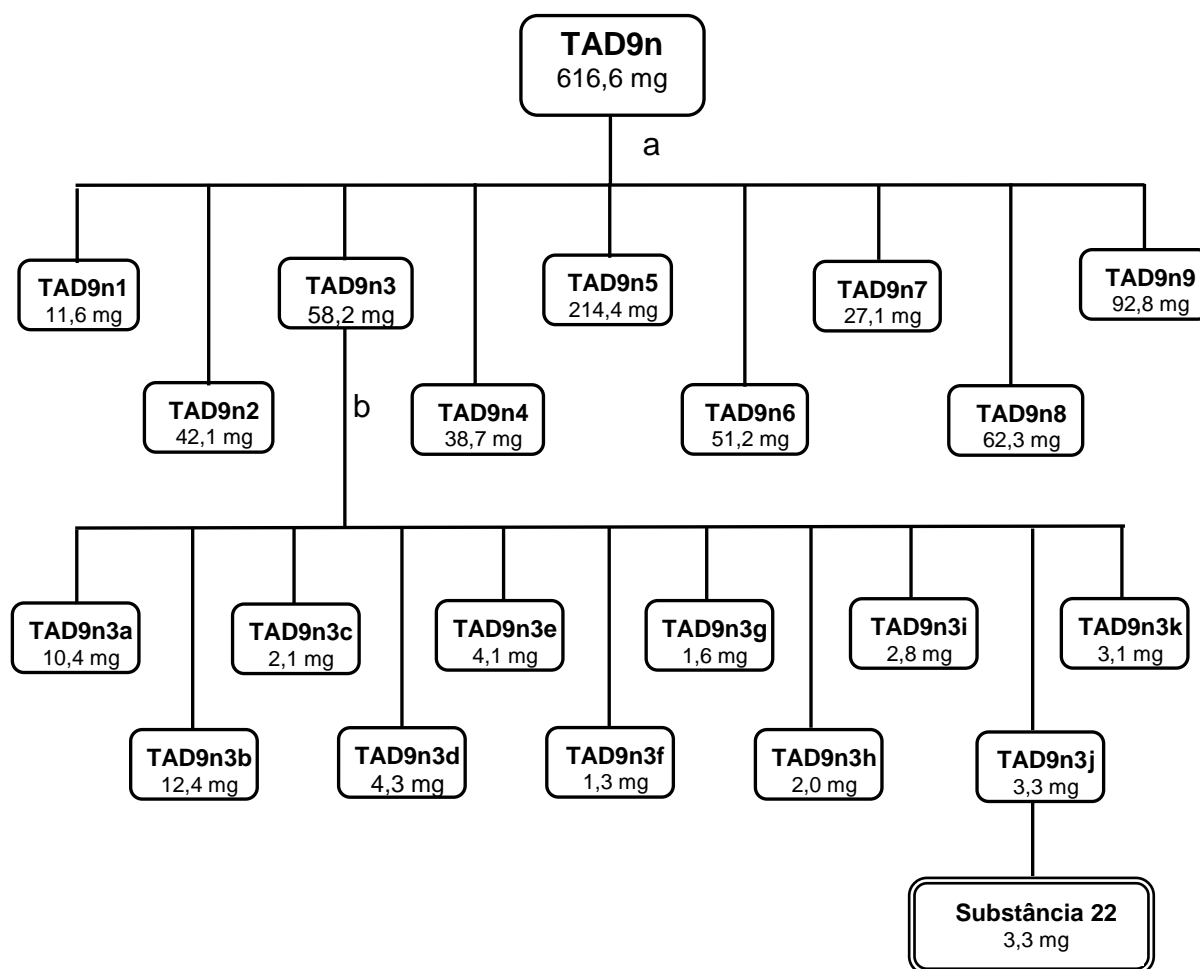
Fluxograma 3.19: Fracionamento de TAD9.

a: cromatografia por exclusão:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 3,0 \times 72,0$ cm)
- fase estacionária: Sephadex LH-20
- eluição isocrática: MeOH:CH₂Cl₂ (1:1)

3.7.1.2 - Estudo da fração TAD9n

A fração **TAD9n** foi estudada utilizando diversas técnicas cromatográficas. Deste estudo foi possível isolar o limonóide 6 α -O-acetil-7-deacetilnimocinol (**22**) relatado pela primeira vez nessa espécie. O Fluxograma 3.20 mostra de forma resumida como este estudo foi realizado.



Fluxograma 3.20: Fracionamento de TAD9n.

a: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 3,0 \times 25,0$ cm)

- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 mesh)

- gradiente de eluição: CH_2Cl_2 : Acetona (4,5:0,5), aumento gradativo até Acetona 100% (62 frações de 20 mL, reunidas após CCDC)

b: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- coluna propildiol ($\varphi \times h = 0,78 \times 30,0$ cm)

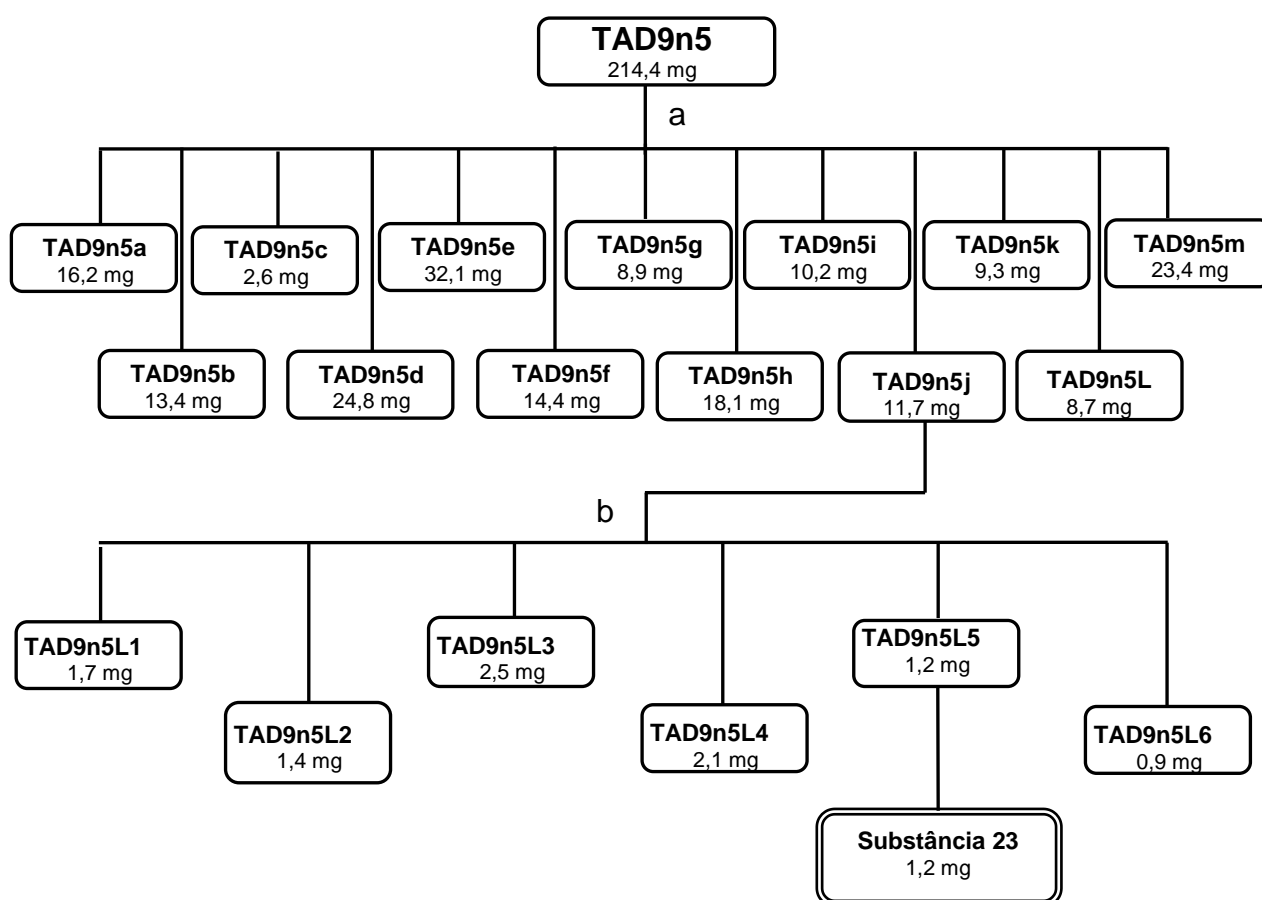
- eluição isocrática: Hex: CH_2Cl_2 (9:1)

- fluxo: 3,5 mL/min

- detector UV 222 nm

3.7.1.2.1- Estudo da fração TAD9n5

A fração **TAD9n5** foi fracionada utilizando-se cromatografia por adsorção em sílica gel (230-400 *mesh*) como fase estacionária e como fase móvel uma mistura de solventes em ordem crescente de polaridade (CH_2Cl_2 - acetona), obtendo-se 77 frações de 3 mL, que foram reunidas em 13 frações de acordo com as semelhanças apresentadas na análise por CCDC. A fração **TAD9n5j** foi então submetido a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se coluna propildiol e eluição isocrática Hex: CH_2Cl_2 (9:1) (Fluxograma 3.21). Deste estudo foi possível isolar o limonóide (**23**) inédito na literatura.



Fluxograma 3.21: Fracionamento de TAD9n5.

a: cromatografia por adsorção:

- coluna de vidro ($\varphi \times h = 2,3 \times 30,0$ cm)
- fase estacionária: sílica do tipo "flash" (230-400 *mesh*)
- gradiente de eluição: CH_2Cl_2 100% - CH_2Cl_2 /Acetona - Acetona 100% (77 frações de 3 mL, reunidas após CCDC)

b: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

- coluna propildiol ($\varphi \times h = 0,78 \times 30,0$ cm)
- eluição isocrática: Hex: CH_2Cl_2 (9:1)
- fluxo: 3,5 mL/min
- detector UV 222 nm

3.8 – Preparo dos extratos e Isolamento das substâncias encapsuladas: ricinina, xantiletina e rauianina

3.8.1 - Obtenção dos extratos bruto das folhas de *Ricinus communis* L.

As folhas de *Ricinus communis* L. foram coletadas no Jardim Experimental do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro.

As folhas foram secas em estufas de circulação de ar por 3 dias a 40 °C e moídas em moinho do tipo Willey. O pulverizado (956,0 g) foi extraído à temperatura ambiente e em repouso com etanol, durante 72 horas por três vezes. Após este tempo os extratos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador, obteve-se o extrato bruto (50,4 g). O extrato obtido foi analisado via RMN ¹H e através de placas de cromatografia.

3.8.2 - Obtenção dos extratos bruto das raízes de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia*

As raízes de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia* foram coletadas na Estação Experimental de Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas, cuja fazenda experimental encontra-se em Cordeirópolis-SP.

As raízes da planta foram secas em estufa de circulação de ar por 5 dias a 40 °C e em seguida foram moídas em moinho tipo Willey. O pulverizado (467,0 g) foi extraído à temperatura ambiente e em repouso com solventes orgânicos (3,0 L de cada) em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e metanol, durante 216 horas, sendo substituído a cada 72 horas. Em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos brutos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4: Extratos brutos das raízes de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia*

<i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i>	Extrato	Massa (g)
Raiz (467,0 g)	Hexânico	5,73
	Diclorometânico	7,60
	Metanólico	17,64

Os extratos obtidos foram analisados via RMN ¹H e através de placas de cromatografia.

3.8.3 - Obtenção dos extratos brutos do caule de *Rauia resinosa*

O caule de *Rauia resinosa* foi coletado em Linhares (Espírito Santo), na Estrada Rio Bananal – Fazenda Santo Antonio – e devidamente identificada por Kallunki *et al.* (número de herbário 693).

O caule foi secado em estufa de circulação de ar por 3 dias a 40 °C e moídas em moinho do tipo Willey. O material seco e moído foi submetido a três extrações consecutivas com um intervalo de três dias entre cada uma delas utilizando-se os solventes (5,0 L de cada) hexano, diclorometano, metanol, (nesta ordem de polaridade. Após este tempo os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo (Tabela 3.5).

Tabela 3.5: Extratos brutos do caule de *Rauia resinosa*.

<i>Citrus sinensis</i> sobre <i>Citrus limonia</i>	Extrato	Massa (g)
Caule (1,15 Kg)	Hexânico	2,71
	Diclorometânico	13,07
	Metanólico	50,39

3.9 - Isolamento de ricinina, xantiletina e rauianina por HSCCC

Existem diversos tipos de cromatografias em contracorrente, dentre as mais conhecidas estão a Cromatografia Contracorrente de Gotículas (DCCC); Cromatografia Contracorrente de Rotação Locular (RLCC); Cromatografia Contracorrente Centrífuga de Partição (CPC), Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC).

A técnica de cromatografia contracorrente mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a cromatografia contracorrente de alta velocidade ("HSCCC: high-speed counter-current chromatography", Figura 3.5).

Os extratos etanólico das folhas de *Ricinus communis*, diclorometânico das raízes enxerto de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia* e diclorometânico do caule de *Rauia resinosa* foram submetidos ao fracionamento utilizando ao HSCCC.

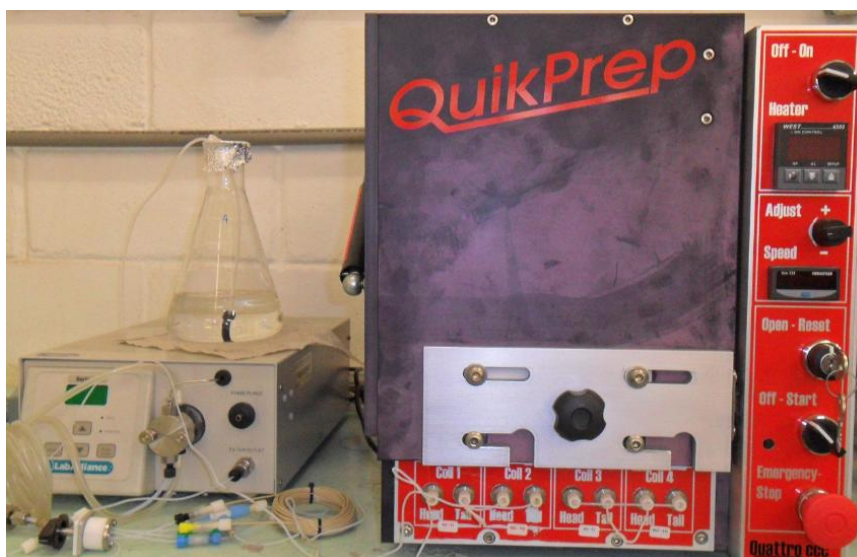


Figura 3.5: High-speed counter-current chromatography (HSCCC).

A instrumentação da HSCCC é composta por uma bobina de tubo de teflon enrolado de forma espiral, que realiza um movimento planetário em torno de um eixo central. Nesta técnica, a fase estacionária é mantida no equipamento através da força centrífuga e a fase móvel é bombeada em alta velocidade permitindo, assim, menor tempo de análise (ITO & CONWAY, 1995, ITO, 2005, LEITE *et al.*, 2005).

O sucesso do fracionamento por HSCCC depende da escolha correta do sistema de solvente. Os sistemas de solventes testados foram baseados na consulta de lista de solventes para classes específicas de produtos naturais encontrados na literatura. Para a determinação do coeficiente de partição foi utilizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi adicionado cerca de 1,5 mg de extrato em um tubo de ensaio que continha 2 mL de cada fase pré-equilibradas. O tubo de ensaio foi agitado vigorosamente durante 5 min em vortex. Então a mistura foi separada por centrifugação a $4000 \times g$ durante 15 min. Após a centrifugação, uma alíquota de 200 μL de cada fase foi seca no speed-vac e ressuspendidas. As fases superiores e inferiores foram analisadas por CLAE para determinar o coeficiente de partição (k). O valor k foi expresso com a concentração da substância analisada na fase inferior dividido pela concentração desta na fase superior.

O aparelho utilizado foi o CCC Quik Prep/Lab Prep MK 5 com quatro colunas. Inicialmente a coluna foi preenchida com a fase estacionária e em seguida,

o equipamento foi submetido à rotação de 800 rpm, enquanto a fase móvel foi bombeada para a coluna a um fluxo de 3,0 mL/min.

Todas as frações obtidas foram analisadas por cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) e/ou RMN ¹H. Posteriormente as frações semelhantes foram agrupadas.

3.9.1- Isolamento de ricinina

O HSCCC foi utilizado para o isolamento de ricinina a partir do extrato etanólico das folhas de *Ricinus communis*. Foram testados diferentes misturas de solventes para fase móvel, Hex/EtOH/ACN/H₂O (10:8:1:1, v/v), AcOEt/EtOH/H₂O (2:1:2, v/v), Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (3:7:5:5, v/v), Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (1:1:1:1, v/v), MeOH/CH₂Cl₂/H₂O (5:4:3, v/v), CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (7:13:9, v/v), CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (93:35:72, v/v), CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (93:35:72, v/v), Hex/EtOH/H₂O (6:5:5, v/v) (CAZAL *et al.* 2009a).

3.9.2- Isolamento de xantiletina

O HSCCC foi utilizado para o isolamento de xantiletina do extrato diclorometânico das raízes enxerto de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia*. Foram testados diferentes misturas de solventes para fase móvel, CHCl₃/MeOH/H₂O (5:4:3, v/v), CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (4:5:3, v/v), Hex/ACN/ MeOH (8:5:2, v/v), Hex/EtOH/H₂O (6:5:5, v/v), Hex/EtOH/ACN/H₂O (10:8:1:1, v/v), Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (1:1:1:1, v/v), Hex/AcOEt/MeOH/H₂O (3:7:5:5, v/v), Hex/EtOH/MeOH/H₂O (10:7:10:8, v/v), Hex/EtOH/MeOH/H₂O (10:10:9:11, v/v), Hex/MeOH/H₂O (6:5:5, v/v), Hex/CHCl₃/MeOH/H₂O (3:6:3:2, v/v) (CAZAL *et al.* 2009b).

3.9.3- Isolamento de rauianina

O HSCCC foi utilizado para o isolamento de rauianina do extrato diclorometânico do caule de *Rauia resinosa*. Foram testados 39 sistemas de solventes descritos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Sistemas de solventes testados e suas proporções.

Sistemas de solvente	Proporções (v/v)	Referências
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:8:1:1	
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:8:2:1	
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:8:3:1	
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:8:4:1	
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:8:5:1	
Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O	10:5:5:1	
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	4:6:4:6	
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	5:5:5:5	
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	4:5:4:5	YAN <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	2:5:2:5	YAN <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	5:5:6:4	WEI <i>et al.</i> , 2004
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	3:7:5:5	CHEN <i>et al.</i> , 2009
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	6:4:5:5	YAN <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:1:0,85:1,5	MA <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:1:0,60:1,4	MA <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:1:0,52:1,47	MA <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:1:0,45:1,55	MA <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:1:0,3:1,70	MA <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	0,6:4:0,05:1	
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	0,6:4:0,7:1	
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:0,9:1:0,9	PENG <i>et al.</i> , 2005
Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O	1:5:1:5	
AcOEt /H ₂ O	5:5	LIU <i>et al.</i> , 2005
Hex/MeOH/H ₂ O	5:5:5	LIU <i>et al.</i> , 2004
Hex/MeOH/H ₂ O	5:7:3	LIU <i>et al.</i> , 2004
Hex /MeOH /H ₂ O	35:30:3	
Hex/AcOEt/H ₂ O	1:5:6	YAN <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/H ₂ O	5:5:10	YAN <i>et al.</i> , 2006
Hex/AcOEt/EtOH/H ₂ O	5:5:4:6	LI & CHEN, 2005
AcOEt/MeOH/H ₂ O	8:3:8	MA <i>et al.</i> , 2006
AcOEt/EtOH/H ₂ O	50:1:50	YAN <i>et al.</i> , 2006
AcOEt/EtOH/H ₂ O	2:1:2	
AcOEt/EtOH/H ₂ O	10:1:10	YAN <i>et al.</i> , 2006
CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O	5:4:3	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O	7:13:9	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O	8:13:7	
CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O	93:35:72	LEITE <i>et al.</i> , 2005
CH ₂ Cl ₂ /EtOH /H ₂ O	93:35:72	CAZAL <i>et al.</i> , 2009
Hex /EtOH /H ₂ O	6:5:5	

Foram injetadas 2,0 gramas de extrato solubilizadas em 5 mL da mistura do solvente utilizada. As 4 colunas foram inicialmente preenchidas com a fase estacionária (fase hidroalcoólica, fase inferior), sendo o modo de aplicação cauda - cabeça. Em seguida, o equipamento foi submetido à rotação (800 rpm), enquanto a fase móvel (fase orgânica) foi bombeada à um fluxo de 3,0 mL/min.

Foram coletadas alíquotas de 10 mL totalizando 71 frações. Todas as frações obtidas foram analisadas por cromatografias em camada delgada analítica (CCDA) e/ou RMN ¹H. Posteriormente as frações semelhantes foram agrupadas.

3.10- Análise cromatográfica de ricinina, xantiletina e rauianina

A ricinina, xantiletina e rauianina foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência após desenvolvimento e validação do método cromatográfico.

Após diversos experimentos de ajustes a melhor seletividade e sensibilidade foram alcançadas utilizando coluna analítica Luna fenil hexil, (250 x 4,60 nm, 5µm) acoplada a uma coluna de segurança C18 (Phemonemex® - 4x3 mm) e as condições descritas na Tabela 3.7 de acordo com cada substância.

Tabela 3.7: Condições para análise cromatográfica de ricinina, xantiletina e rauianina

Substância	Fase móvel	Vazão mL.min ⁻¹	Volume de injeção (µL)	Comprimento de onda (nm)
Ricinina	ACN : CH ₃ COOH 0,1% (45:55 v/v)	0,8	10	310
Xantiletina	ACN : H ₂ O (6:4 v/v)	1,0	20	263
Rauianina	ACN : H ₂ O (6:4 v/v)	1,0	20	297

3.10.1- Validação o do método analítico para quantificação de ricinina, xantiletina e rauianina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

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

3.10.1.1- Preparo das soluções padrões para construção da Curva analítica

As faixas lineares de trabalho foram estabelecidas entre 0,15 e 8,0 µg/mL. As soluções estoque (1.000 µg/mL) foram preparadas diluindo-se 2 mg de cada padrão (ricinina, xantiletina ou rauianina) em 2 mL de acetonitrila. A partir da solução estoque foram preparadas as soluções de trabalho, diluindo 1 mL de cada solução para um volume total de 100 mL, obtendo-se uma solução de concentração de 10 µg/mL. Desta solução foram preparadas oito soluções nas concentrações 0,15; 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 8 µg/mL. Todos os pontos da curva de calibração foram preparadas e analisadas em triplicata.

3.10.1.2- Preparo das soluções padrões para determinação da exatidão e precisão do método

Para a determinação da exatidão e precisão do método analítico foram preparados soluções em três diferentes concentrações abrangendo toda a faixa linear de trabalho. O primeiro ponto representou 120% (0,18 µg/mL, para xantiletina e rauianina e 0,36 µg/mL para a ricinina) da menor concentração da curva analítica. O segundo e o terceiro foram localizados entre 40 e 60% (4,5 µg/mL) e 90 e 100% (7,5 µg/mL) respectivamente para a concentração do último ponto da curva analítica. Estes valores foram selecionados por possuírem concentrações dentro da faixa linear utilizada, porém em concentrações diferentes das utilizadas nas curvas de calibração. Para determinação da precisão e exatidão, cada ponto foi preparado em quintuplicata e analisados por três dias não consecutivos.

3.10.1.3- Limites de Detecção e quantificação do método analítico

A sensibilidade do método foi definida pelos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os limites foram calculados através dos parâmetros da curva analítica por padronização externa.

O LD foi expresso como $LD = 3,3 \cdot (s/a)$

O LQ foi expresso como $LQ = 10 \cdot (s/a)$

Sendo:

s = Desvio padrão do intercepto,

a = Coeficiente angular da curva de calibração

3.11- Coeficiente de partição

Os coeficientes de partição foram determinados pelo método de agitação em frasco de acordo com as normas da OECD (1995).

Inicialmente foram preparadas soluções de ricinina, xantiletina e rauianina 500 µg/mL na fase oleosa (octanol, Myritol[®] 812, miristato de isopropila, óleo de rícino e oleato de isodecila). Em seguida cada solução foi misturada à fase aquosa nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 (v/v). A mistura foi mantida sob agitação por 24h a temperatura ambiente. Depois deste tempo, procedeu-se à separação das fases por centrifugação a 2000 rpm, durante 10 minutos. A quantificação de ricinina, xantiletina e rauianina nas fases oleosa e aquosa foi determinada utilizando os métodos analíticos desenvolvidos e validados por CLAE.

3.12- Método de preparo das Nanopartículas

Para a obtenção das nanopartículas foram investigadas quatro técnicas de preparação. Para as nanopartículas de xantiletina e rauianina foi utilizado o método de nanoprecipitação: deposição interfacial de um polímero pré-formado e para ricinina além desse método foram avaliados outras quatro técnicas: Dupla-emulsão, Gelificação iônica: nanoesferas de quitosana e Deposição interfacial/deslocamento do solvente.

3.12.1- Preparo das nanopartículas de xantiletina e rauianina

3.12.1.1- Método de nanoprecipitação

As nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS) foram preparadas baseadas na técnica de deslocamento do solvente descrita por FESSI *et al.* (1988a, 1988b, 1989).

Inicialmente foi preparada uma fase orgânica contendo o biopolímero, o princípio ativo, óleo (somente para nanocápsulas), tensoativo de baixo EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) e o solvente orgânico. Em seguida esta fase foi vertida, sob agitação constante, sobre uma fase aquosa contendo um tensoativo de elevado EHL, mantendo-se a agitação magnética durante 10 minutos para estabilização. Na seqüência, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados via um evaporador rotativo a 45 °C ajustando para um volume final conhecido. A composição das

nanopartículas encontra-se listada na Tabela 3.8 e uma representação esquemática do método para preparo das nanopartículas é mostrado na Figura 3.6.

Tabela 3.8: Composição das nanopartículas pelo método de nanoprecipitação

Formulação		Quantidades
Fase orgânica		
Polímero	PLGA (poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) ou PCL (poli-ε-(caprolactona) e/ou PHB (poli-β-(hidroxibutirato))	50 mg
Tensoativo de baixo EHL	Lecitina de soja ou Span [®] 60	100 mg
Óleo	Myglyol-812 ou Miristato de isopropil ou Oleato de isodecila	60 mg
Solvente	Acetona e/ou etanol	10 mL
Substância ativa	Xantiletina ou rauianina	10 mg
Fase aquosa		
Tensoativo de alto EHL	Pluronic [®] F-68 ou Tween 80	100 mg
Solvente	H ₂ O	20 mL

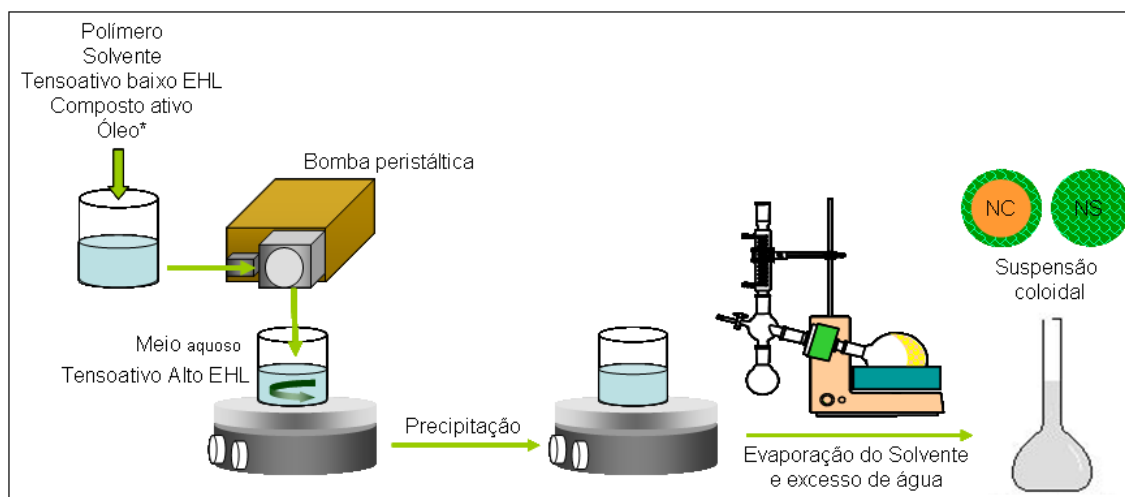


Figura 3.6: Esquema de preparo de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação. *somente no caso das nanocápsulas.

De posse dos resultados de caracterização das nanopartículas, chegou-se à composição da formulação em que obtive-se as melhores propriedades e vantagens economicas. Estas continham: PCL, Span[®] 60, Oleato de isodecila,

Acetona e Tween 80. Todavia, foi também preciso verificar a melhor concentração de cada componente na formulação. Para tal, realizou-se um planejamento experimental com objetivo de se conseguir o máximo de informações úteis a partir de poucos experimentos, proporcionando economia de tempo e de reagentes.

Em um planejamento fatorial cada variável é denominada de fator e cada fator varia em quantidade de níveis. Normalmente os planejamentos são estudados em dois níveis, porque dependendo da quantidade de fatores, o número de experimentos é grande e o planejamento torna-se inviável. O número de experimento é calculado pela expressão N^k , onde n é o número de níveis e k o número de fatores.

Neste caso, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 centrado na média. As variáveis observadas foram a quantidade de princípio ativo xantiletina ou rauianina, PCL e oleato de isodecila em cada formulação. Estes componentes foram selecionados por exercerem maiores influências sobre as características das nanopartículas. Os níveis escolhidos para cada variável pode ser observado nas Tabelas 3.9 e 3.10.

Tabela 3.9: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2^3 centrado na média.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Xantiletina/rauianina (mg/mL)	1,0	2,0	3,0
PCL (g)	0,05	0,10	0,15
Óleo (g)	0,0	0,5	1,0

O planejamento fatorial 2^3 centrado na média foi executado com um total de 11 experimentos, sendo três utilizados para investigação da reprodutibilidade da técnica de nanoencapsulamento, avaliada pelo desvio padrão dos experimentos, ou seja, pelos ensaios 9 a 11 descritos na Tabela 3.9.

Tabela 3.10: Planejamento fatorial 2^3 centrado na média.

Ensaio	Fatores		
	Xantiletina/rauianina	PCL	Óleo
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Nesses experimentos as concentrações de Span[®] 60 e Tween 80 foram mantidas constantes em 100 mg.

Estabelecidas as melhores condições, um segundo planejamento fatorial foi realizado considerando o efeito que os tensoativos podem exercer sobre as características das nanopartículas. Neste caso foi realizado um planejamento fatorial 2^2 , duas variáveis, em dois níveis, como descrito nas Tabelas 3.11 e 3.12.

Tabela 3.11: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial 2^2 .

Fatores	Níveis	
	-1	1
Span 60 (mg)	50	150
Tween 80 (mg)	50	150

Tabela 3.12: Planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	Fatores	
	Span 60	Tween 80
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

3.12.2 - Preparo das nanopartículas de ricinina

O preparo de nanocápsulas e nanoesferas de ricinina foi investigada através do uso de quatro diferentes técnicas. Todas as nanoformulações desenvolvidas utilizaram polímeros pré-formados.

3.12.2.1- Método de nanoprecipitação

As nanocápsulas e nanoesferas foram preparadas com base na técnica de deslocamento do solvente introduzida por FESSI *et al.* (1988a, 1988b, 1989), como descrita no item 3.10.1.1. Para o preparo de nanocápsulas foram utilizados como fase oleosa, myglyol-812, miristato de isopropil, oleato de isodecila, óleo de rícino e óleo de neem.

Modificações no método foram propostas visando à melhoria da eficiência de encapsulação. Foram utilizados na fase orgânica ácidos graxos de cadeia longa, ácidos láurico ($C_{12}H_{24}O_2$) e caprílico ($C_8H_{16}O_2$), na razão molar ricinina:ácido graxo (1:1, 1:2, 1:4, 1:5 e 1:6).

Utilizou-se também, soluções de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) e tampão, substituindo a água deionizada. O $CaCl_2$ foi utilizado na razão molar de (1:1, 2:1, 4:1 e 6:1) com a ricinina. Foram utilizados os tampões glicina (0,2 mol L^{-1}) (pH 9,2 e 10,6), carbonato de sódio (0,2 mol L^{-1}) (pH 9,2 e 10,6) e fosfato de sódio (0,2 mol L^{-1}) (pH 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0).

3.12.2.2- Método de Dupla-Emulsão

O método de dupla-emulsão de solvente (emulsificação-evaporação do solvente) é normalmente aplicado ao nanoencapsulamento de substâncias hidrofílicas.

As nanocápsulas água/óleo/água (A/O/A) foram preparadas com base na técnica de dupla-emulsão desenvolvida por COHEN-SELA *et al.* (2009) com algumas modificações. O método consiste no preparo e uso de três fases. A fase 1, solução aquosa de ricinina, foi adicionada sob agitação com auxílio do ultra-turrax a fase 2, PCL e Tween 80 em acetato de etila, formando a emulsão A/O. Em seguida, essa emulsão (A/O) foi adicionada com auxílio do ultra-turrax a fase 3, água deionizada ou solução de cloreto de cálcio (1,0; 1,5; 2,5; 3,5; 5,5; 6,5 mg/mL), formando a emulsão A/O/A.

Em seguida, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados em evaporador rotativo a 45 °C ajustando o volume final conhecido. A Tabela 3.13, mostra a composição usada no preparo das nanocápsulas.

Tabela 3.13: Composição das nanocápsulas preparadas pelo método de Dupla-Emulsão.

Composição	Quantidade
Fase 1	
Água deionizada	1,0 mL
Ricinina	2,0 mg
Fase 2	
PCL	90,0 mg
Tween 80	90,0 mg
Acetato de etila	3 mL
Fase 3	
Água destilada ou solução de CaCl ₂	10,0 mL

A Figura 3.7 ilustra o esquema do método de dupla-emulsão.

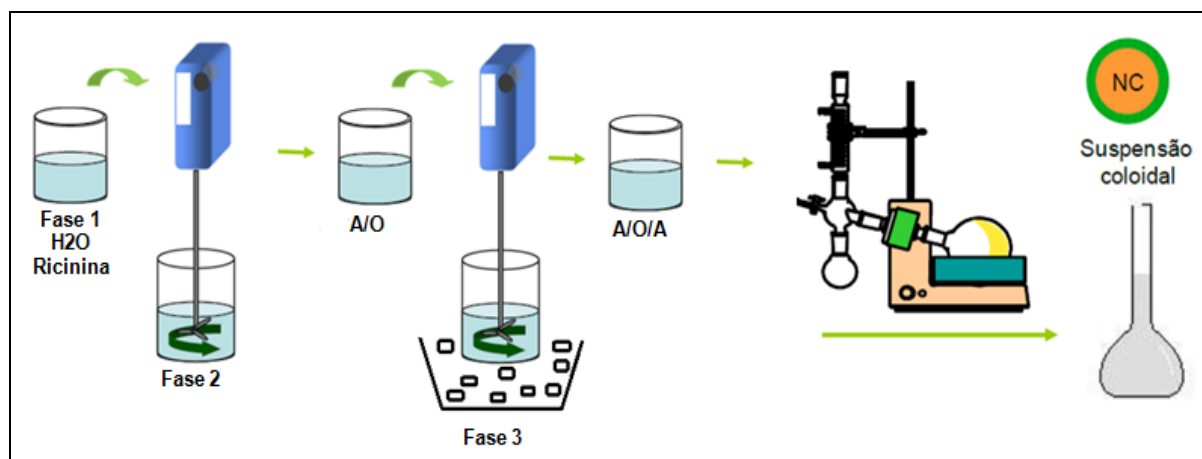


Figura 3.7: Esquema de preparo das nanocápsulas pelo método de dupla-Emulsão.

3.12.2.3- Gelificação iônica: nanoesferas de quitosana

As nanopartículas de quitosana (CS, grau de desacetilação 87%) foram preparadas de acordo com o procedimento previamente descrito por CALVO *et al.*, 1997, baseados na gelificação ionotrópicos da CS com os ânions trifosfato pentassódico (TPP).

A quitosana foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético 1% (5,0 mg/mL). A essa solução foi adicionado 2,0 mL da solução aquosa de PEG (50,0 mg/mL) e 1 mg de ricinina. As nanopartículas de CS são formadas espontaneamente pela adição de 1,2 mL da solução aquosa de TPP (5,0 mg/mL), sob agitação magnética constante. As nanopartículas produzidas foram isoladas por centrifugação a 16.000 rpm por 40 min. A Figura 3.8 mostra a representação esquemática do método para nanopartículas de CS.

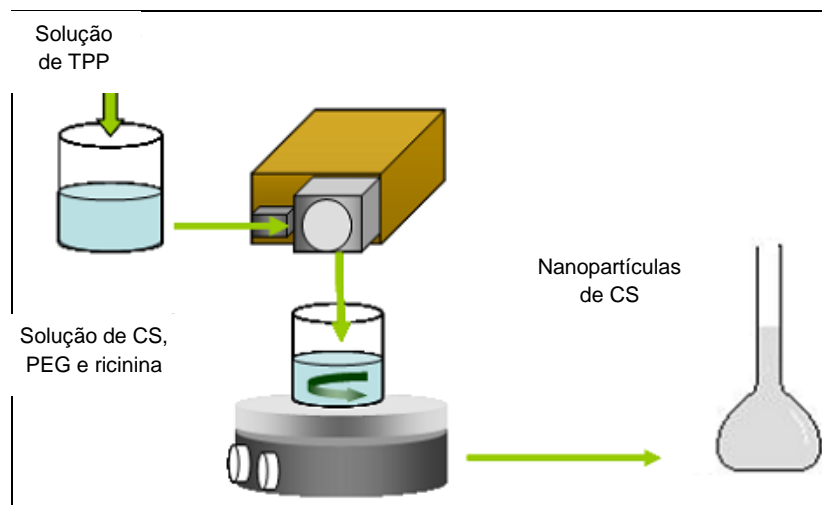


Figura 3.8: Representação esquemática do método para nanopartículas de quitosana (CS).

3.12.2.4- Método deposição interfacial/ deslocamento do solvente

As nanopartículas foram preparadas por uma nova metodologia desenvolvida no laboratório de Produtos Naturais, conforme mostra a Figura 3.9. O método consiste em três fases, onde a chamada fase 1, solução de PCL em acetona, foi adicionada com auxílio de uma bomba peristáltica (rotor a 10%) sob agitação magnética moderada à fase 2. A fase 2 é uma nanoemulsão água/óleo preparada inicialmente pela homogeneização sob agitação vigorosa (Ultra-turrax[®] IKA T10, 16.000 rpm, 2 min) de água, ricinina e oleato de isodecila. As vesículas da nanoemulsão da fase 2, foram então revestida com o polímero dissolvido na fase 1 através do movimento de dispersão do solvente pela fase aquosa. Em seguida, as nanocápsulas da mistura (fase 1 e 2) foram estabilizadas vertendo-se a fase 3, solução aquosa de Tween[®] 80, com auxílio de uma bomba peristáltica (rotor a 10%). Na seqüência, o solvente orgânico e parte da água foram eliminados via um

evaporador rotativo a 45 °C, ajustando o volume final. Com a adição da solução de polímero na fase aquosa (meio de dispersão), ocorre a difusão do solvente posicionando o polímero na interface óleo/água. Com a evaporação do solvente e do excesso de água num evaporador rotativo ocorre a formação das nanocápsulas. O tensoativo da fase 3 se localiza na interface nanocápsula/água estabilizando a suspensão coloidal.

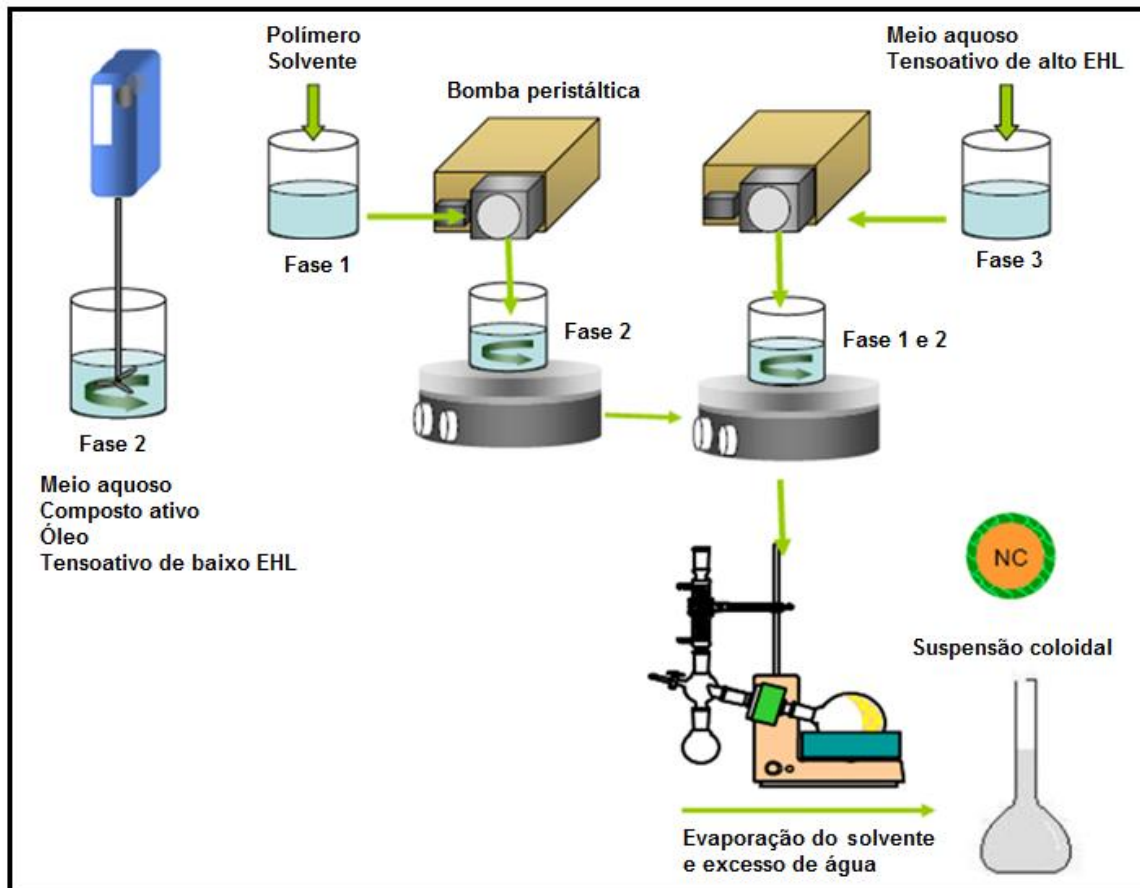


Figura 3.9: Representação esquemática do método de deposição interfacial/deslocamento do solvente para preparo das nanocápsulas.

A composição das nanopartículas pode ser observada na Tabela 3.14.

Tabela 3.14: Composição das suspensões preparadas pelo Método de deposição interfacial/deslocamento do solvente.

Composição	Quantidade
Fase 1	
PCL	100,0 mg
Acetona	20,0 mL
Fase 2	
Ricinina	10 mg
Água deionizada	50,0 mL
Span 60	100,0 mg
Oleato de isodecila	500,0 mg
Fase 3	
Água deionizada	20,0 mL
Tween 80	100,0 mg

3.13- Preparo dos produtos secos por aspensão

As suspensões contendo nanocápsulas e nanoesferas foram secas pelo método da secagem por aspensão (Mini *Spray-Dryer* Büchi B290) utilizando como suporte de secagem o dióxido de silício coloidal (Figura 3.10).

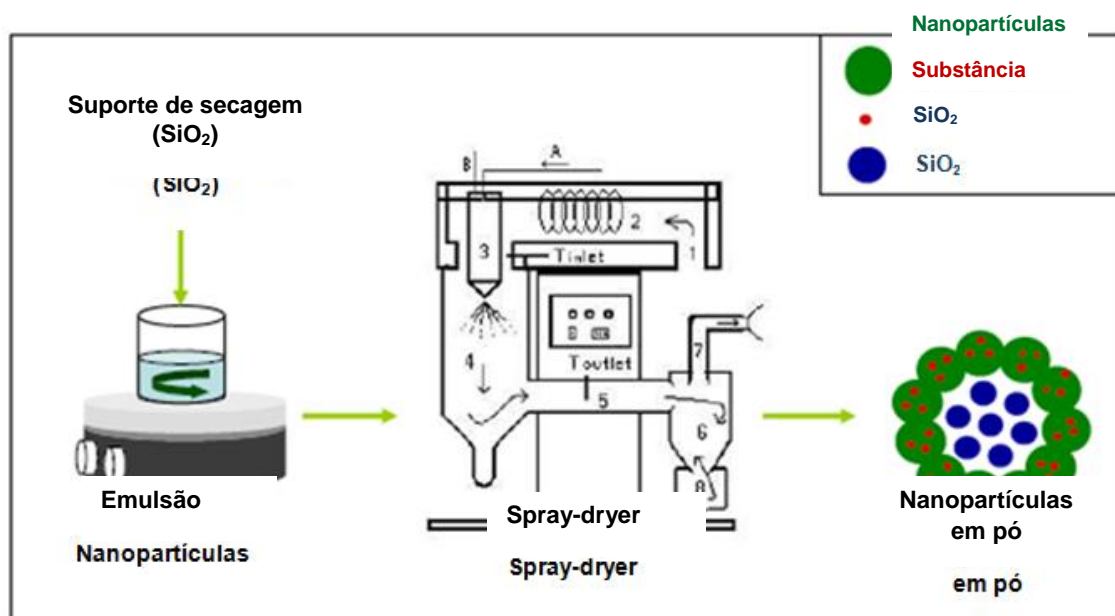


Figura 3.10: Esquema de preparo de micropartículas em pó.

Alguns estudos foram desenvolvidos avaliando o rendimento do processo em função da quantidade do suporte de secagem usado, volume do meio de dispersão e os parâmetros operacionais. A Tabela 3.14 mostra os parâmetros operacionais ajustados para um maior rendimento.

Tabela 3.15: Parâmetros operacionais Mini *Spray-Dried*:

Parâmetros	Valor
Fluxo de alimentação	7,5 mL/min
Fluxo de ar	530 L/h
Pressão de ar comprimido	0,55 bar
Temperatura de entrada do ar de secagem	125 °C ± 5 °C
Temperatura de saída do ar de secagem	50 °C ± 5 °C
Diâmetro do atomizador	0,7 mm
Sistema de aspiração	96 % (38 m ³ /h)

3.14 - Caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas

3.14.1-Determinação do pH

Os valores de pH das suspensões foram determinados diretamente nas suspensões através do potenciômetro (Qualxtron Mod. 8010), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e pH 7,0. O pH foi medido após o preparo e durante 4 meses num intervalo de 15 dias para avaliação da estabilidade das suspensões. Os resultados representam a média de três amostras.

3.14.2 - Diâmetro médio

O diâmetro das partículas em suspensão foi determinado em Diâmetro BI-FOQELS (Fiber Optic Quase Elastic Light Scattering) da Brookhaven Instruments

Corporation. As amostras, soluções coloidais, foram diluídas em água deionizada (5 %, v/v) e analisadas em quintuplicada.

3.14.3 - Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado no Zeta Potencial Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation) logo após o preparo das suspensões. As amostras foram diluídas em água deionizada (5 %, v/v) e analisadas em quintuplicada.

3.14.4 - Determinação da quantidade total de ricinina, xantiletina e rauianina

A quantidade total de ricinina, xantiletina e rauianina foram determinadas mediante a dissolução das nanopartículas em acetonitrila e analisadas em triplicata por CLAE utilizando os métodos analíticos desenvolvidos e validados.

3.14.5 - Determinação da quantidade de ricinina, xantiletina e rauianina encapsuladas

Para avaliar o teor de ricinina, xantiletina e rauianina encapsulados, foi necessário quantificar o teor destas livres, ou seja, não encapsulada.

Utilizou-se a técnica filtração-centrifugação, utilizando tubos com filtros de acetato de celulose com poros de 0,22 µm (Spin-X, Corning®) em centrífuga Eppendorf® Mod. 8210R a 8.000 rpm. Um volume de 0,5 ml da suspensão coloidal foi adicionado ao tubo spin e centriugado por 40 min. Neste procedimento, as nanopartículas foram retidas pela membrana, enquanto que o meio de dispersão, a fase aquosa, foi filtrada e analisada por CLAE, para a determinação do total de substância livre (Figura 3.11). Conseqüentemente, a eficiência de encapsulamento (EE%), em porcentagem, pode ser foi determinada pela diferença entre a quantidade de substância total e a quantidade de substância livre através do uso da seguinte equação:

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

onde A é a concentração da ricinina, xantiletina ou rauianina no ultrafiltrado (µg/mL) e B é a concentração total (µg/mL).



Figura 3.11: Determinação da quantidade de ricinina, xantiletina e rauianina encapsuladas.

3.14.6 – Morfologia

Para avaliar a homogeneidade e morfologia das nanopartículas, gotas da suspensão coloidal foram evaporadas diretamente em suportes metálicos ou depositadas em fitas de carbono quando se tratavam de nanopartículas em pó. Depois disso, as amostras foram metalizadas com ouro e submetidas à análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) Philips XL 30 FEG no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais/UFSCar.

O suporte metálico usado foi fabricado em alumínio sendo previamente limpo e polido à máquina com pasta de diamante.

3.14.7 – Estudos de estabilidade

3.14.7.1- Tempo de armazenamento

Para o estudo da avaliação físico-química das nanocápsulas em suspensão durante o armazenamento, estas foram conservadas em frascos de vidro a 4°C, ao abrigo da luz, durante 4 meses. Em intervalos de tempo previamente estabelecidos avaliou-se o aspecto macroscópico, diâmetro de partícula, potencial zeta e pH das suspensões de nanocápsulas.

3.14.7.2- Degradação acelerada pela luz UV

Os estudos de degradação acelerada pela luz UV das substâncias encapsuladas foram realizados em uma câmara de envelhecimento acelerado por Ultravioleta (Figura 3.12) construída com conjunto de quatro lâmpadas especiais (Philipps 40 cm, 15 W, quartzo) que simulam a radiação no espectro do UV-A e UV-B com comprimentos de onda entre 400-320 e 320-280 nm, respectivamente.

A câmara de degradação foi revestida com espelhos para maior aproveitamento da radiação. Os espelhos apresentam uma superfície altamente refletora com perdas mínimas de luminosidade. O sistema foi mantido com temperatura controlada a $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ por um sistema de circulação de ar termostaticado.

As amostras de nanopartículas (1 mL por *vial*) foram colocadas na câmara e monitoradas por CLAE de tempos em tempos para avaliar estabilidade das substâncias encapsuladas. Os resultados representam a média de três amostras.



Figura 3.12: Câmara de envelhecimento acelerado por Ultravioleta.

3.14.7.3- Degradação térmica (65 °C)

O estudo de degradação térmica das substâncias encapsuladas foi realizado em estufa a 65 °C.

As amostras de nanocápsulas (1,0 mL em *via*) eram colocadas na estufa e monitoradas por CLAE de tempos em tempos para avaliar estabilidade das nanopartículas.

3.14.8 – Estudos de liberação

O estudo do perfil de liberação *in vitro* da ricinina, xantiletina ou rauianina a partir das nanocápsulas foi realizado através da técnica de diálise inversa (MAGENHEIM & BENITA, 1991).

O estudo de liberação consiste na dispersão das nanopartículas no meio de liberação, onde foram imersos previamente vários sacos de diálise, com um volume aproximado de 1,0 mL, contendo no seu interior o mesmo meio de dispersão (Figura 3.13).

Adicionou-se um determinado volume da suspensão das nanocápsulas contendo xantiletina, rauianina ou ricinina a 200 mL de água (meio de liberação) onde havia adicionado previamente vários sacos de diálise (membrana de celulose MM 12000D, Sigma-Adrich Química, Sintra, Portugal) contendo 1,0 mL de água. O volume da suspensão de cada nanocápsulas foi adicionado obedecendo às condições *sink* (GIBALDI & FELDMAN, 1967), de modo a corresponderem de 10 - 20% da respectiva solubilidade no meio.

O sistema foi mantido sob agitação magnética em banho de água termostaticado a 30 °C. Em intervalos de tempo previamente estabelecidos procedeu-se à remoção dos sacos de diálise do meio de liberação e à quantificação do composto liberado utilizando o método desenvolvido por CLAE.

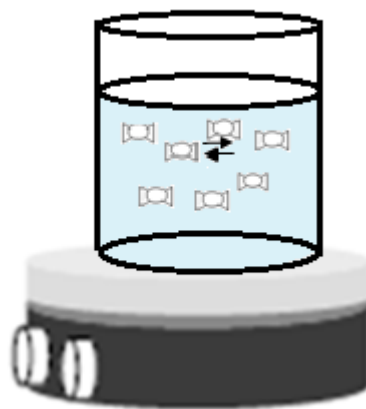


Figura 3.13: Representação esquemática da técnica de diálise inversa.

3.15 - Metodologia dos ensaios Biológicos

3.15.1 – Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras

Os ensaios por ingestão com as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram realizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) UNESP – Rio Claro/SP com a colaboração das alunas pós-graduação Tais Garcia Freitas e Marcela Ceccato sob orientação do Prof. Dr. Odair Corrêa Bueno.

Nestes ensaios as formigas operárias foram retiradas aleatoriamente de formigueiros mantidos em laboratório. Para manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi utilizada dieta sólida artificial constituída por: 5,0% glicose, 1,0% peptona bacteriológica, 0,1% extrato de levedura e 1,5% Agar bacteriológico dissolvidos em 100 mL de água destilada. No caso das nanopartículas foi utilizado dieta líquida ou seja sem a presença de Agar.

As amostras submetidas ao ensaio com as operárias foram incorporadas na dieta na concentração de 2 mg/mL (extrato bruto) ou 0,1 mg/mL (substância pura) (BUENO *et al.*, 1997). Em seguida essa mistura foi levada ao forno de microondas por 4 minutos e então autoclavada por 15 minutos a uma temperatura de 120°C e 1,0 atm. A dieta ainda líquida foi transferida para placas de Petri de 10 cm de diâmetro e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subseqüentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização do experimento de toxicidade. A dieta para manutenção das formigas (controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser testado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 horas a dieta era renovada.

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

3.15.2 – Ensaios Biológicos com o Fungo Simbionte

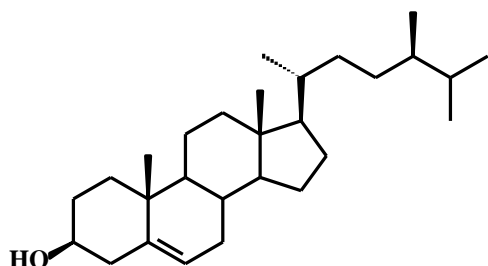
Os ensaios biológicos com o fungo simbionte, *Leucoagaricus gongylophorus*, foram realizados com a colaboração da doutora Ana Paula Terezan e a técnica Sonia P. Cardoso.

As amostras submetidas ao ensaio com o fungo simbionte foram incorporadas ao meio de cultura e dissolvidas em água destilada, obtendo concentração final igual a 100 µg/mL para substâncias puras. Em seguida, essa mistura foi autoclavada nas condições 120 °C, 1,0 atm por 20 minutos. Após a esterilização do material, os meios de cultura foram vertidos nas placas de Petri dentro da capela com fluxo laminar, previamente esterilizada durante 30 minutos por luz ultravioleta. Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri foi inoculada na posição central com um disco de ágar de 8 mm de diâmetro, previamente colonizado pelo fungo simbionte *L. gongylophorus*. Cada amostra foi preparada em quintuplicata, havendo um número idêntico de réplicas para o controle geral (meio de cultura e fungo simbionte). Após o tempo de incubação de 30 dias, a 25 °C foram realizadas as medidas de cinco diâmetros diferentes em cada placa das amostras testadas (adaptação MIYASHIRA, 2007). As porcentagens de inibição foram calculadas a partir da comparação da área do crescimento micelial do fungo simbionte dos controles com a área do crescimento micelial nas placas com amostra. O controle foi considerado como 0% de inibição do fungo simbionte.

4- Resultados e discussão

4.1- Substâncias isoladas

Os estudos fitoquímicos das plantas *Trichilia elegans* e *T. catigua* levou ao isolamento e identificação de 23 metabólitos secundários.

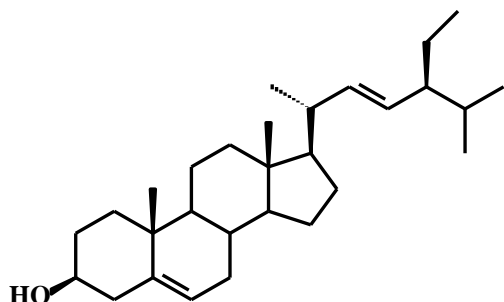


Campesterol (1)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 22

Identificação: p. 74

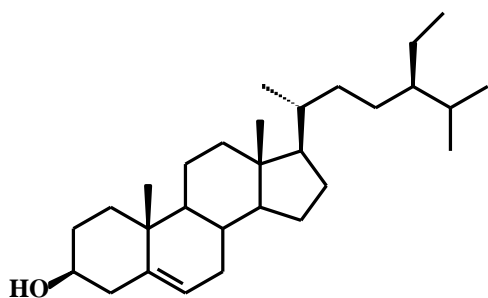


Stigmasterol (2)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 22

Identificação: p. 74

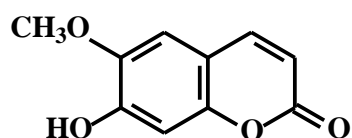


β -sitosterol (3)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 22

Identificação: p. 74



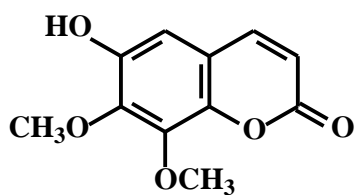
Escopoletina (4)

Procedência: caule e folhas de

Trichilia elegans

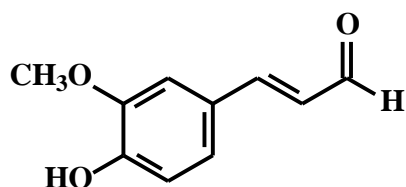
Isolamento: p. 25

Identificação: p. 78



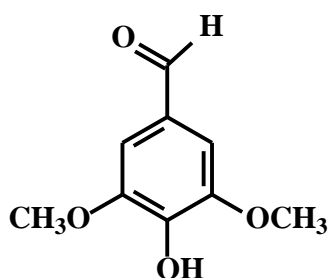
Ascontina (5)

Procedência: caule e folhas de *Trichilia elegans*
Isolamento: p. 26
Identificação: p. 81



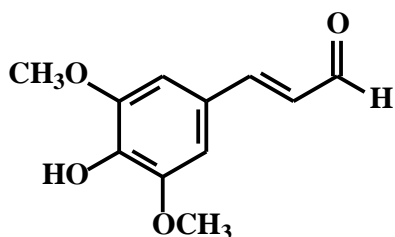
4-hidroxi-3-metoxi-cinamaldeído (6)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*
Isolamento: p. 23
Identificação: p. 83



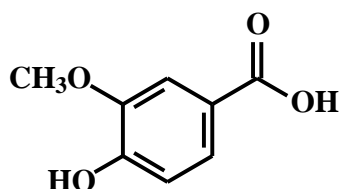
4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído (7)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*
Isolamento: p. 23
Identificação: p. 86



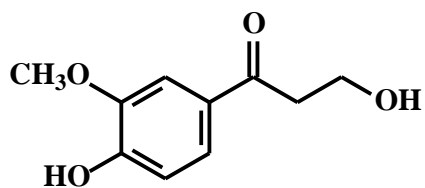
3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinamaldeído (8)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*
Isolamento: p. 24
Identificação: p. 88



Acido vanílico (9)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*
Isolamento: p. 29
Identificação: p. 90

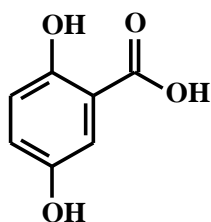


3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propan-1-one (10)

Procedência: caule de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 27

Identificação: p. 92

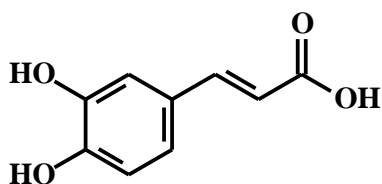


Ácido gentísico (11)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 96

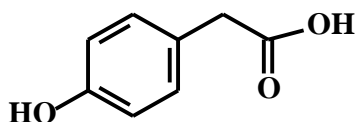


Ácido caféico (12)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 98

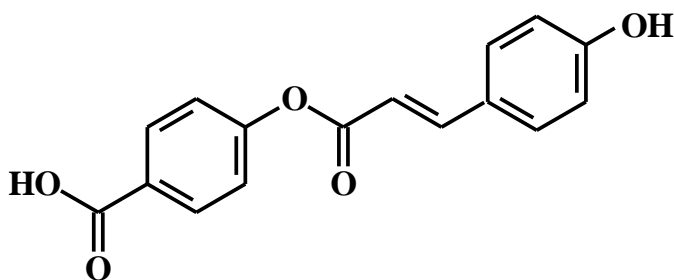


4-hidroxifenilacético (13)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 33

Identificação: p. 100

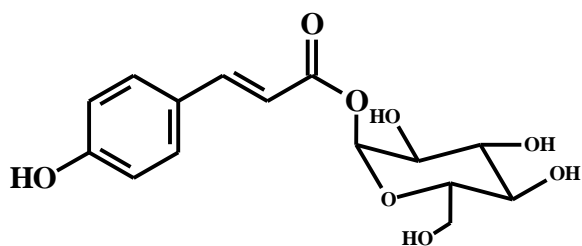


3-(4'-hidroxifenil) 2-propenóico de (4''-carboxil) fenil (14)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 33

Identificação: p. 102

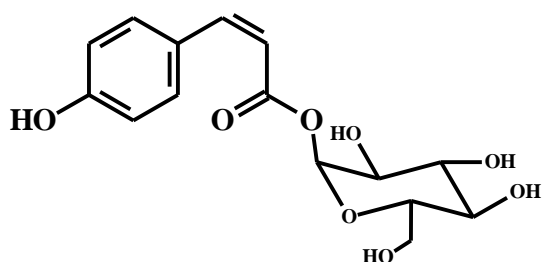


trans-p-cumarato de α-glicose (15)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 108

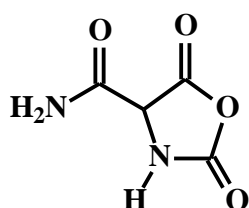


cis-p-cumarato de α-glicose (16)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 34

Identificação: p. 108

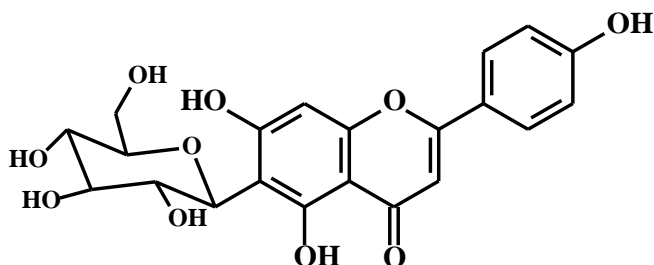


Inédito (17)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 37

Identificação: p. 112

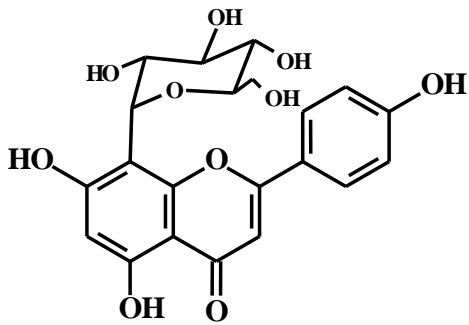


Isovitexina (18)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 37

Identificação: p. 117

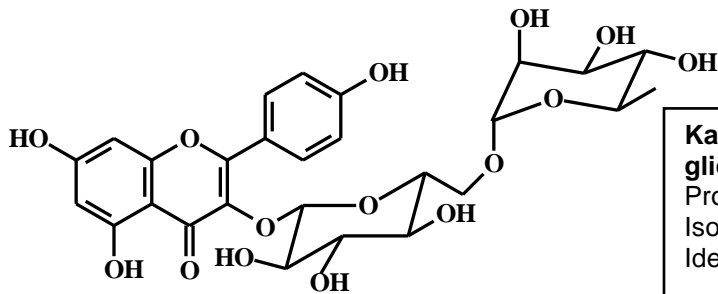


Vitexina (19)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 37

Identificação: p. 124

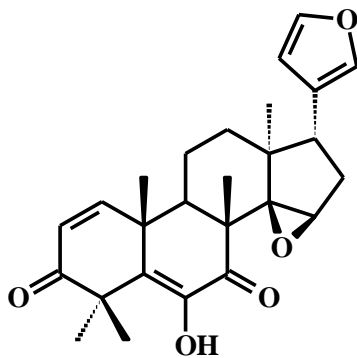


Kaempferol 3-O-(6''-O-α-raminopiranosil)-β-glicopiranosideo (20)

Procedência: folhas de *Trichilia elegans*

Isolamento: p. 37

Identificação: p. 130

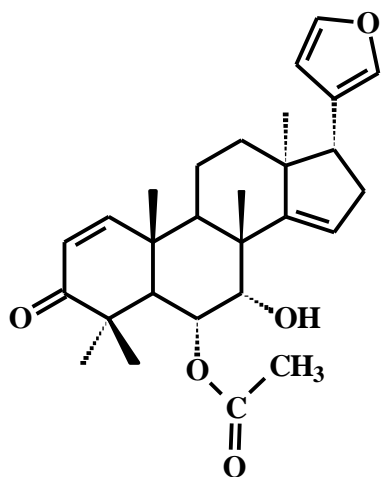


Cedrelona (21)

Procedência: arilo de *Trichilia catigua*

Isolamento: p. 41

Identificação: p. 136

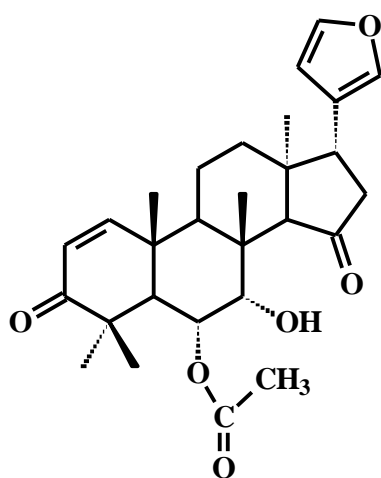


6 α -O-acetil-7-deacetilnimocinol (22)

Procedência: arilo de *Trichilia catigua*

Isolamento: p.43

Identificação: p. 141



6 α -O-acetil-7-deacetil-14,15-dihidro-15-oxo-nimocinol (Inédito, 23)

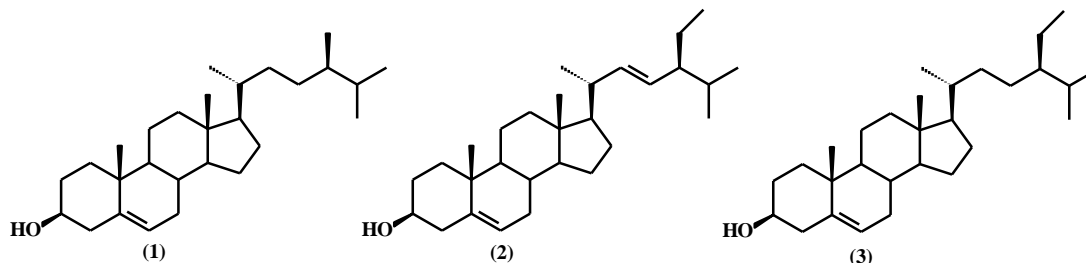
Procedência: arilo de *Trichilia catigua*

Isolamento: p. 44

Identificação: p. 154

4.2- Esteróides

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



Os esteróides são triterpenos modificados contendo o sistema de anéis tetracíclicos do lanosterol, mas sem a presença das metilas nas posições C-4 e C-14. Originados das frações lipídicas de vegetais e animais o sitosterol e o estigmasterol são os esteróides mais freqüentemente encontrados no reino vegetal (DEWICK, 2001).

Os esteróides campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) foram obtidos em mistura no extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* e caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C (Figuras 4.1 e 4.2) e por CG/EM (Figura 4.3). Os dados obtidos foram concordantes com a literatura (WERLI & NISHIDA, 1979; SUGA & KONDO, 1974; SAKAKIBARA *et al.*, 1983).

Os sinais nas regiões de δ 0,67 a 2,36 (RMN de ^1H) e δ 12,6 a 57,6 (RMN ^{13}C) referentes aos prótons metínicos, metilênicos e metílicos indicam a existência de um esqueleto esteroidal. O duplete largo em δ 5,34 ($J = 5,0$ Hz) e um multiplete em δ 3,50 foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-3, respectivamente. Os sinais de multipletos em δ 5,02 e δ 5,14 foram atribuídos aos hidrogênios vinílicos da cadeia lateral do estigmasterol.

A mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) foi confirmada por CG-EM (Figura 4.3), onde os picos dos íons moleculares em m/z 414, 412 e 400 conferiram com as fórmulas moleculares $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ e $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}$, respectivamente (Figuras 4.4 a 4.6). A Figura 4.7 apresenta propostas de fragmentação para o sitosterol.

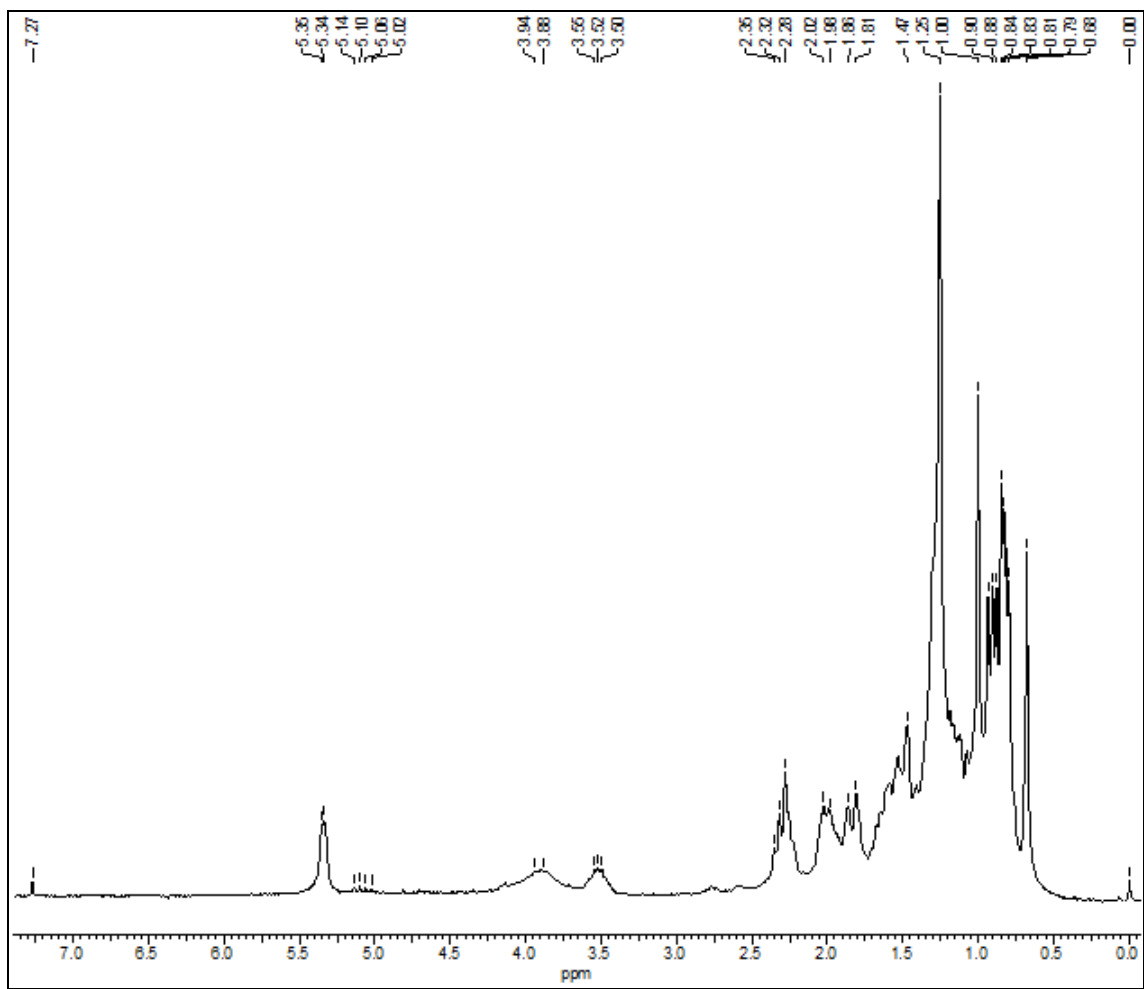


Figura 4.1: Espectro de RMN^1H da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl_3 , 200MHz)

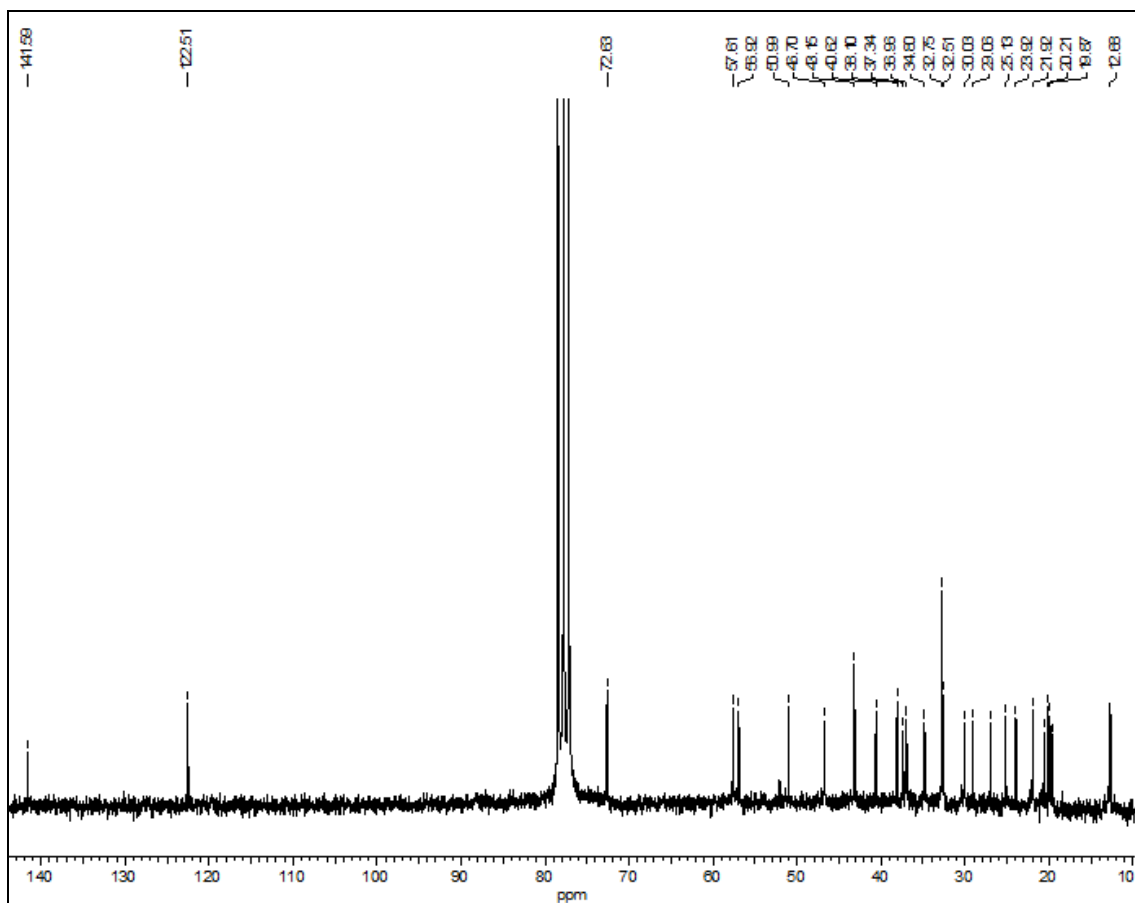


Figura 4.2: Espectro de RMN ^{13}C da mistura do campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3) (CDCl_3 , 50MHz)

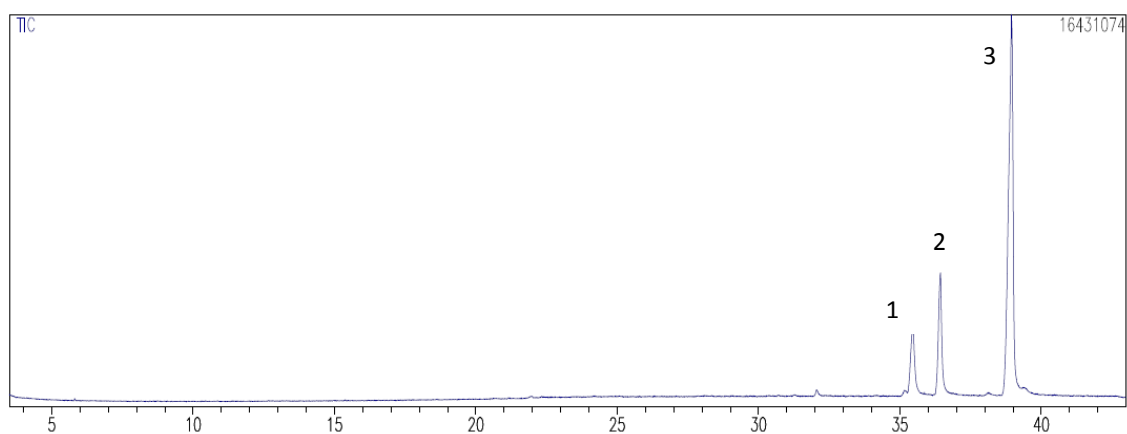


Figura 4.3 - Cromatograma obtido no GC para a mistura de campesterol (1), estigmasterol (2) e sitosterol (3). Condições: Gás de arraste: Nitrogênio (N); temperatura inicial de 150° C; tempo inicial de 1,0 min.; a temperatura da coluna aumentou de 6° C/min. até 280° C, permanecendo nesta temperatura por 20,0 min.

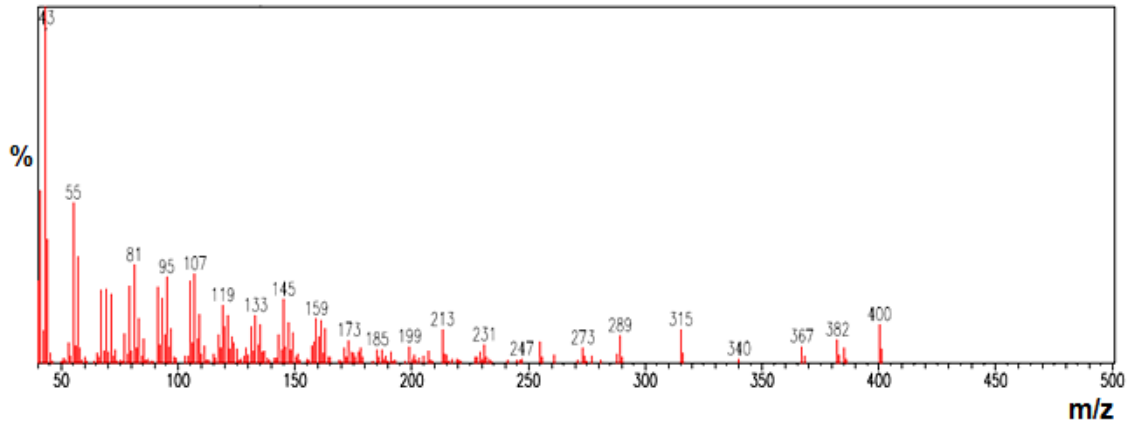


Figura 4.4: Espectro de massas do campesterol (**1**, IE = 70 e.V)

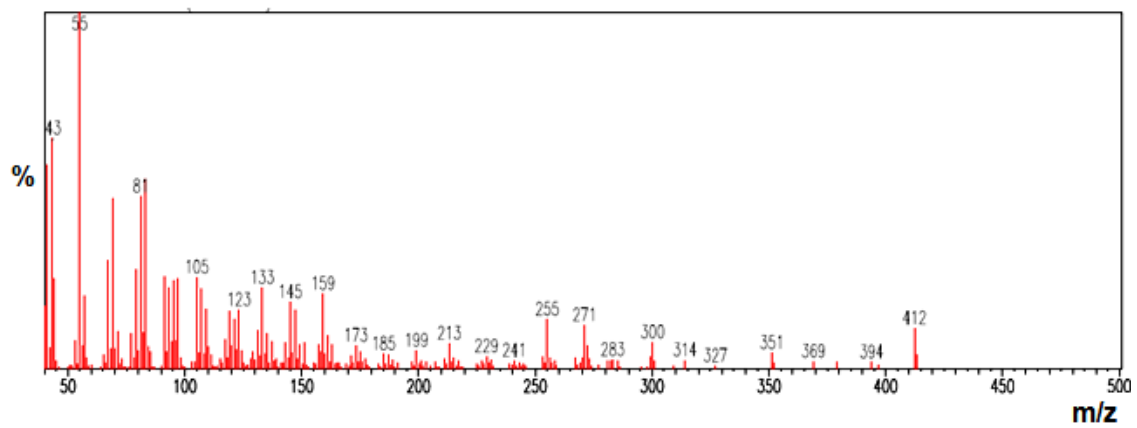


Figura 4.5: Espectro de massas do estigmasterol (**2**, IE = 70 e.V)

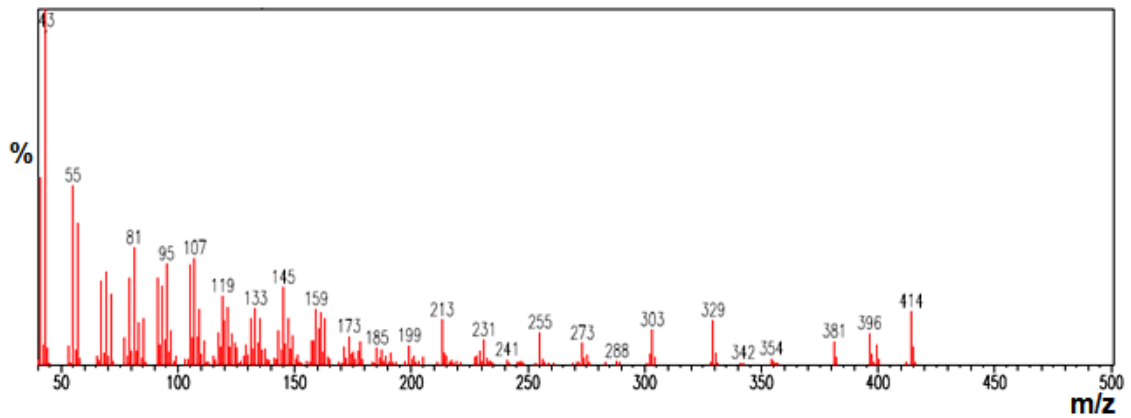


Figura 4.6: Espectro de massas do sitosterol (**3**, IE = 70 e.V)

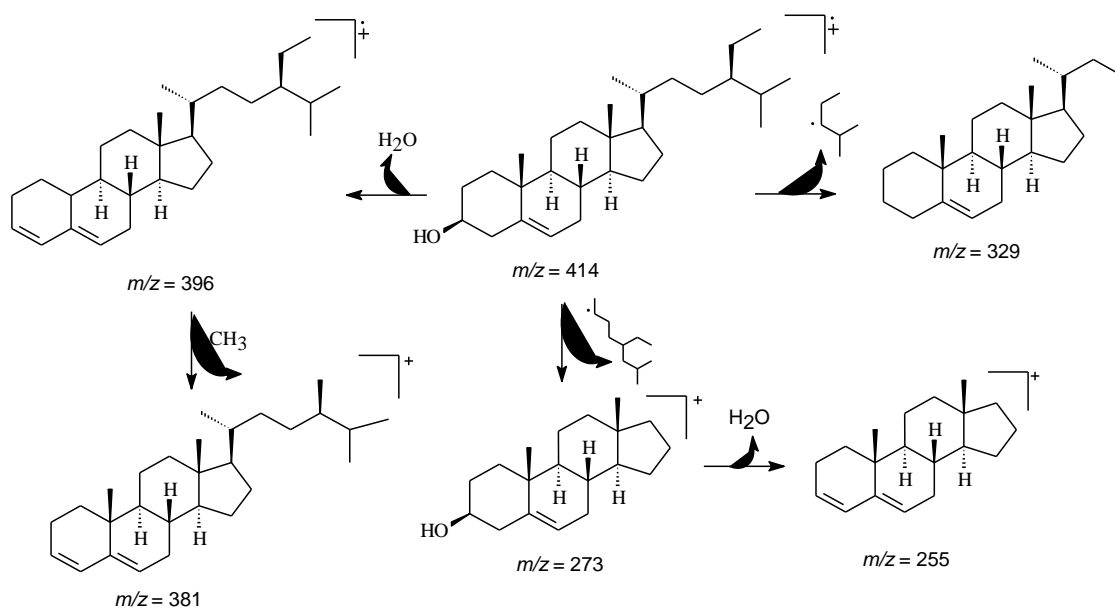


Figura 4.7: Proposta de Fragmentação do sitosterol (1).

4.3- Cumarinas

4.3.1- Determinação Estrutural da Substância 4

As cumarinas quando analisadas por CCDA e expostas à luz ultravioleta (254 nm) apresentam uma fluorescência azulada característica para essa classe de substâncias. As cumarinas apresentam características bastante comuns em seus espectros de RMN de ¹H, facilitando sua caracterização. Quando não estão substituídas nas posições C-3 e C-4, estas apresentam dois dubletos em aproximadamente δ 6,30 e 7,60 (*J* = 9,5 – 10 Hz), atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4, característico de hidrogênios de ligação dupla *cis* conjugada com grupo lactônico e com o anel aromático.

O hidrogênio H-4 encontra-se sempre mais desblindado que o H-3 devido à contribuição da estrutura de ressonância na qual se verifica uma deficiência eletrônica sobre o carbono a que este se encontra ligado.

A substância **4** foi isolada do extrato diclorometânico do caule e do extrato metanólico partição diclorometano das folhas de *Trichilia elegans* e caracterizados por RMN de ¹H e EM.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 4.8) da substância **4** apresentou sinais característicos de esqueleto cumarínico. Os sinais em δ 6,25 (1H, d, *J* = 9,5 Hz) e δ 7,57 (1H, d, *J* = 9,5 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-4 do

esqueleto cumarínico, respectivamente (MURRAY *et al.*, 1982). O espectro apresenta ainda dois singletos em δ 6,92 (1H) e δ 6,85 (1H) que foram atribuídos aos hidrogênios H-8 e H-5 do anel aromático respectivamente. O singlete em δ 3,96 indica a presença de uma metoxila, sugerindo que uma das posições tem uma hidroxila como substituinte. Deste modo duas estruturas podem ser propostas a 7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina) ou o seu isômero a 6-hidroxi-7-metoxicumarina (isoescopoletina).

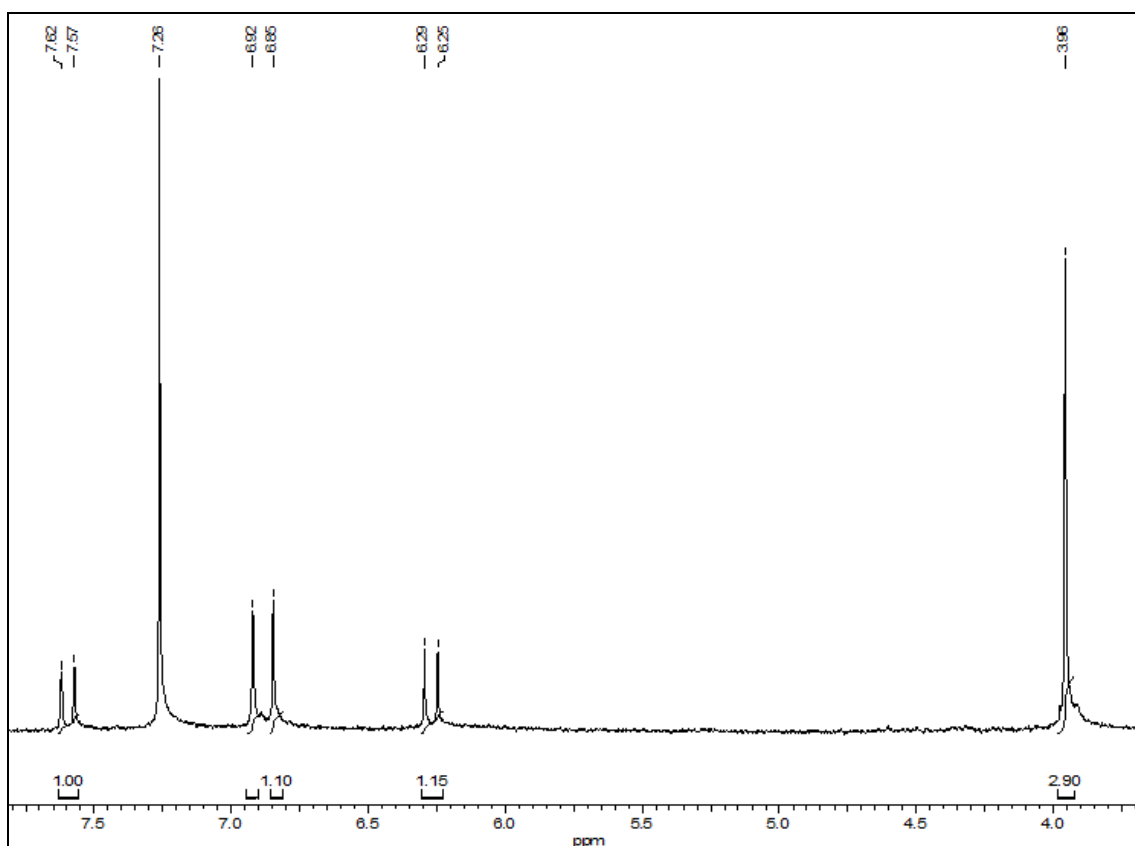
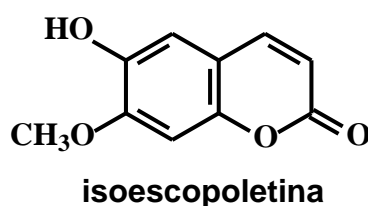
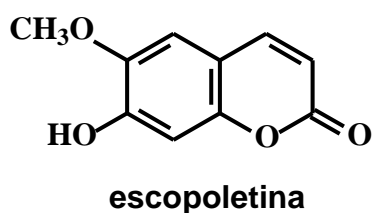
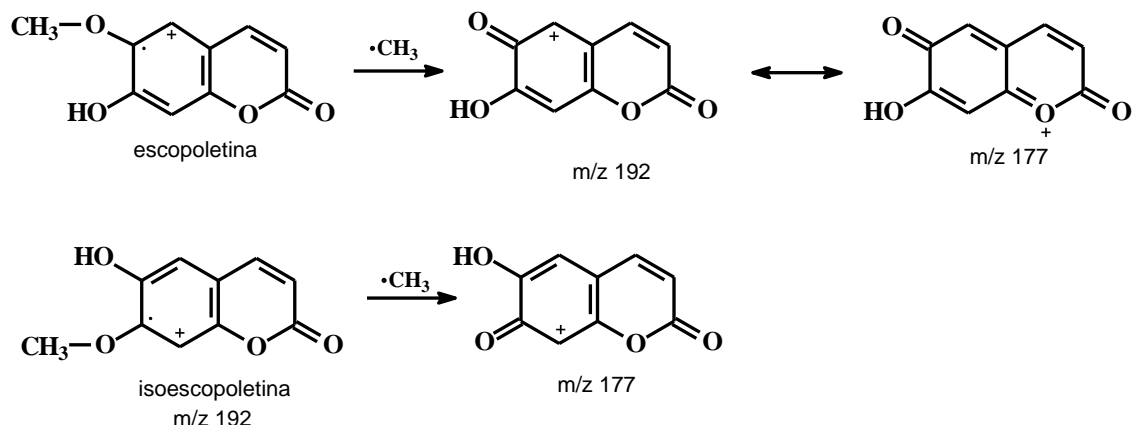


Figura 4.8: Espectro de RMN ^1H da substância **4** (200 MHz, CDCl_3)

Para diferenciá-las foi necessário fazer uma análise através de espectrometria de massas. A escopoletina apresenta o pico de m/z 177 com

intensidade de aproximadamente 70 % que é maior do que o da isoescopoletina devido à estabilização adicional deste fragmento (JANUÁRIO, 1995).



A análise do espectro de massas obtido mostra o pico $m/z=177$ com intensidade de 70% o que indica que a substância **4** é a escopoletina (Figura 4.9). Os dados RMN ^1H da substância **4** assim como os dados descritos na literatura (MAFEZOLI *et al.*, 2001) estão dispostos na Tabela 4.1.

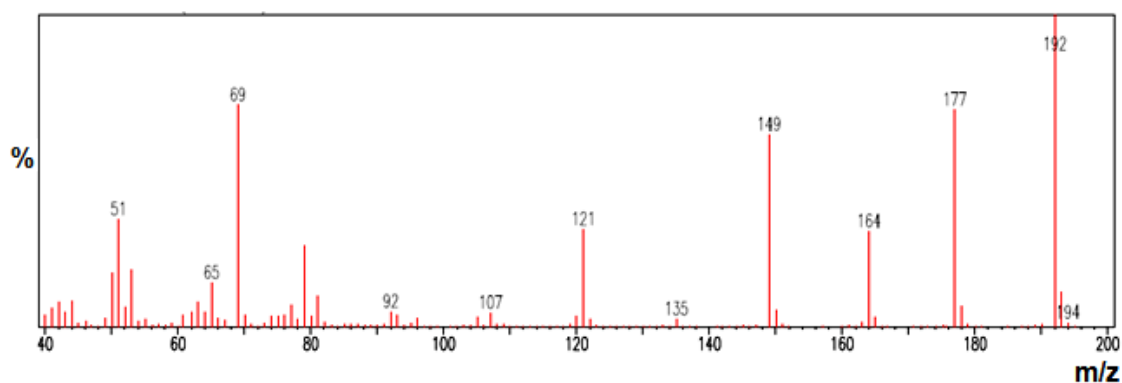


Figura 4.9: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância **4**.

Tabela 4.1: Dados de RMN ^1H da escopoletina (**4**).

H	δ ou ppm, J em Hz (CDCl_3 , 200 MHz)	MAFEZOLI <i>et al.</i> , 2001 (CDCl_3 , 400 MHz)
3	6,25 (d, 9,5)	6,28 (d, 9,5)
4	7,57 (d, 9,5)	7,61 (d, 9,5)
5	6,85 (s)	6,84 (s)
8	6,92 (s)	6,91 (s)
OCH_3	3,96 (s)	3,95 (s)

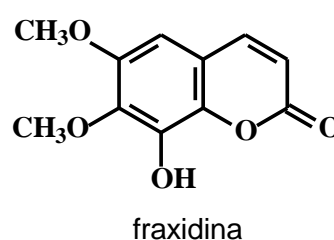
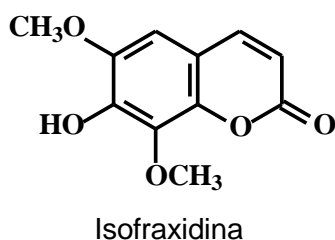
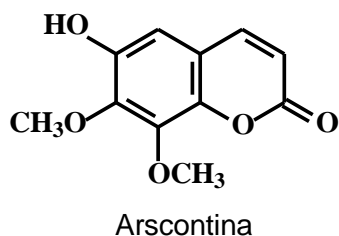
4.3.2- Determinação Estrutural da Substância 5

A substância **5** foi isolada do extrato diclorometânico do caule e do extrato metanólico partição diclorometano das folhas de *Trichilia elegans* e caracterizados por RMN de ^1H , EM e ponto de fusão.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.10) da substância **5** apresentou sinais em δ 6,23 (1H, d, $J = 10$ Hz) e δ 7,91 (1H, d, $J = 10$ Hz) que foram atribuídos aos hidrogênios da dupla ligação conjugada a carbonila lactônica H-3 e H-4, respectivamente. O singlete em δ 6,97 foi atribuída ao hidrogênio H-5, indicando que o anel aromático encontra-se substituído nas posições C-6, C-7 e C-8. Os singletos em δ 4,03 e δ 3,98, típicos de metoxilas, sugeriram serem estas, juntamente com um grupo hidroxila, os substituintes do anel aromático.

O espectro de massas da cumarina **5** (Figura 4.11) exibiu o pico do íon molecular m/z 222, confirmando os substituintes propostos para a estrutura.

Esses dados juntamente com a medida do ponto de fusão (pf = 190 °C), permitiram identificar a cumarina **5** como sendo a arscantina, diferenciando-a dos seus isômeros isofraxidina (PF = 148-149 °C) e isofraxidina (pf = 196-197 °C) (AHLUWALIA *et al.*, 1978).



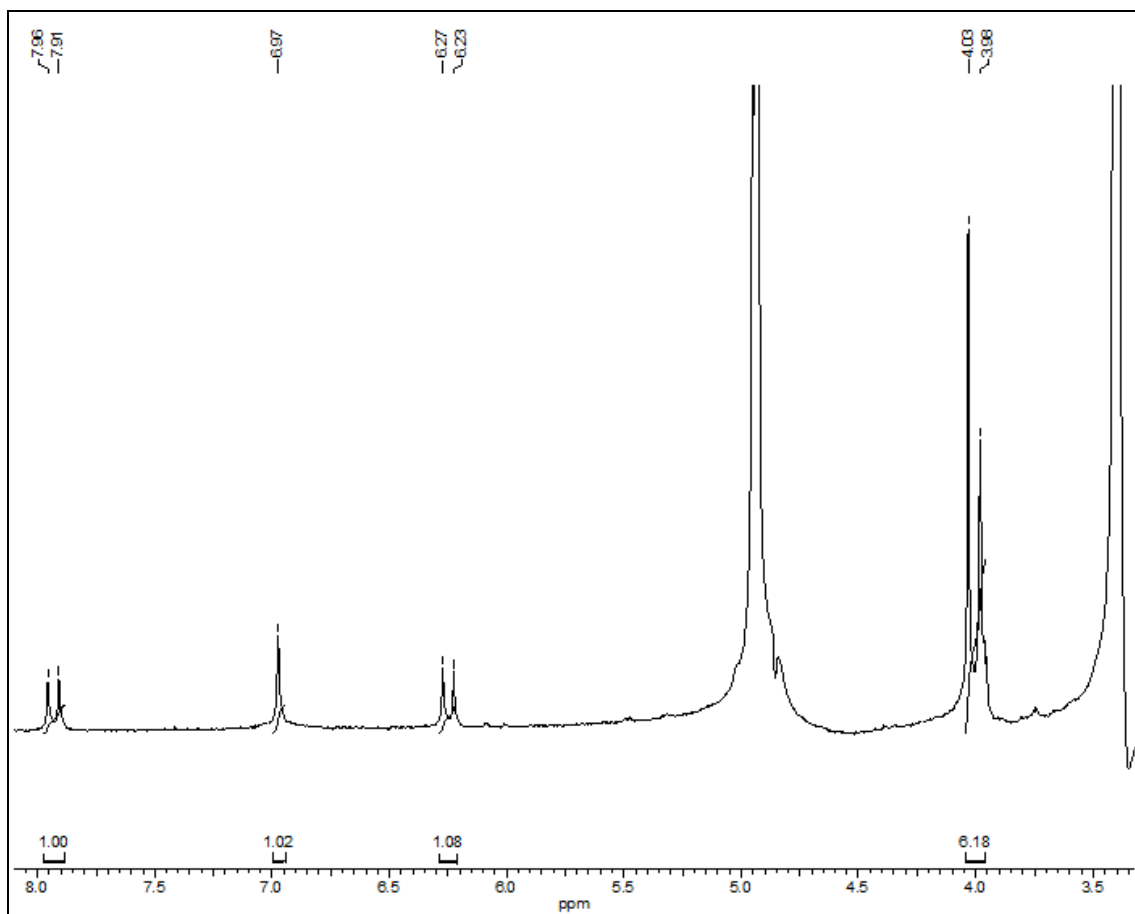


Figura 4.10: Espectro de RMN ^1H da substância **5** (200 MHz, MeOD)

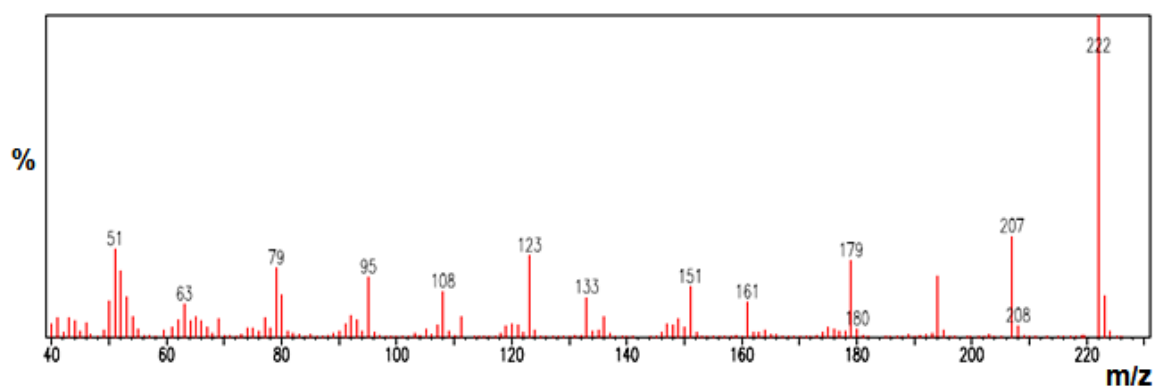


Figura 4.11: Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **5**.

Os dados experimentais de RMN de ^1H da substância **5** assim como os descritos na literatura (AHLUWALIA *et al.*, 1978) estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Dados de RMN ^1H da arscantina (5).

H	δ ou ppm, J em Hz (MeOD, 200 MHz)	AHLUWALIA <i>et al.</i> , 1978 (MeOD, 100 MHz)
3	6,23 (<i>d</i> , $J = 9,4$)	6,19 (<i>d</i> , $J = 9,5$)
4	7,91 (<i>d</i> , $J = 9,4$)	7,84 (<i>d</i> , $J = 9,5$)
5	6,97 (<i>s</i>)	6,90 (<i>s</i>)
6-OH	-	-
7-OCH ₃	4,03 (<i>s</i>)	3,94 (<i>s</i>)
8-OCH ₃	3,98 (<i>s</i>)	3,90 (<i>s</i>)

A Figura 4.12 apresenta propostas de fragmentação para a substância

5.

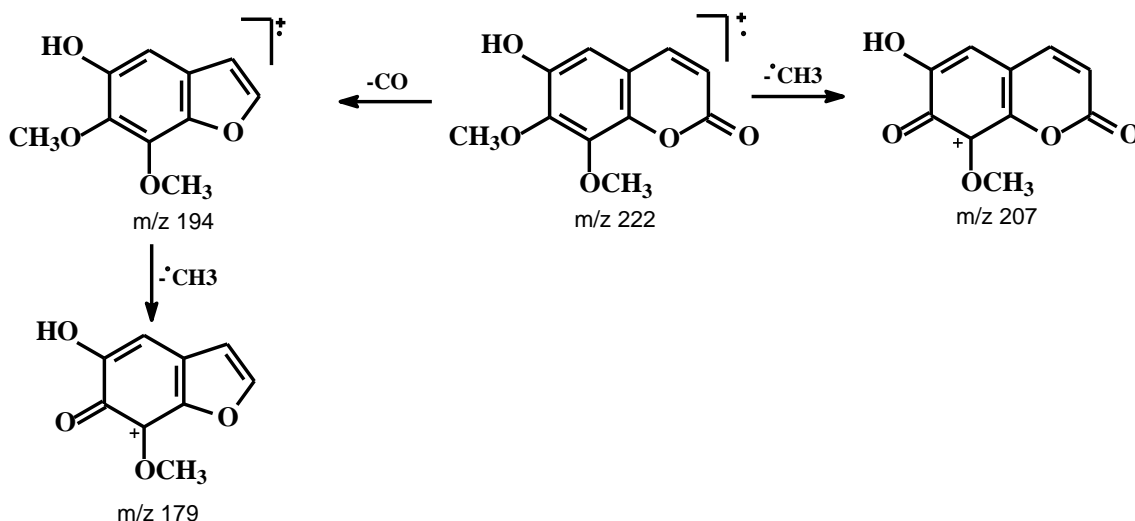


Figura 4.12: Proposta de fragmentação para a substância 5.

4.4- Compostos fenólicos

4.4.1- Determinação Estrutural da Substância 6

A substância 6 foi isolada do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* e caracterizados por RMN de ^1H e HMBC.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.13) da substância 6 apresentou um duplo dubleto em δ 6,60 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz e 7,7 Hz) e dois dubletos em δ 7,40 (1H,

d, $J = 15,8$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos em relação *trans* e δ 9,66 (1H, d, $J = 7,7$ Hz) característicos de hidrogênios aldeídicos. Observam-se ainda dubletos em δ 7,07 (1H, d, $J = 1,8$ Hz) e δ 6,97 (1H, d, $J = 8,2$ e um duplo dubleto δ 7,13 (1H, dd, $J = 8,2$ e 1,8 Hz), que sugerem a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído. Observa-se um singlete em δ 3,96 atribuído a metoxila, o que sugeriu ser esta, juntamente com um grupo hidroxila, os substituintes do anel aromático.

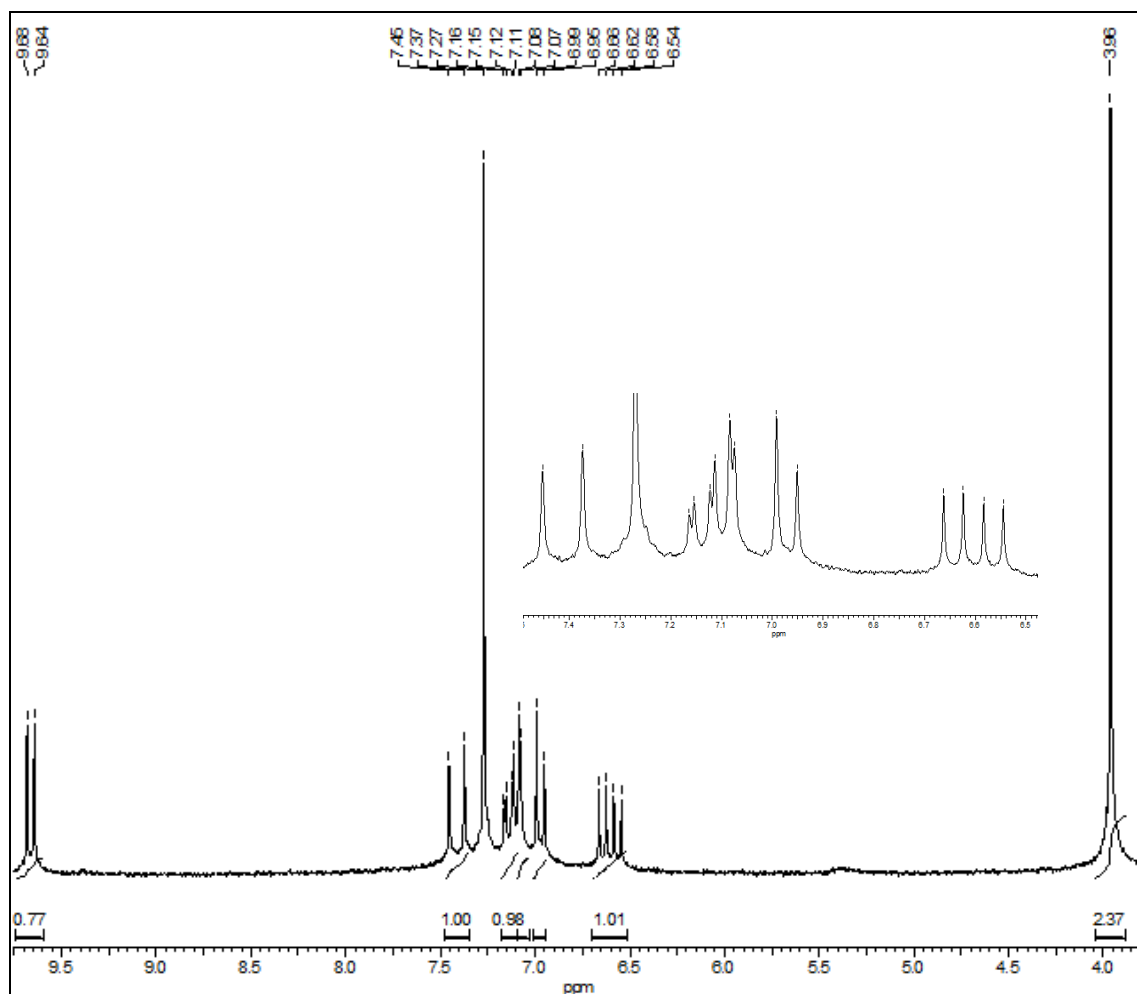


Figura 4.13: Espectro de RMN ^1H da substância **6** (200 MHz, CDCl_3)

A análise do mapa de contorno de HMBC (Figura 4.14) mostra as correlações entre hidrogênios e os carbonos a três ligações. O sinal dos hidrogênios da metoxila em δ 3,96 mostra correlação com um sinal em δ 147,0 atribuído ao carbono C-3'. O sinal do hidrogênio H-2 (δ 6,60) mostra correlação com o C-1' em δ 127,0. O sinal do hidrogênio aromático H-5' mostra correlação com os sinais do C-1' e do C-3'. O sinal do hidrogênio aromático H-2' mostra correlação com os sinais do

C-6' em δ 124,0, do C-4' em δ 148,0 e de um sinal em δ 153,0 atribuído ao carbono C-3. O sinal do hidrogênio H-6' mostra correlação com os sinais do C-2' em δ 108,0, do C-4' e do C-3. Ainda é possível observar para o sinal do hidrogênio H-3 a correlação com os sinais de C-2', de C-6' em δ 124,0 e da carbonila em δ 193,0. Com estas informações foi possível atribuir as posições dos substituintes.

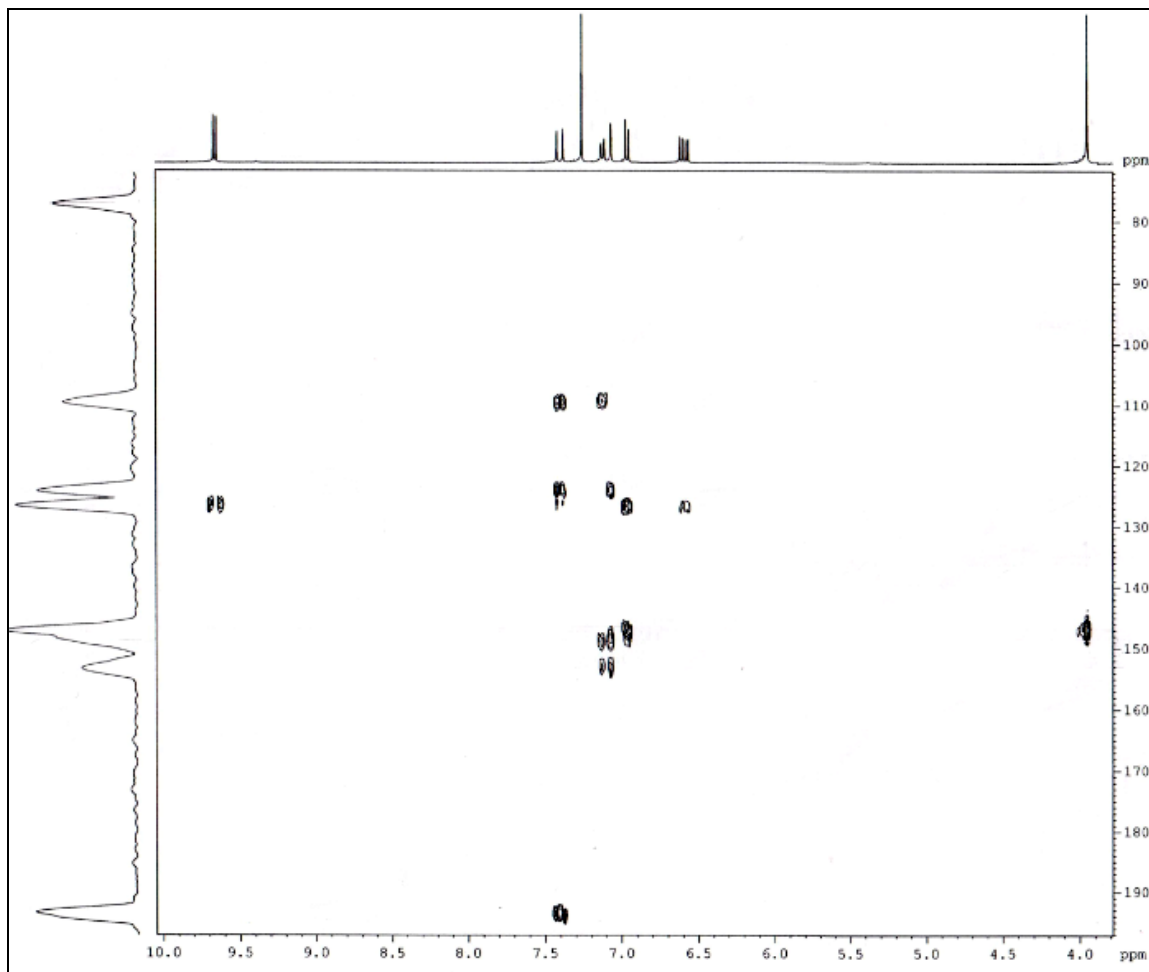


Figura 4.14: Mapa de contorno de HMBC de **6** (400 MHz, CDCl_3)

A análise dos dados obtidos e a comparação com os dados da literatura indicam que a substância **6** é conhecida como 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído isolada anteriormente de *Melia azedarach* L. (CARPINELLA *et al.*, 2003). Entretanto as atribuições indicadas por esses autores estão erroneamente atribuídas. Os dados de RMN de ^1H da substância **6** assim como os dados descritos na literatura estão representados na Tabela 4.3.

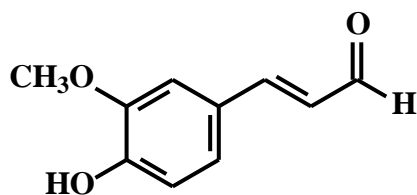


Tabela 4.3: Dados de RMN ^1H da substância **6**.

H	δ ou ppm, J em Hz (CDCl_3 , 200 MHz)	CARPINELLA <i>et al.</i> , 2003 (CDCl_3 , 200 MHz)
1	9,66 (1H, <i>d</i> , $J = 7,7$)	9.65 (1H, <i>d</i> , $J = 7.7$)
2	6,60 (dd, $J = 15,8$ e $7,7$)	6.59 (1 H, <i>q</i> , $J = 7.8$)
3	7,91 (<i>d</i> , $J = 15,8$)	7.35 (1H, <i>t</i> , $J = 17.9$)
2'	7,07 (1H, <i>d</i> , 1,8)	6.96 (1 H, <i>d</i> , $J = 8,6$)
3'-OCH ₃	3,96 (3H, s)	3.94 (3 H, s).
4'-OH	-	
5'	6,97 (1H, <i>d</i> , $J = 8,2$)	7.07 (1 H, <i>d</i> , $J = 1,8$)
6'	7,13 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,8$)	7.12 (1 H, <i>dd</i> , $J = 8.1, 1.8$)

4.4.2- Determinação Estrutural da Substância **7**

A substância **7** foi isolada do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* e caracterizada por RMN de ^1H e EM.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.15) da substância **7** apresentou sinais em δ 9,82 (1H, s) característicos de hidrogênios aldeídicos e δ 7,15 (2H, s) atribuída aos hidrogênios H-2 e H-6, indicando que o anel aromático encontra-se substituído nas posições C-1, C-3, C-4 e C-5. O singlete em δ 3,82 (6 H) típicos de metoxilas, sugeriram serem estas, juntamente com um grupo hidroxila, os substituintes do anel aromático.

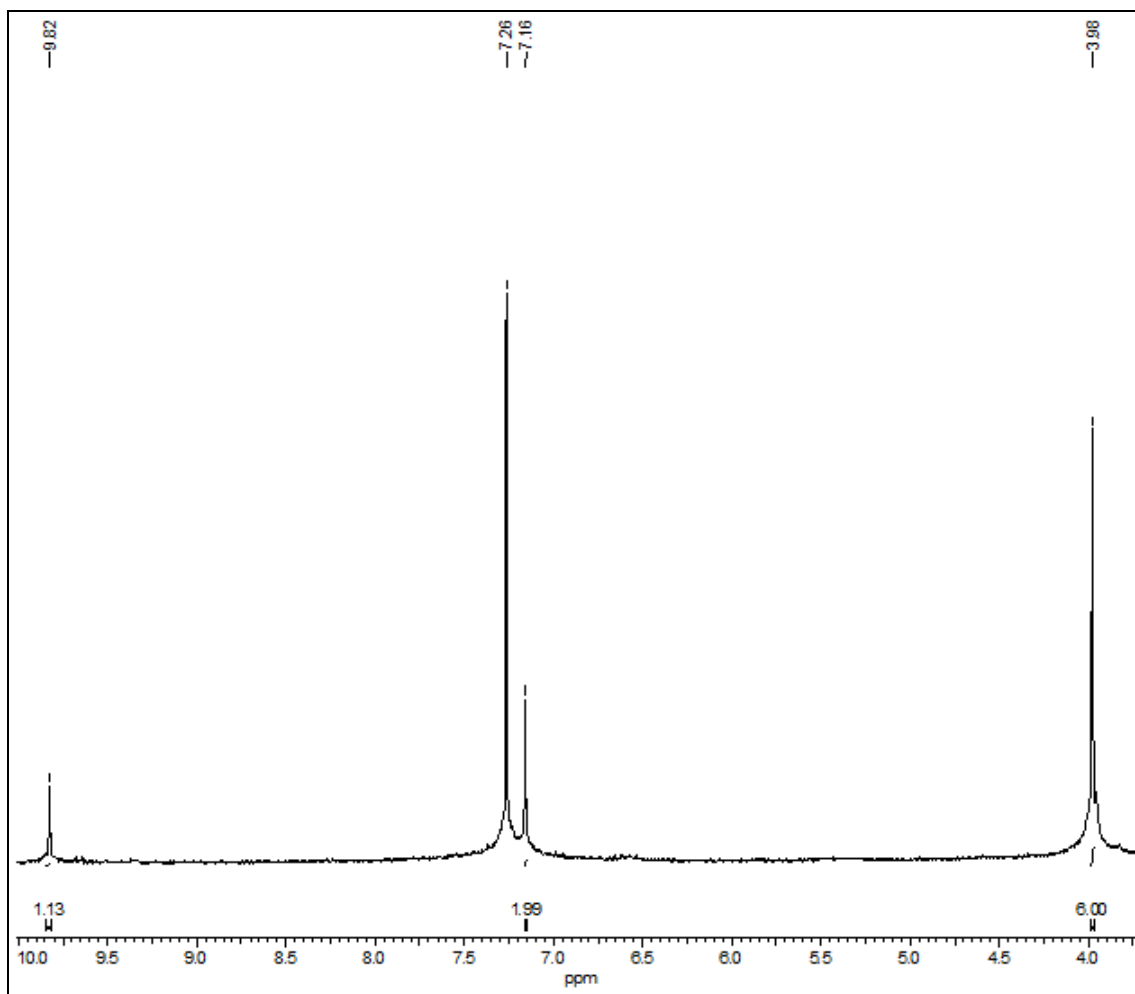
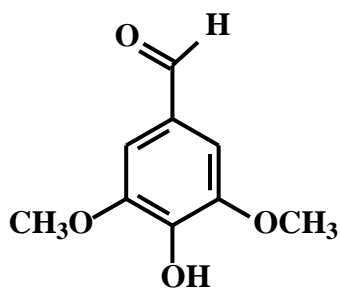


Figura 4.15: Espectro de RMN ^1H da substância **7** (200 MHz, CDCl_3)

O espectro de massas da substância **7** (Figura 4.16) exibiu o pico do íon molecular m/z 182, confirmando os substituintes propostos para a estrutura.

Esses dados permitiram identificar a substância **7** como sendo a 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído. Os dados de RMN de ^1H da substância **7** assim como os dados descritos na literatura estão dispostos na Tabela 4.4.



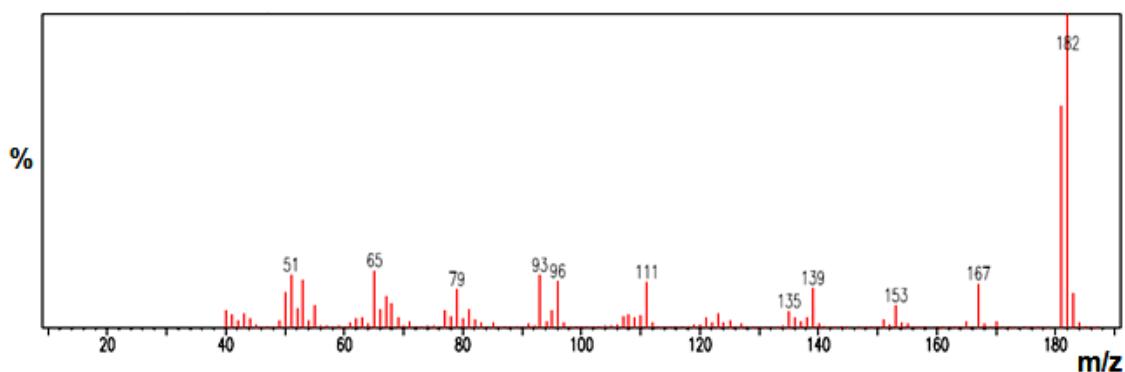


Figura 4.16: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância 7.

Tabela 4.4: Dados de RMN ^1H da substância 7.

H	7 (CDCl_3 , 200 MHz)	PETTIT <i>et al.</i> , 2009 (CDCl_3 , 300 MHz)
2/6	7,15 (2H, s)	7,15 (2H, s)
3/5- OCH_3	3,96 (6H, s)	3,97 (6H, s)
7	9,82 (1H, s)	9,82 (1H, s)

4.4.3- Determinação Estrutural da Substância 8

A substância **8** foi isolada do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* e caracterizada por RMN de ^1H e EM.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.17) da substância **8** apresentou um duplo dubleto δ 6,64 (1H, d, $J = 16$ Hz e 7,7 Hz) e dois dubletos em δ 7,40 (1H, d, $J = 16$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos em relação *trans* e δ 9,66 (1H, d, $J = 7,7$ Hz) característicos de hidrogênios aldeídicos. O singleto em δ 6,81 (2H, s) sugere a presença de um anel aromático 3,4,5-trissubstituído. Observou-se ainda um singleto em δ 3,94 (6H, s) atribuído a duas metoxilas, o que sugeriram ser estas, juntamente com um grupo hidroxila, os substituintes do anel aromático.

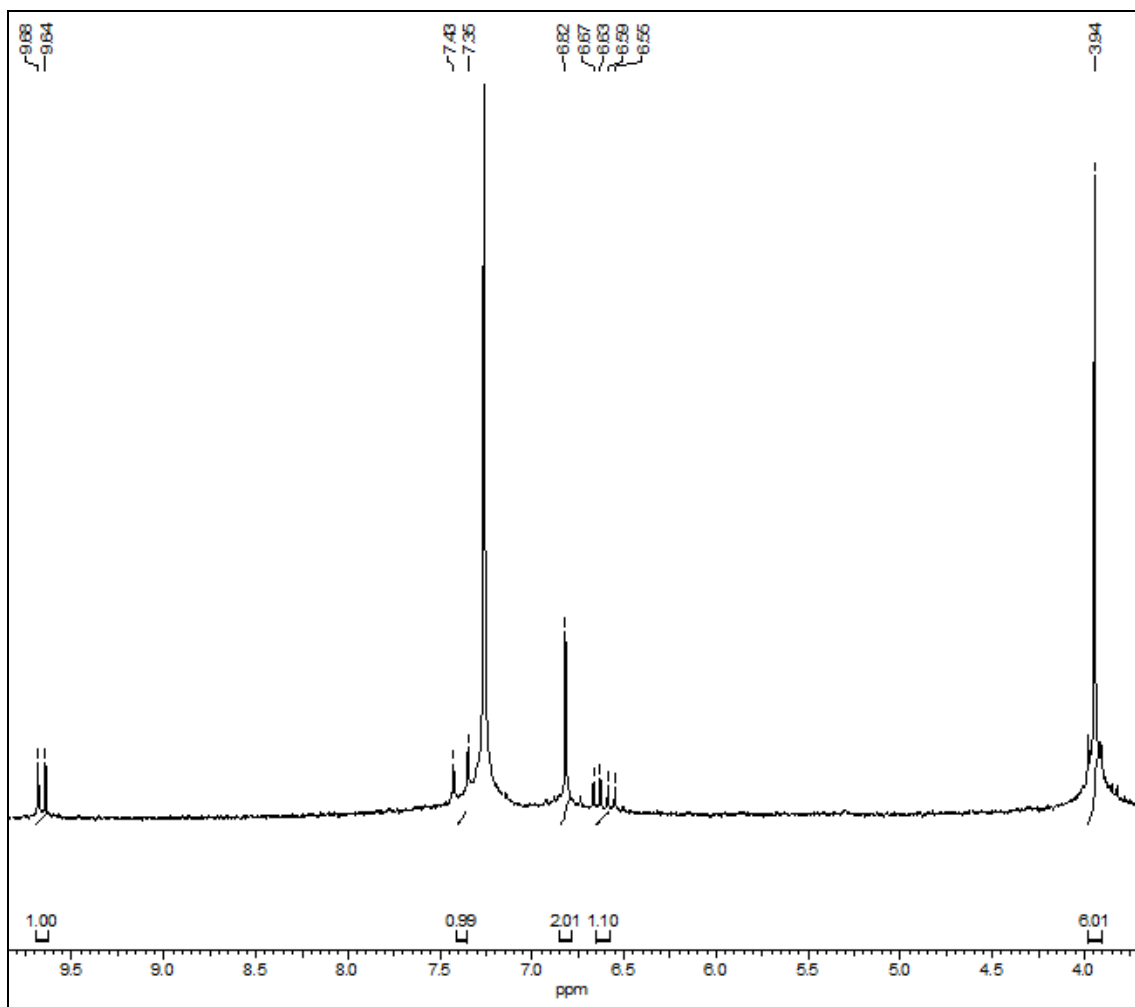
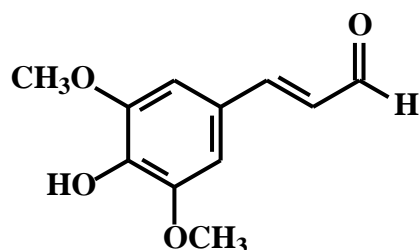


Figura 4.17: Espectro de RMN ^1H da substância **8** (200 MHz, CDCl_3)

O espectro de massas da substância **8** (Figura 4.18) exibiu o pico do íon molecular m/z 208, confirmando os substituintes propostos para a estrutura.

Esses dados permitiram identificar a substância **8** como sendo a 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinamaldeído. Os dados de RMN de ^1H dessa substância assim como os dados obtidos na literatura estão descritos na Tabela 4.5.



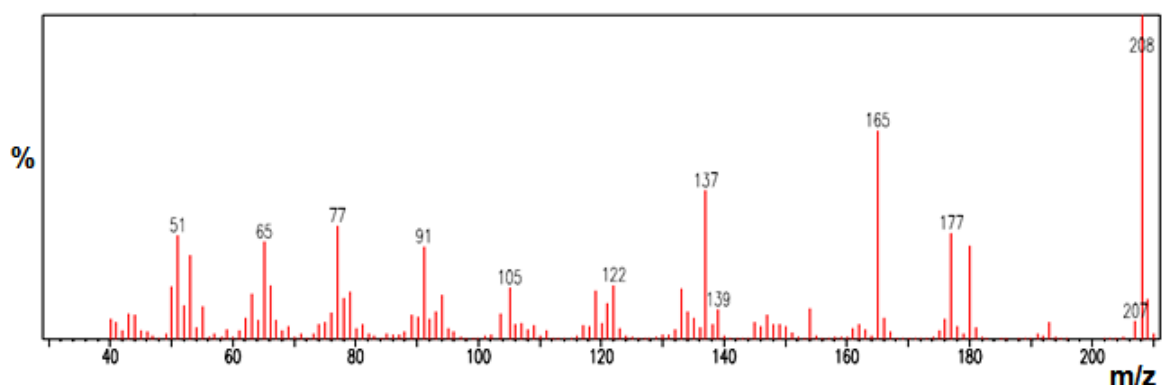


Figura 4.18: Espectro de massas (ESI = 70 eV) da substância **8**.

Tabela 4.5: Dados de RMN ^1H da substância **8**.

H	δ ou ppm, J em Hz (CDCl_3 , 200 MHz)	SAKAKIBARA <i>et al.</i> , 2007 (CDCl_3 , 400 MHz)
1	9,66 (1H, d, $J = 7,7$)	9,65 (1H, d, $J = 7,6$)
2	6,64 (1H, dd, $J = 16$ e $7,7$)	6,60 (1H, dd, $J = 15,8$ e $7,8$)
3	7,40 (1H, d, $J = 16$)	7,38 (1H, d, $J = 15,8$)
2'/6'	6,81 (2H, s)	6,80 (2H, s)
3'/5'- OCH_3	3,94 (6H, s)	3,93 (6H, s)
4'-OH	-	-

4.4.4- Determinação Estrutural da Substância **9**

A substância **9** foi isolada da fração diclorometano do extrato metanólico do caule de *Trichilia elegans* e caracterizados por RMN de ^1H e EM.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.19) da substância **9** mostra um multiplete em δ 7,64 integrando para dois hidrogênios e dubleto em δ 6,93 ($J = 8,6$ Hz) integrado para um hidrogênio na região aromática. Observa-se também um singlete integrando para três hidrogênios em δ 3,98 que pode ser atribuído a uma metoxila.

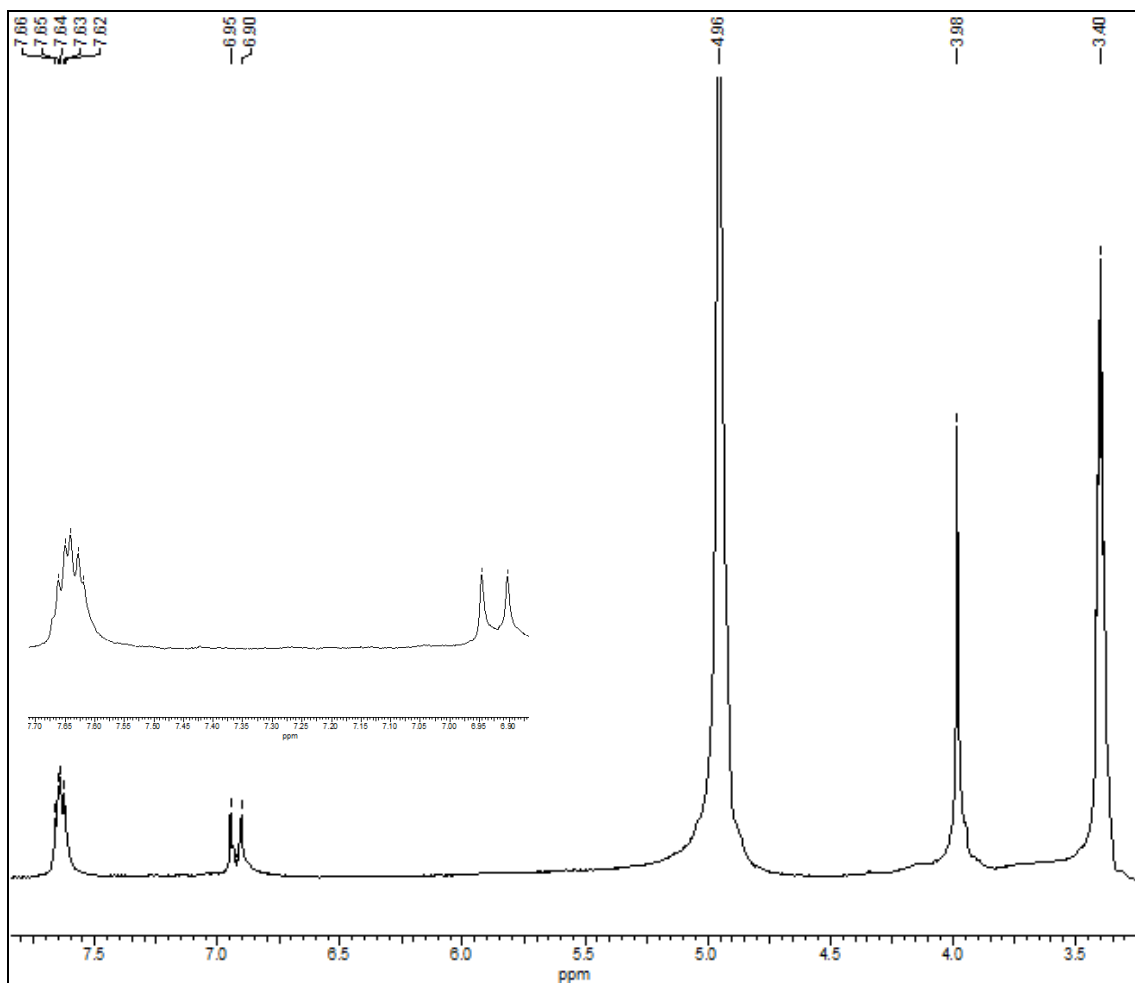
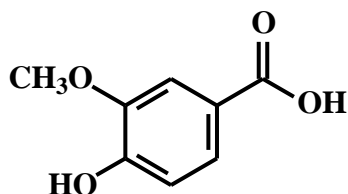


Figura 4.19: Espectro de RMN ^1H da substância **9** (200 MHz, MeOD)

O espectro de massas da substância **9** (Figura 4.20) exibiu o pico do íon quase molecular m/z 168, confirmando os substituintes propostos para a estrutura.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (SOUZA, 2003) indicam que a substância **9** é um composto fenólico conhecido com o ácido vanílico, que é amplamente distribuído no reino vegetal. Os dados RMN de ^1H da substância **9** assim como os dados da literatura estão representados na Tabela 4.6.



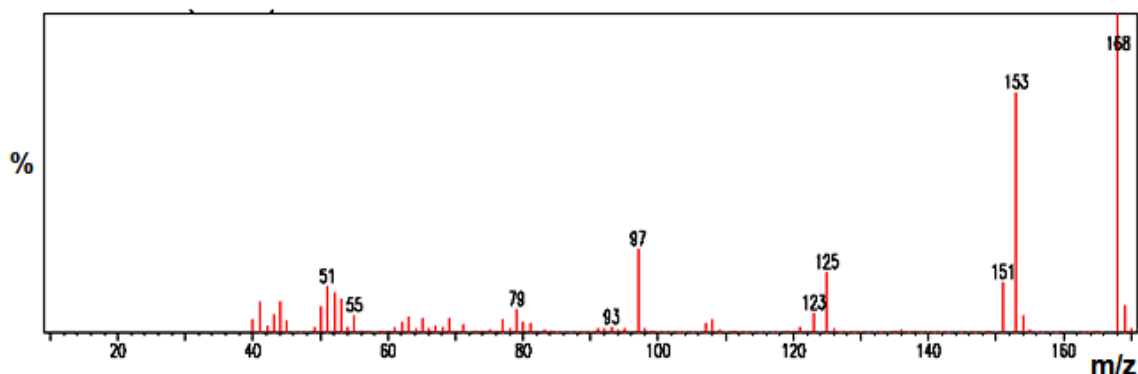


Figura 4.20: Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **9**.

Tabela 4.6: Dados de RMN ^1H da substância **9**.

H	δ ou ppm, J em Hz (MeOD, 200 MHz)	SOUZA, 2003 (CDCl_3 , 200 MHz)
2	7,64 (m)	7,58 (1H, d, $J = 1,8$)
5	6,93 (1H, dd, $J = 8,6$)	6,96 (1H, d, $J = 8,3$)
6	7,64 (m)	7,70 (1H dd, $J = 8,3$ e 1,8)
3-OCH ₃	3,98 (6H, s)	3,94 (3H, s)

4.4.5- Determinação Estrutural da Substância **10**

A substância **10** foi isolada do extrato diclorometano do caule de *Trichilia elegans*, sendo a primeira vez relatada neste gênero. Sua estrutura foi determinada com base em espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC como também através da comparação com dados da literatura (BADERSCHNEIDER & WINTERHALTER, 2001).

O espectro de RMN de ^1H da substância **10** (Figura 4.21) mostra dois tripletos em δ 3,18 (2H, t, $J = 5,2$ Hz) e δ 4,02 (2H, t, $J = 5,2$ Hz) referentes aos hidrogênios metilênicos H-2 e H-3, respectivamente. Em δ 3,96 (3H, s) observa-se o sinal de metoxila. Em δ 6,95 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), δ 7,53 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e δ 7,54 (1H, dd, $J = 2$ e 8,8 Hz) observam-se sinais referentes aos hidrogênios aromáticos H-5', H-2' e H-6' respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.22) apresenta sinais de 10 carbonos, cujos valores podem ser observados na Tabela 4.7.

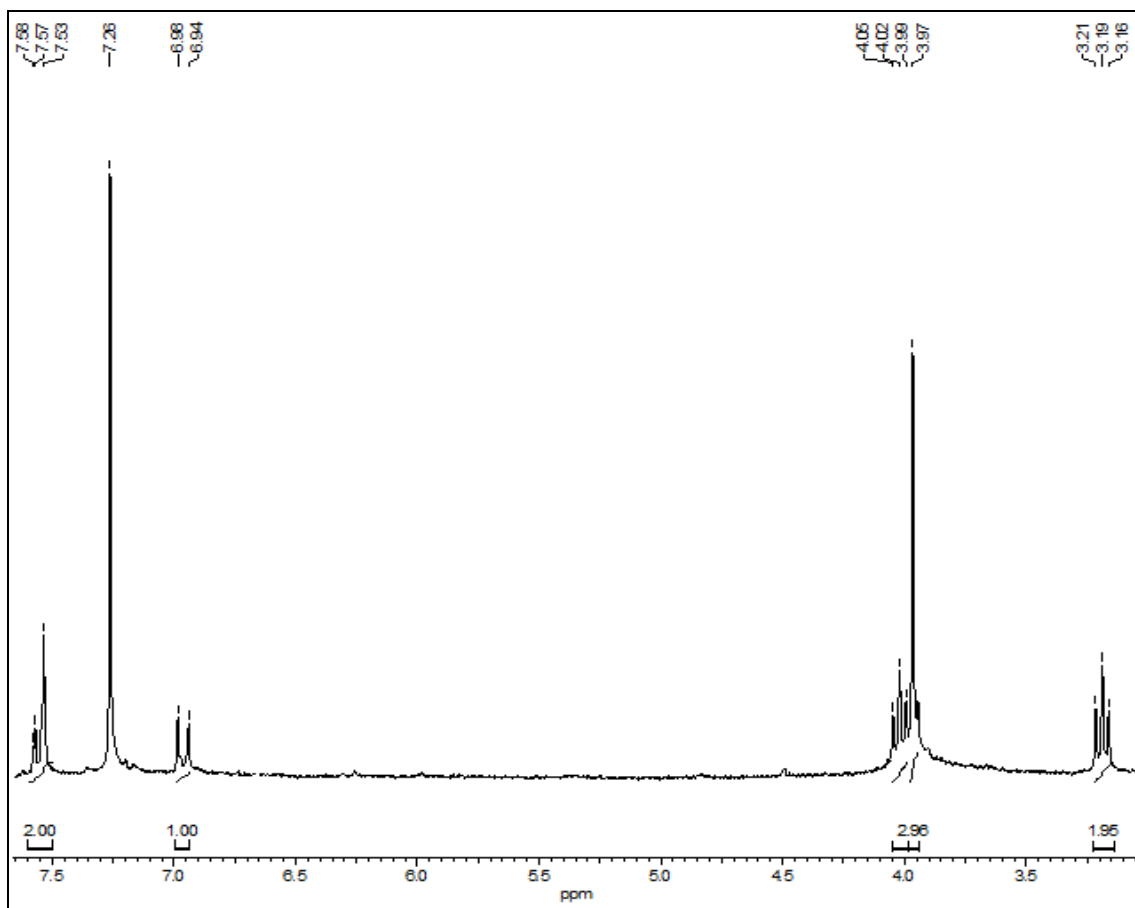


Figura 4.21: Espectro de RMN ^1H da substância **10** (200 MHz, CDCl_3)

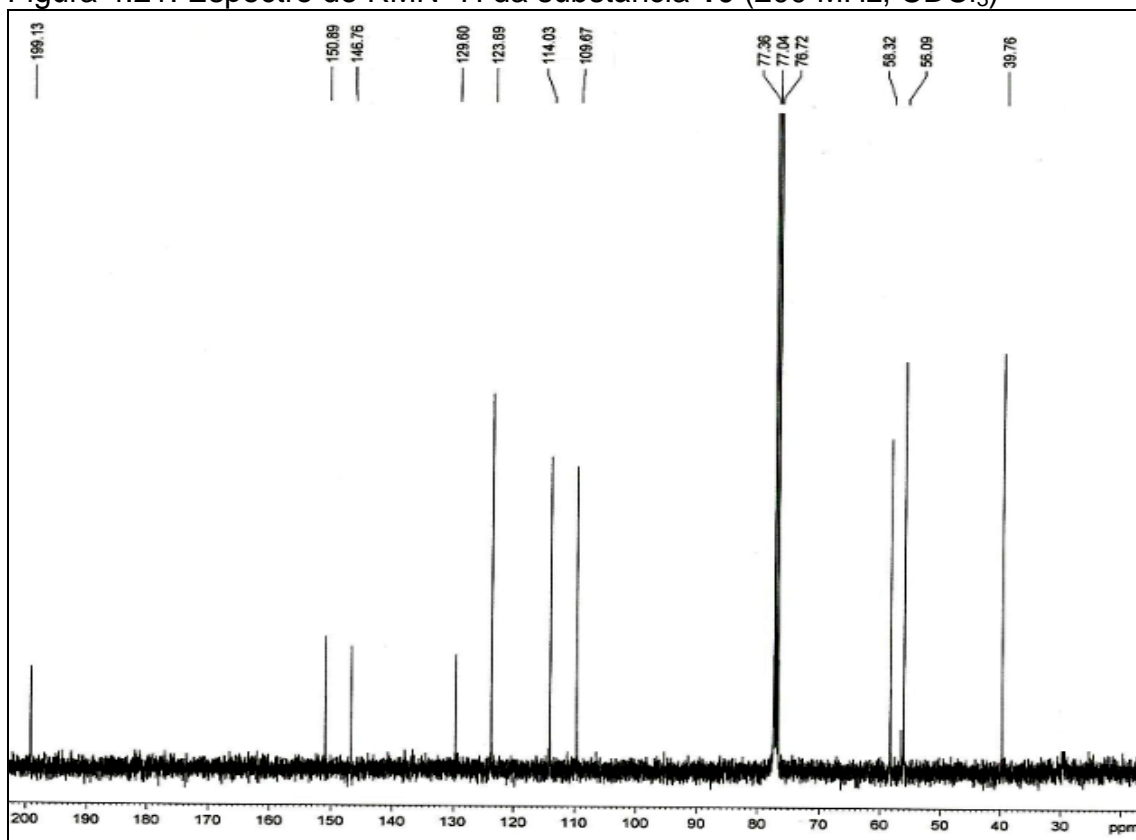


Figura 4.22: Espectro de RMN ^{13}C da substância **10** (100 MHz, CDCl_3)

O espectro de HSQC (Figura 4.23) mostra correlação a J^1 de H-2 em δ 3,18 com C-2 em δ 39,7 e de H-3 em δ 4,20 com C-3 em δ 58,3. A metoxila ligada ao carbono C-3' mostra correlação a J^1 com o carbono em δ 56,0. Os sinais dos hidrogênios aromáticos H-5', H-2' e H-6' mostram correlação a J^1 com os carbonos em δ 114,0 δ 109,6 e δ 123,6 respectivamente.

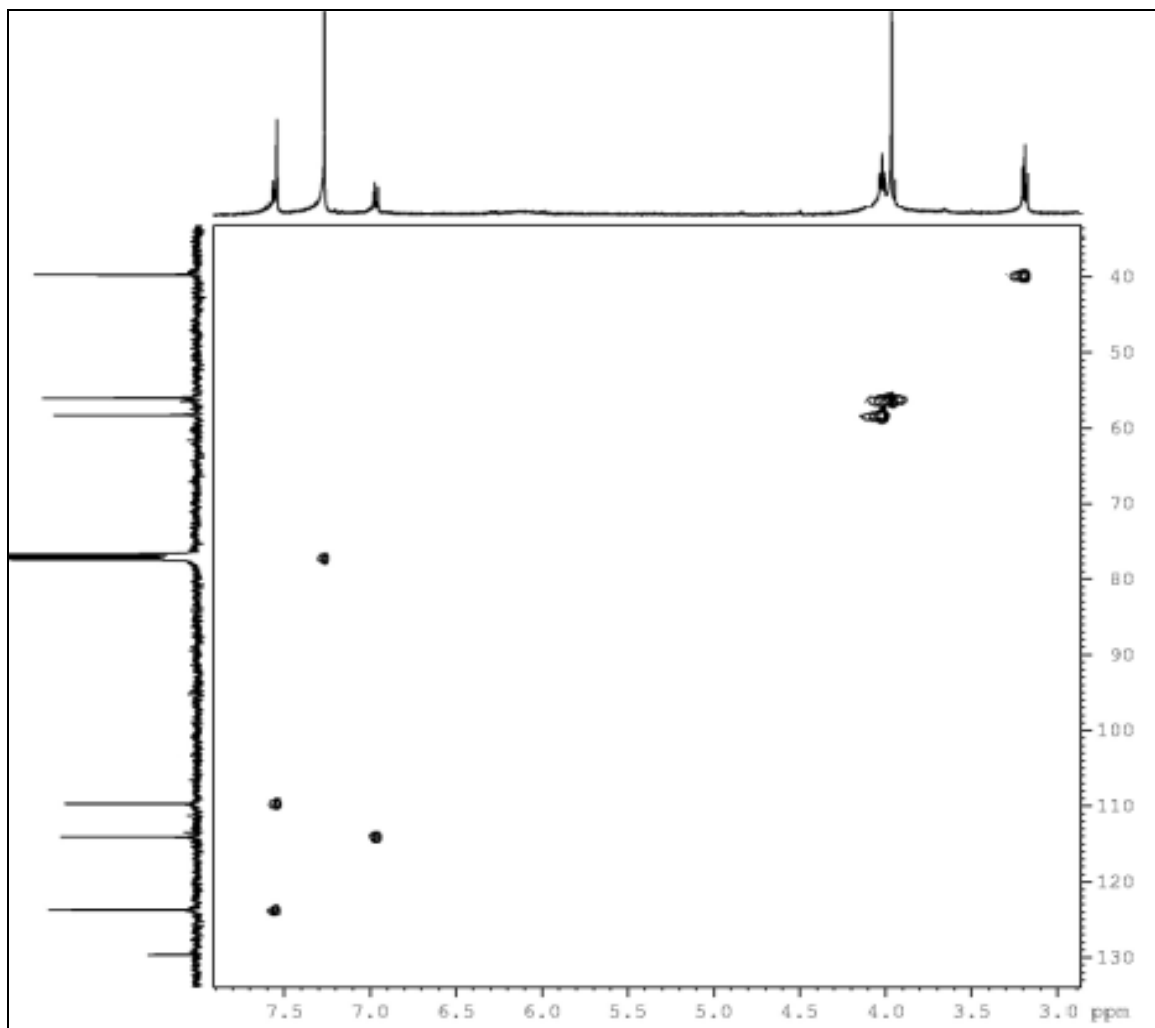


Figura 4.23: Mapa de contorno de HSQC da substância **10** (400 MHz, CDCl_3)

No espectro de HMBC (Figura 4.24) o sinal do hidrogênio H-3 (δ 4,20) mostra correlação com os sinais de C-2 em δ 39,7 e com o da carbonila em δ 199,1 e o sinal do hidrogênio H-2 (δ 3,18) mostra correlação com os de C-3 em δ 58,3 e com a carbonila em δ 199,1. O sinal dos hidrogênios da metoxila em δ 3,95 mostra correlação com um sinal em δ 146,7 atribuído ao carbono C-3'. O sinal do hidrogênio aromático H-2' mostra correlação com os sinais de C-3' em δ 146,7, de C-6' em δ

123,6, da carbonila em δ 199,1 e com um sinal em δ 129,6 atribuído ao carbono C-1'. O sinal do hidrogênio aromático H-5' mostra correlação com os sinais do C-1' em δ 129,6, do C-3' em δ 146,7 e de um sinal em δ 150,8 atribuído ao carbono C-4'. Ainda é possível observar para o sinal do hidrogênio H-6' a correlação com os sinais de C-2' em δ 109,6, de C-4' em δ 150,8 e da carbonila em δ 199,1.

Dessa forma foi possível determinar a substância **10** como sendo a 3-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propan-1-one. Os dados RMN de ^1H e ^{13}C da substância **10** assim como os da literatura estão representados na Tabela 4.7.

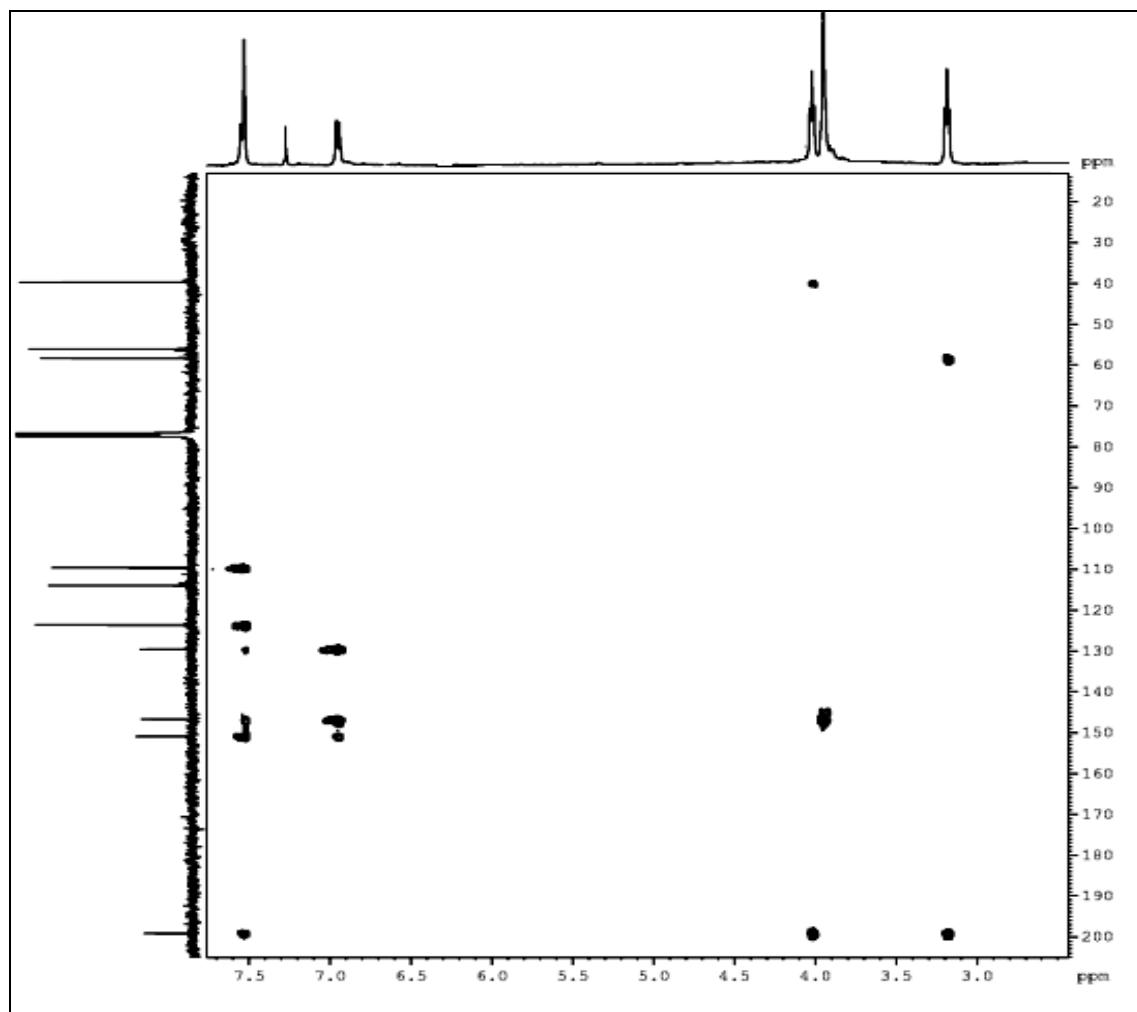
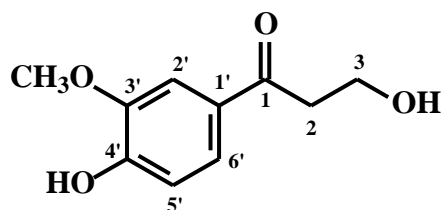


Figura 4.24: Mapa de contorno de HMBC da substância **10** (400 MHz, CDCl_3)

Tabela 4.7: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **10**.

H	δ ou ppm, J em Hz (400 MHz, CDCl_3)	δ ou ppm (400 MHz, CDCl_3)	(BADERSCHNEIDER & WINTERHALTER., 2001) (300 MHz, CDCl_3)
1	-	199,1	-
2	3,18 (2H, t, $J = 5,2$)	39,7	3,16 (2H, t, $J = 6,5$)
3	4,03 (2H, t, $J = 5,2$)	58,3	3,94 (2H, t, $J = 6,5$)
1'	-	129,6	-
2'	7,53 (1H, d, $J = 2,0$)	109,6	7,55 (1H, d, $J = 2$)
3'	-	146,7	-
4'	-	150,8	-
5'	6,95 (1H, d, $J = 8,8$)	114,0	6,87 (1H, d, $J = 8$)
6'	7,54 (1H, dd, $J = 2,0$ e $8,8$)	123,6	7,58 (1H, dd, $J = 2$ e 8)
3-OCH ₃	3,96 (3H, s)		3,91 (3H, s)

4.4.6- Determinação Estrutural da Substância 11

A substância **11** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

O espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da substância **11** (Figura 4.25) mostra três sinais integrando para um hidrogênio cada na região hidrogênios ligados a anel aromática. Um duplo dubleto em δ 6,56 (1H, dd, $J = 8,4$ e $3,2$ Hz), um dubleto em δ 7,11 (1H, d, $J = 3,2$ Hz) e um dubleto em δ 6,42 (1H, d, $J = 8,4$ Hz). O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 4.26) mostra sinais referentes a 7 carbonos. O sinal em δ 171,12 sugere a presença de uma carbonila.

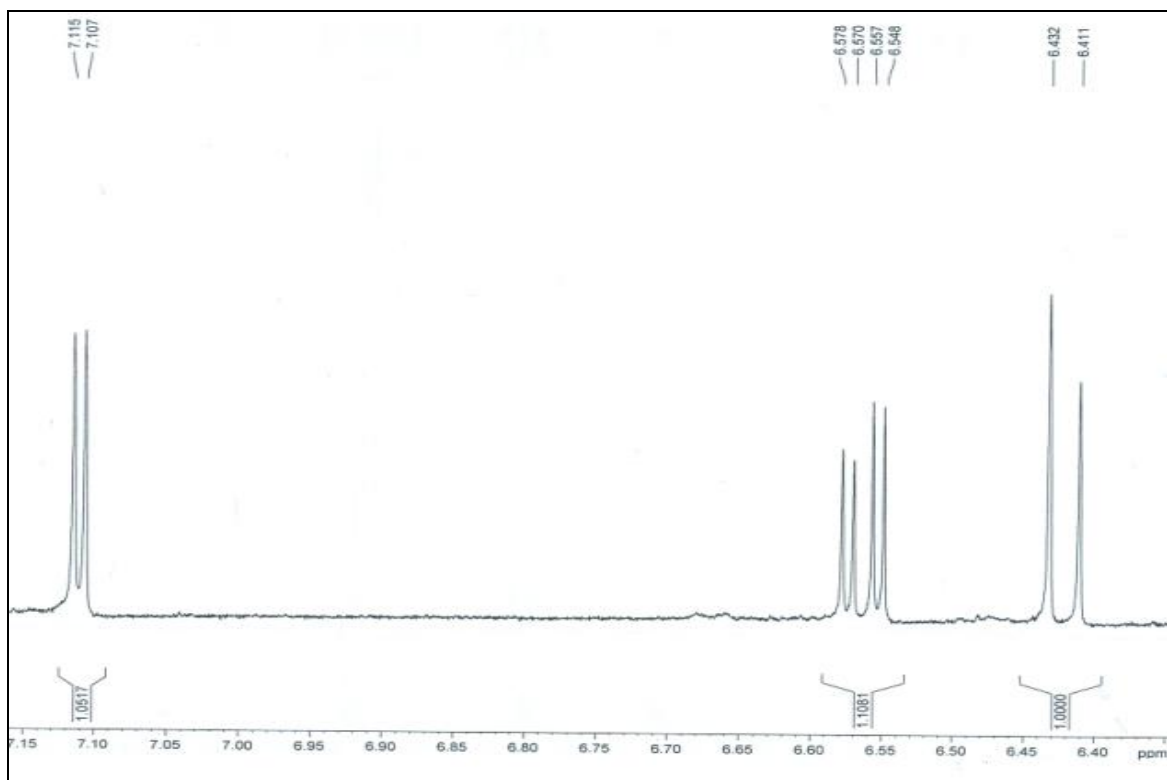


Figura 4.25: Espectro de RMN ^1H da substância **11** (400 MHz, DMSO)

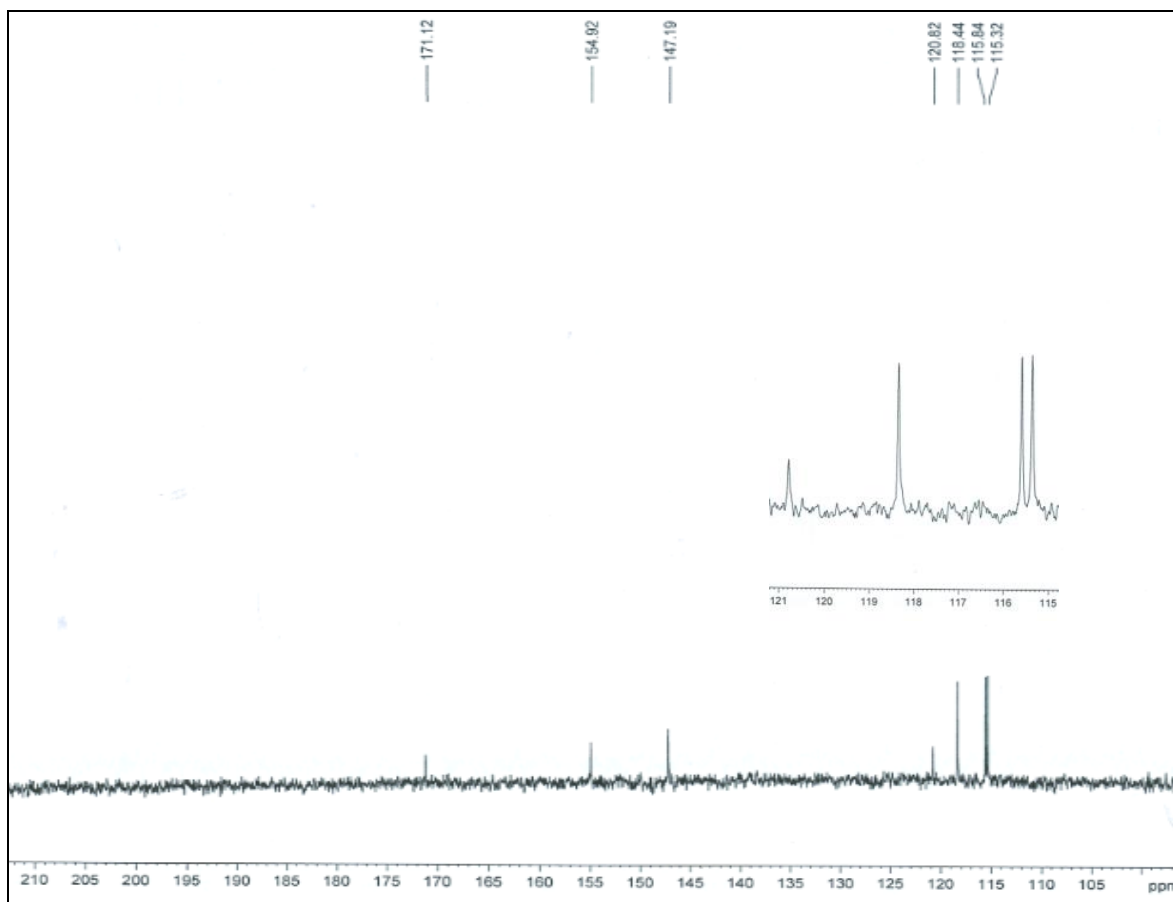


Figura 4.26: Espectro de RMN ^{13}C da substância **11** (400 MHz, DMSO)

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (BELLÉS *et al.*, 1999) indicam que a substância **11** é um composto fenólico conhecido como ácido gentico. Os dados RMN de ^1H da substância **11** assim como os dados da literatura estão representados na Tabela 4.8.

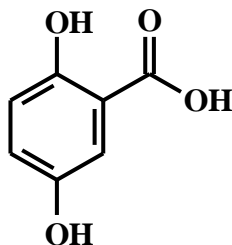


Tabela 4.8: Dados de RMN ^1H da substância **11**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 200 MHz)	BELLÉS <i>et al.</i> , 1999 (MeOD, 300 MHz)
3	6,42 (1H, <i>d</i> , $J = 8,4$)	6,82 (1H, <i>d</i> , $J = 8,8$)
4	6,56 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,6$ e $3,2$)	7,01 (1H, <i>dd</i> , $J = 8,8$ e $3,0$)
6	7,11 (1H, <i>d</i> , $J = 3,2$)	7,30 (1H, <i>d</i> , $J = 3,0$)

4.4.7- Determinação Estrutural da Substância **12**

A substância **12** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.27) da substância **12** apresentou dois dubletos em δ 6,27 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz) e em δ 7,52 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos em relação *trans*. Observam-se ainda um dubleto em δ 6,86 (1H, *d*, 8,1 Hz), um duplo dubleto δ 7,07 (1H, *dd*, $J = 8,1$ e $1,8$ Hz) e um dubleto em δ 7,14 (1H, *d*, $J = 1,8$) que sugerem a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO) (Figura 4.28) mostra sinais referentes a 9 carbonos.

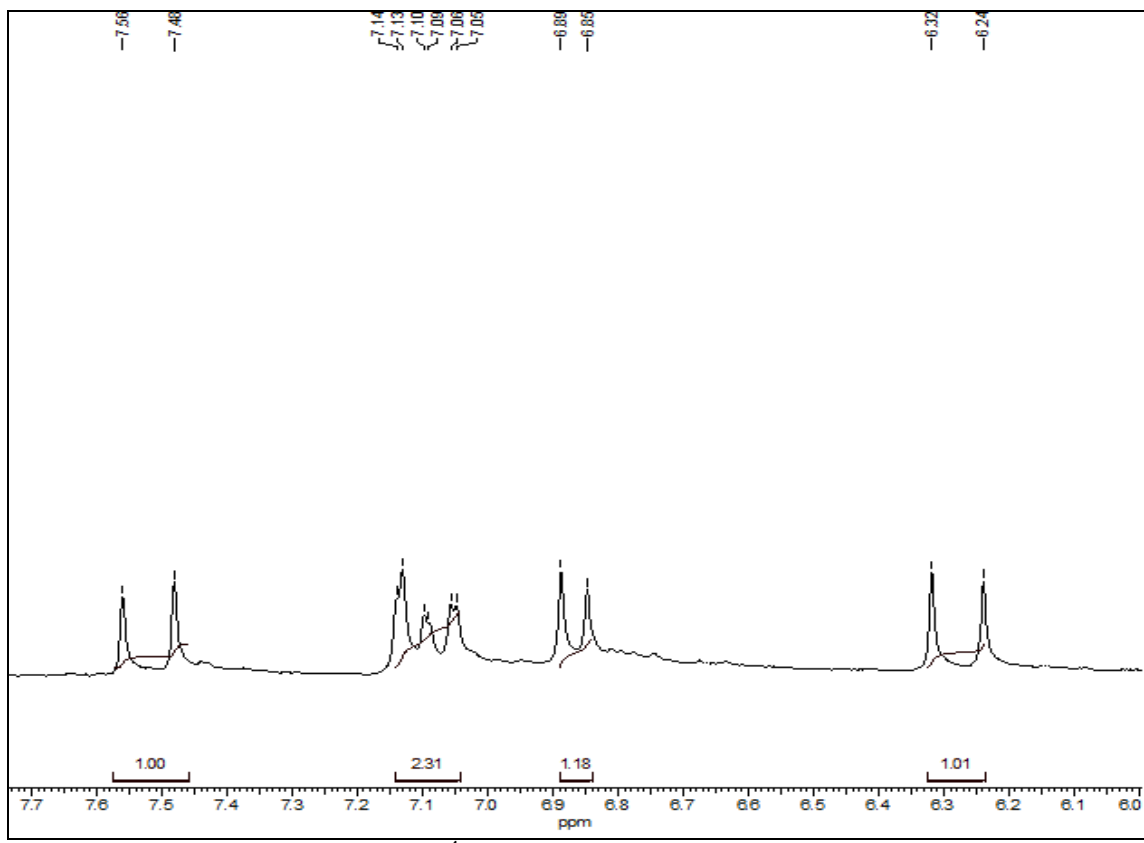


Figura 4.27: Espectro de RMN ¹H da substância **12** (200 MHz, DMSO)

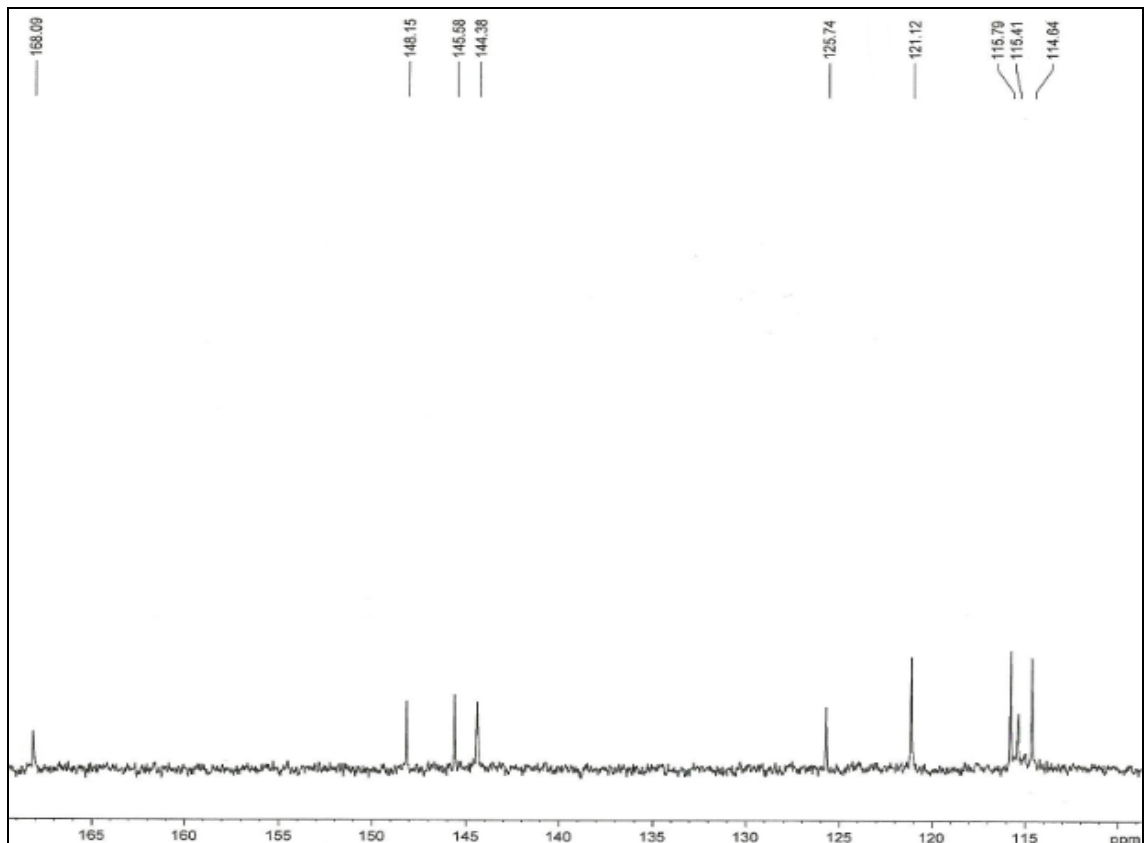


Figura 4.28: Espectro de RMN ¹³C da substância **12** (100 MHz, DMSO)

A análise dos dados obtidos e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **12** é conhecida como ácido caféico. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância **12** assim como os dados descritos na literatura estão descritos na Tabela 4.9.

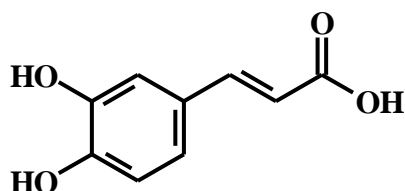


Tabela 4.9: Dados de RMN ^1H da substância **12**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 200 MHz)	δ ou ppm (DMSO, 100 MHz)	FLAMINI <i>et al.</i> ,2001 (MeOD, 200 MHz)
1	-	168,1	
2	6,27 (1H, t, $J = 15,8$)	115,7	6,22 (1H, t, $J = 15,6$)
3	7,52 (1H, t, $J = 15,8$)	145,5	7,51 (1H, t, $J = 15,6$)
1'	-	125,7	
2'	7,14 (1H, d, $J = 1,8$)	114,6	7,03 (1H, d, $J = 2,0$)
3'	-	148,1	
4'	-	144,3	
5'	6,86 (1H, d, $J = 8,1$)	115,4	6,77 (1H, d, $J = 8,2$)
6'	7,07 (1H, dd, $J = 8,1$ e $1,8$)	121,1	6,94 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,0$)

4.4.8- Determinação Estrutural da Substância **13**

A substância **13** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.29) da substância **13** apresentou dois dubletos em δ 6,75 (2H, d, $J = 9$ Hz) e em δ 7,12 (2H, d, $J = 9$ Hz) que sugere a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído. Observa-se ainda um singlete em δ 3,37 referentes aos hidrogênios metilênicos.

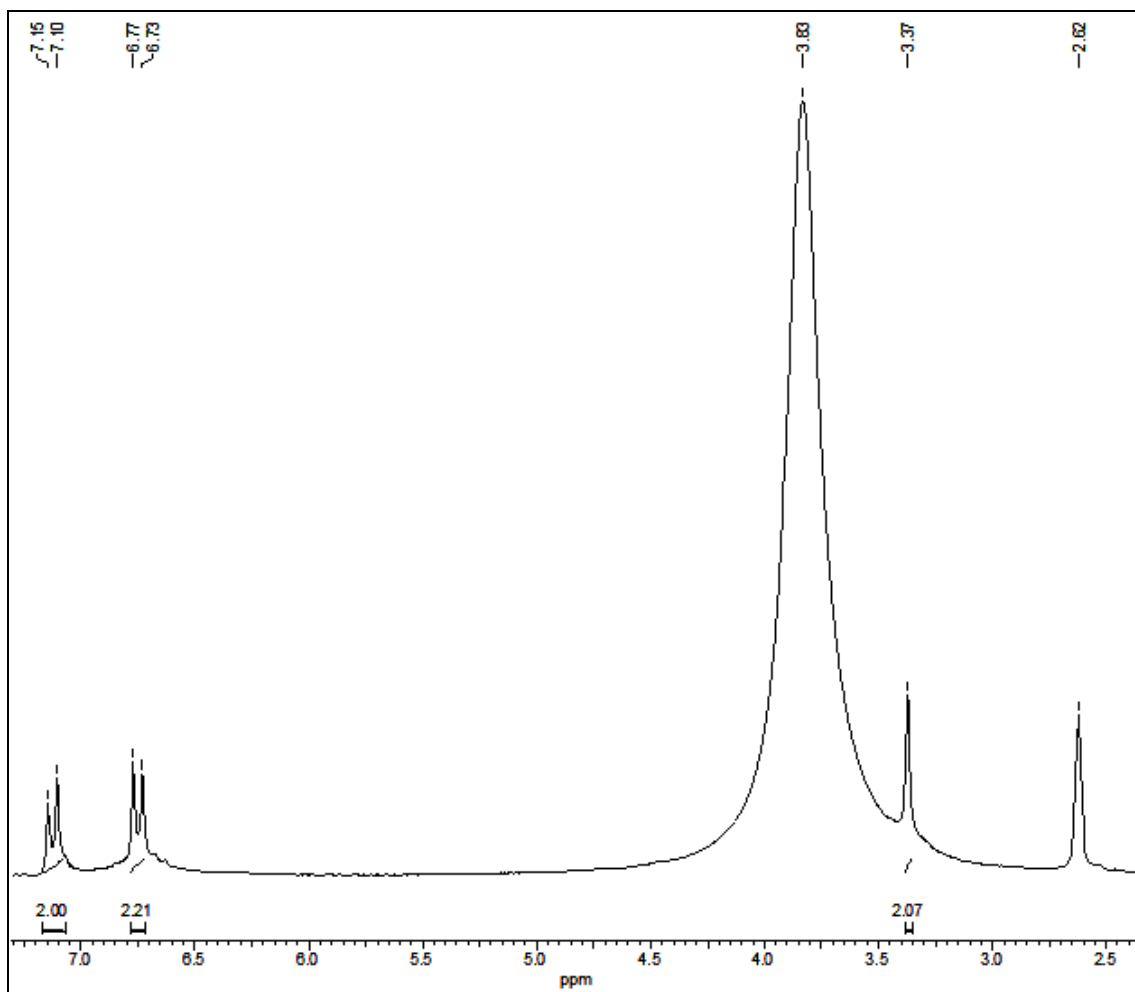
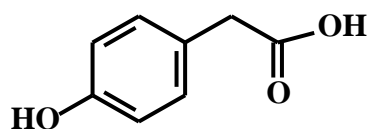


Figura 4.29: Espectro de RMN ^1H da substância **13** (200 MHz, DMSO)

O espectro de massas da substância **13** (Figura 4.30) exibiu o pico do íon molecular m/z 152, confirmando a fórmula molecular proposta para a estrutura.

A análise dos dados e a comparação com dados da literatura (DIB *et al.*, 2010) indicam que a substância **13** é o composto fenólico ácido 4-hidroxifenilacético. Os dados RMN de ^1H da substância **13** assim como os da de RMN ^1H da literatura estão dispostos na Tabela 4.10.



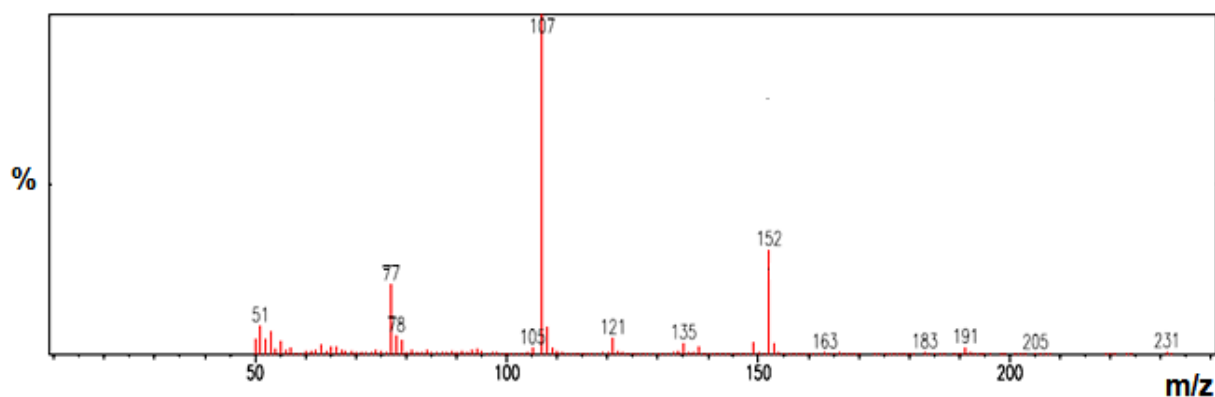


Figura 4.30: Espectro de massas (IE = 70 eV) da substância **13**.

Tabela 4.10: Dados de RMN ^1H da substância **13**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 200 MHz)	DIB <i>et al.</i> , 2010 (MeOD, 200 MHz)
2	3,37 (s)	3,30 (s)
2'/6'	7,12 (2H, d , $J = 9$)	7,10 (2H, d , $J = 8,8$)
3'/5'	6,75 (2H, d , $J = 9$)	6,70 (2H, d , $J = 8,8$)

4.4.9- Determinação Estrutural da Substância 14

A substância **14** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.31) da substância **14** mostra dois dubletos em δ 7,38 e δ 6,28 (1H, $J = 16,0$ Hz), característico de hidrogênios olefínicos em relação *trans*, quatro dubletos em δ 7,75 e δ 6,77 (2H, $J = 8,6$ Hz) e em δ 7,44 e δ 6,78 (2H, $J = 8,6$ Hz) que sugerem a presença de dois anéis aromáticos *para* substituídos.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.32) mostra 13 sinais sendo que os sinais em δ 131,0; δ 129,0; δ 114,7 e δ 115,3 são referentes a dois carbonos equivalentes cada. Observa-se também os sinais em δ 168,0 e δ 169,0 que sugere a presença de duas carbonilas.

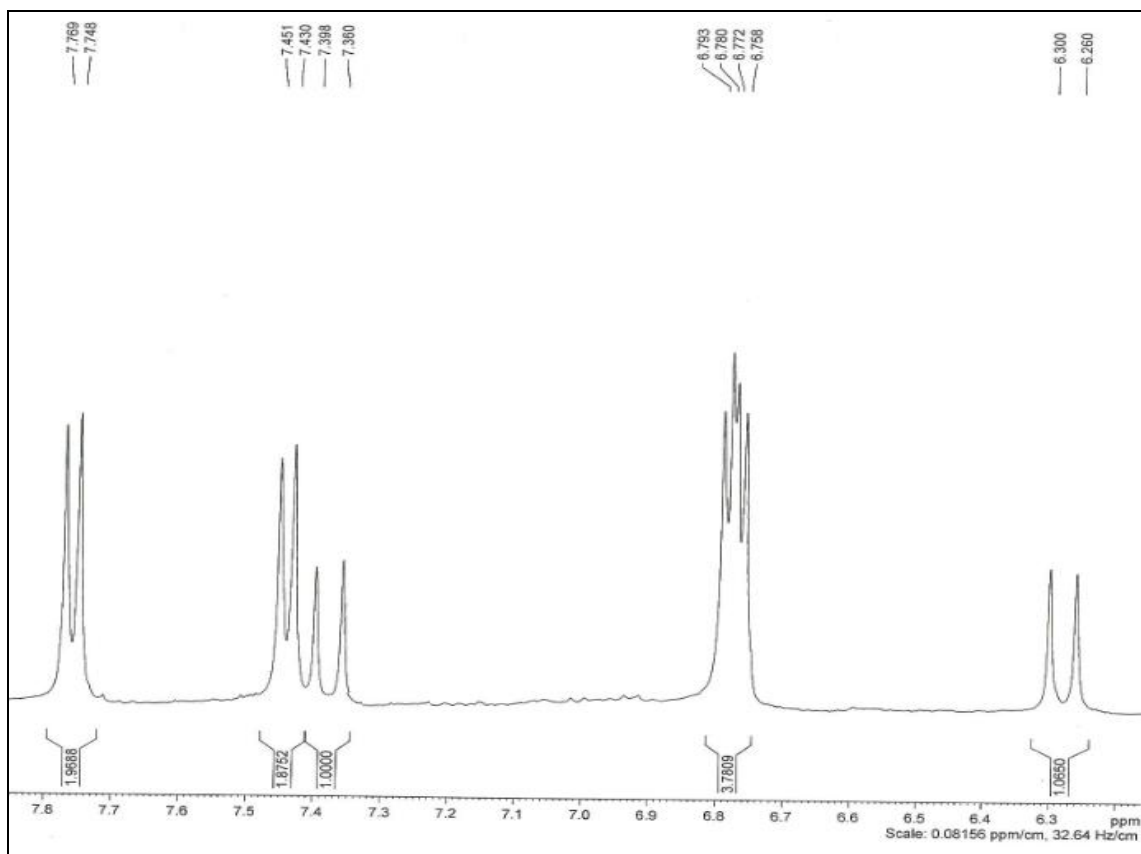


Figura 4.31: Espectro de RMN ^1H da substância **14** (400 MHz, DMSO)

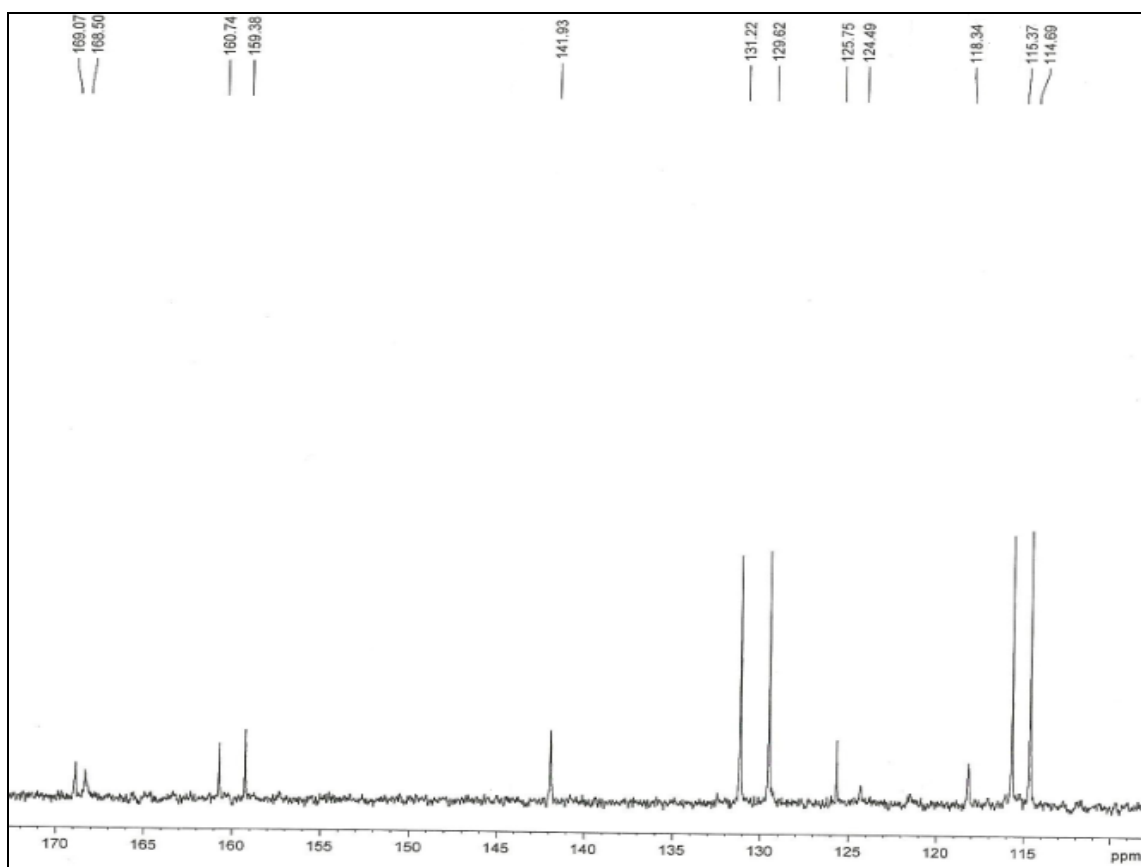
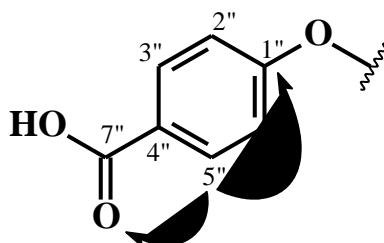


Figura 4.32: Espectro de RMN ^{13}C da substância **14** (100 MHz, DMSO)

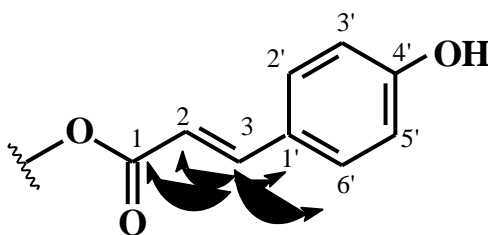
Ao analisar o espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (Figura 4.33) observou-se que o duplete em δ 7,75 ($J= 8,6$ Hz) acopla com o sinal em δ 6,77 (2H, $J= 8,6$ Hz), o sinal em δ 7,44 ($J= 8,6$ Hz) acopla com o sinal em δ 6,78 (2H, $J= 8,6$ Hz) e o sinal em δ 7,38 ($J= 16,0$ Hz) acopla com o sinal em δ 6,28 (2H, $J= 16,0$ Hz).

O mapa de correlações de HSQC (Figura 4.34) mostra a correlação dos sinais de hidrogênios em δ 7,75, δ 7,44, δ 7,38, δ 6,77, δ 6,78 e δ 6,28 com os dos carbonos em δ 131, δ 129,0, δ 142,0, δ 114,7, δ 115,3 e δ 118, respectivamente.

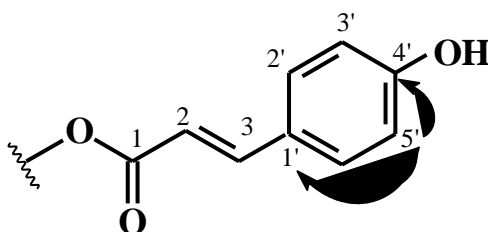
O mapa de correlações HMBC (Figura 4.35) mostra que o sinal em δ 7,75, atribuído aos hidrogênios H-3'' e H-5'', correlaciona-se com os dos carbonos em δ 160,7, δ 114,7 e δ 168 sugerindo estes sinais para os carbonos C-1', C-2''/6'' e C-7', respectivamente.



O duplete em 7,38 atribuído ao hidrogênio H-3 correlaciona-se com os carbonos em δ 169,0, δ 118,0, δ 125,7 e δ 129,0 sugerindo estes sinais para os carbonos C-1, C-2, C-1' e C-2'/6' respectivamente.



O duplete em δ 6,78 atribuído aos hidrogênios H-3' e H-5' mostrou correlação os sinais de C-1' e C-2'/6' e com o do carbono em δ 159,0 atribuído ao carbono C-4'.



A estrutura da substância **14** foi definida como sendo 3-(4'-hidroxifenil) 2-propenoato de (4''-carboxil) fenila relatado pela primeira vez na família Meliaceae.

Este éster foi relatado pela primeira vez na literatura em 2006 por NIU *et al*, entretanto as atribuições e correlações indicadas pelo autor estão erroneamente atribuídas.

Os dados RMN de ^1H e ^{13}C da substância **14** assim como os dados da literatura estão dispostos na Tabelas 4.11 e 4.12, respectivamente.

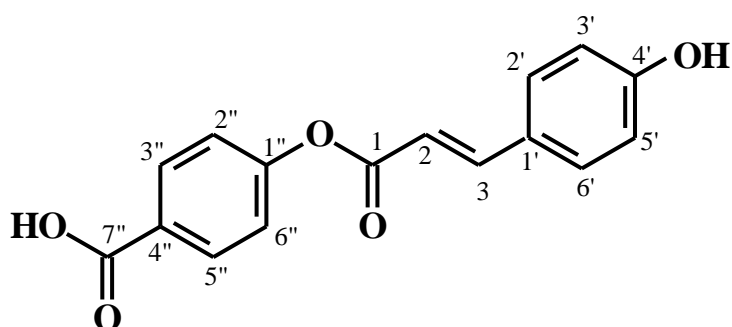


Tabela 4.11: Dados de RMN ^1H da substância **14**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 400 MHz)	(NIU <i>et al.</i> , 2006) (acetona- d_6 , 500 MHz)
2	6,28 (1H, d , $J = 16$)	6,32 (1H, d , $J = 15,5$)
3	7,38 (1H, d , $J = 16$)	7,60 (1H, d , $J = 15,5$)
2'/6'	7,44 (1H, d , $J = 8,6$)	6,91 (1H, d , $J = 7,0$)
3'/5'	6,78 (1H, d , $J = 8,6$)	6,88 (1H, d , $J = 7,0$)
2''/6''	6,77 (1H, d , $J = 8,6$)	7,54 (1H, d , $J = 7,0$)
3''/5''	7,75 (1H, d , $J = 8,6$)	7,91 (1H, d , $J = 7,0$)

Tabela 4.12: Dados de RMN ^{13}C da substância **14**.

C	δ ou ppm	
	(DMSO, 100 MHz)	(NIU <i>et al.</i> , 2006) (acetona- d_6 , 500 MHz)
1	169,0	168,0
2	118,0	115,7
3	142,0	145,5
1'	125,7	127,1
2'/6'	129,0	116,6
3'/5'	115,3	115,8
4'	159,0	160,4
1''	160,7	162,4
2''/6''	114,7	130,9
3''/5''	131,0	132,7
4''	124,3	129,7
7''	168,0	167,3

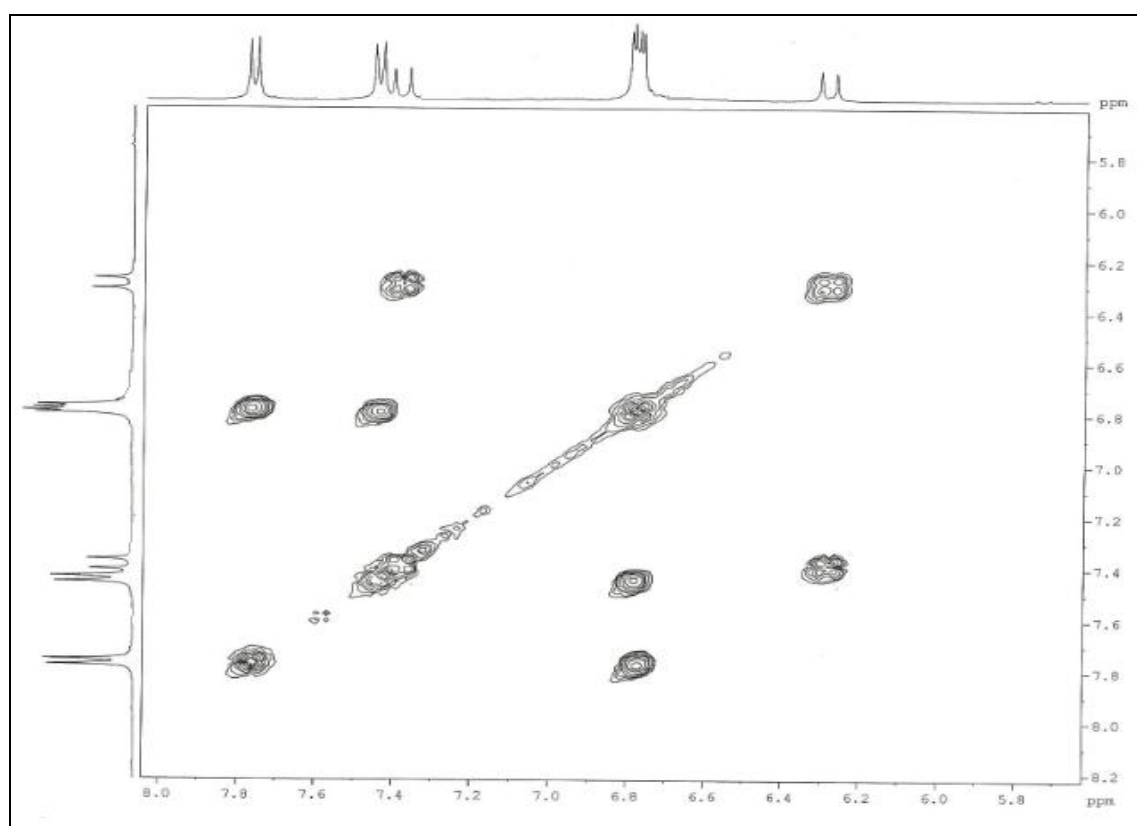


Figura 4.33: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **14** (400 MHz, DMSO)

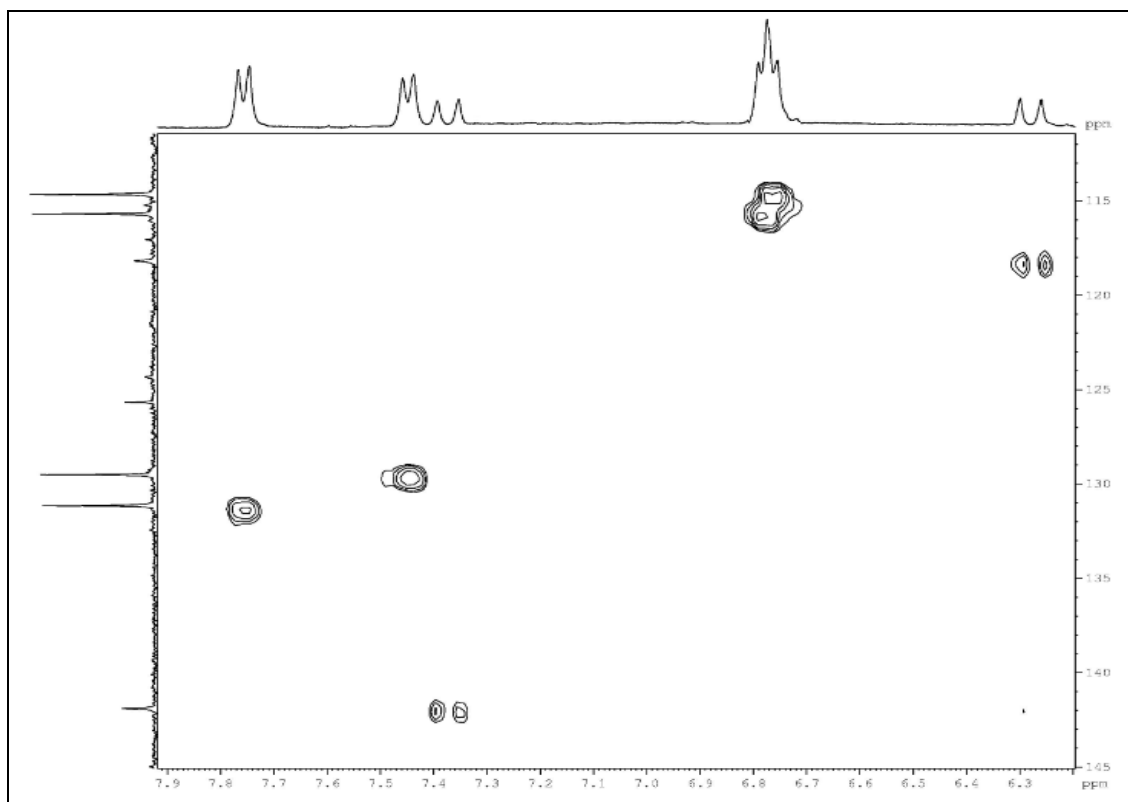


Figura 4.34: Mapa de contorno de HSQC da substância **14** (400 MHz, DMSO)

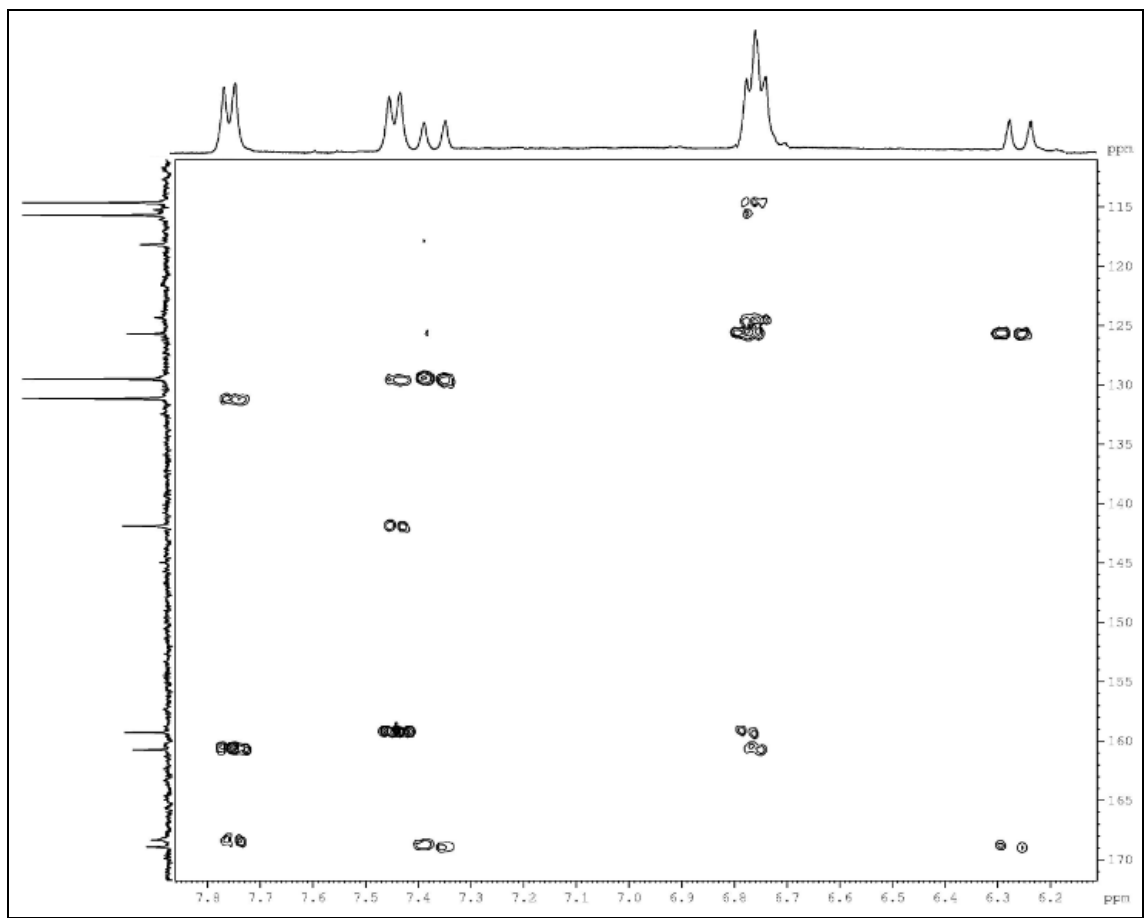


Figura 4.35: Mapa de contorno de HMBC da substância **14** (400 MHz, DMSO)

4.4.10- Determinação Estrutural das Substâncias 15 e 16

As substâncias **15** e **16** foram isoladas do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans* e determinadas em misturas.

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.36) da substância **15** apresenta dois dubletos em δ 6,28 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) e δ 7,47 (1H, d, $J = 16,0$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos em relação *trans*. Já a substância **16** apresentou dois dubletos em δ 5,71 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) e δ 6,70 (1H, d, $J = 12,6$ Hz) característicos de hidrogênios olefínicos em relação *cis*.

Observam-se ainda dois dubletos em δ 6,78 (2H, d, $J = 8,0$ Hz) e em δ 7,50 (2H, d, $J = 8,0$ Hz) para a substância **15** e mais dois dubletos em δ 6,73 (2H, d, $J = 8,4$ Hz) e em δ 7,62 (2H, d, $J = 8,4$ Hz) para a substância **16**, que sugerem a presença de um anel aromático 1,4-dissubstituído para ambos os compostos. Ao analisar o espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (Figura 4.38) observou-se o acoplamento dos dubletos.

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3 , Figura 4.37) mostra sinais referentes ao anel aromático e a carbonos de unidades de glicose.

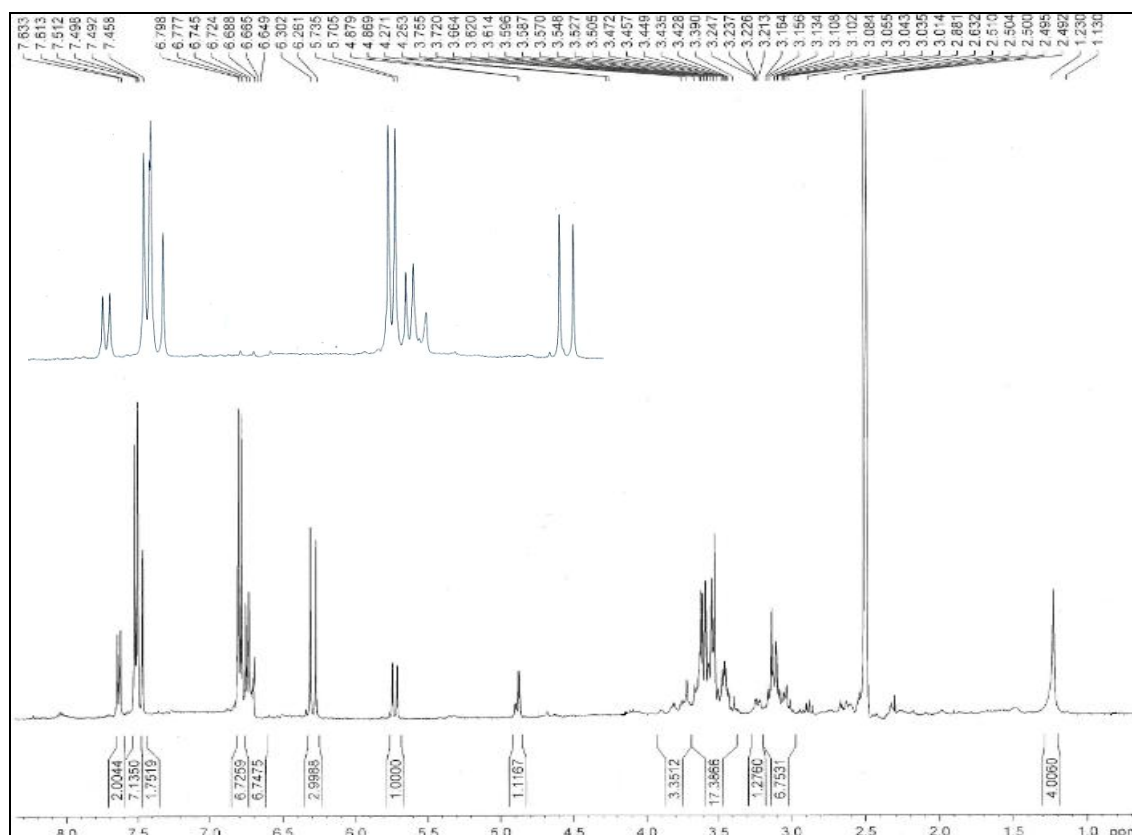


Figura 4.36: Espectro de RMN ^1H da substância **15** e **16** (400 MHz, DMSO).

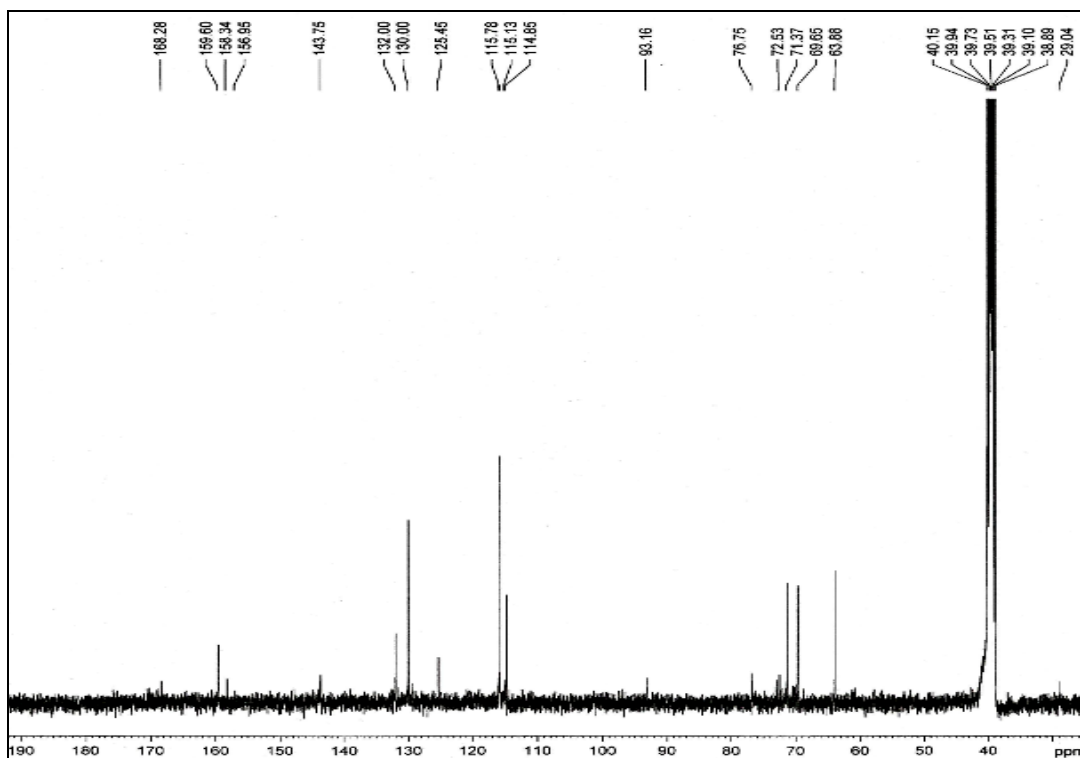


Figura 4.37: Espectro de RMN ^{13}C da substância **15 e 16** (100 MHz, DMSO).

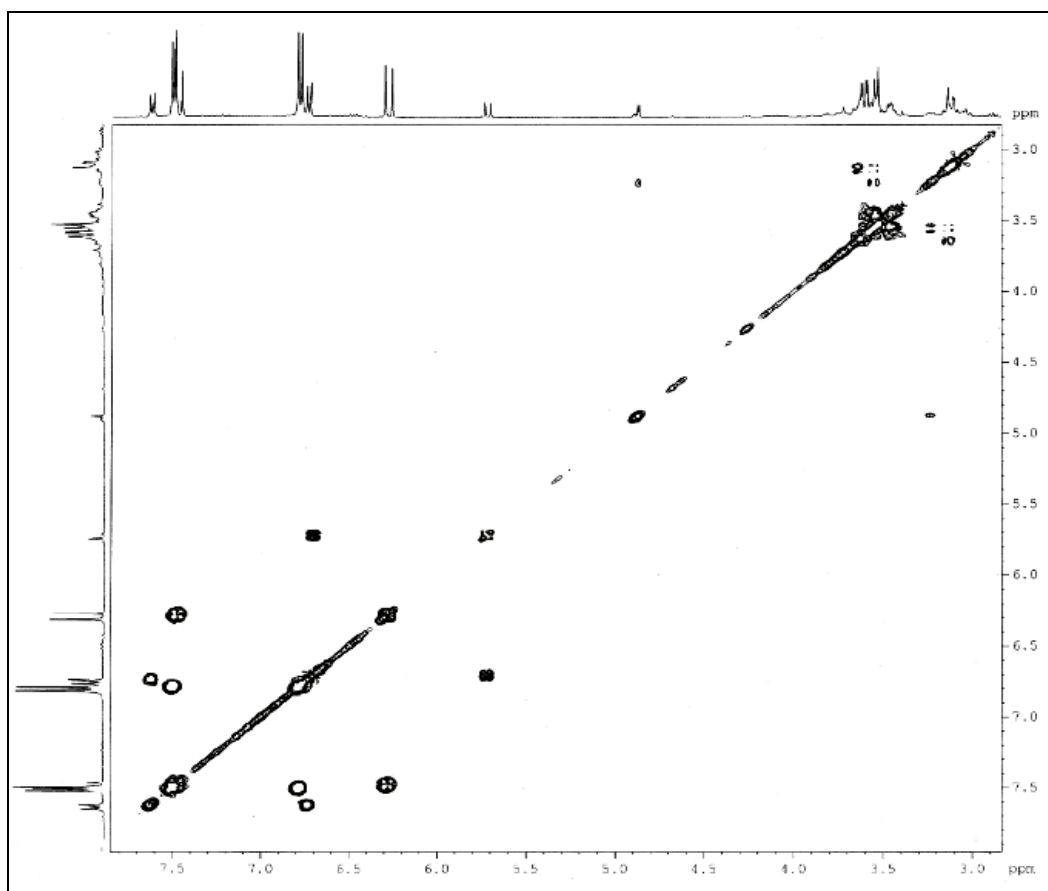


Figura 4.38: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **15 e 16** (400 MHz, DMSO)

O espectro de HSQC (Figura 4.39) mostra correlação a J^1 de H-2 em δ 6,28 com C-2 em δ 114,8 e de H-3 em δ 7,47 com C-3 em δ 143,7. Os sinais dos hidrogênios aromáticos H-2'/6' e H-3'/5' mostram correlação a J^1 com os carbonos em δ 130,0 e δ 115,7 respectivamente.

No espectro de HMBC (Figura 4.40) o sinal do hidrogênio H-3 (δ 7,47) mostra correlação com os sinais de C-2'/6', C-2 e com o da carbonila em δ 168,2 (C-1) e o sinal do hidrogênio H-2 (δ 6,28) mostra correlação com um sinal em δ 125,4 atribuído ao carbono C-1' e com a carbonila em δ 168,2. Os sinais dos hidrogênios aromáticos H-2'/6' mostra correlação com os sinais de C-3'/5', C-3 e com um sinal em δ 158,3 atribuído ao carbono C-4' e os hidrogênios H-3'/5' mostra correlação com os sinais de C-2'/6', C-1' e C-4'

A presença de resíduo de açúcar na estrutura desta substância foi confirmada devido ao sinal em δ 5,0 (d, $J = 4,0$ Hz) que é característico de hidrogênio anomérico atribuído a de uma unidade de glicose. Os demais hidrogênios carbinólicos da unidade glucosídica estão entre δ 3,10-3,90. Para se determinar a posição na qual o glicosídeo está ligado, utilizou-se a correlação no espectro de HMBC (Figura 4.40) do hidrogênio anomérico da glicose (H-1'') com um carbono em δ 168,2 que foi atribuído ao C-1 do ácido cinamílico.

A configuração α -glicose ($J = 4,0$ Hz) foi determinada de acordo com a constante de acoplamento e comparação com dados da literatura (HARBONE, 1994). No espectro de HSQC (Figura 3.39) observa-se que o dubleto em δ 5,0 referente a α -glicose se correlaciona com o carbono em δ 93,2 característico de ligação O-glicosilada.

As estruturas das substâncias foram definidas como sendo o *trans-p*-cumarato de α -glicose (**15**) e *cis-p*-cumarato de α -glicose (**16**).

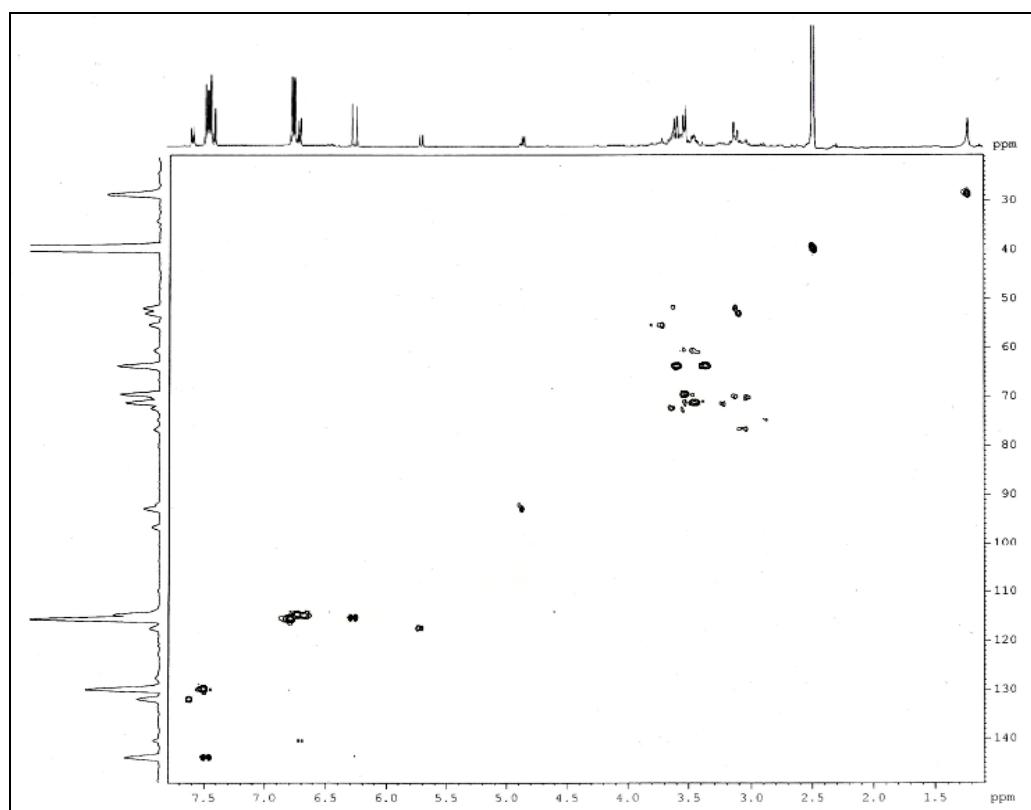
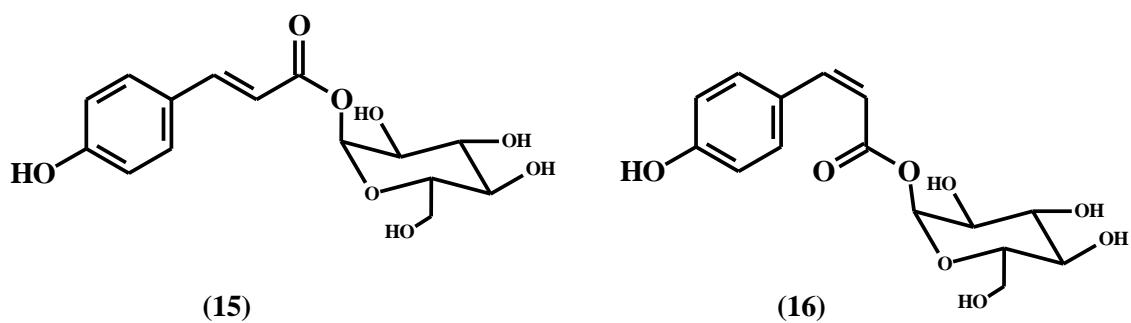


Figura 4.39: Mapa de contorno de HSQC da substância **15** e **16** (400 MHz, DMSO)

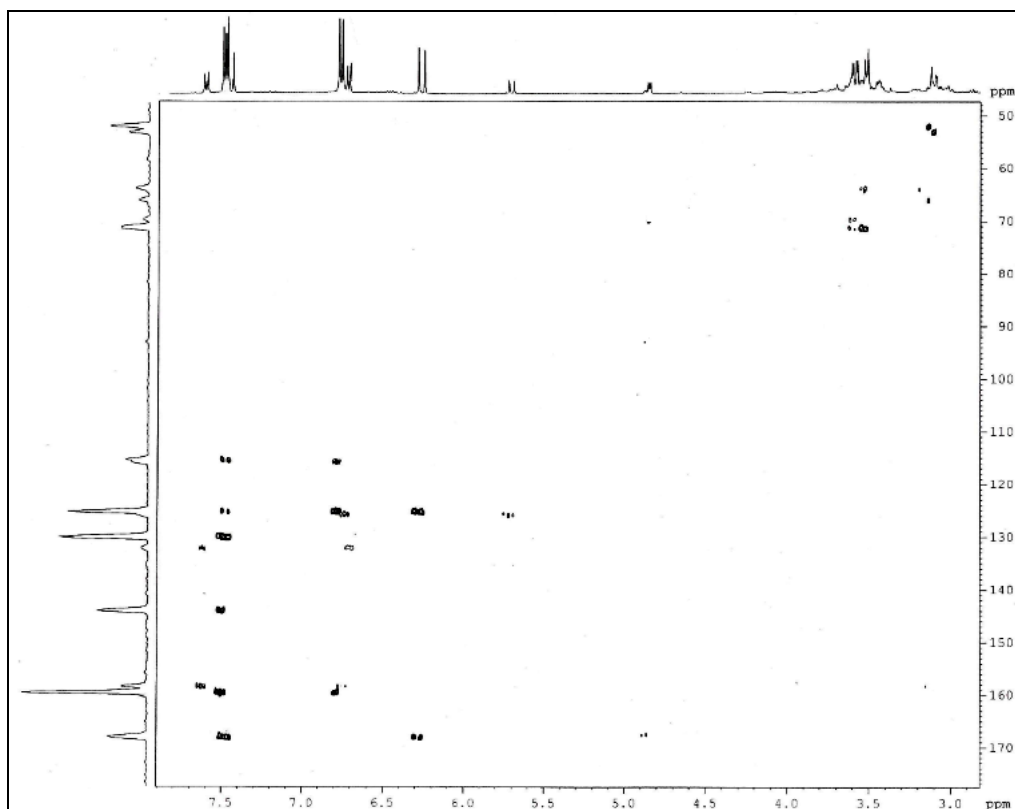


Figura 4.40: Mapa de contorno de HMBC da substância **15 e 16** (400 MHz, DMSO)

4.5- Derivado de oxazole

4.5.1- Determinação Estrutural da Substância 17

A substância **17** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.41) da substância **17** mostra dois dubletos em δ 6,92 e δ 5,23 (1H, $J = 8,4$ Hz) e um singlete δ 5,79 integrado para 2 hidrogênios.

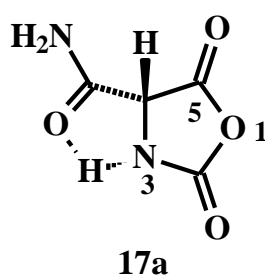
O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.43) apresenta 4 sinais, sendo que os sinais em δ 156,7, δ 157,3 e δ 173,6 são referentes a três carbonos de carbonilas presentes na estrutura.

Ao analisar o espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (Figura 4.44) observou-se que o dubleto em δ 6,92 ($J = 8,4$ Hz) acopla com o sinal em δ 5,23 (1H, $J = 8,4$ Hz).

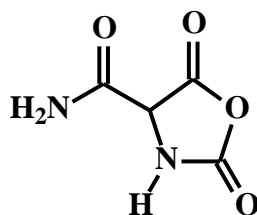
No espectro de HSQC (Figura 4.45) mostra que apenas o hidrogênio em δ 5,23 correlaciona com o carbono em δ 62,0. O experimento de RMN de ^1H

adicionando ao tubo de ressonância gotas de D₂O (Figura 4.42), faz com que o dubleto em δ 5,23 transforme em singlete e os demais sinais do espectro desapareçam. Isso sugere que os sinais em δ 6,92 e δ 5,79 sejam de hidrogênios ligados a nitrogênio. O HMBC (Figura 4.46) mostra um sinal em δ 5,23 correlaciona-se com os dois carbonos em δ 157,3 (tipo de amida) e δ 173,6 (tipo de éster).

Através da análise do modelo de **17**, foi possível propor a existência de uma ligação de hidrogênio entre NH-3 e a carboxamida fixando H-3 de forma que a estereoquímica entre NH-3 e H-4 (constante de acoplamento 8,4 Hz) esteja numa relação *trans* entre eles conforme mostrado em **17a**.



A estrutura da substância **17** (4 carboxamida 2,5 dioxoxazolidina), possivelmente um derivado de oxazole, é inédito na literatura de acordo com levantamento bibliográfico realizado. Outra possibilidade é que ela tenha origem a partir do ácido 2-aminopropanodióico ou de biotransformação de oxazole presente nos metabólitos primários das plantas. Futuros estudos deverão ser realizados para determinar sua origem biossintética.



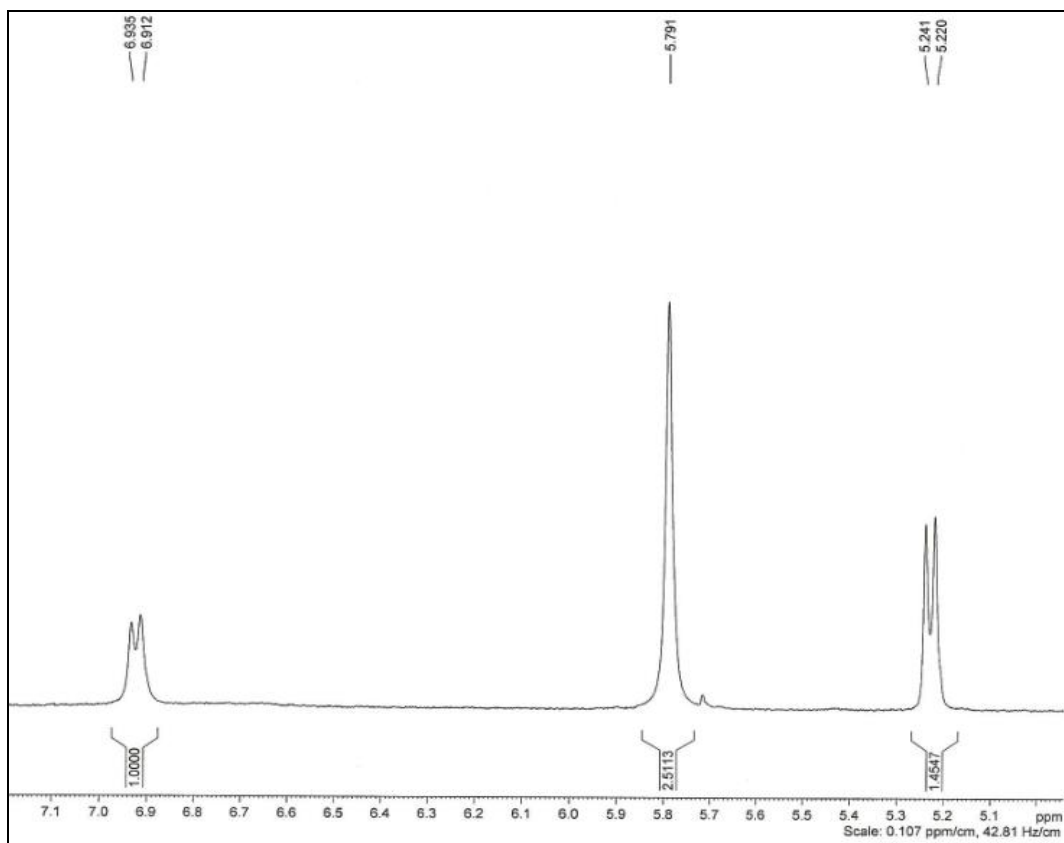


Figura 4.41: Espectro de RMN ^1H da substância **17** (400 MHz, DMSO)

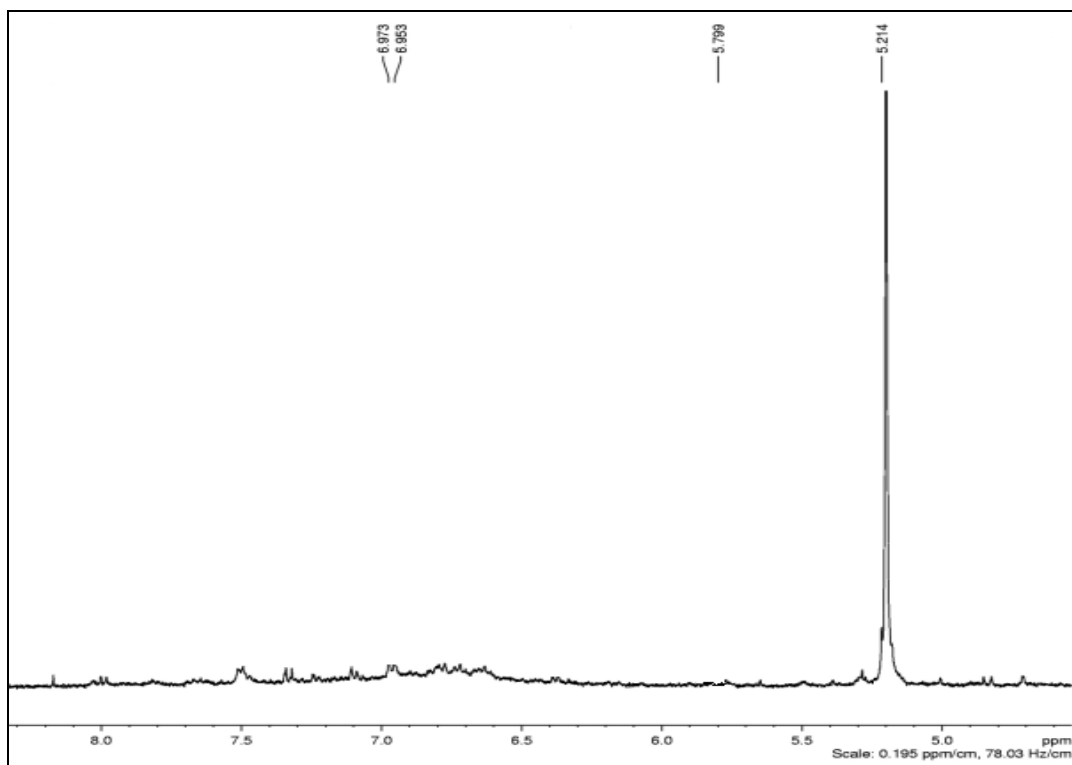


Figura 4.42: Espectro de RMN ^1H da substância **17** (400 MHz, DMSO + 1 gota de D_2O)

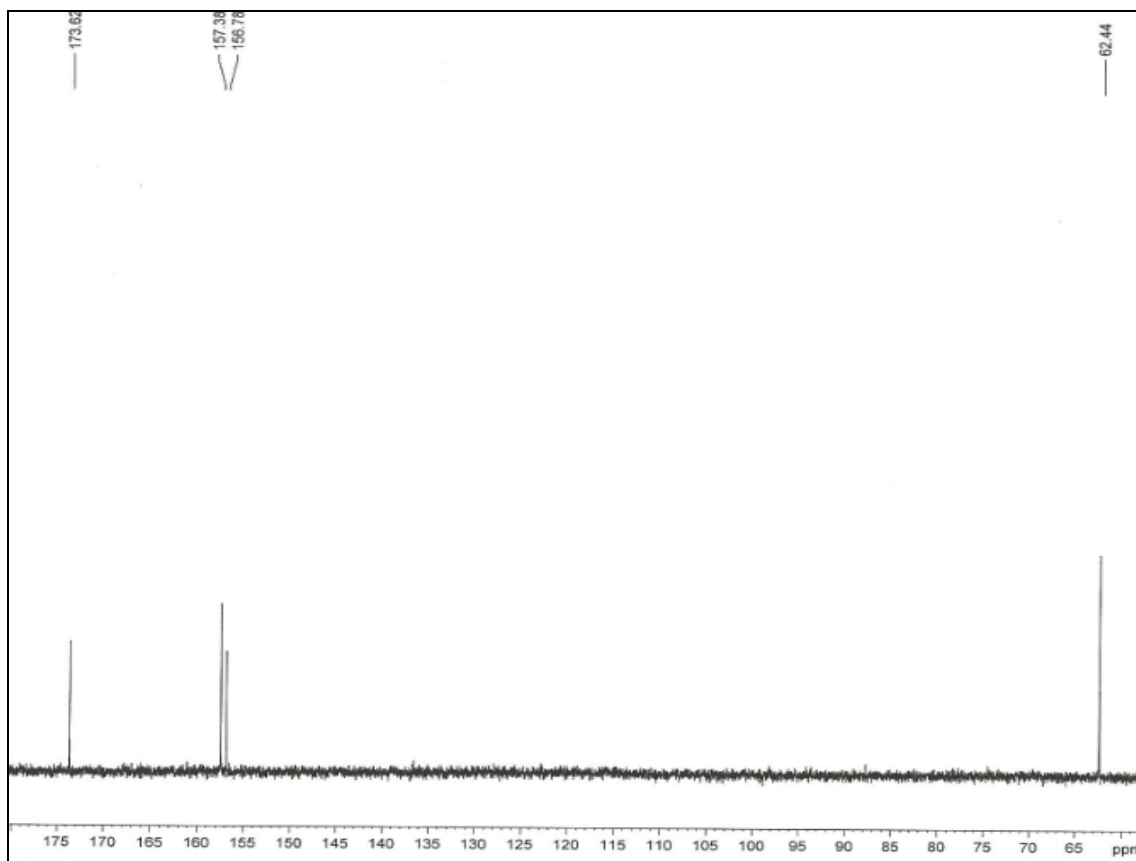


Figura 4.43: Espectro de RMN ^{13}C da substância **17** (100 MHz, DMSO)

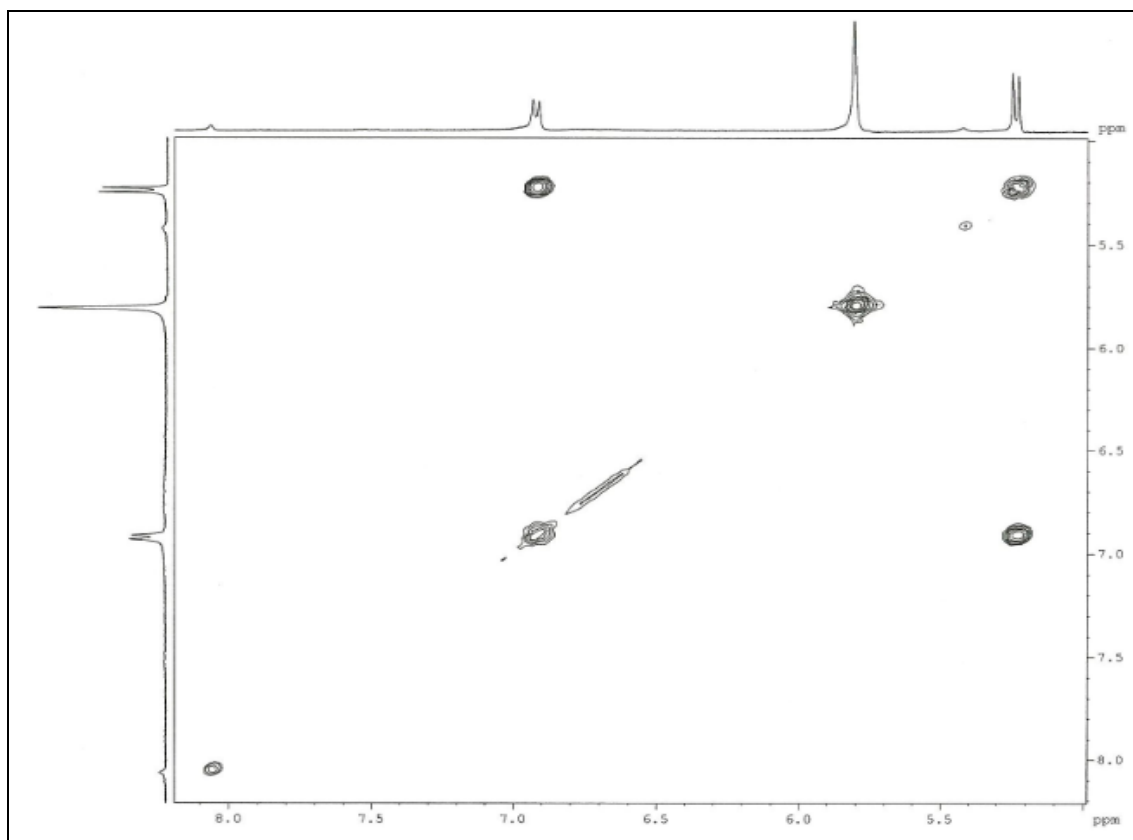


Figura 4.44: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **17** (400 MHz, DMSO)

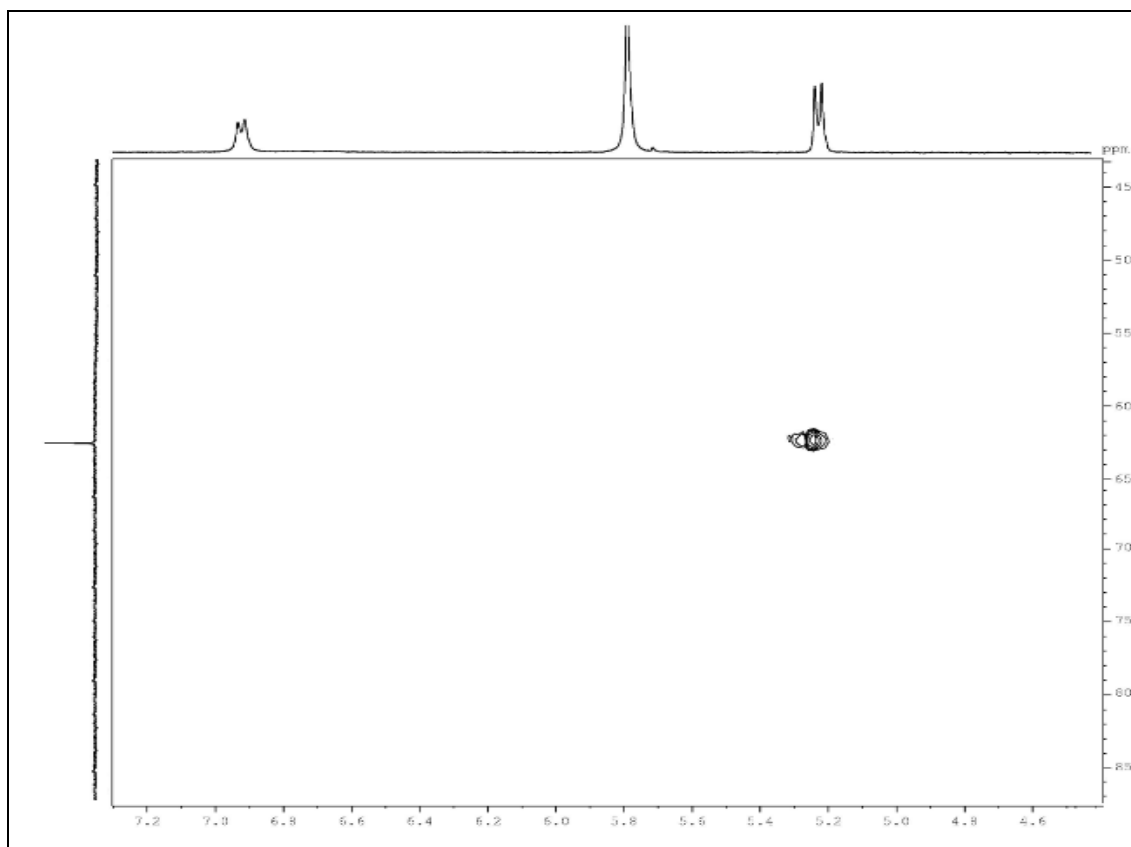


Figura 4.45: Mapa de contorno de HSQC da substância **17** (400 MHz, DMSO)

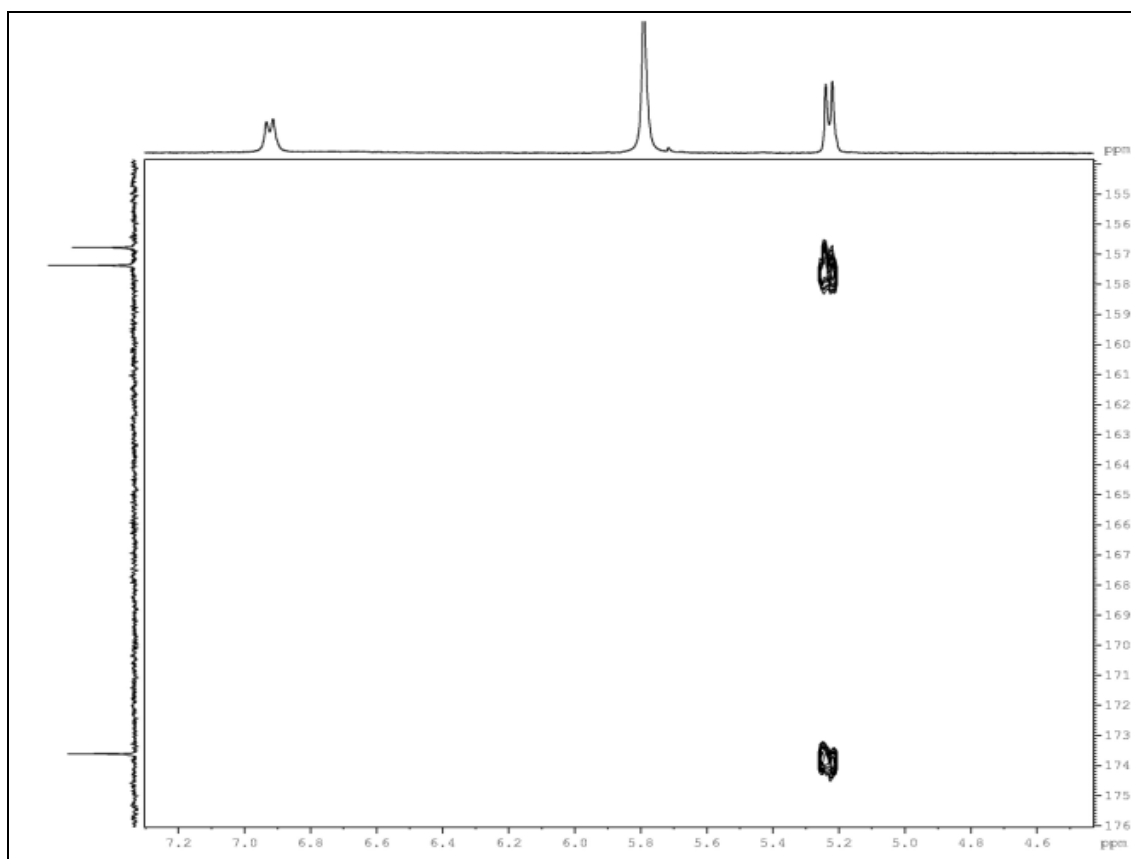


Figura 4.46: Mapa de contorno de HMBC da substância **17** (400 MHz, DMSO)

4.6- Flavonóides

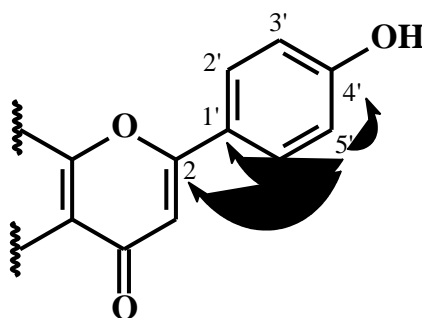
4.6.1- Determinação Estrutural da Substância 18

A substância **18** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

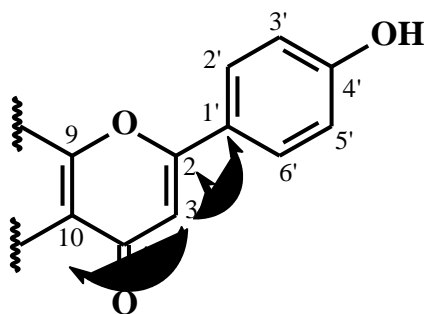
O espectro de RMN de ^1H (Figura 4.47) da substância **18** mostra dois dubletos em δ 7,89 e δ 6,90 (2H, $J = 8,8$ Hz) que possuem constante de acoplamento *orto*, confirmada pela correlação apresentada no espectro de COSY (Figura 4.49), atribuídos aos hidrogênios H-2' e H-6', H-3' e H-5'. A presença de um singlete em δ 6,74 (1H) evidencia a presença de uma flavona, sendo este um sinal característico do hidrogênio H-3. Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se a presença de um hidrogênio anomérico (H-1'') de glicosídeos em δ 4,58 (d, $J = 8,8$, 1H).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.48) apresenta 21 sinais sendo que o sinal em δ 182,3 é referente à carbonila (C-4) da flavona.

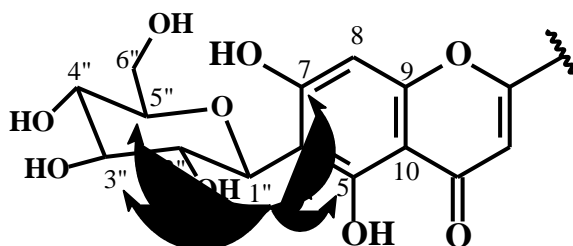
No espectro de HSQC (Figura 4.50) verificaram-se correlações dos hidrogênios δ 7,89 (H-2'/H-6') e δ 6,90 (H-3'/H-5') com os carbonos δ 128,9 e δ 116,5, respectivamente. No espectro de HMBC (Figura 4.51) foi observada a correlação do sinal δ 6,90 (H-3'/H-5') com os sinais em δ 161,7, δ 163,9, δ 116,5 e δ 121,5 que foram atribuídos aos carbonos C-4', C-2, C-3'/C-5', C-1' respectivamente.



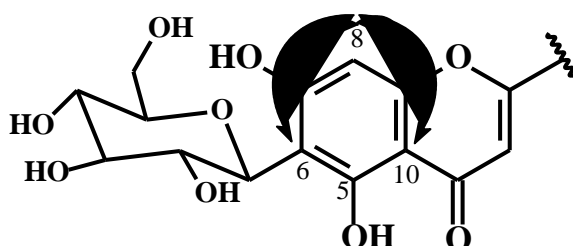
O singlete em δ 6,74 (H-3) correlaciona-se com os carbonos C-1', C-2 e com os sinais em δ 103,2 e δ 182,3 que foram atribuídos aos carbonos C-10 e C-4.



A posição na qual o glicosídeo está ligado à aglicona foi atribuída através de suas correlações no espectro de HMBC, no qual o hidrogênio H-1" se correlaciona com os carbonos em δ 71,0; δ 79,4; δ 81,9; δ 109,3 δ 161,1 e δ 164,2 correspondentes a C-2", C-3", C-5", C-6, C-5 e C-7, através de uma ligação C-glicopiranosídeo, evidenciada pelo deslocamento de C-6 em $\delta = 109,3$, valor muito baixo para ser um O-glicosídeo e muito alto para ser uma ligação C-H que é esperado entre δ 94,0 e δ 99,0.



A estrutura proposta acima foi também confirmada pelas correlações do singlete em δ 6,48 (1H), correspondente ao H-8, com o carbono em δ 94,2 no espectro HSQC e com os carbonos δ 103,2, δ 109,3, δ 163,1 e δ 156,7 referentes a C-10, C-6, C-7 e C-9 respectivamente.



Através dos experimentos de RMN 1D e 2D, pode-se atribuir todos os hidrogênios e carbonos da substância **18** que com a análise do conjunto de dados

em comparação com a literatura (PENG *et al.*, 2008; Tabelas 4.13 e 4.14) indicaram ser a flavona Isovitexina.

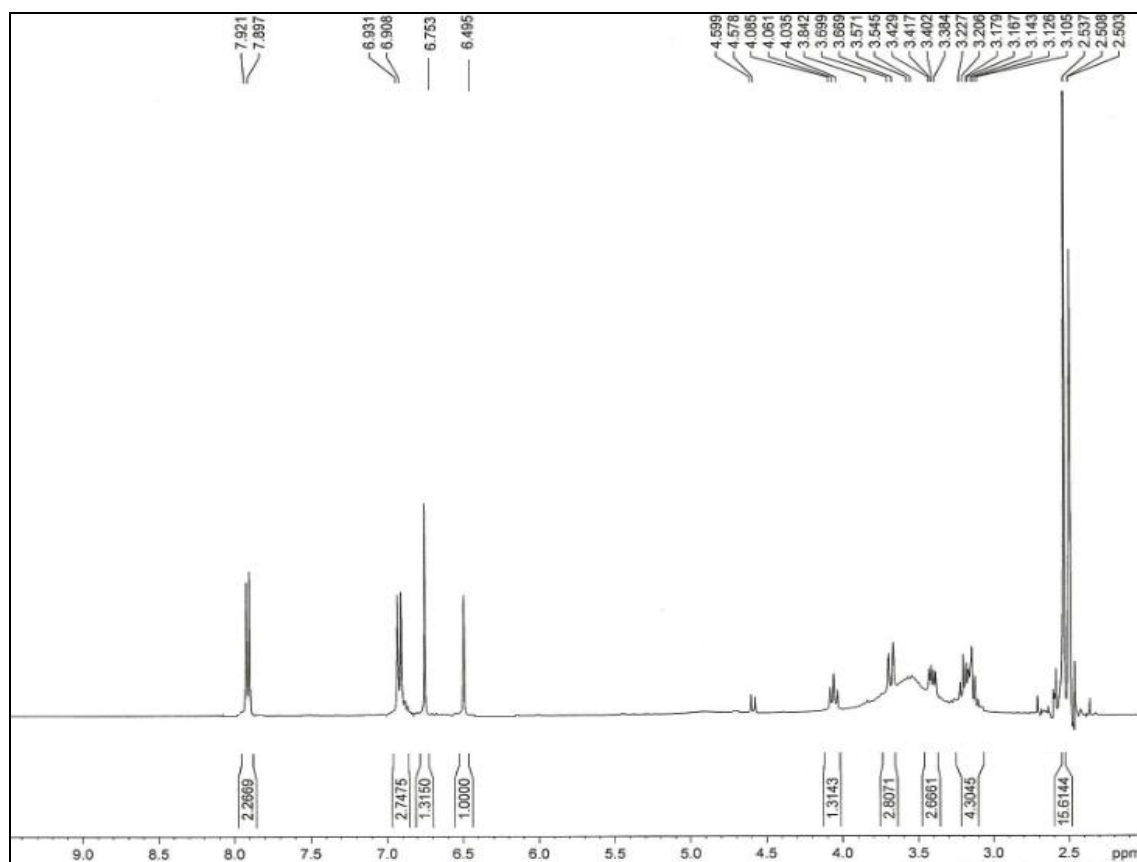
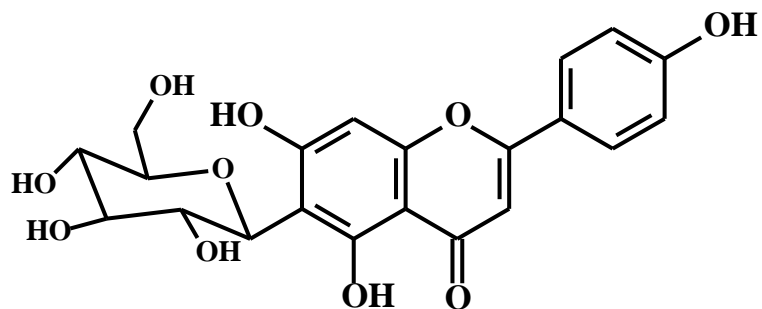


Figura 4.47: Espectro de RMN ^1H da substância **18** (400 MHz, DMSO)

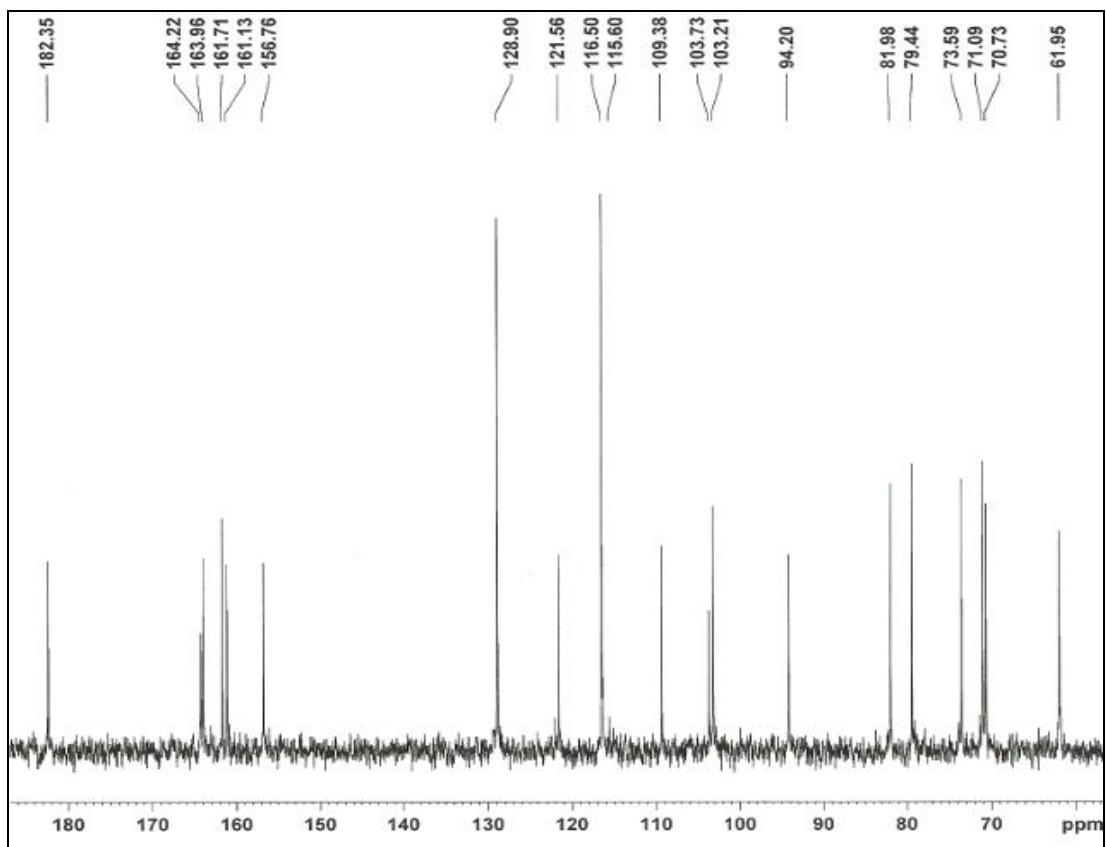


Figura 4.48: Espectro de RMN ^{13}C da substância **18** (100 MHz, DMSO)

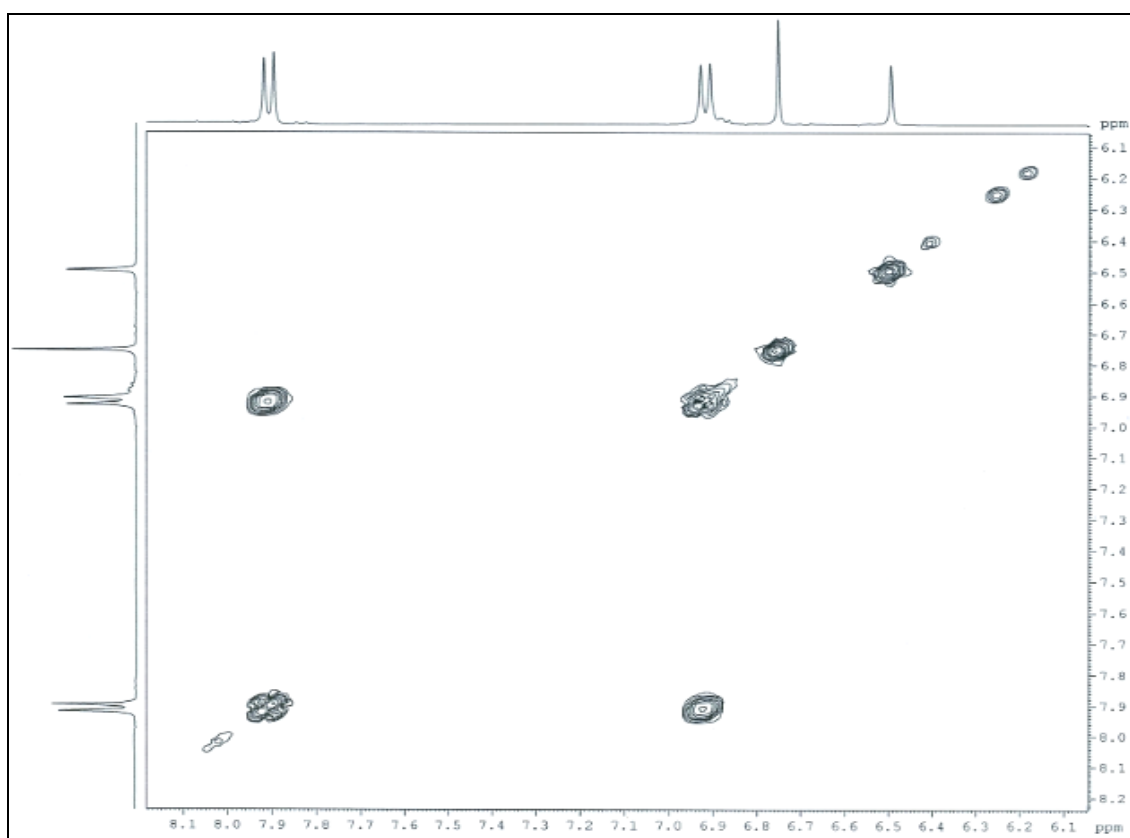


Figura 4.49: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **18** (400 MHz, DMSO).

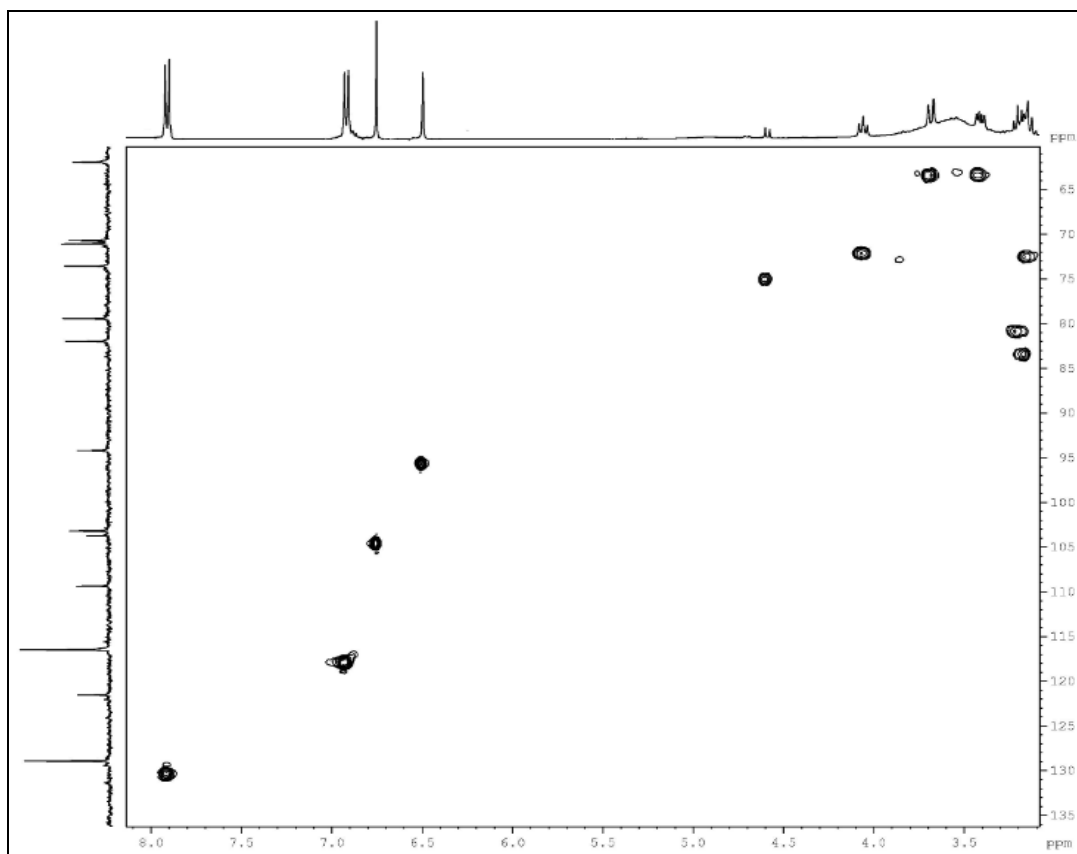


Figura 4.50: Mapa de contorno de HSQC da substância **18** (400 MHz, DMSO)

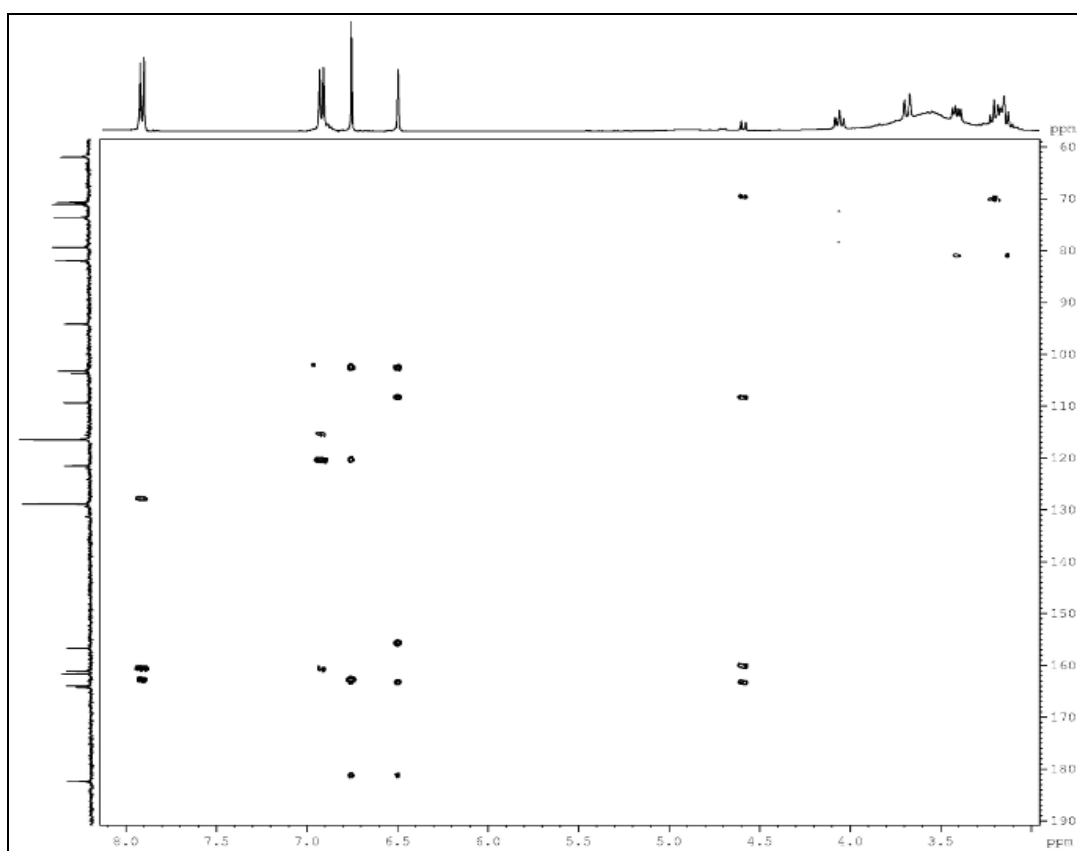


Figura 4.51: Mapa de contorno de HMBC da substância **18** (400 MHz, DMSO)

Tabela 4.13: Dados de RMN¹H da substância **18**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 400 MHz)	(PENG <i>et al.</i> , 2008) (DMSO, 500 MHz)
3	6,74 (1H, s)	6,78 (1H, s)
5 (OH)	-	13,55 (1H, s)
8	6,48 (1H, s)	6,51 (1H, s)
2', 6'	7,89 (2H, d, $J = 8,8$)	7,91 (2H, d, $J = 8,8$)
3', 5'	6,90 (2H, d, $J = 8,8$)	6,91 (2H, d, $J = 8,8$)
6-C-Glc	3,85- 3,21(6H, m)	
1"	4,58 (1H, d, $J = 8,8$)	4,58 (1H, d, $J = 9,0$)

Tabela 4.14: Dados de RMN ^{13}C da substância **18**.

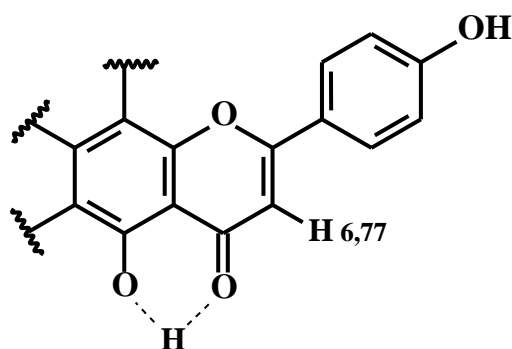
C	δ ou ppm (DMSO, 100 MHz)	(PENG <i>et al.</i> , 2008) (DMSO, 125 MHz)
2	163,9	163,5
3	103,7	102,8
4	182,3	181,9
5	161,7	161,2
6	109,3	108,9
7	164,2	163,3
8	94,2	93,6
9	156,7	156,2
10	103,3	103,4
1'	121,5	121,1
2', 6'	128,9	128,5
3', 5'	116,5	116,0
4'	161,7	160,7
6-C-Glc		
1''	73,5	73,6
2''	71,0	71,2
3''	79,4	78,9
4''	70,7	70,6
5''	81,9	81,6
6''	61,9	61,5

4.6.2- Determinação Estrutural da Substância 19

A substância **19** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

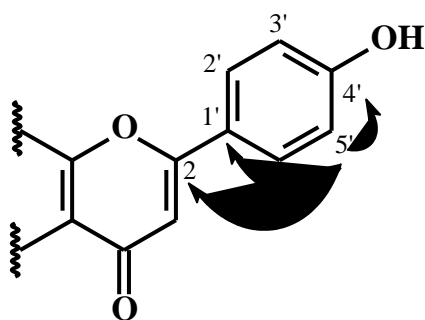
O espectro de RMN ^1H (Figura 4.52) da substância **19** apresentou dois dubletos em δ 8,02 e δ 6,89 (2H, $J = 8,8$ Hz) que possuem constante de acoplamento *orto*, atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5', confirmados pela correlação apresentada no espectro de COSY (Figura 4.54)

A presença de um singlete em δ 6,77 (1H) evidencia a presença de uma flavona sendo este sinal característico do hidrogênio H-3. Observou-se um sinal em δ 13,16 (s, 1H) característico de hidroxila quelada, posicionada no C-5 de flavonóides. Ainda no espectro de RMN ^1H observou-se a presença de um hidrogênio anomérico (H-1'') de glicosídeo em δ 4,69 (d, $J = 9,6$, 1H).

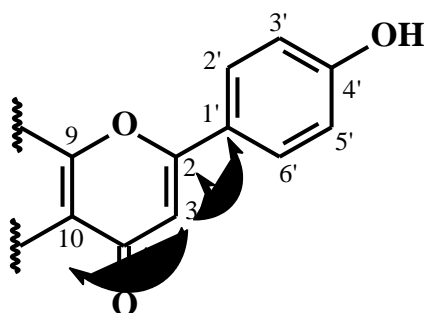


O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.53) apresenta 21 sinais sendo que o sinal em δ 181,9 é referente a carbonila (C-4) da flavona. Os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados foram estabelecidos pelo mapa de correlações de HMBC por meio das correlações heteronucleares.

Pelo HSQC (Figura 4.55) observaram-se as correlações dos hidrogênios δ 8,02 (H-2'/H-6') e δ 6,89 (H-3'/H-5') com os carbonos δ 128,8 e δ 115,8, respectivamente. No espectro de HMBC (Figura 4.56) foi observada a correlação do sinal δ 6,89 (H-3'/H-5') com os sinais em δ 161,1, δ 162,8, δ 115,8 e δ 121,5 que foram atribuídos aos carbonos C-4', C-2, C-3'/C-5', C-1', respectivamente.



O sinal do H-3 em δ 6,77 correlaciona-se com os carbonos C-1', C-2 e com os sinais em δ 103,9 e δ 181,9 que foram atribuídos aos carbonos C-10 e C-4.



A posição na qual o glicosídeo está ligado à aglicona foi atribuída através de suas correlações no espectro de HMBC, no qual o hidrogênio H-1" se correlaciona com os carbonos em δ 70,8; δ 78,6; δ 81,7; δ 104,6, δ 155,9 e δ 163,9 correspondentes a C-2", C-3", C-5", C-8, C-9 e C-7. O deslocamento apresentado para este hidrogênio é característico de uma ligação 8-C- β -D-glicopiranosídeo.

De acordo com a análise do conjunto de dados em comparação com a literatura (PENG *et al.*, 2008; Tabelas 4.15 e 4.16) pode-se atribuir todos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos da substância **19**, os quais indicaram ser a flavona vitexina em mistura com seu isômero isovitexina (**18**).

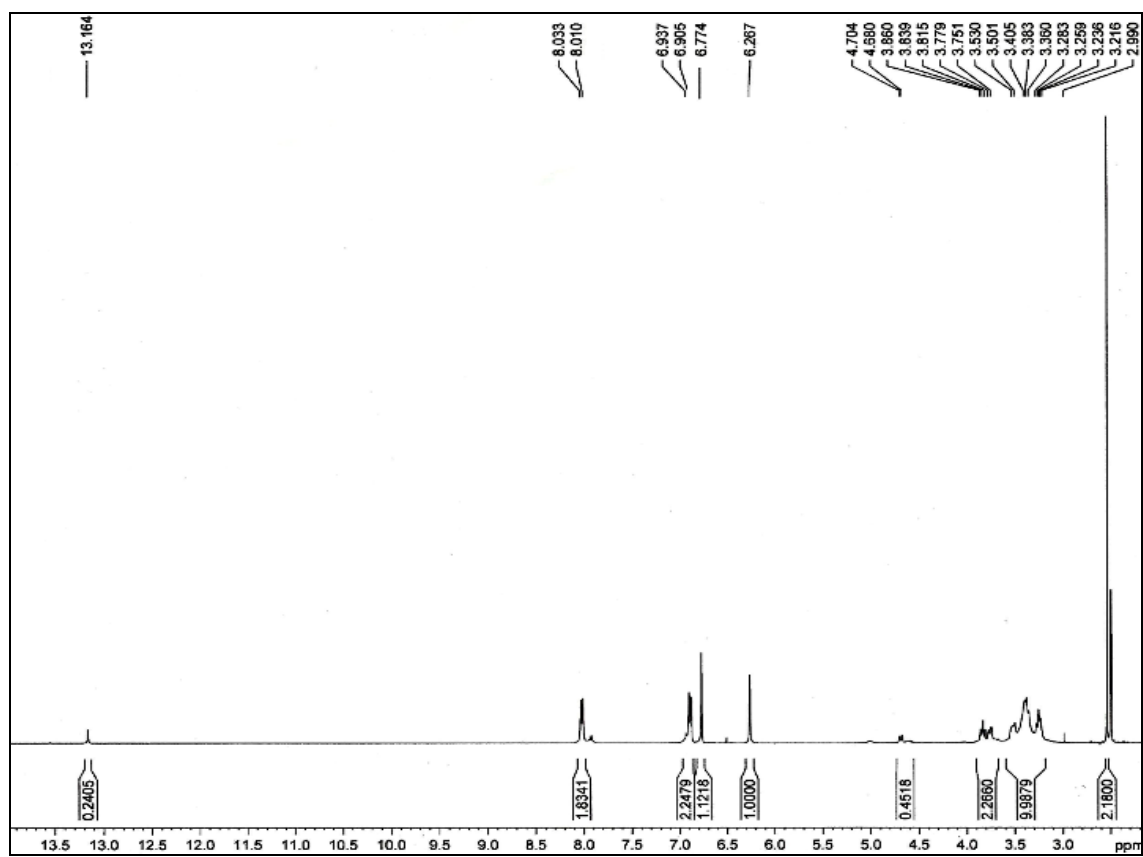
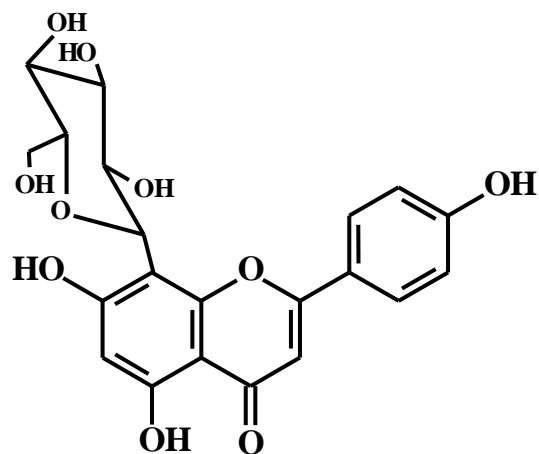


Figura 4.52: Espectro de RMN ^1H da substância **19** (400 MHz, DMSO)

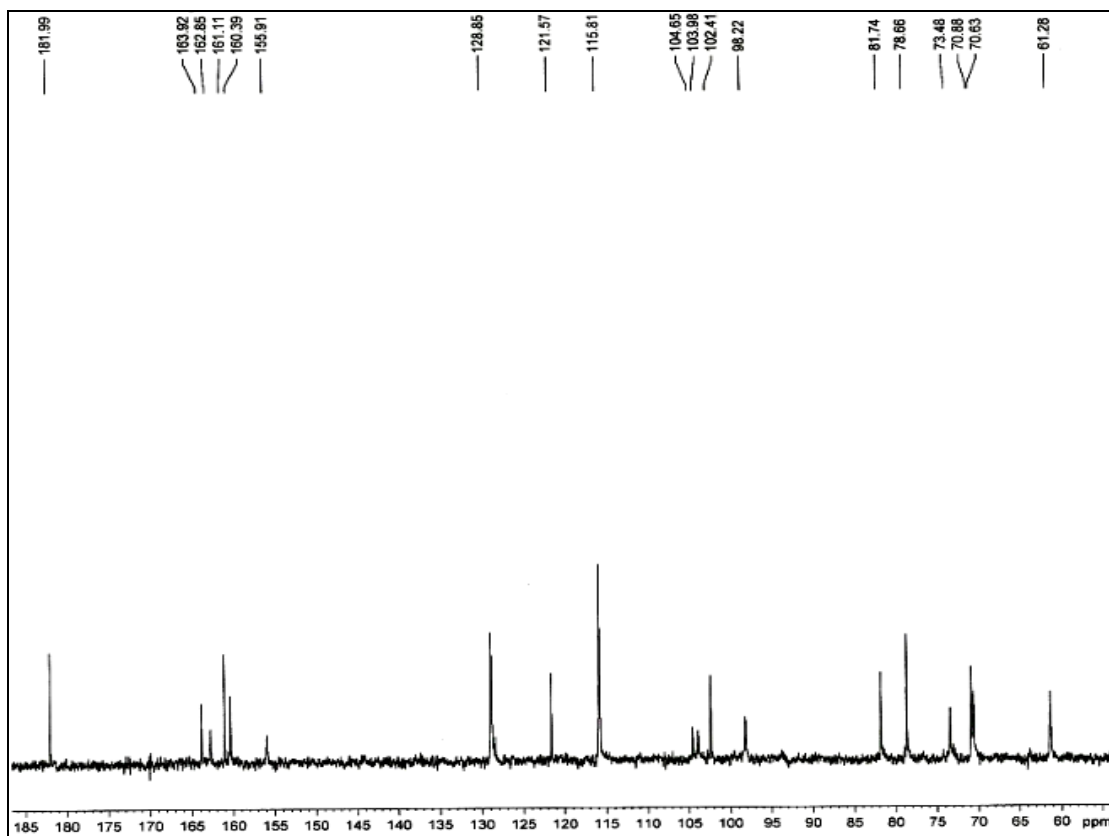


Figura 4.53: Espectro de RMN ^{13}C da substância **19** (100 MHz, DMSO)

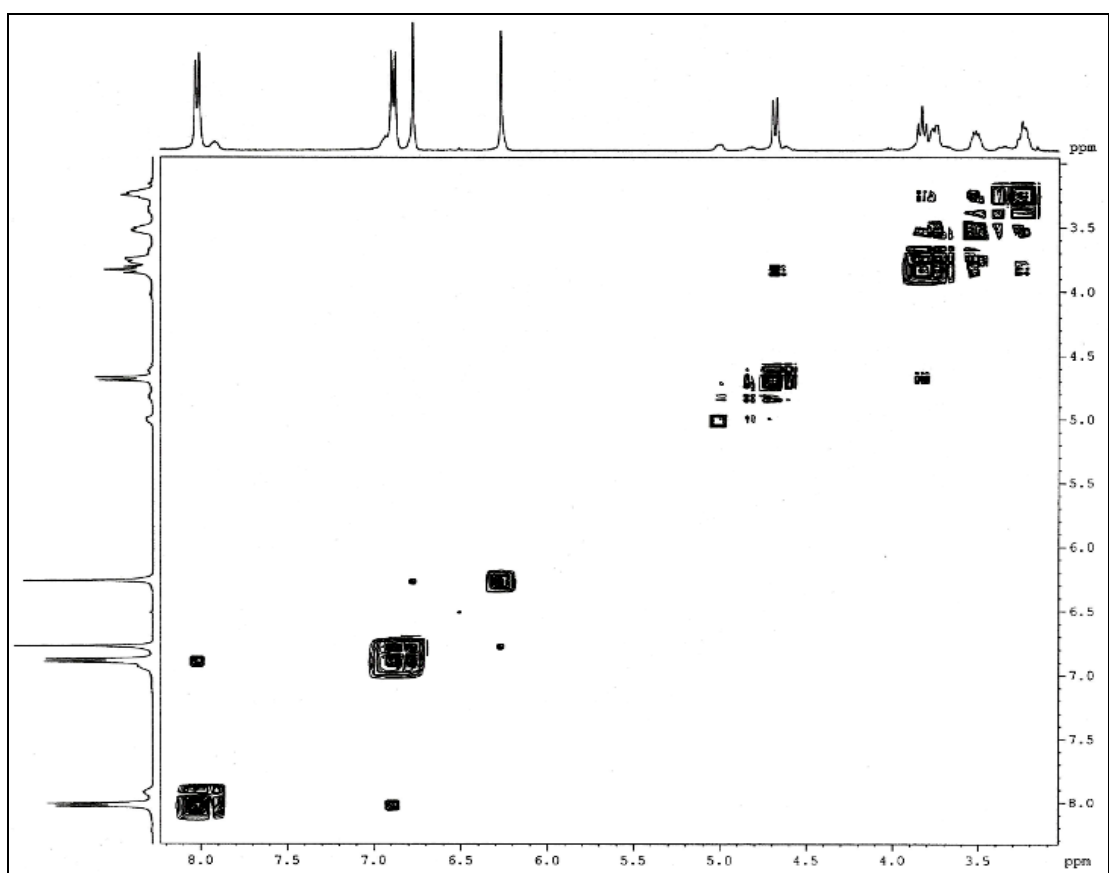


Figura 4.54: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **19** (400 MHz, DMSO)

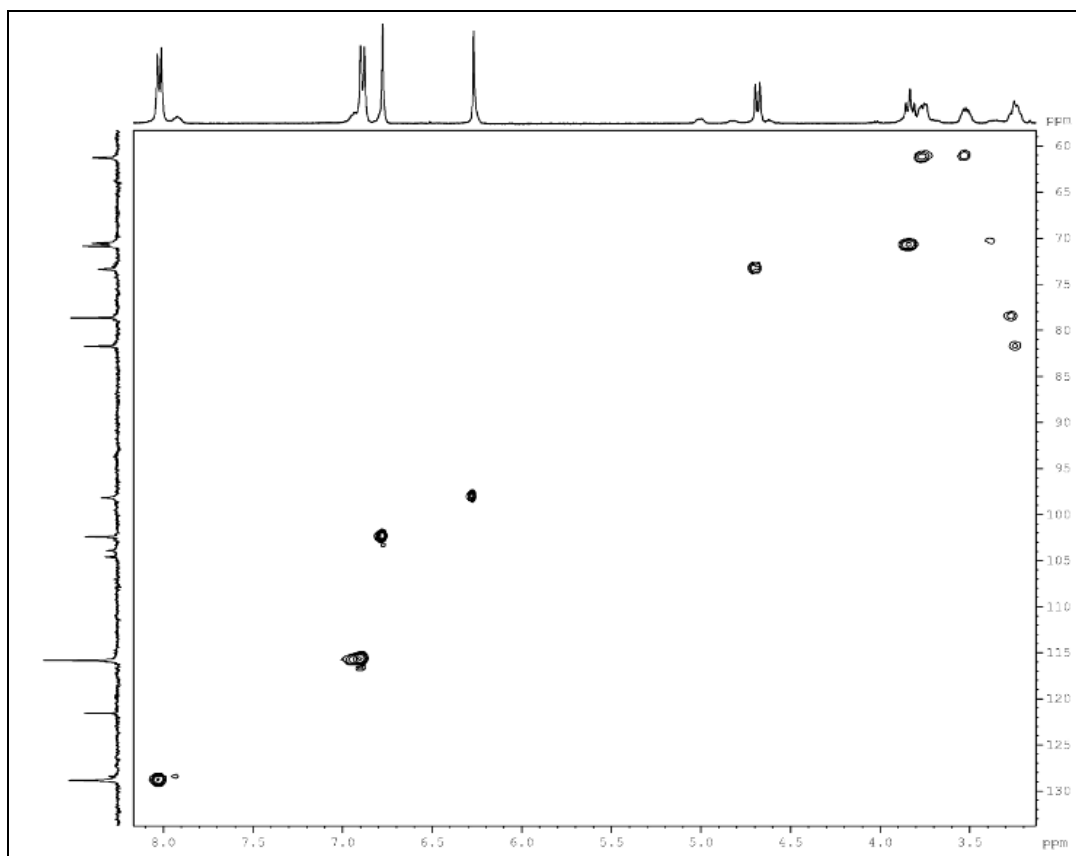


Figura 4.55: Mapa de contorno de HSQC da substância **19** (400 MHz, DMSO)

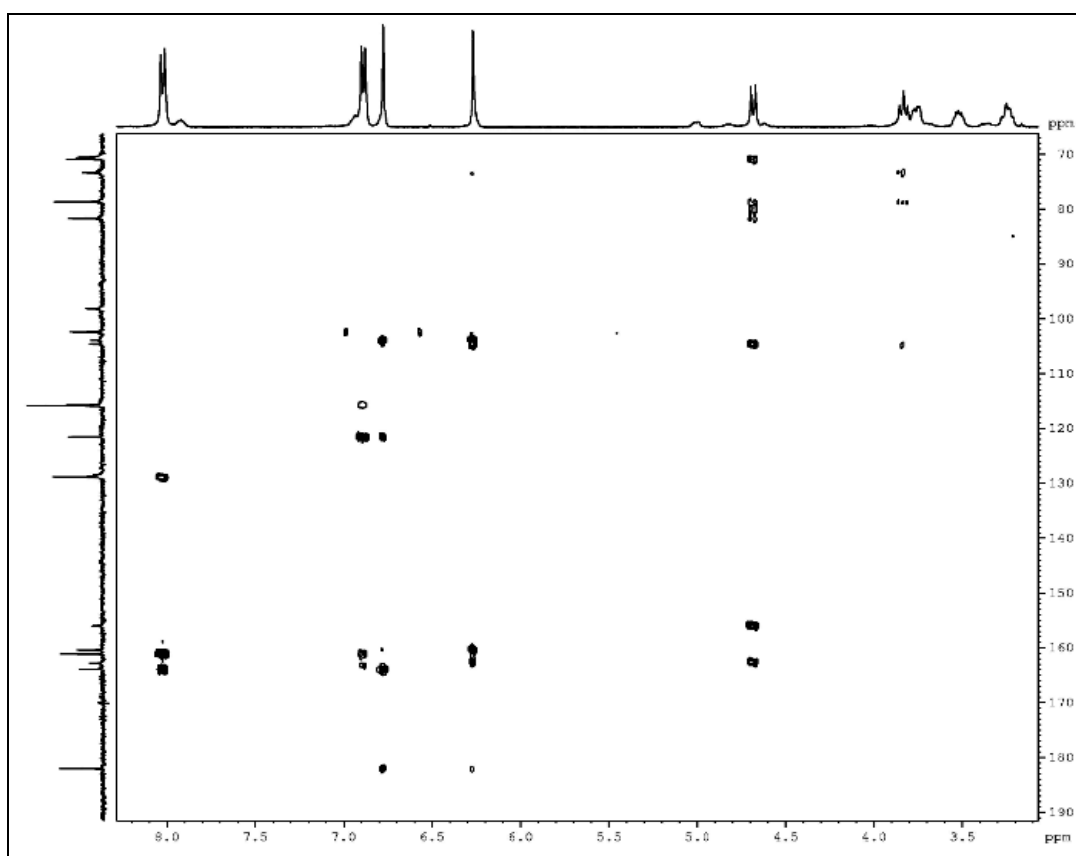


Figura 4.56: Mapa de contorno de HMBC da substância **19** (400 MHz, DMSO)

Tabela 4.15: Dados de RMN¹H da substância **19**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 400 MHz)	(PENG <i>et al.</i> , 2008) (DMSO, 500 MHz)
3	6,77 (1H, s)	6,76 (1H, s)
5 (OH)	13,16 (1H, s)	13,15 (1H, s)
6	6,26 (1H, s)	6,27 (1H, s)
2', 6'	8,02 (2H, d, $J = 8,8$)	8,01 (2H, d, $J = 8,7$)
3', 5'	6,89 (2H, d, $J = 8,8$)	6,88 (2H, d, $J = 8,7$)
6-C-Glc	3,85- 3,21(6H, m)	3,85-3,22 (6H, m)
1''	4,69 (1H, d, $J = 9,6$)	4,58 (1H, d, $J = 9,0$)

Tabela 4.16: Dados de RMN¹³C da substância **19**.

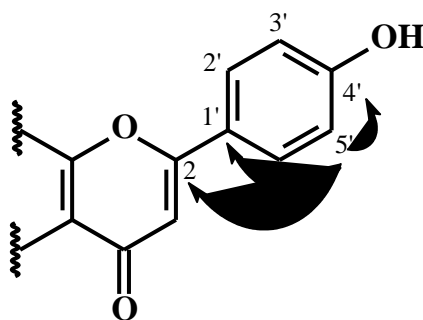
C	δ ou ppm (DMSO, 100 MHz)	(PENG <i>et al.</i> , 2008) (DMSO, 125 MHz)
2	162,8	164,0
3	102,4	102,5
4	181,9	182,2
5	160,3	160,5
6	98,2	98,3
7	163,9	162,7
8	104,6	104,1
9	155,9	156,1
1o	103,9	104,7
1'	121,5	121,7
2', 6'	128,8	129,0
3', 5'	115,8	115,9
4'	161,1	161,2
6-C-Glc		
1''	73,4	73,5
2''	70,8	70,9
3''	78,6	78,7
4''	70,6	70,6
5''	81,7	81,7
6''	61,2	61,4

4.6.3- Determinação Estrutural da Substância 20

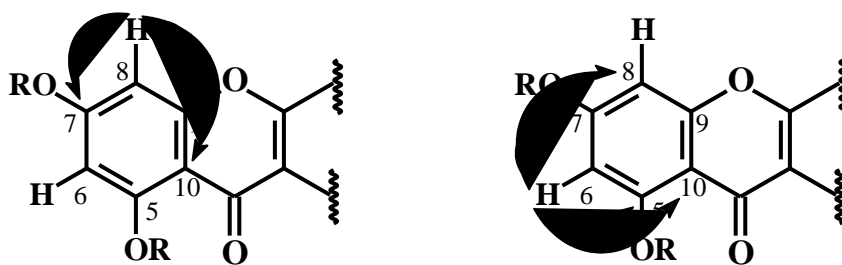
A substância **20** foi isolada do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

O espectro de RMN ^1H (Figura 4.57) da substância **20** apresentou dois dubletos em δ 8,07 e δ 6,90 (2H, $J = 8,8$ Hz) que possuem constante de acoplamento *orto*, atribuídos aos hidrogênios H-2'/H-6' e H-3'/H-5'.

Pelo HSQC (Figura 4.59) foram observadas as correlações dos hidrogênios δ 8,07 (H-2'/H-6') e δ 6,90 (H-3'/H-5') com os carbonos δ 130,8 e δ 115,8 respectivamente. No espectro de HMBC (Figura 4.60) foi observada a correlação do sinal δ 6,90 (H-3'/H-5') com os sinais em δ 160,0 δ 156,8 e δ 120,9 que foram atribuídos aos carbonos C-4', C-2 e C-1' respectivamente.



Ainda no espectro de RMN ^1H (Figura 4.57) observou-se dois singletos largos em δ 6,41 e δ 6,21. O espectro de HSQC (Figura 4.59) mostrou a correlação dos sinais dos hidrogênios em δ 6,41 e δ 6,21 com os carbonos em δ 93,9 e δ 99,0, respectivamente. Através do espectro de HMBC (Figura 4.60) pode-se verificar a correlação do hidrogênio em δ 6,41 com os carbonos em δ 103,7; δ 156,57 e δ 164,9 correspondentes aos carbonos C-10, C-9 e C-7, respectivamente. O sinal do hidrogênio em δ 6,21 se correlaciona com os carbonos em δ 93,9; δ 103,7; δ 161,1 e δ 164,9 correspondentes aos carbonos C-8, C-10, C-5 e C-7, respectivamente. A observação destas correlações permite atribuir estes sinais aos hidrogênios 8 e 6 do anel A de uma flavona.



O espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.58) apresenta 27 sinais sendo que o sinal em δ 177,3 é referente a carbonila (C-4) da flavona. Os deslocamentos químicos dos carbonos não hidrogenados foram estabelecidos pelo mapa de correlações de HMBC.

A presença de dois açúcares na estrutura desta substância foi confirmada devido a presença dos sinais em δ 4,52 (s) e δ 5,13 (d, $J = 8,8$ Hz) que são característicos de hidrogênios anoméricos atribuídos a de uma unidade raminone (H-1'') e uma unidade glicose (H-1'''), respectivamente. Os demais hidrogênios carbinólicos da unidade glucosídica estão entre δ 3,15-3,90 e o dubleto em δ 1,11 (3H, H-6'', $J = 6,0$ Hz) foi atribuído a metila de uma unidade de raminose.

Para se determinar a posição na qual o glicosídeo está ligado na aglicona, utilizou-se a correlação no espectro de HMBC (Figura 4.60) do hidrogênio anomérico da glicose (H-1''') com um carbono em δ 133,2 que foi atribuído ao C-3 do anel C da flavona. O hidrogênio anomérico da raminose (H1'') correlaciona com o sinal em δ 67,4 ppm referente ao sinal do carbono C-6'' do resíduo de glicose indicando que os glicosídeos estão ligados entre si.

A configuração das unidades glicosídicas foi determinada de acordo com as constantes de acoplamento e comparação com dados da literatura (HARBONE, 1994), sendo então uma β -glicose ($J = 8,8$ Hz) e uma α -raminose devido à baixa constante de acoplamento entre o hidrogênio anomérico e o H-2''.

No espectro de HSQC (Figura 4.59) observa-se que o dubleto em δ 5,11 referente a β -D-glicose e o sinal em δ 4,48 se correlacionam com os carbonos em δ 101,5 e 101,2, respectivamente, característicos de flavonóide O-glicosilado.

O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo negativo (Figura 4.61) da substância **20** apresentou um pico em m/z 593,0 correspondente ao íon molecular.

De acordo com a análise do conjunto de dados em comparação com a literatura (SLIMESTAD *et al.*, 1995; Tabelas 4.17 e 4.18) pode-se atribuir todos os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos da substância **20** os quais indicaram ser o flavonol Kaempferol 3-O-(6"-O- α -raminopiranosil)- β -glicopiranosideo ou Kaempferol-3-rutinosídeo.

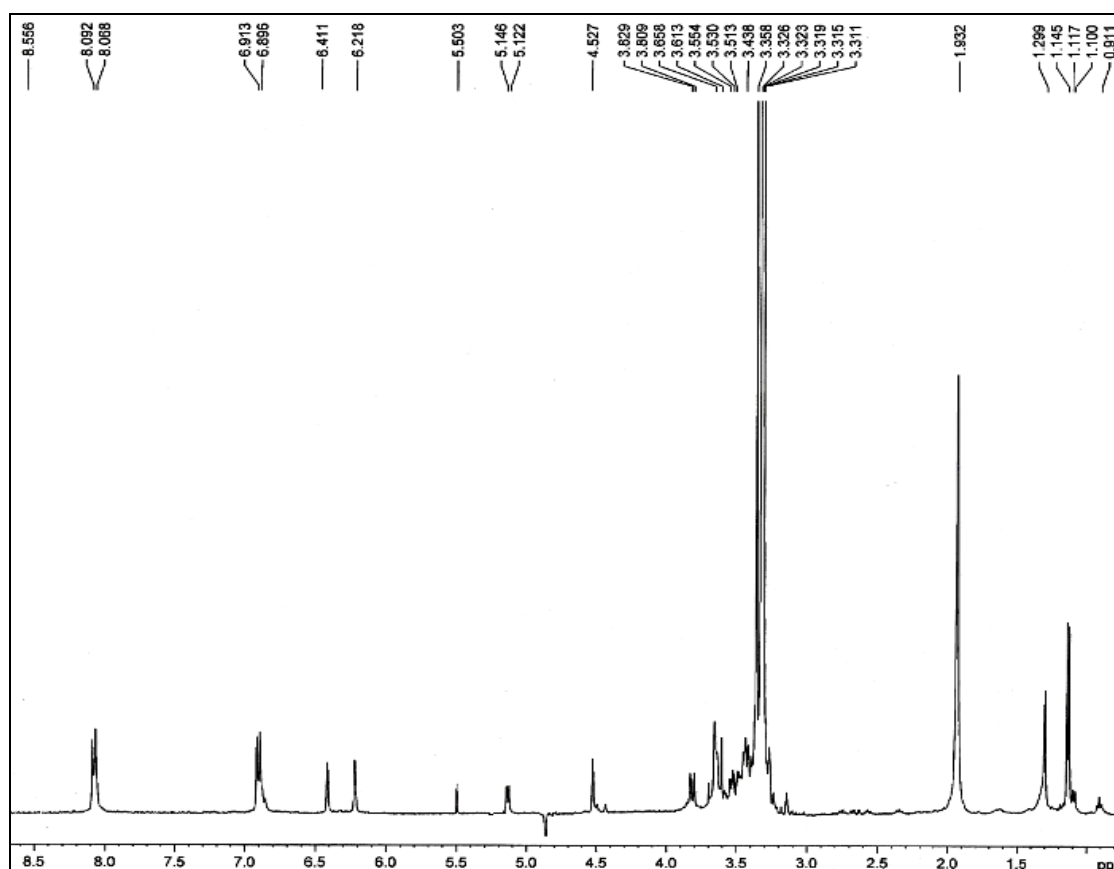
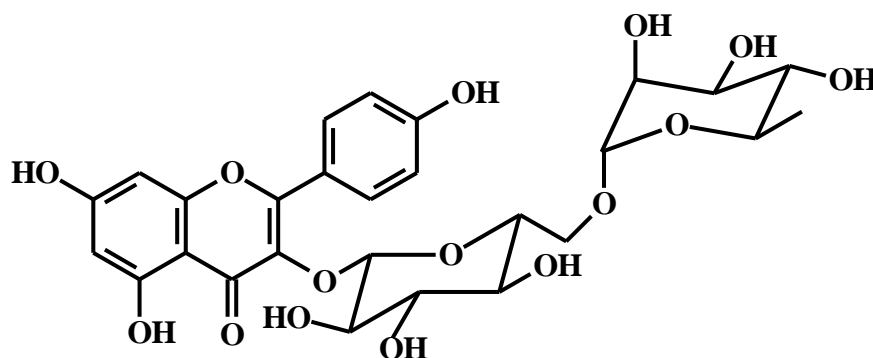


Figura 4.57: Espectro de RMN ^1H da substância **20** (400 MHz, MeOD)

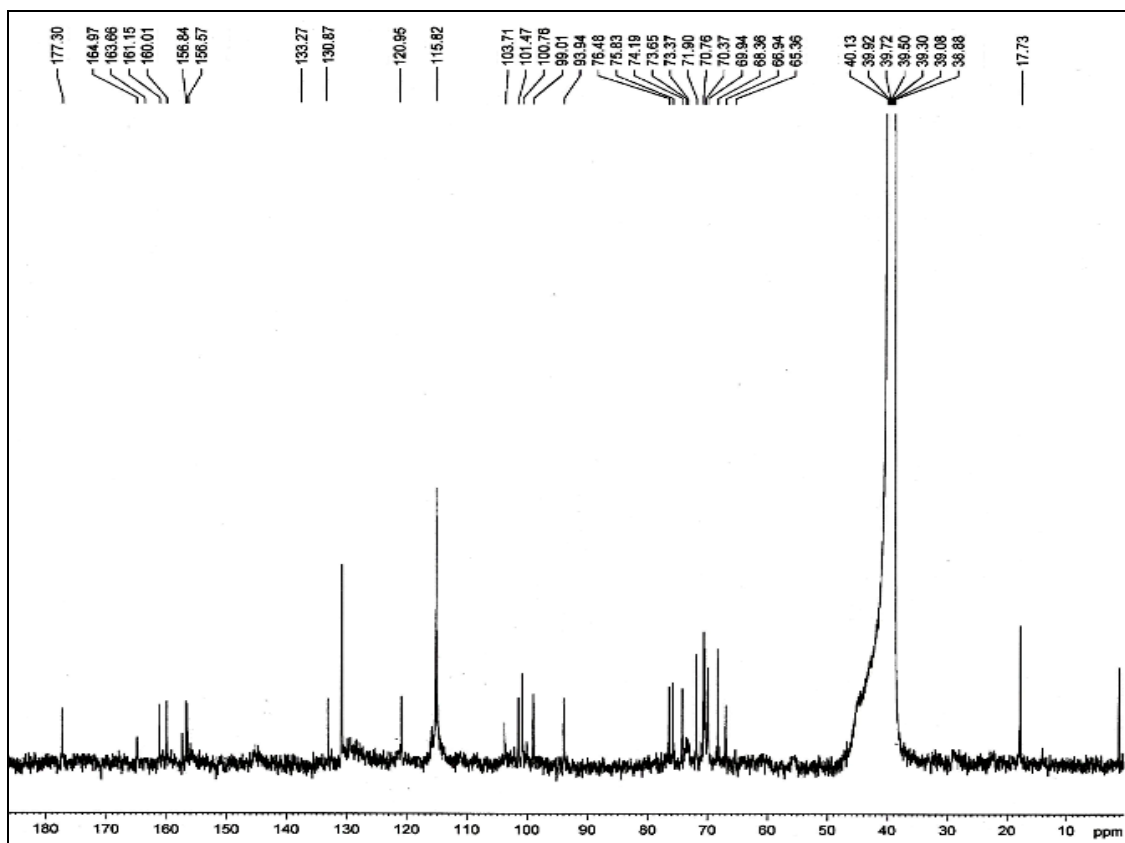


Figura 4.58: Espectro de RMN ^{13}C da substância **20** (100 MHz, DMSO)

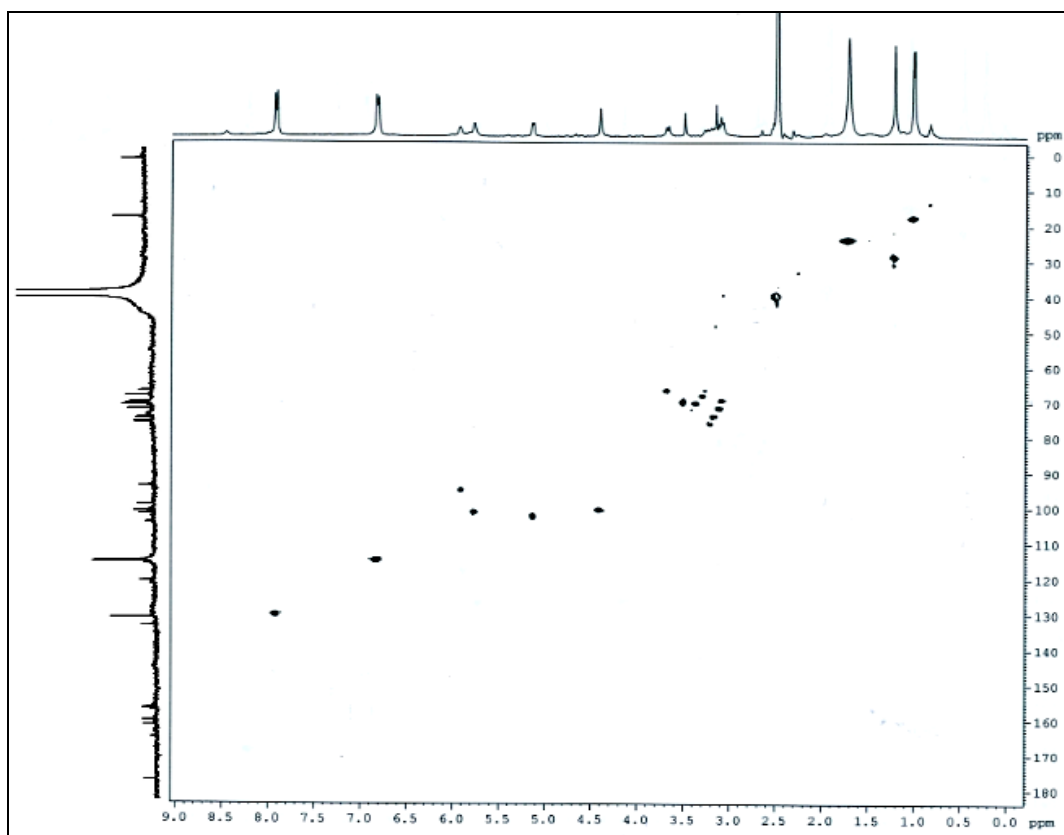


Figura 4.59: Mapa de contorno de HSQC da substância **20** (400 MHz, DMSO)

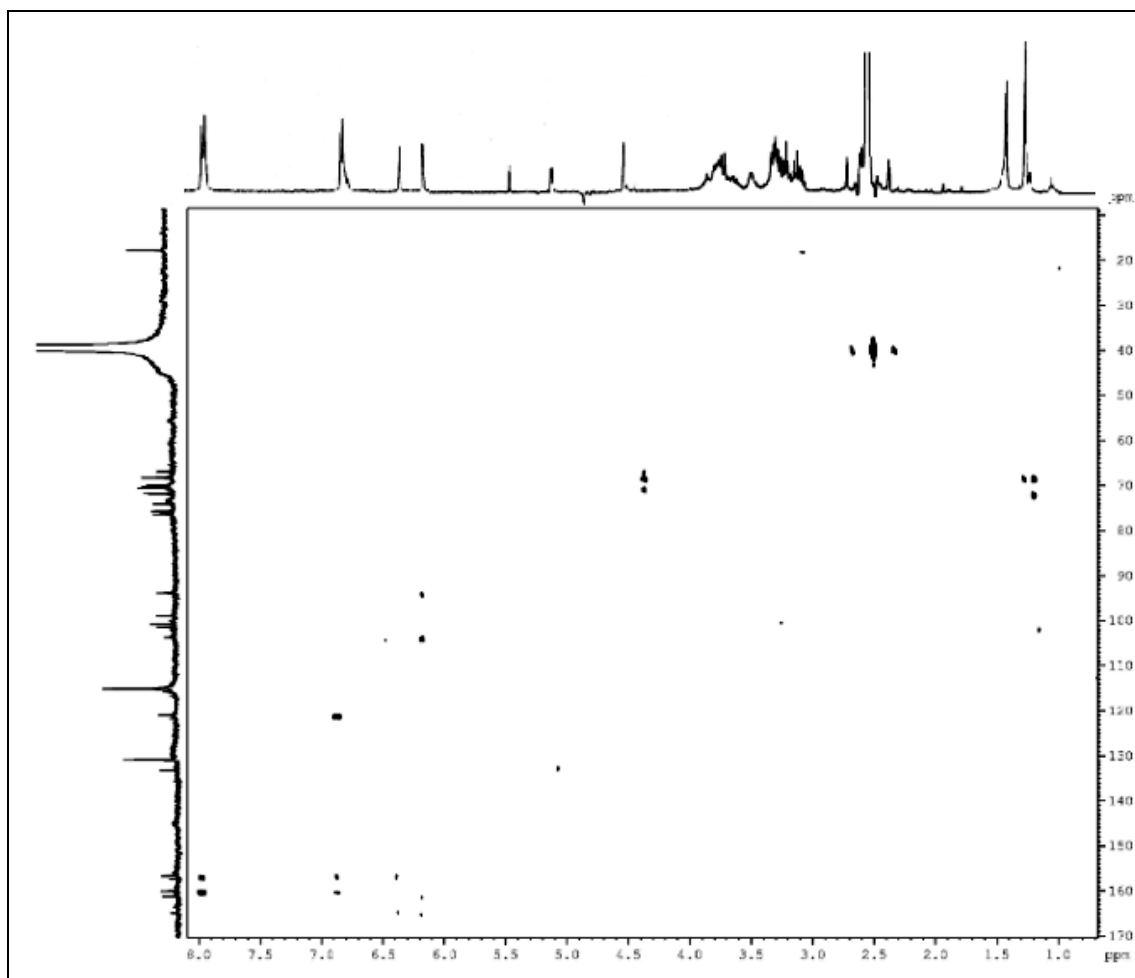


Figura 4.60: Mapa de contorno de HMBC da substância **20** (400 MHz, DMSO)

Tabela 4.17: Dados de RMN¹H da substância **20**.

H	δ ou ppm, J em Hz (DMSO, 400 MHz)	(SLIMESTAD <i>et al.</i> , 1995) (MeOD, 400 MHz)
6	6,21 (1H, sl)	6,27 (1H, d, $J = 1,8$)
8	6,41 (1H, sl)	6,45 (1H, d, $J = 1,8$)
2', 6'	8,07 (2H, d, $J = 9,0$)	8,15 (2H, d, $J = 8,9$)
3', 5'	6,90 (2H, d, $J = 9,0$)	6,98 (2H, d, $J = 8,9$)
3-O-Glc-6"-O-Rha	3,90- 3,15(6H, m)	3,85-3,09 (6H, m)
1"	5,11 (1H, d, $J = 8,8$)	5,20 (1H, d, $J = 7,0$)
1'''	4,48 (1H, s)	4,60 (1H, s)
6'''	1,11 (3H, d, $J = 6,0$)	1,22 (3H, d, $J = 6,1$)

Tabela 4.18: Dados de RMN ^{13}C da substância **20**.

C	δ ou ppm (SLIMESTAD <i>et al.</i> , 1995)	
	(DMSO, 100 MHz)	(MeOD, 100 MHz)
2	156,8	156,8
3	133,2	135,7
4	177,3	179,3
5	161,1	161,8
6	99,0	98,9
7	164,9	167,0
8	93,9	94,1
9	156,5	158,9
10	103,7	104,2
1'	120,9	123,1
2', 6'	130,8	132,6
3', 5'	115,8	116,4
4'	160,0	160,1
3-O-Glc		
1''	101,4	105,0
2''	74,1	76,0
3''	76,4	78,4
4''	70,7	71,7
5''	75,8	77,5
6''	66,9	68,8
6''-O-Rha		
1'''	100,7	102,7
2'''	70,3	72,3
3'''	69,9	70,9
4'''	71,9	72,5
5'''	68,3	70,0
6'''	17,7	18,2

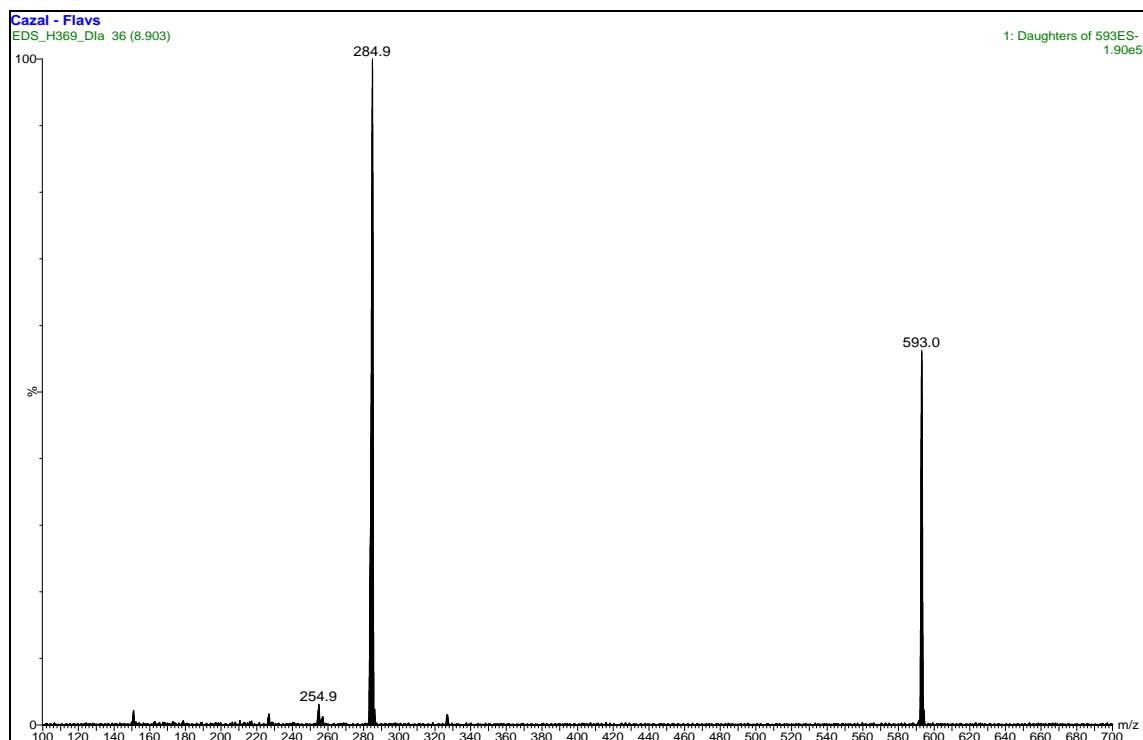


Figura 4.61: Espectro de massas (ESI) no modo negativo $[M-H]^-$ como íon molecular da substância **20**.

4.7- Limonóides

4.7.1- Determinação Estrutural da Substância 21

A substância **21** foi isolada do extrato diclorometânico do arilo de *Trichilia catigua*.

A análise do espectro de RMN 1H (Figura 4.62) indicou a presença de um limonóide. Foram observados cinco singletos a δ 0,75; 1,12; 1,29; 1,49 e 1,57 atribuídos a cinco metilas. Os sinais em δ 7,36 (*t*, $J = 1,3$ Hz), δ 7,14 (*m*) e δ 6,18 (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios do anel furano, H-23, H-21 e H-22 respectivamente. Um singlete em δ 3,79 foi atribuído ao H-15 do grupo epóxido localizado entre C-14/C-15 e o singlete em δ 6,52 foi atribuído à hidroxila do grupo diosfenol no C-6. Observam-se ainda dois dubletos em δ 6,92 (*d*, $J = 10$ Hz) e δ 6,10 (*d*, $J = 10$ Hz) atribuídos aos H-1 e H-2, respectivamente.

Através da análise de RMN ^{13}C (Figura 4.63) observaram-se 26 átomos de carbono. Sendo dois carbonílicos em δ 203,5 atribuído ao C-3, um outro em δ 197,9, valor de deslocamento químico característico de grupamento diosfenol, foi

atribuído ao C-7. Os sinais em δ 69,8 e 55,0 foram atribuídos aos carbonos do epóxido C-14 e C-15, respectivamente. Os sinais em δ 152,3 e 127,2 foram atribuídos aos carbonos C-1 e C-2, respectivamente.

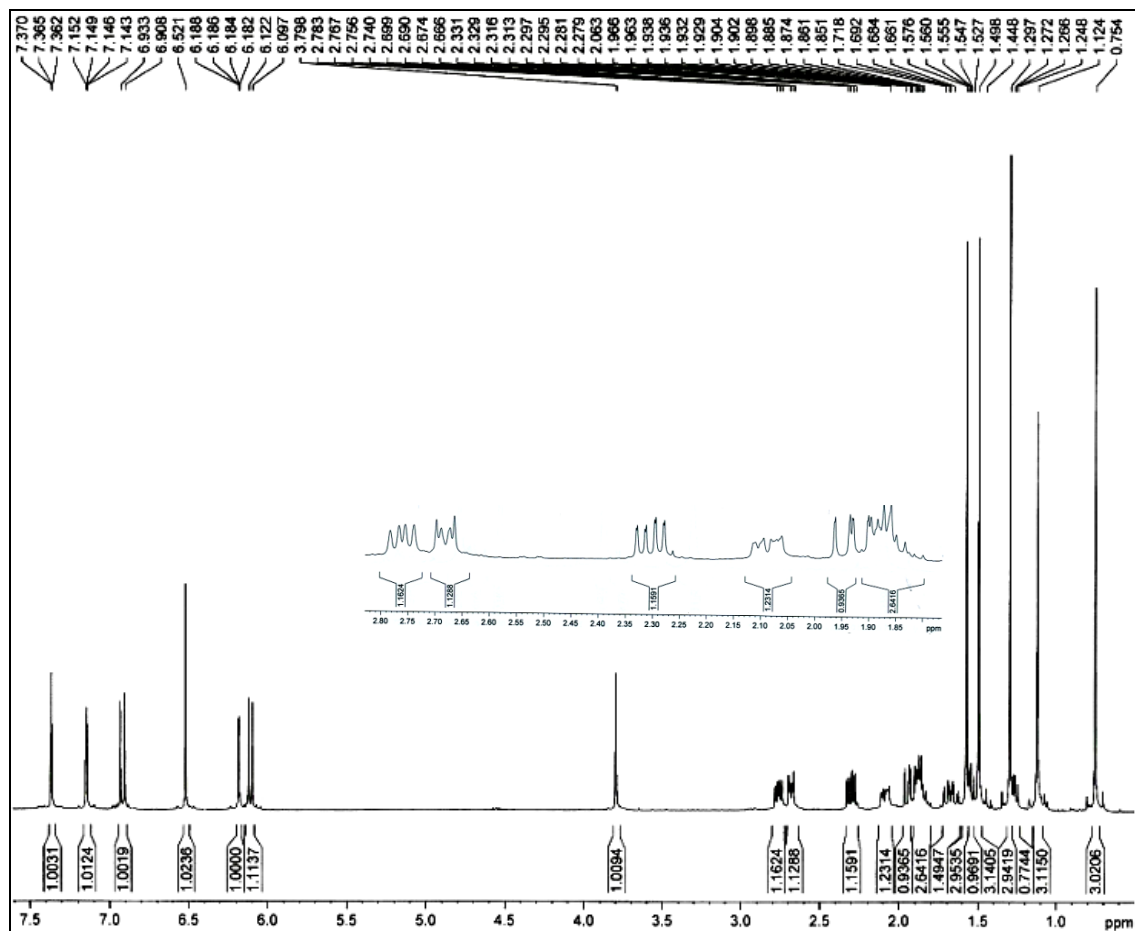


Figura 4.62: Espectro de RMN ¹H da substância **21** (400 MHz, CDCl₃)

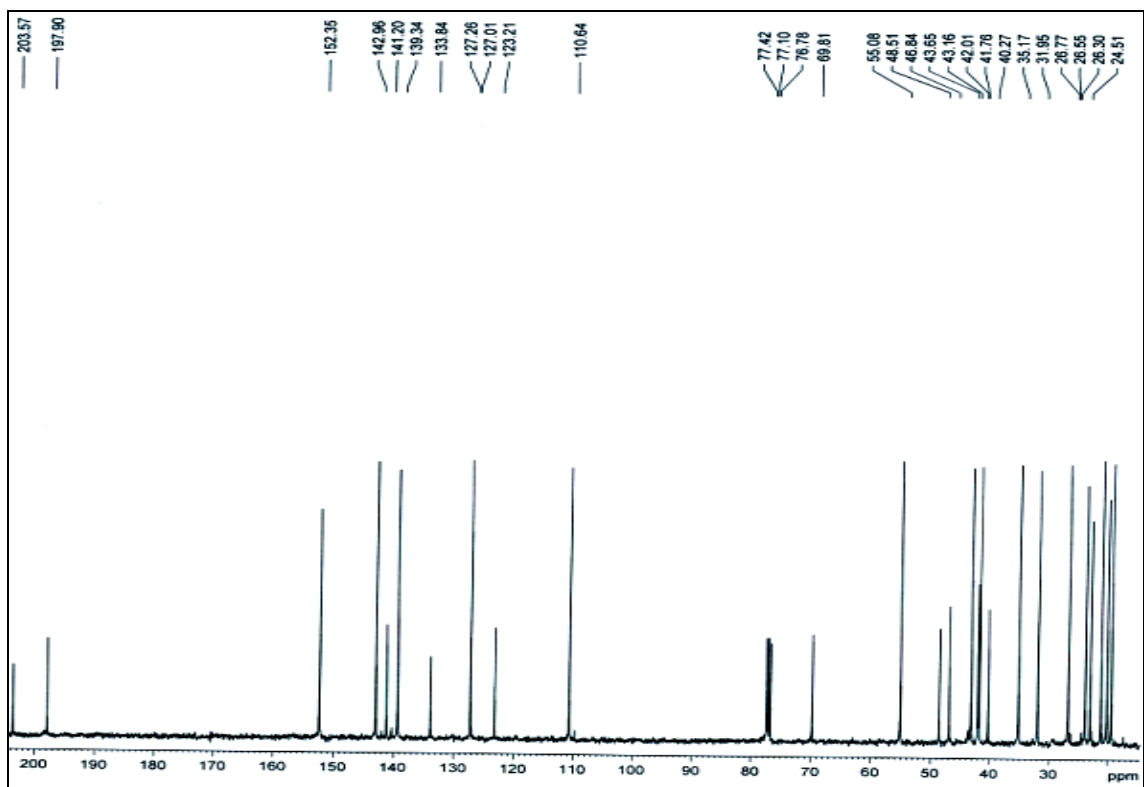


Figura 4.63: Espectro de RMN ^{13}C da substância **21** (100 MHz, CDCl_3)

A análise dos dados obtidos e a comparação com dados da literatura indicam que a substância **21** é conhecida como cedrelona. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C da cedrelona assim como os dados descritos na literatura estão representados nas Tabelas 4.19 e 4.20, respectivamente.

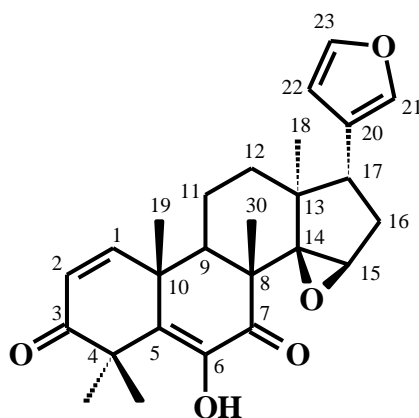


Tabela 4.19: Dados de RMN¹H da substância **21**.

H	δ ou ppm, J em Hz (CDCl ₃ , 400 MHz)	(LUO <i>et al.</i> , 2000) (CDCl ₃ , 400 MHz)
1	6,92 (1H, <i>d</i> , $J = 10$ Hz)	6,86 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
2	6,10 (1H, <i>d</i> , $J = 10$ Hz)	6,05 (1H, <i>d</i> , $J = 9,8$ Hz)
9	2,68 (2H, <i>dd</i> , $J = 9,6; 3,2$ Hz)	-
11	1,85	-
12	2,08 (<i>m</i>)	-
15	3,79 (1H, <i>s</i>)	3,74 (1H, <i>s</i>)
16a	1,94 (<i>dd</i>)	-
16b	2,30 (<i>dddd</i>)	-
17	2,76 (2H; <i>dd</i> , $J = 6,4$ e 10 Hz)	-
18	0,75 (3H, <i>s</i>)	0,69 (3H, <i>s</i>)
19	1,12 (3H, <i>s</i>)	1,06 (3H, <i>s</i>)
21	7,14 (1H, <i>s</i>)	7,09 (1H, <i>s</i>)
22	6,18 (1H, <i>s</i>)	6,12 (1H, <i>s</i>)
23	7,36 (1H, <i>t</i> , $J = 1,3$ Hz)	7,31 (1H, <i>t</i> , $J = 1,5$ Hz)
28	1,49 (3H, <i>s</i>)	1,43 (3H, <i>s</i>)
29	1,57 (3H, <i>s</i>)	1,51 (3H, <i>s</i>)
30	1,29 (3H, <i>s</i>)	1,23 (3H, <i>s</i>)
OH	6,52 (1H, <i>s</i>)	6,46 (1H, <i>s</i>)

Tabela 4.20: Dados de RMN ^{13}C da substância **21**.

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

4.7.2- Determinação Estrutural da Substância 22

A substância **22** foi isolada do extrato diclorometânico do arilo *Trichilia catigua*.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figuras 4.64 e 4.65) indicou a presença de um limonóide. Foram observados seis singletos a δ 0,80; 1,15; 1,17; 1,26, 1,29 e 2,16 atribuídos a seis metilas, sendo esta última referente aos hidrogênios da metila do grupo acetato. Os sinais em δ 7,36 (t, $J = 1,2$ Hz), δ 7,23 (dd 1,6, 0,9) e δ 6,26 (dd 1,2, 0,9) foram atribuídos aos hidrogênios do anel furano, H-23, H-21 e H-22 respectivamente. Os dubletos em δ 7,08 (d, $J = 9,6$ Hz) e δ 5,86 (d, $J = 9,6$ Hz) atribuídos aos H-1 e H-2, respectivamente confirmam a presença do anel 1-en-3-one do sistema mimocinol (SIDDIQUI *et al.*, 1984 e 2000, Tabela 4.21).

Na análise do Espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.66, Tabela 4.22) observou-se 28 átomos de carbono. A ligação dupla conjugada à carbonila em C-3 (205,0) foi caracterizada pelos sinais em δ 157,0 (C-1) e δ 126,0 (C-2). Além dos sinais de carbonos olefínicos C-1 e C-2, os sinais em δ 160,0 e δ 120,0 foram atribuídos à ligação dupla entre C-14 e C-15 dos limonóides com o anel D intacto. O carbono carbonílico do grupo acetato foi caracterizado pelo sinal em δ 170,4.

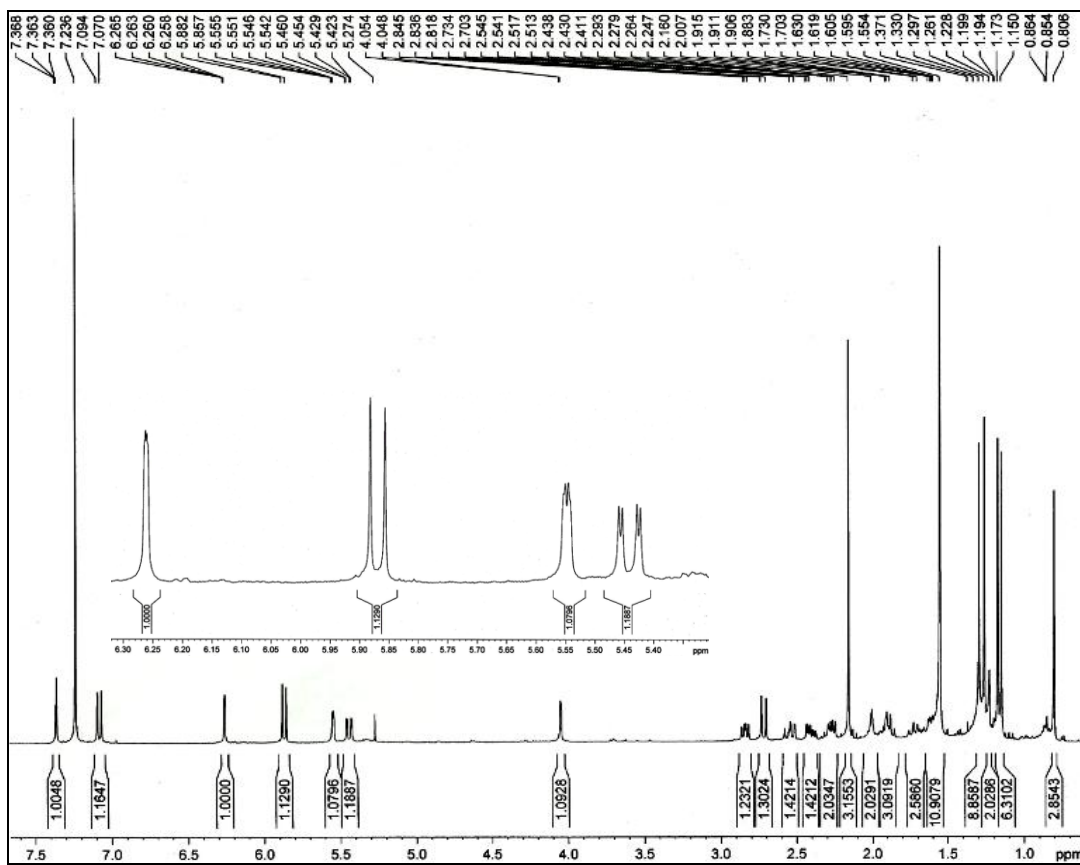


Figura 4.64: Espectro de RMN ^1H da substância **22** (400 MHz, CDCl_3)

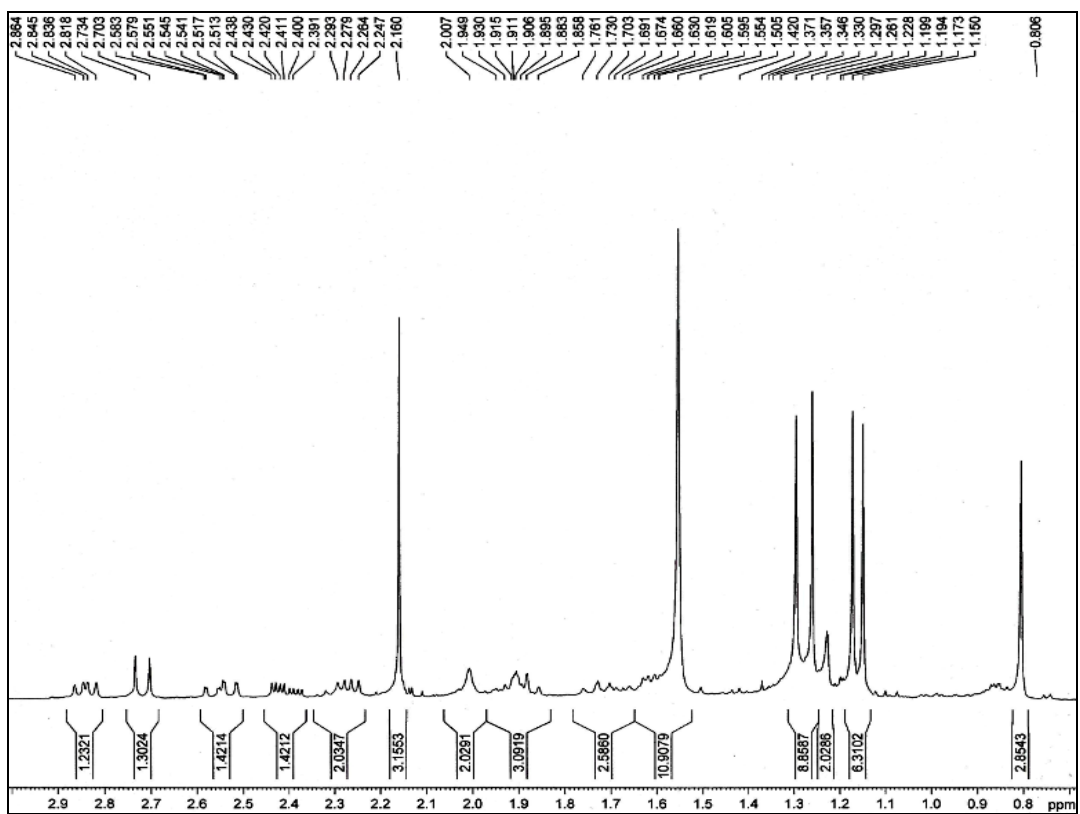


Figura 4.65: Ampliação do espectro de RMN ^1H da substância **22** (400 MHz, CDCl_3).

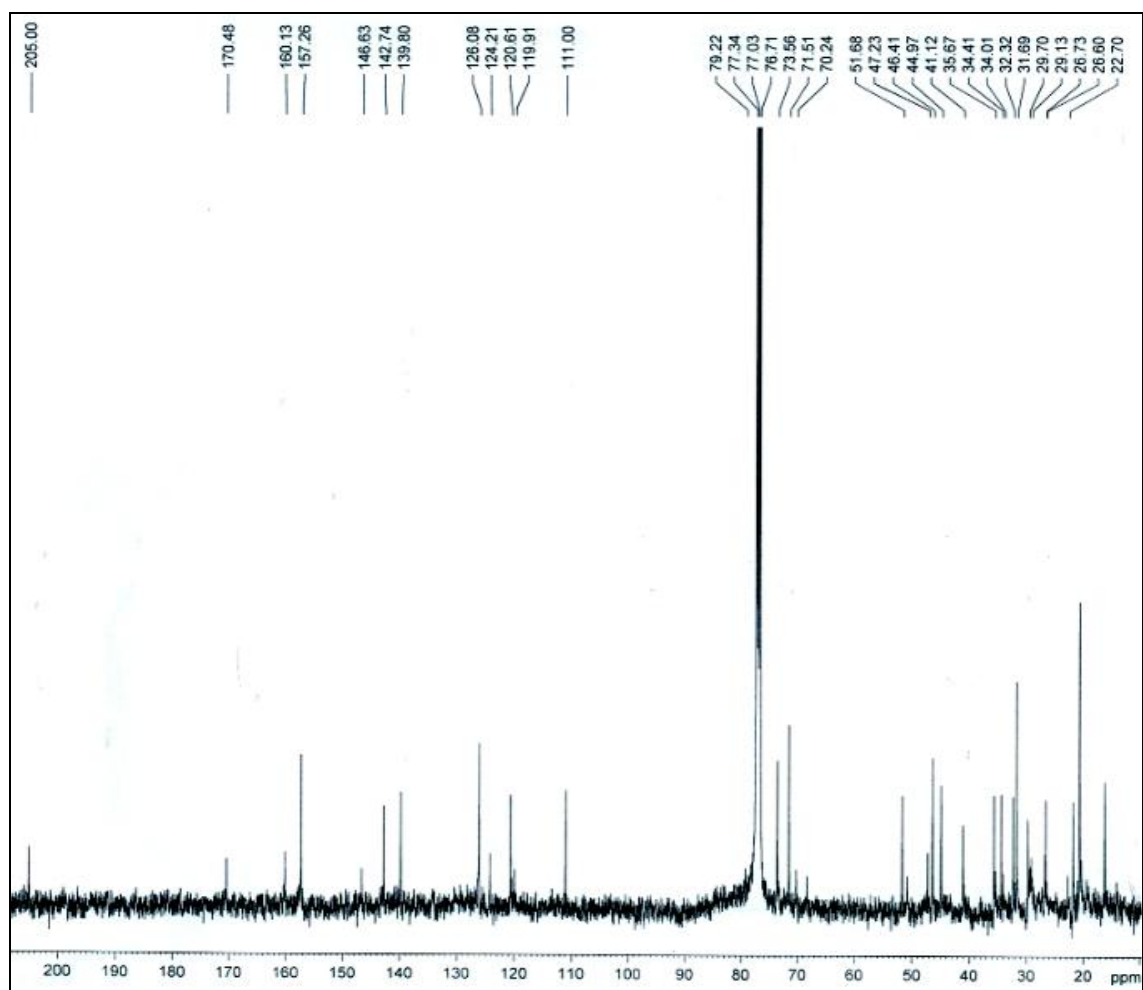


Figura 4.66: Espectro de RMN ^{13}C da substância **22** (100 MHz, CDCl_3).

Tabela 4.21: Dados de RMN¹H da substância **22**.

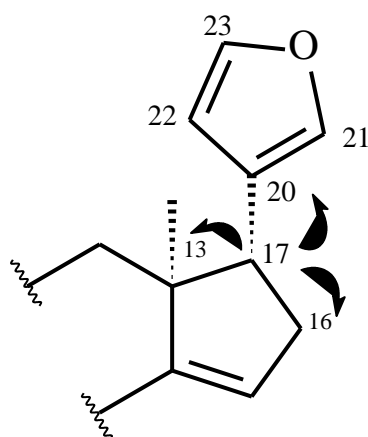
H	δ ou ppm, J em Hz (CDCl ₃ , 400 MHz)	(SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000) (CDCl ₃ , 300 MHz)	(SIDDIQUI <i>et al.</i> , 1984, 1986) (CDCl ₃ , 100 MHz)
1	7,08 (1H, d, $J = 9,6$)	7,10 (1H, d, $J = 10,1$)	7,06 (1H, d, $J = 10,1$)
2	5,86 (1H, d, $J = 9,6$)	5,90 (1H, d, $J = 10,1$)	5,82 (1H, d, $J = 10,1$)
5	2,72 (1H, d, $J = 12,4$)	2,75 (1H, d, $J = 12,3$)	2,17 (1H, d, $J = 11,2$)
6	5,43 (1H, dd, $J = 12,4, 2,4$)	5,48 (1H, dd, $J = 12,3, 2,5$)	4,30 (1H, dd, $J = 11,2, 2,5$)
7	4,00 (1H, d, $J = 2,4$)	4,07 (1H, d, $J = 2,5$)	5,30 (1H, d, $J = 2,5$)
9	2,26 (1H, dd, $J = 12,8, 6,8$)	2,30 (1H, dd, $J = 12,6, 6,5$)	2,00-2,35 (m)
11	1,70 e 1,90 (2H, 2 m)	2,00-2,25 e 2,20-2,39 (2H, m)	2,00-2,90 (m)
12	1,60 e -1,90 (2H, 2 m)	2,41-2,45 e 2,00-2,25 (2H, m)	2,55-2,90 (m)
15	5,55 (1H, dd, $J = 3,2, 1,6$)	5,57 (1H, , $J = 3,6, 1,7$)	5,37 (1H, m)
16a	2,41 (1H, ddd, $J = 14,4, 7,2, e 3,2$)	2,41 (2H, ddd, $J = 14,4, 7,2, 3,3$)	2,00-2,35 (m)
16b	2,50 (1H, ddd, $J = 14,4, 10,8, e 1,6$)	-	2,00-2,35 (m)
17	2,84 (1H, dd, $J = 7,2, 10,8$)	2,46 (1H, dd, $J = 7,2, 3,3$)	2,00-2,35 (m)
18	0,80 (3H, s)	0,82 (3H, s)	1,07 (3H, s)
19	1,15 (3H, s)	1,17 (3H, s)	1,18 (3H, s)
21	7,23 (1H, dd, $J = 1,2, 0,9$)	7,25 (1H, dd, $J = 1,6, 0,9$)	7,30 (1H, m)
22	6,26 (1H, dd, $J = 1,2, 0,9$)	6,27 (1H, dd, $J = 1,6, 0,9$)	6,22 (1H, m)
23	7,36 (1H, t, $J = 1,2$)	7,37 (1H, t, $J = 1,6$)	7,18 (1H, m)
28	1,29 (3H, s)	1,19 (3H, s)	1,21 (3H, s)
29	1,17 (3H, s)	1,24 (3H, s)	1,25 (3H, s)
30	1,26 (3H, s)	1,31 (3H, s)	1,35 (3H, s)

OCO <u>C</u> H ₃	2,16 (3H, s)	1,95 (3H, s)	1,97 (3H, s)
-----------------------------	--------------	--------------	--------------

Tabela 4.22: Dados de RMN ¹³C da substância **22**.

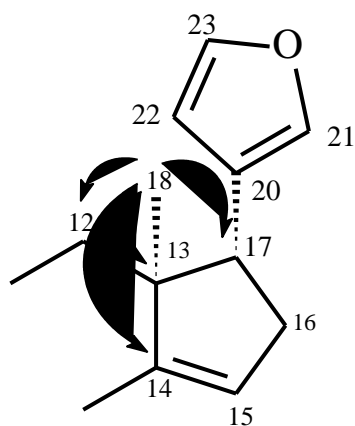
H	δ ou PPM (CDCl ₃ , 100 MHz)	(SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2000) (CDCl ₃ , 125 MHz)	(SIDDIQUI <i>et al.</i> , 1984) (CDCl ₃ , 25 MHz)
1	157,2	157,3	157,3
2	126,0	126,1	126,1
3	205,0	205,9	205,9
4	44,9	40,5	40,5
5	46,4	49,8	49,8
6	71,5	76,0	68,0
7	73,5	68,5	79,0
8	44,9	45,4	45,4
9	35,6	37,1	37,1
10	41,1	43,1	43,1
11	16,2	16,3	16,3
12	32,3	33,6	33,6
13	47,2	47,0	47,0
14	160,1	158,6	158,0
15	120,6	119,0	119,5
16	34,4	34,3	34,3
17	51,6	51,6	51,6
18	20,6	20,7	20,7
19	20,6	14,0	14,0
20	124,2	124,5	124,4
21	139,8	142,5	142,5
22	111,0	110,9	110,9
23	142,7	139,6	139,6
28	31,6	27,0	27,0
29	20,6	19,6	19,6
30	26,6	20,2	20,2
O <u>C</u> COH ₃	170,4	171,9	171,9
OCO <u>C</u> H ₃	21,7	21,2	21,2

O espectro de HSQC (Figura 4.68 e 4.69), mostra a correlação dos hidrogênios H-21, H-22 e H-23 com os carbonos em δ 139,8, δ 111,0, δ 142,7 respectivamente e o espectro de HMBC (Figuras 4.70 - 4.72) mostra correlação dos sinais de H-21 e H-23 com um carbono em δ 124,2, atribuído ao C-20. O sinal do hidrogênio em δ 2,84 (s) foi atribuído ao H-17 do anel D, pois através do mapa de correlações HMBC observa-se a correlação deste sinal com o do carbono C-20 e este sinal de hidrogênio também se correlaciona com os carbonos em δ 34,4 e 47,2, sugerindo estes sinais para os carbonos C-16 e C-13 respectivamente.

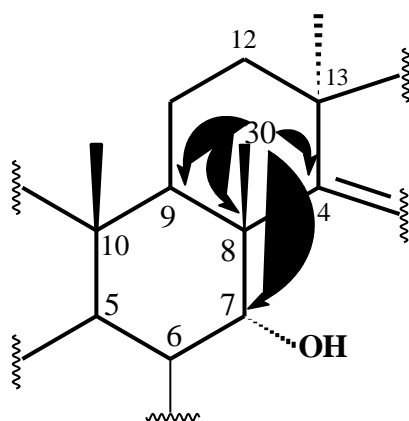


O acoplamento entre H-1 e H-2 foi evidenciado através do espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (Figura 4.67). As atribuições dos deslocamentos químicos H-1/C-1 e H-2/C-2 foram confirmadas através do mapa de correlações HSQC (Figura 4.68 e 4.69). Observou uma correlação entre o dubleto em δ 7,08 (H-1) e o sinal em δ 157,0 (C-1) e uma correlação entre o dubleto em δ 5,86 (H-2) e o sinal em δ 126,0 (C-2).

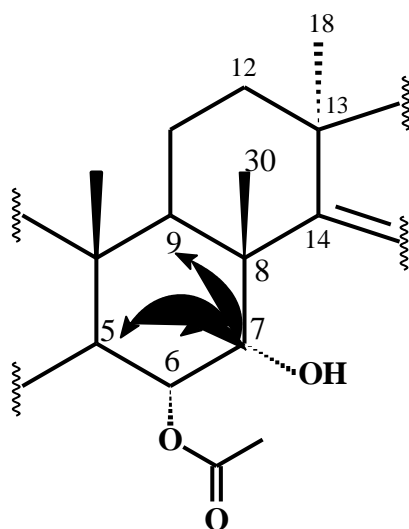
O HMBC mostra um sinal de hidrogênio de metila em δ 0,80 atribuído a metila 18, pois observa-se a correlação deste com os sinais de C-13, C-17, e ainda com os carbonos em δ 32,3 e δ 160,1 sugerindo estes sinais para os carbonos C-12 e C-14 respectivamente.



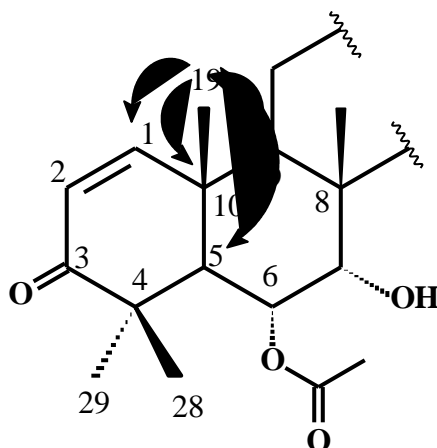
O sinal em δ 1,26 foi atribuído a metila 30 que correlacionou-se com o sinal de C-14 (δ 160,1) e com os dos carbonos em δ 73,5, δ 44,9, δ 35,6 sugerindo estes sinais para os carbonos C-7, C-8 e C-9 respectivamente.



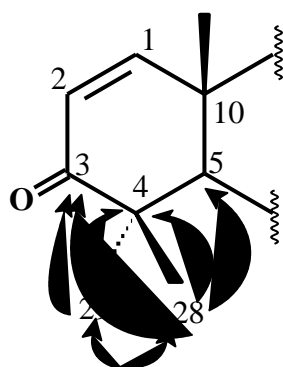
O sinal em δ 4,00 atribuído ao H-7 mostrou correlação com o sinal de C-9 (δ 35,7) e com os dos carbonos em δ 46,4 e δ 71,5 sugerindo estes sinais para os carbonos C-5 e C-6 respectivamente.



O sinal em δ 1,15 foi atribuído a metila 19 que correlacionou-se com os sinais de C-1, C-5, C-9 e com o carbono em δ 41,1 atribuído ao C-10.



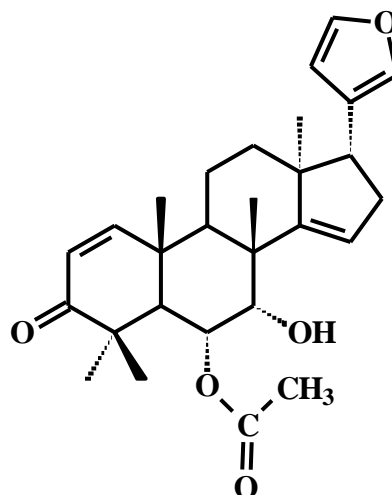
Dois outros singletos relativos a grupos metila foram observados em δ 1,17 (Me-29) e δ 1,29 (Me-28). A correta atribuição da posição de cada grupo metila foi efetuada com auxílio dos mapas de correlações HSQC e HMBC. As correlações a longa distância do sinal em δ 1,17 (Me-29) com os sinais de carbonos C-3 (δ 205,0), C-4 (δ 44,9) e C-28 (δ 31,6) e, por fim, o sinal em δ 1,29 (Me-28) com os sinais de carbonos C-3 (δ 205,0), C-4 (δ 44,4), C-5 (δ 46,4) e C-29 (δ 20,6), puderam ser observados no mapa de correlações HMBC.



Ao analisar o espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (Figura 4.67) observou-se que o sinal em δ 2,84 (dd, $J = 7,2$ e $10,8$ Hz), que foi atribuído ao H-17, acopla com os sinais em 2,41 (ddd, $J = 14,4$; $7,2$ e $3,2$ Hz) e δ 2,50 (ddd, $J = 14,4$; $1,6$ e $10,8$ Hz) (H-16a e b), os quais acoplam entre si. Além disso, foi possível confirmar o sinal do H-11 (δ 1,70, m e 1,90, m) que acoplam com o sinal em δ 2,26 (dd, $J = 12,8$ e $6,8$)

atribuído ao H-9 e com os sinais em δ 1,90 m e 1,60 m. atribuídos aos hidrogênios H-12.

O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo positivo (Figura 4.73) da substância **22** apresentou um pico em m/z 453,2 correspondente ao íon quasimolecular. Essa informação, associada às análises de RMN realizadas, indicou que o limonóide é o 6 α -O-acetil-7-deacetilnimocinol.



Tendo em vista as diferenças observadas nos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H para a substância **22** e aquelas propostas por SIDDIQUI *et al.* (1984, **22a** e 2000, **22b**), verifica-se que provavelmente SIDDIQUI publicou os mesmos dados de RMN ^{13}C para as duas substâncias (Tabela 4.22) e os dados de RMN ^1H (Tabela 4.21) não foram analisados adequadamente, assim como as correlações HMBC (por exemplo H-1 e H-29 correlacionarem com C-6). As principais alterações verificadas ao comparar os dados de RMN ^{13}C , do composto isolado e aquelas da literatura, são os valores de C-19, 28 e 30, que foram causadas provavelmente pela localização do grupo acetato em C-6 e não em C-7. As alterações de RMN ^1H entre os limonóides isolados por SIDDIQUI *et al.*, (1984 e 2000) referem-se principalmente aos dados da metila 18. Os dados de RMN ^1H entre estes limonóides e o isolado no presente trabalho, diferem principalmente entre os sinais dos hidrogênios 11, 12, 17, 28-30. A análise desse conjunto de dados sugere que os compostos isolados por SIDDIQUI *et al.*, (1984 e 2000) devem possuir o grupo acetato localizado em C-7, sendo um

deles o isômero 17-epi. Portanto, a substância isolada neste trabalho deve ser inédita.

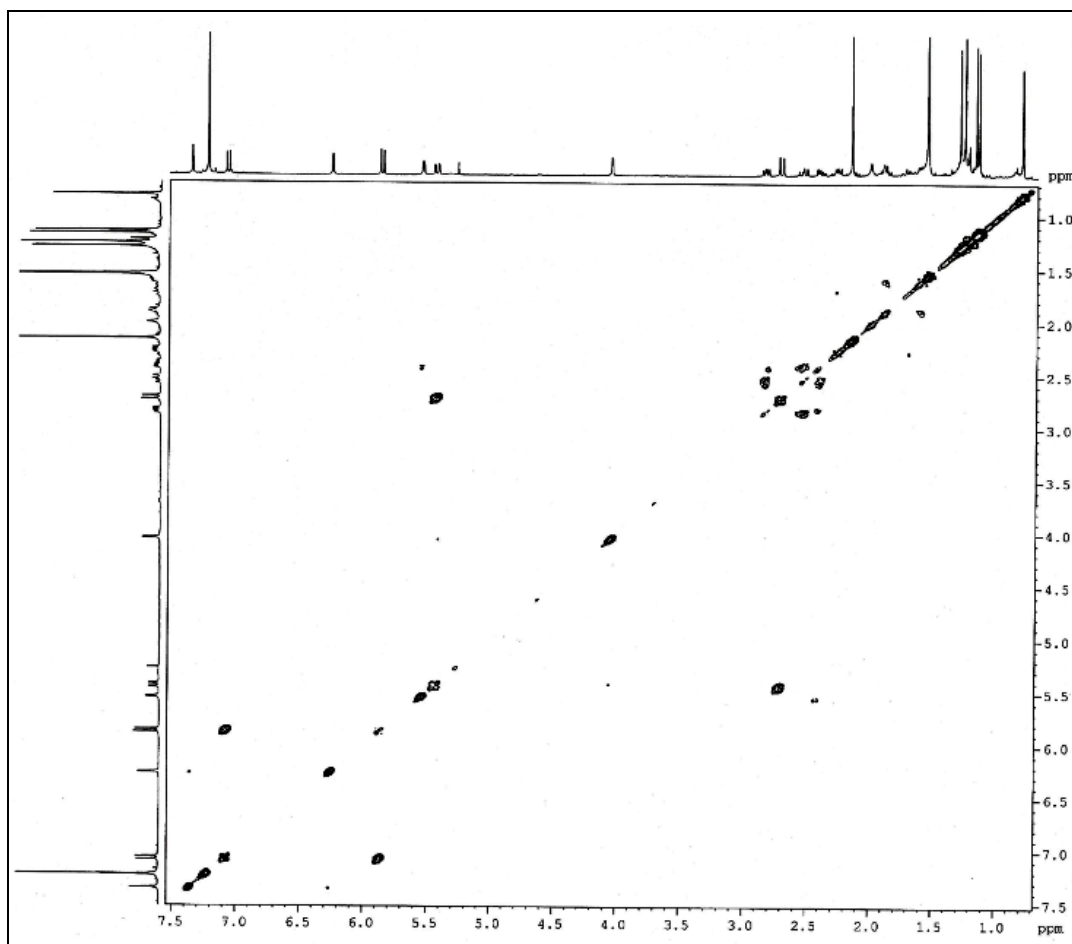
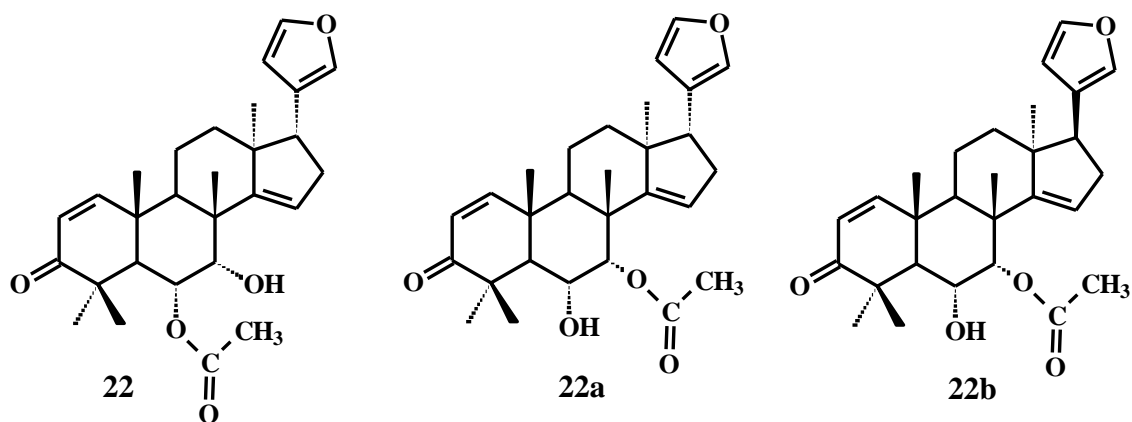


Figura 4.67: Espectro de COSY ¹H-¹H 45° da substância **22** (400 MHz, CDCl₃)

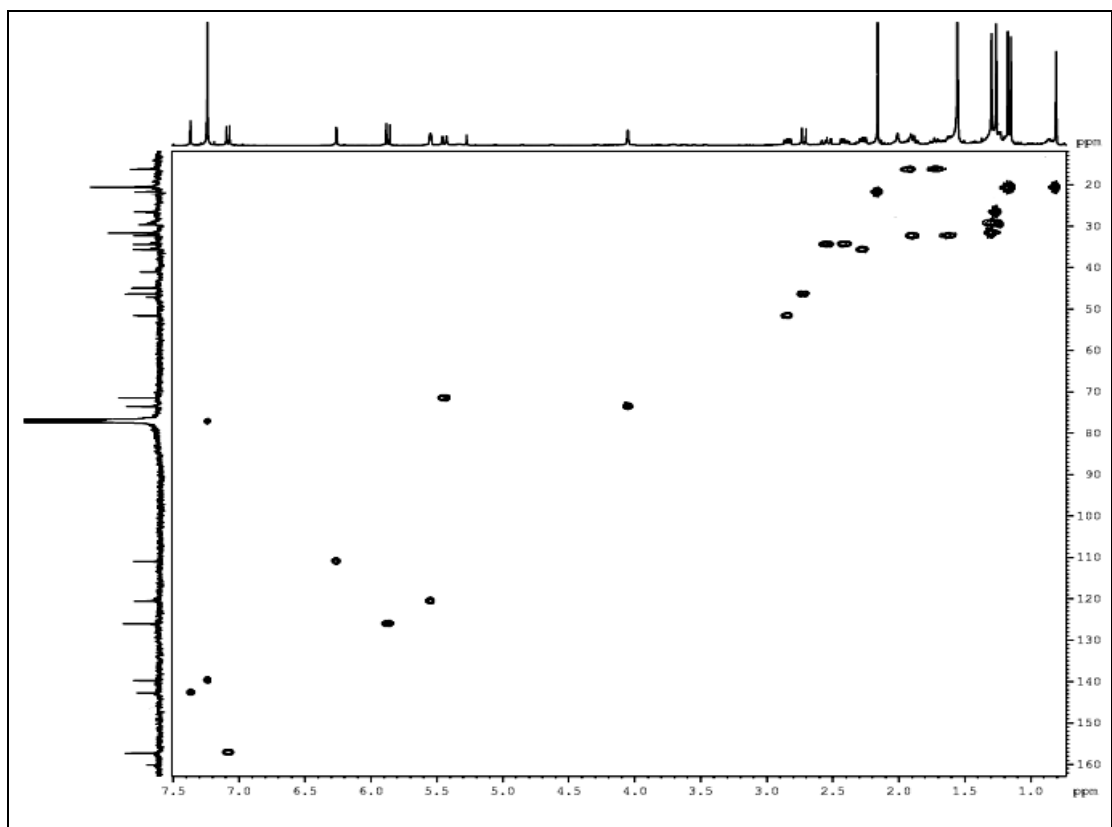


Figura 4.68: Mapa de contorno de HSQC da substância **22** (400 MHz, CDCl_3)

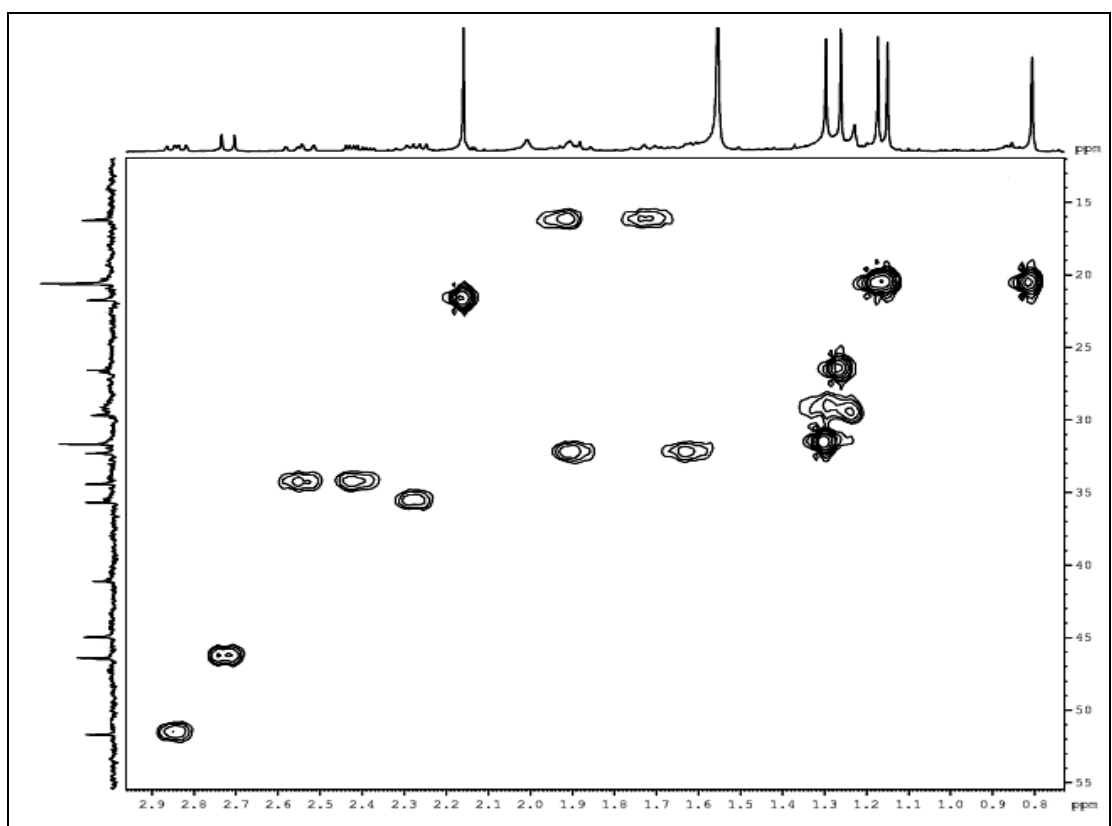


Figura 4.69: Ampliação do mapa de contorno de HSQC da substância **22** (400 MHz, CDCl_3)

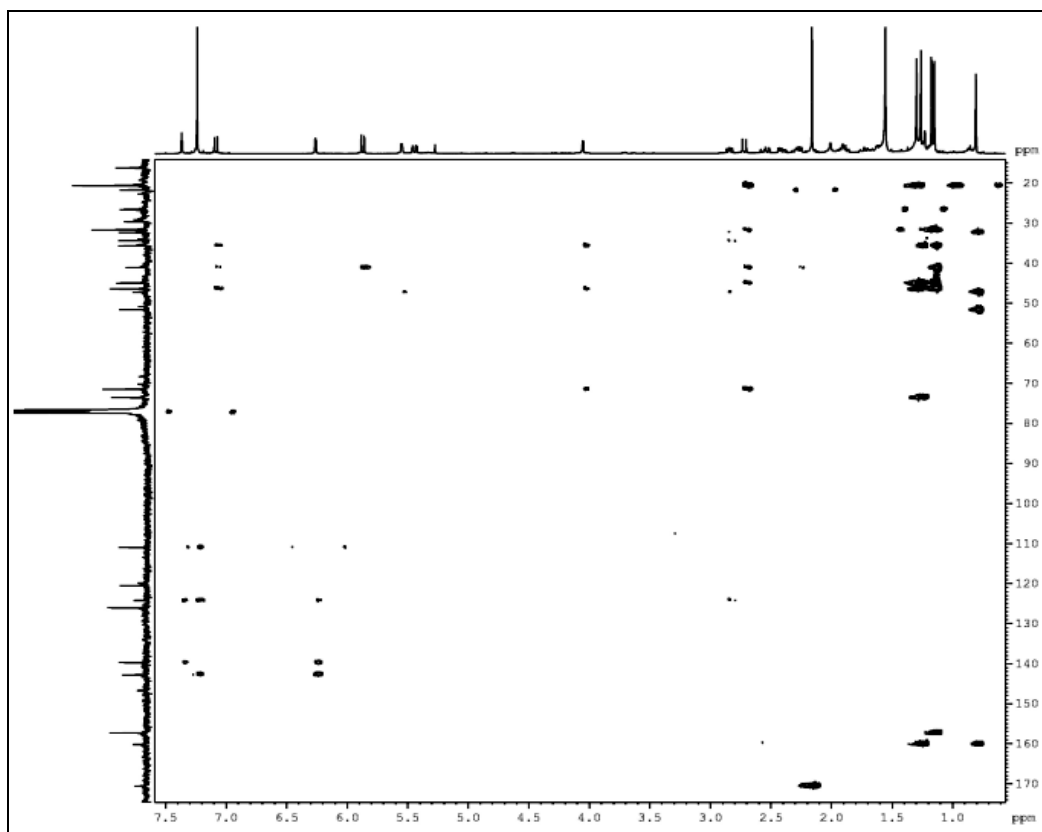


Figura 4.70: Mapa de contorno de HMBC da substância **22** (400 MHz, CDCl₃)

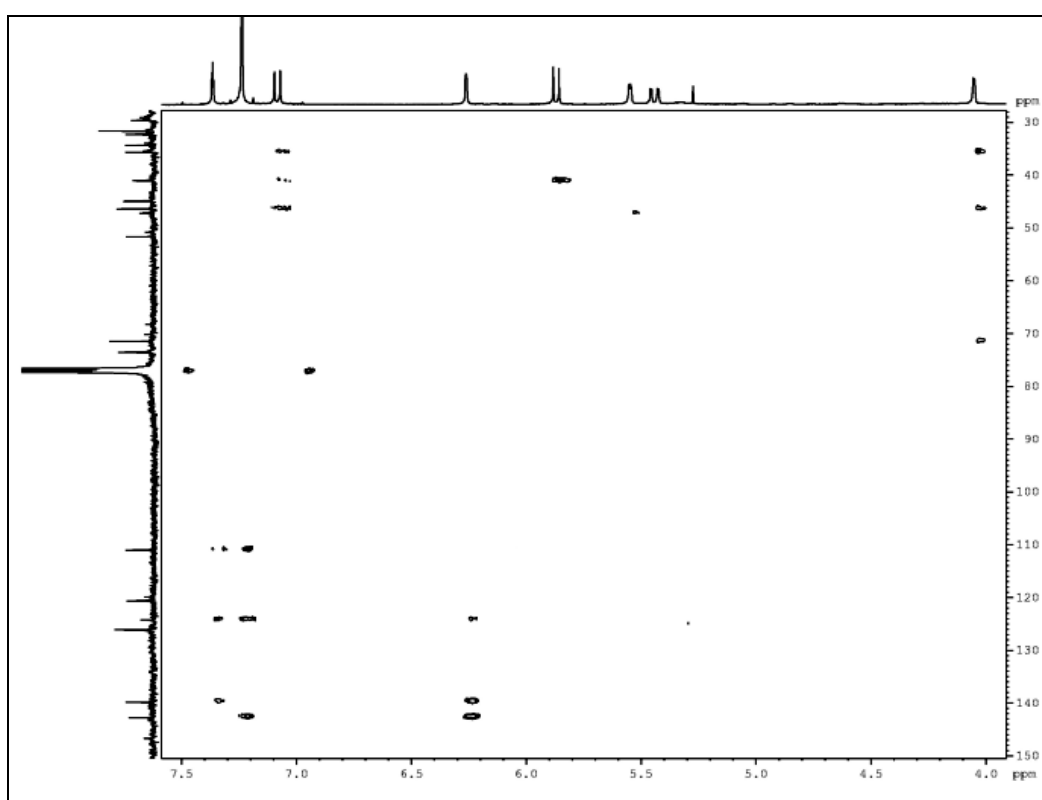


Figura 4.71: Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância **22** (400 MHz, CDCl₃)

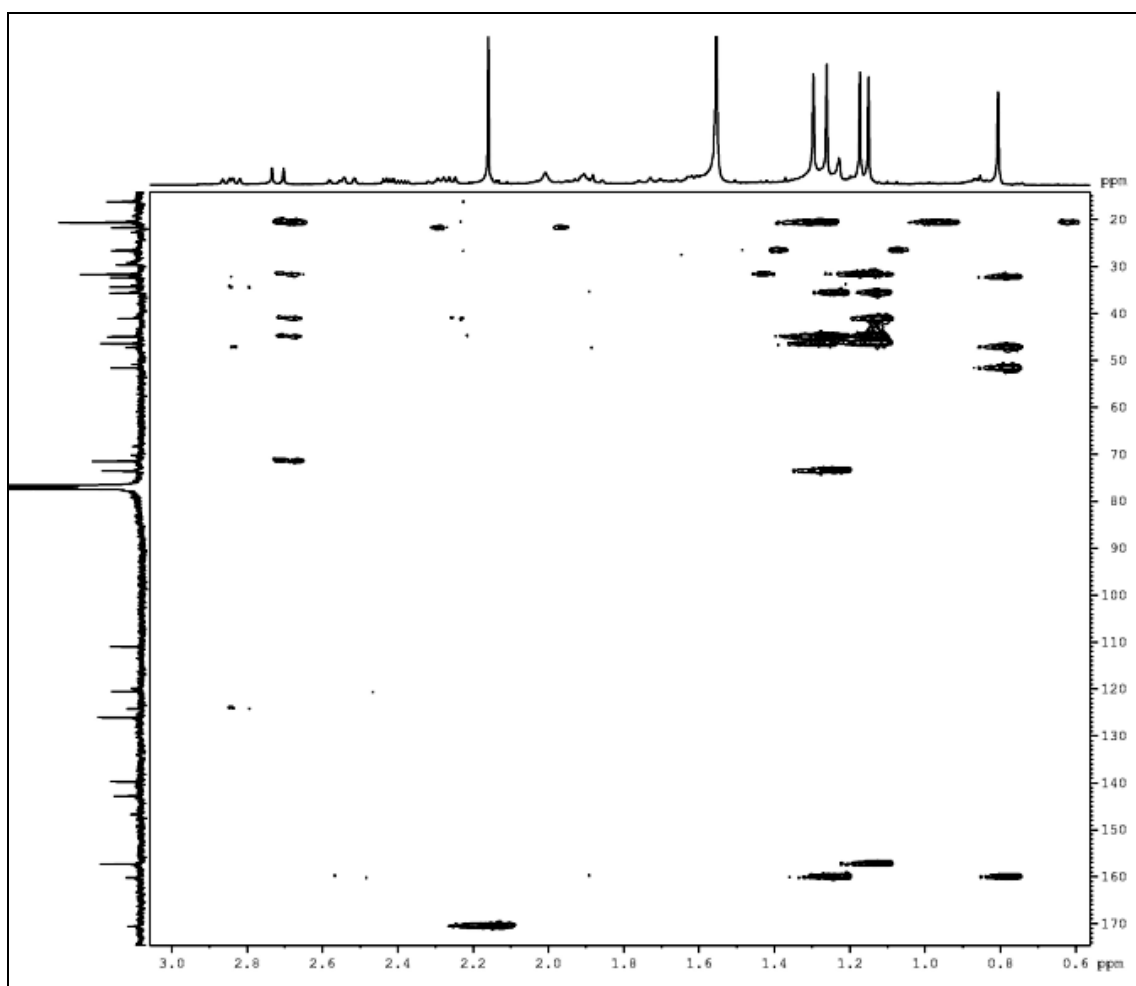


Figura 4.72: Ampliação do mapa de contorno de HMBC da substância **22** (400 MHz, CDCl_3)

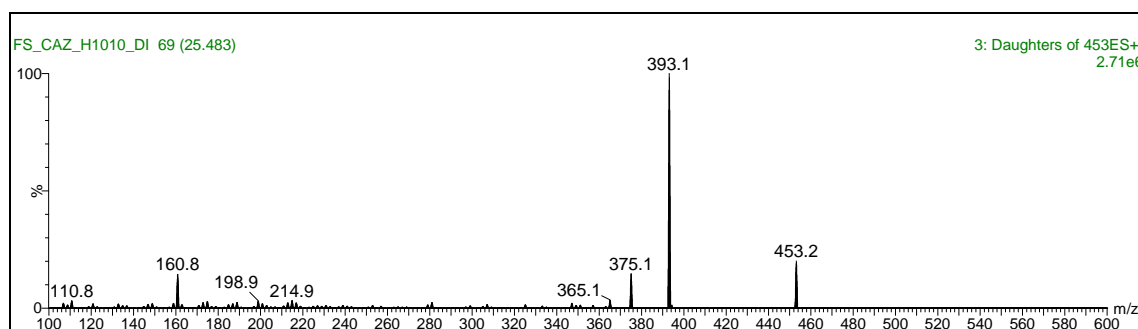


Figura 4.73: Espectro de massas (ESI) modo positivo da substância **22**.

4.7.3- Determinação Estrutural da Substância 23

A substância **23** foi isolada do extrato diclorometânico do arilo de *Trichilia catigua*.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 4.74) indicou a presença de um limonóide. Foram observados seis singletos a δ 0,81; 1,10; 1,17; 1,20; 1,27 e 2,18 atribuídos a seis metilas, sendo esta última referente aos hidrogênios da metila do grupo acetato. Os sinais em δ 7,43 (*t*, $J = 1,6$ Hz), δ 7,29 (*dd* 1,6, 0,8) e δ 6,29 (*dd* 1,6, 0,8) foram atribuídos aos hidrogênios H-23, H-21 e H-22 respectivamente do anel furano. Os dubletos em δ 7,08 (*d*, $J = 10,0$ Hz) e δ 5,92 (*d*, $J = 10,0$ Hz) atribuídos aos H-1 e H-2, respectivamente confirmam a presença do anel 1-en-3-one.

Na análise do Espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.75, Tabela 4.23) foram observados 28 sinais para átomos de carbono. A ligação dupla conjugada à carbonila em C-3 (205,0) foi caracterizada pelos sinais em δ 157,6 (C-1) e δ 126,1 (C-2). O carbono carbonílico do grupo acetato foi caracterizado pelo sinal em δ 169,7.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **23** estão listados na Tabela 4.23 juntamente com os dados descritos na literatura para os compostos **22** e **24** (7-acetyltrichilenone, CORTEZ *et al.* 1998).

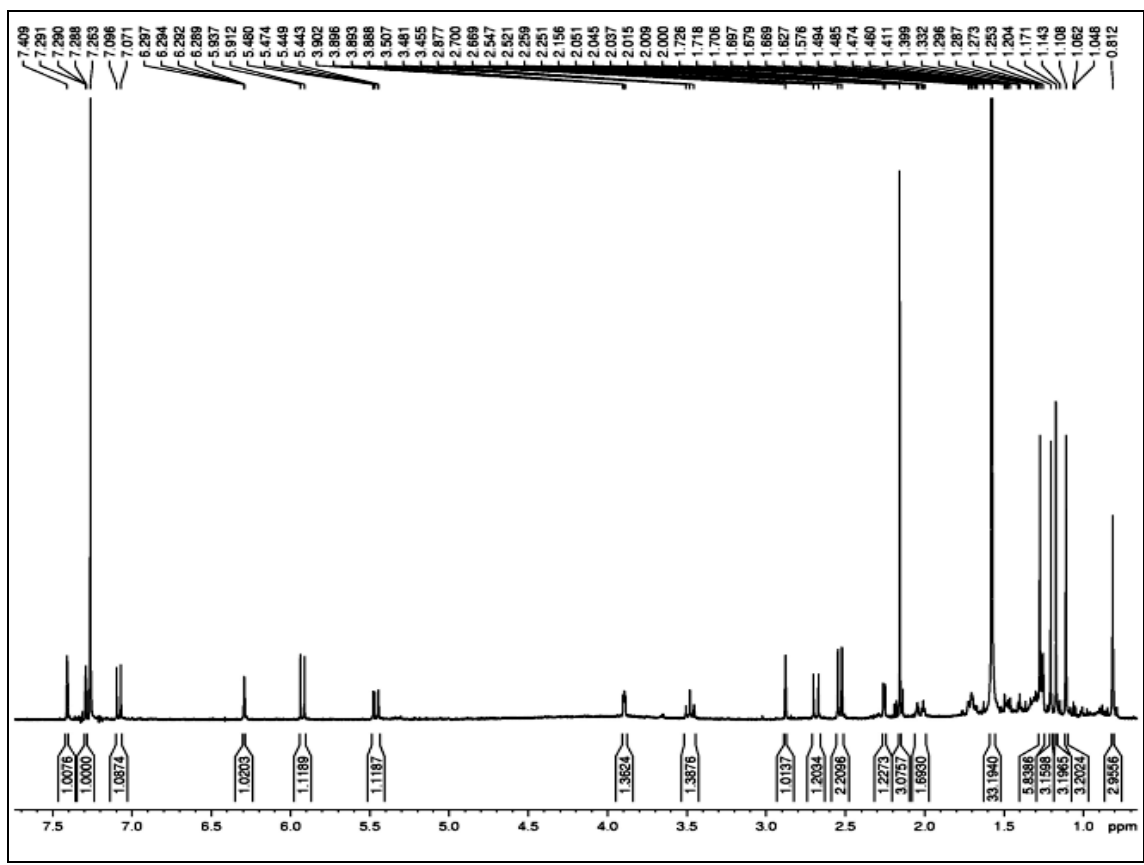


Figura 4.74: Espectro de RMN ¹H da substância **23** (400 MHz, CDCl₃)

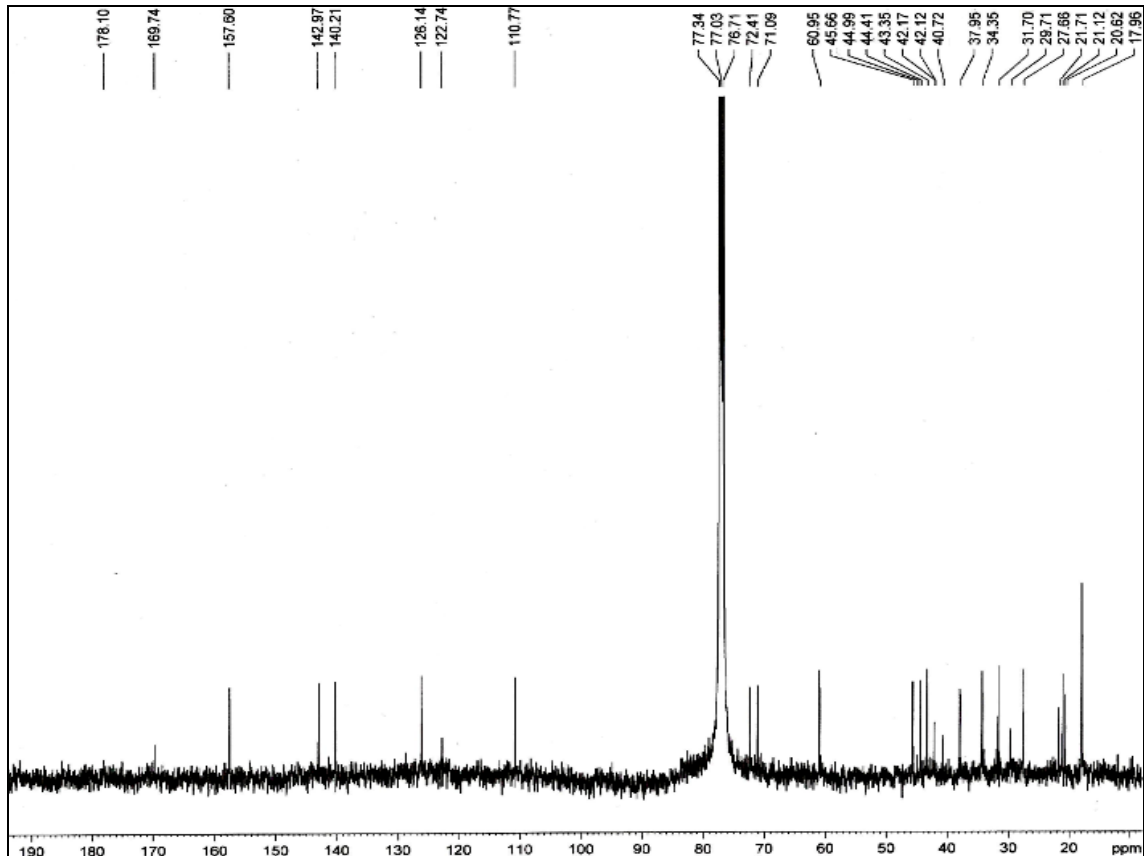
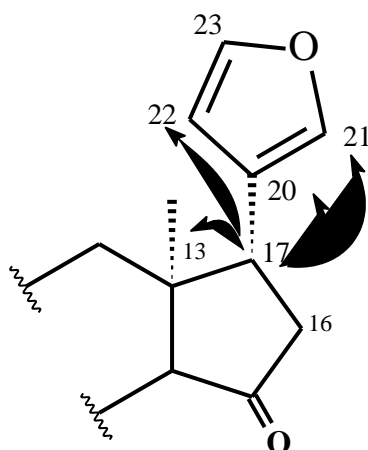


Figura 4.75- Espectro de RMN ¹³C da substância **23** (100 MHz, CDCl₃)

Tabela 4.23: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **23**.

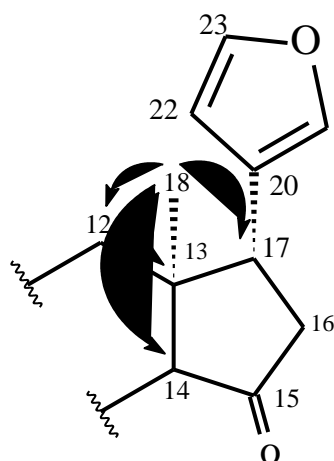
H/C	RMN ^1H de 23	RMN ^1H de 22	RMN ^{13}C de 23	RMN ^{13}C de 22	RMN ^{13}C de 24
1	7,08 (1H, d, $J = 10,0$)	7,08 (1H, d, $J = 9,6$)	157,6	157,2	157,8
2	5,92 (1H, d, $J = 10,0$)	5,86 (1H, d, $J = 9,6$)	126,1	126,0	125,9
3	-		205,0	205,0	204,4
4	-		44,4	44,4	44,1
5	2,68 (1H, d, $J = 12,0$)	2,72 (1H, d, $J = 12,4$)	45,6	46,4	45,2
6	5,46 (1H, dd, $J = 12,0$, 2,0)	5,43 (1H, dd, $J = 12,4$, 2,4)	71,1	71,5	22,3
7	3,91 (1H, dd, $J = 2,0$, 4,0)	4,00 (1H, d, $J = 2,4$)	72,4	73,5	73,3
8	-		42,1	44,9	41,1
9	1,47 (1H, m)	2,26 (1H, dd, $J = 12,8$, 6,8)	44,4	35,7	47,1
10			40,7	41,1	39,6
11	1,69 e 2,00 (2H, 2m)	1,70 e 1,90 (2H, 2 m)	17,9	16,2	17,6
12	1,23 e 2,03 (2H, 2m)	1,60 e -1,90 (2H, 2 m)	34,3	32,3	34,5
13	-		42,1	47,2	42,1
14	2,87 (1H, s)		60,9	160,1	61,3
15	-	5,55 (1H, dd, $J = 3,6$, 1,6)	220,0	120,6	218,6
16	2,55 (2 H, d, $J = 10,4$)	2,41 (2H, ddd, $J = 10,8$, 7,2, 3,2)	43,3	34,4	43,2
17	3,48 (1H, t, $J = 10,4$)	2,84 (1H, dd, $J = 7,2$, 10,8)	37,9	51,6	38,0
18	0,81 (3H, s)	0,80 (3H, s)	27,6	20,6	27,9
19	1,10 (3H, s)	1,15 (3H, s)	21,1	20,6	19,3
20	-		122,7	124,2	122,9
21	7,29 (1H, dd, $J = 1,6$, 0,8)	7,23 (1H, dd, $J = 1,6$, 0,9)	140,2	139,8	140,3
22	6,29 (1H, dd, $J = 1,6$, 0,8)	6,26 (1H, dd, $J = 1,2$, 0,9)	110,7	111,0	110,8
23	7,43 (1H, t, $J = 1,6$)	7,36 (1H, t, $J = 1,2$)	142,9	142,7	143,0
28	1,27 (3H, s)	1,29 (3H, s)	31,7	31,6	27,4
29	1,17 (3H, s)	1,17 (3H, s)	20,6	20,6	21,1
30	1,20 (3H, s)	1,26 (3H, s)	17,9	26,6	18,2
OH	2,26 (1H, d, $J = 4,0$)		-		
$\text{O}\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$			169,7	170,4	169,3
$\text{O}\text{C}\underline{\text{O}}\text{CH}_3$	2,18 (3H, s)	2,16 (3H, s)	21,7	21,7	21,1

O mapa de contorno HSQC (Figura 4.77), mostra as correlações dos sinais dos hidrogênios H-21, H-22 e H-23 com os dos carbonos em δ 140,2, δ 110,7, δ 142,9 respectivamente e o de HMBC (Figura 4.78) mostra as correlações dos sinais de H-21 e H-22 com um carbono em δ 122,7, atribuído ao C-20. O sinal do hidrogênio em δ 3,48 (t) foi atribuído ao H-17, pois através do mapa de correlações HMBC observa-se a correlação deste sinal com os carbonos C-20, C-21, C-22 e com o carbono em δ 42,1 atribuído ao C-13.

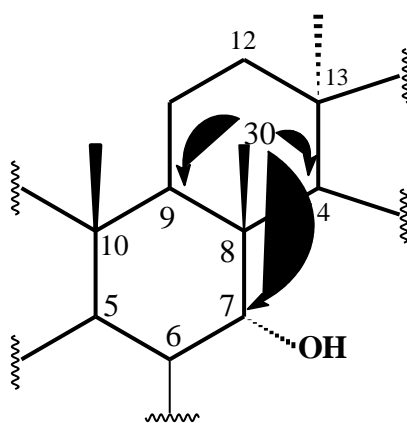


O acoplamento entre H-1 e H-2 foi evidenciado através do espectro de COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ 45° (Figura 4.76). As atribuições dos deslocamentos químicos H-1/C-1 e H-2/C-2 foram confirmadas através do mapa de correlações HSQC (Figura 4.77). Observou uma correlação entre o dubleto em δ 7,08 (H-1) e o sinal em δ 157,6 (C-1) e uma correlação entre o dubleto em δ 5,92 (H-2) e o sinal em δ 126,1 (C-2).

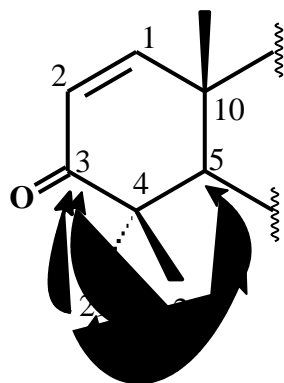
O HMBC mostra um sinal de metila em δ 0,81 atribuído aos hidrogênios da metila 18, pois este sinal correlacionando com os sinais de C-13, C-17 e com os carbonos em δ 34,3 e δ 60,9 sugerindo estes sinais para os carbonos C-12 e C-14 respectivamente.



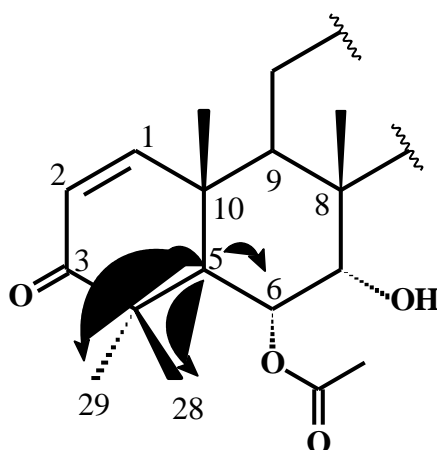
O sinal em δ 1,27 foi atribuído aos hidrogênios da metila 30 que correlacionou-se com o sinal em δ 42,1, δ 44,4, δ 60,9 e δ 72,4 atribuído aos carbonos C-8, C-9, C-14 e C-7 respectivamente.



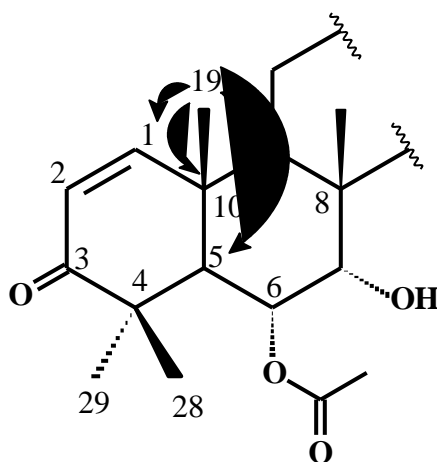
Dois outros singletos relativo a grupos metila foram observados em δ 1,17 (Me-29) e δ 1,27 (Me-28). A correta atribuição da posição de cada grupo metila foi efetuada com auxílio dos mapas de correlações HSQC e HMBC. As correlações a longa distância do sinal em δ H 1,17 (Me-29) com os sinais de carbonos C-3 (δ 205,0), C-5 (δ 45,6) e C-28 (δ 31,7) e por fim o sinal em δ 1,27 (Me-28) com os sinais de carbonos C-3 (δ 205,0), C-4 (δ 44,9) e C-29 (δ 20,6), puderam facilmente ser observados no mapa de correlações HMBC.



O sinal em δ 2,68 atribuído ao H-5 mostrou correlação os sinais de C-28, C-29 e com os carbonos em δ 44,4, δ 45,6, e δ 71,1 sugerindo estes sinais para os carbonos C-4, C-5 e C-6 respectivamente.



O sinal em δ 1,10 foi atribuído a metila 19 que correlacionou-se com os sinais de C-1, C-10, C-5 e C-9 e com o carbono em δ 40,7 atribuído ao carbono C-10.



Ao analisar o espectro de COSY ^1H - ^1H 45° (Figura 4.76) observou-se que o sinal em δ 3,48 que foi atribuído ao H-17 acopla com o sinal em δ 2,55 (*t*, H-16). O sinal em δ 3,91 que foi atribuído ao H-7 acopla com o sinal do OH em δ 2,26 e com o H-6 que por sua vez acopla também com o H-5.

O espectro de massas por electrospray (ESI) no modo positivo (Figura 4.79) da substância **23** apresentou um pico em m/z 469,2 correspondente ao íon quasimolecular. Essa informação, associada às análises de RMN realizadas e levantamento bibliográfico indicam que o limonóide **23** (6 α -O-acetil-7-deacetil-14,15-dihidro-15-oxo-nimocinol) é inédito na literatura.

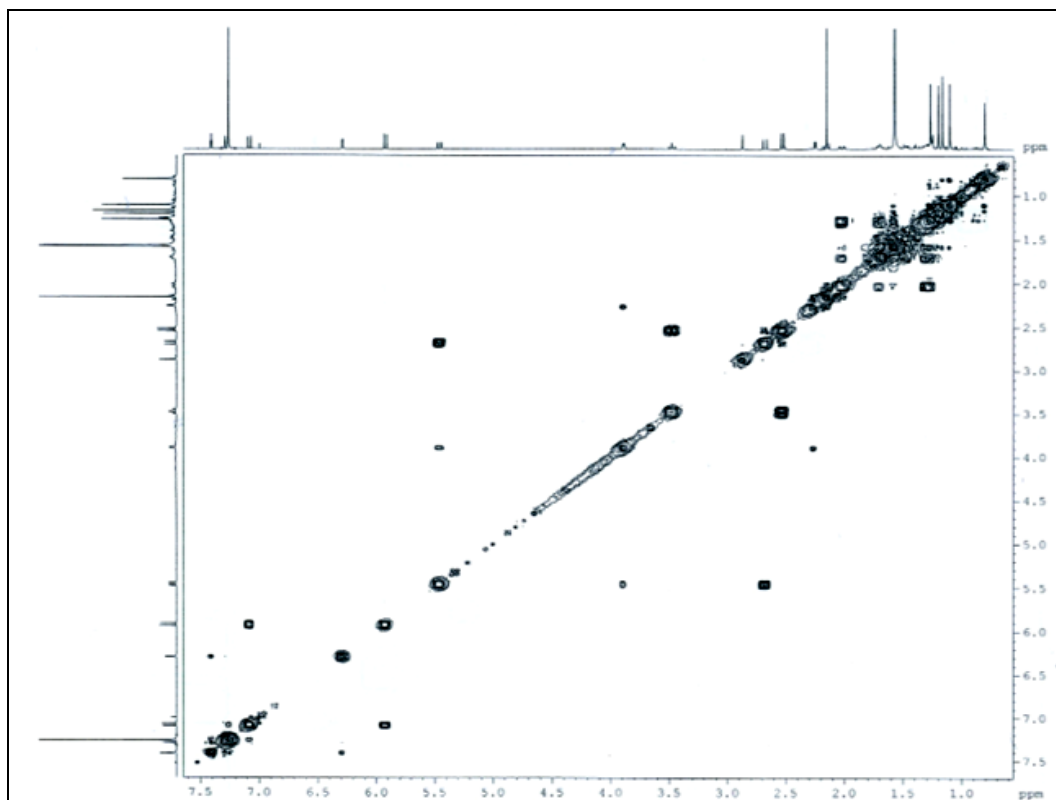
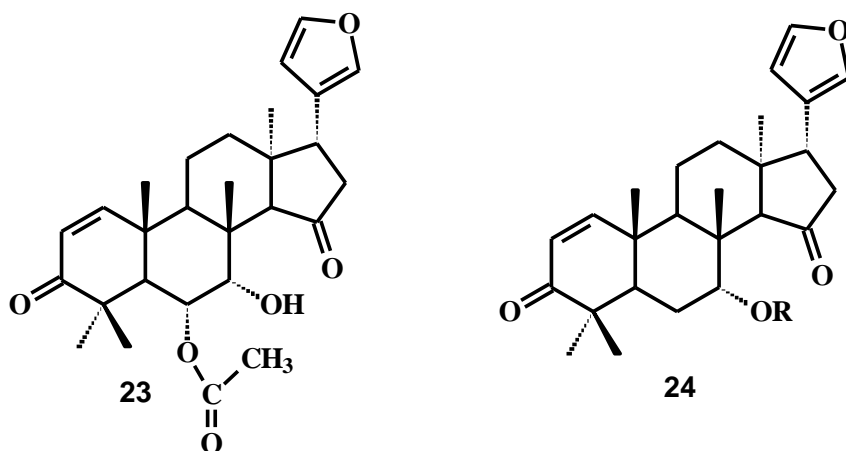


Figura 4.76: Espectro de COSY ^1H - ^1H 45° da substância **23** (400 MHz, CDCl_3)

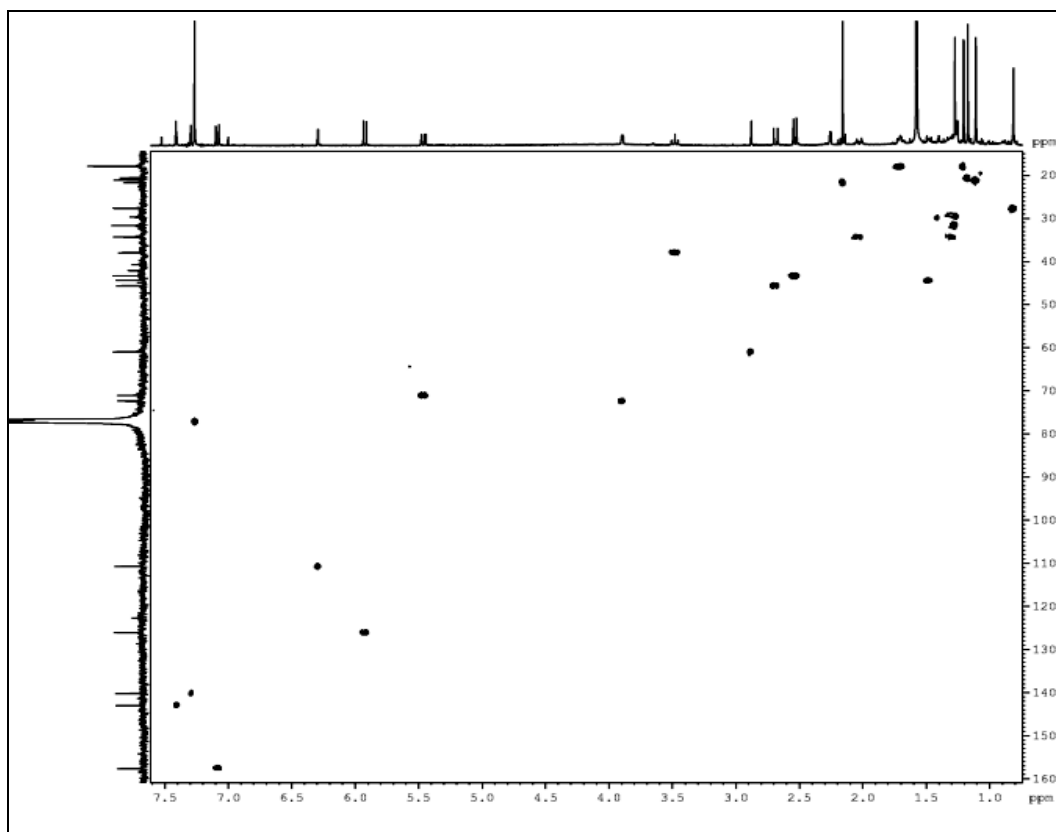


Figura 4.77: Mapa de contorno de HSQC da substância **23** (400 MHz, CDCl₃)

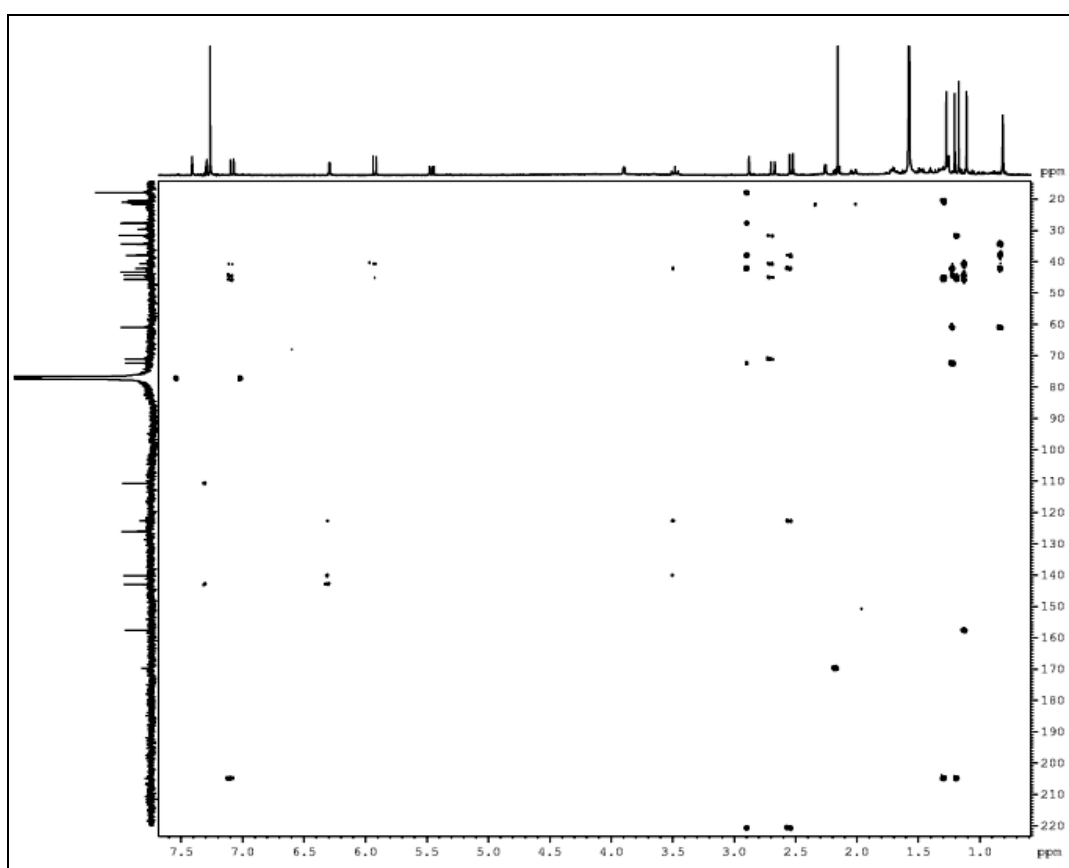


Figura 4.78: Mapa de contorno de HMBC da substância **23** (400 MHz, CDCl₃)

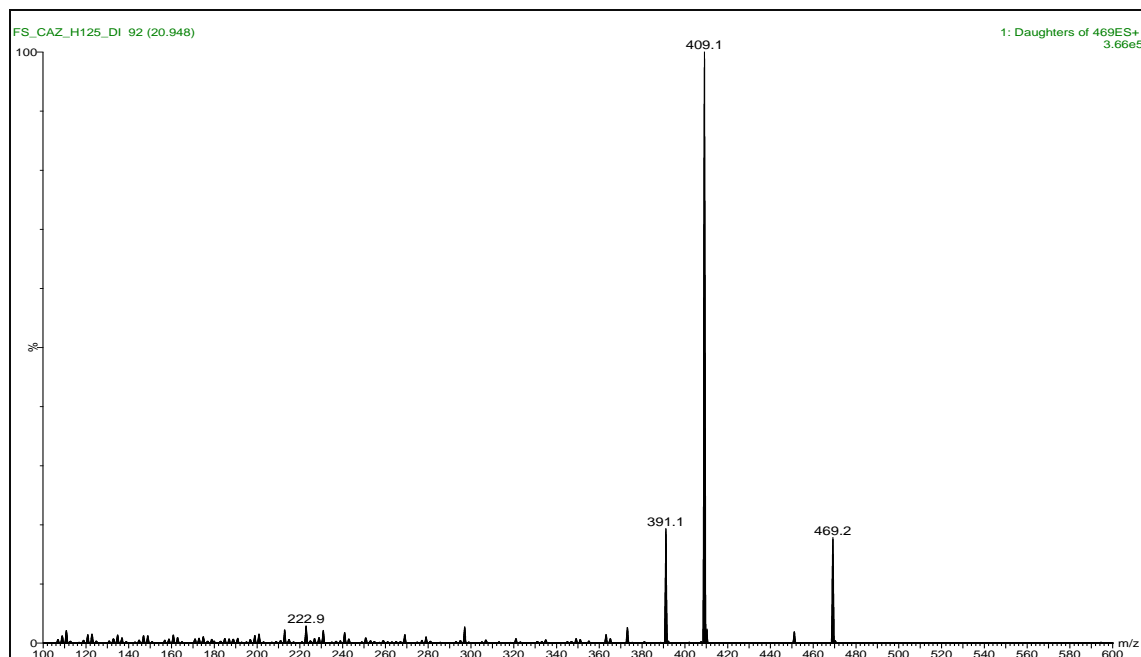


Figura 4.79: Espectro de massas (ESI) modo positivo da substância **23**.

4.8- Estudos do Sistema de solvente, fase móvel e da identificação de ricinina, xantiletina e rauianina isoladas por HSCCC para o microencapsulamento.

As substâncias encapsuladas, ricinina, xantiletina e rauianina, foram isoladas através do HSCCC, uma técnica mais simples e vantajosa que as tradicionais utilizadas em outros trabalhos anteriormente. Esta técnica evita problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes, permitindo a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificação, com recuperação total das amostras e com baixo consumo de solvente.

4.8.1- Sistema de solvente, fase móvel e a identificação de ricinina isolada por HSCCC

A escolha de um bom sistema de solventes é importante para o sucesso da separação no HSCCC. Um bom sistema de solvente deve atender a algumas exigências tais como: solubilidade da amostra, tempos de decantação rápido (< 30 s), volumes iguais de fase superior e inferior (ou pelo menos maior

volume da fase que será usada como fase móvel), sistemas que não formem emulsões e coeficiente de partição próximo a 1.

Diversos sistemas de solventes foram testados (CAZAL *et al.* 2009a) e o melhor sistema foi composto por CH₂Cl₂/EtOH/H₂O (93:35:72 v/v). Neste sistema o metanol foi substituído pelo etanol na mistura de solvente anteriormente proposto por LEITE *et al.*, 2005. Para o desenvolvimento da HSSCC foram utilizados injetor de 5,0 mL, 800 rpm, fluxo de 3 mL/min e 4 colunas (443 mL). A substituição do metanol para o etanol é importante por razões ambientais. O alcalóide ricinina foi identificado por comparação de seus dados de RMN de ¹H e ¹³C, MS, UV e CG-MS (Figura 4.80) (CAZAL *et al.* 2009a).

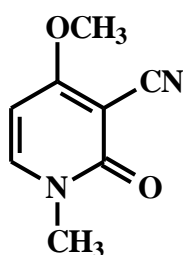


Figura 4.80: Estrutura do alcalóide ricinina.

4.8.2- Sistema de solvente, fase móvel e a identificação de xantiletina isolada por HSCCC

O melhor sistema de solvente avaliado foi composto por Hex/EtOH/ACN/H₂O (10:8:1:1 v/ v). Para o desenvolvimento da HSCCC foram utilizados loop de 5,0 mL, 800 rpm, fluxo de 3 ml/min e 4 colunas. Além da xantiletina foi possível isolar outras 3 cumarinas, suberosina, seselina e xantoxantiletina (Figura 4.81). Todas as substâncias isoladas foram identificadas por comparação de seus dados de RMN de ¹H e ¹³C, MS, UV e GC-MS (CAZAL *et al.* 2009b).

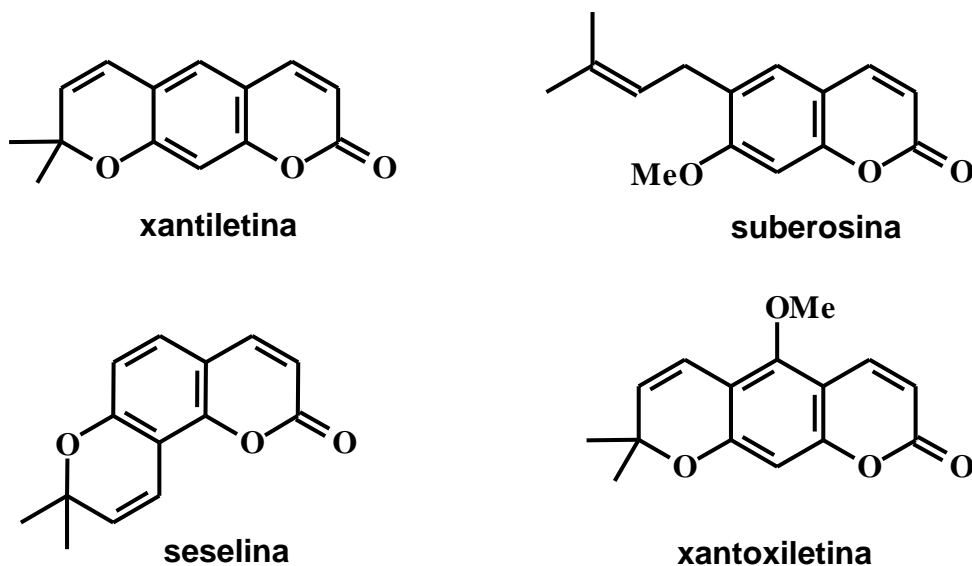


Figura 4.81: Estrutura das cumarinas isoladas do extrato diclorometânico das raízes do enxerto de *Citrus sinensis* sobre *Citrus limonia*: xantiletina, suberosina, seselina, xantoxiletina.

4.8.3- Sistema de solvente, fase móvel e a identificação de rauianina isolada por HSCCC

A Tabela 4.24 apresenta os sistemas de solventes testados bem como seus valores do coeficiente de partição (k) calculado pela equação da reta obtida na curva de calibração ($y = 84.953,7 x - 4.472,3$). Avaliando estes valores, pôde-se confirmar que o sistema de solvente número 21 foi o que obteve o melhor valor do coeficiente de partição, mais próximo de 1, apresentando o equilíbrio da amostra no sistema de solvente, ou seja, 50 % da amostra está presente na fase orgânica e 50 % na fase aquosa.

Num total de 39 misturas de solventes testadas, seis obtiveram valores de k próximo de 1. O melhor sistema de solvente avaliado foi o Hex/AcOEt/ MeOH /H₂O (1:0,9:1:0,9 v/v).

Outros parâmetros também foram avaliados tais como número de colunas, taxa de fluxo, volume de fração coletada, volume e massa de amostra injetada e velocidade de rotação. Quando a análise foi conduzida com 2 (250 mL) ou 3 (350 mL) colunas, a rauianina era eluída junto com outras substâncias. Por outro lado, quando utilizado 4 colunas (500 mL) a rauianina foi obtida com alto grau de pureza. Foi utilizado 800 rpm e fluxo de 3 mL/min.

Tabela 4.24: Sistemas de solventes testados e *k* calculado.

	Sistemas de solvent (v/v)	<i>k</i>
1	Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O (10:8:1:1)	0,01
2	Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O a (10:8:2:1)	0,01
3	Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O (10:8:3:1)	0,01
4	Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O (10:8:4:1)	0,01
5	Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O (10:8:5:1)	0,04
6	Hex/EtOH/ ACN /H ₂ O (10:5:5:1)	0,00
7	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (4:6:4:6)	5,20
8	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (5:5:5:5)	1,29
9	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (4:5:4:5)	2,12
10	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (2:5:2:5)	12,95
11	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (5:5:6:4)	0,77
12	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (3:7:5:5)	3,89
13	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (6:4:5:5)	0,69
14	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:1:0,85:1,5)	2,79
15	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:1:0,60:1,40)	5,59
16	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:1:0,525:1,475)	5,91
17	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:1:0,45:1,55)	15,5
18	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:1:0,3:1,70)	13,0
19	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (0,6:4:0,05:1)	48,9
20	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (0,6:4:0,7:1)	14,9
21	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:0,9:1:0,9)	0,99
22	Hex/AcOEt/ MeOH /H ₂ O (1:5:1:5)	40,8
23	AcOEt /H ₂ O (5:5)	128,0
24	Hex/MeOH/H ₂ O (5:5:5)	emulsão
25	Hex/MeOH/H ₂ O (5:7:3)	0,02
26	Hex /MeOH /H ₂ O (35:30:3 v/v)	0,01
27	Hex/AcOEt/H ₂ O (1:5:6)	132,2
28	Hex/AcOEt/H ₂ O (5:5:10)	78,9
29	Hex/AcOEt/EtOH/H ₂ O (5:5:4:6)	1,35
30	AcOEt/MeOH/H ₂ O (8:3:8)	15,6
31	AcOEt/EtOH/H ₂ O (50:1:50)	77,3
32	AcOEt/EtOH/H ₂ O (2:1:2)	5,74
33	AcOEt/EtOH/H ₂ O (10:1:10)	97,0
34	CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O (4:5:3)	30,6
35	CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O (7:13:9)	37,0
36	CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O (8:13:7)	9,73
37	CH ₂ Cl ₂ /MeOH /H ₂ O (93:35:72)	403,8
38	CH ₂ Cl ₂ /EtOH /H ₂ O (93:35:72)	312,8
39	Hex /EtOH /H ₂ O (6:5:5)	emulsão

O estudo do extrato diclorometânico do caule de *Rauia resinosa* levou ao isolamento da rauianina além de 2 cumarinas (umbiliferona e acetato de murrangatina), 5 alcalóides (7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina, zantobungeanina, N-metilflindersina, 8-hidroxi-N-metilflindersina, esquimianina) e 1 flavonóide (3,7,4'-trimetoxi-5-hidroxi flavona). A Figura 4.82 mostra a estrutura de cada uma dessas substâncias.

A estrutura da rauianina e de todas as substâncias isoladas foram identificadas por comparação de seus dados de RMN ^1H e ^{13}C , HMBC, HSQC e GC-MS, com os dados da literatura (ALBARICI, 2006 e KAMPERDICK *et al.*, 1999).

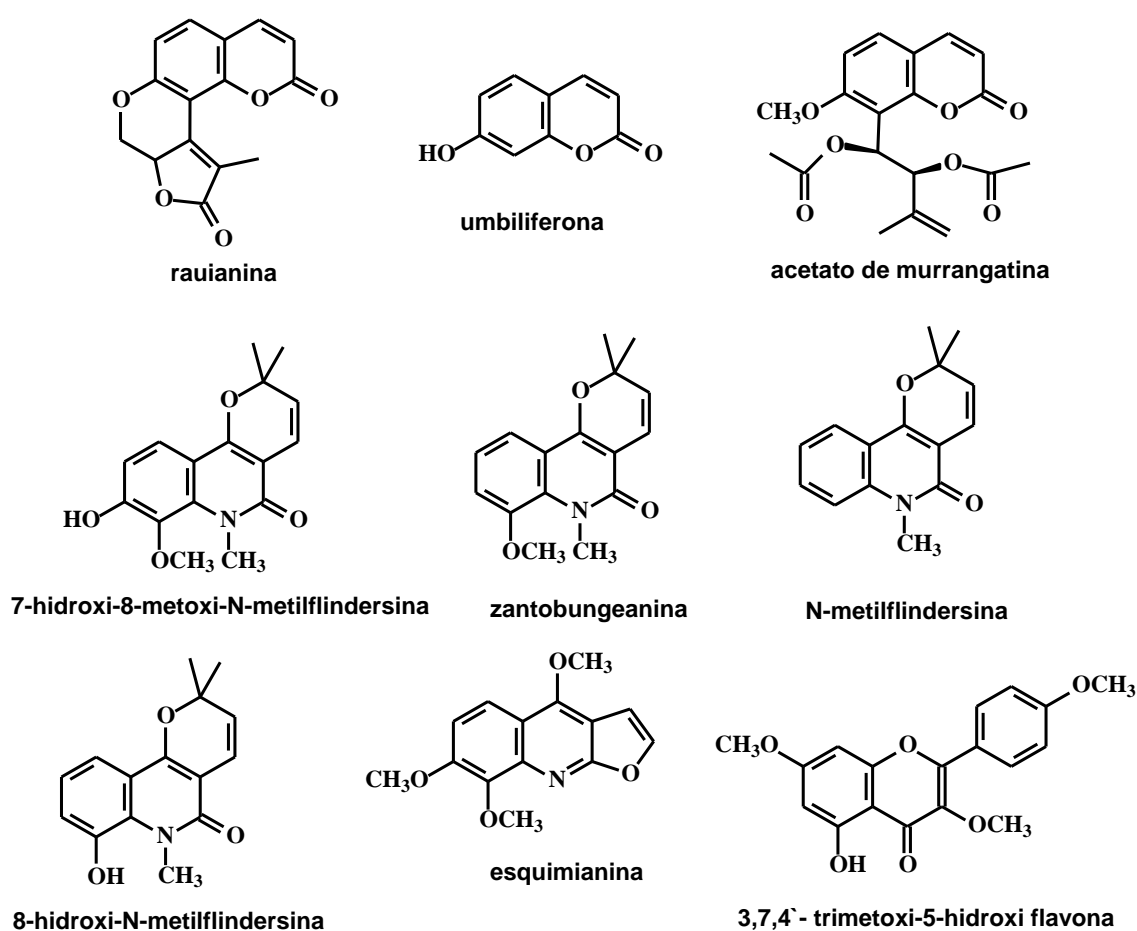


Figura 4.82: Estrutura das substâncias isoladas do extrato diclorometânico do caule de *Rauia resinosa*: rauianina, umbiliferona, acetato de murrangatina, 7-hidroxi-8-metoxi-N-metilflindersina, zantobungeanina, N-metilflindersina, 8-hidroxi-N-metilflindersina, esquimianina e 3,7,4'- trimetoxi-5-hidroxi flavona.

4.9- Análise cromatográfica de ricinina, xantiletina e rauianina

A validação de um método engloba todos os procedimentos necessários para demonstrar se o método empregado na quantificação de um ou mais compostos em uma matriz é eficaz, reprodutivo e específico para a aplicação desejada (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros necessários para medir a aceitabilidade do desempenho de um método analítico de acordo com a FDA (*Food and Drug Administration*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) são: precisão, exatidão, sensibilidade, seletividade, linearidade e recuperação.

Os intervalos de concentração utilizados na curva de calibração foram selecionados baseando-se na faixa de concentração das amostras de nanopartículas estudadas.

4.9.1- Validação do método analítico para quantificação de ricinina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As curvas de calibração foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às concentrações 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 6 e 8 µg/mL. A curva analítica para a ricinina obtida através da regressão linear, está apresentada na Figura 4.83. A equação da reta ($y = 32.954,0 x - 1.446,8$, onde y é a área da banda cromatográfica e x é a concentração da ricinina na solução em µg/mL) foi linear ($n = 3$) na faixa de trabalho e o coeficiente de correlação linear (r^2) de 1,00.

A exatidão e precisão obtidas para cada concentração ($n = 3$) usada na construção da curva de calibração se encontram descritas na Tabela 4.25.

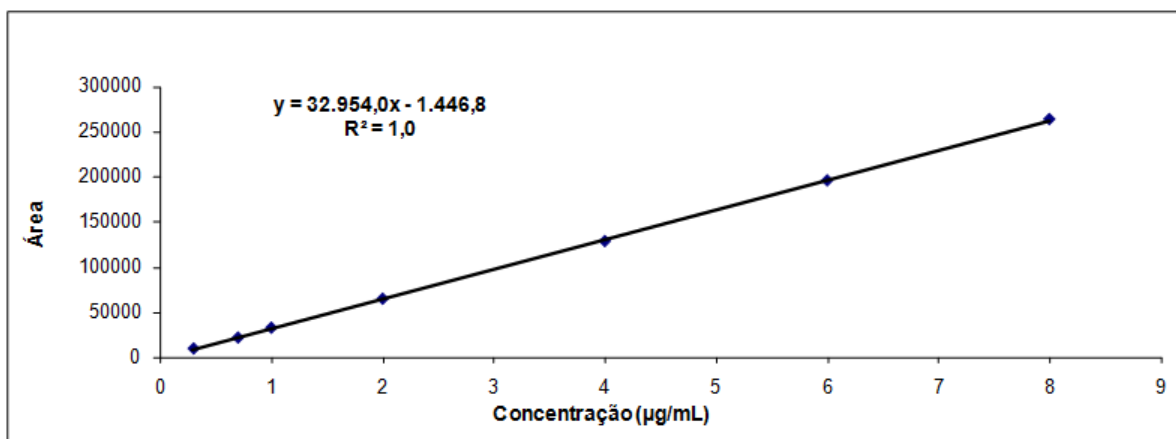


Figura 4.83: Curva de calibração por padronização externa para análise de ricinina. As análises cromatográficas foram realizadas no Equipamento Agilent 1200, coluna Phenomenex® fenil hexil, Luna (250 x 4,6mm d.i., 5 µm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 µm), fase móvel ACN : H₂O (45:55) contendo ácido acético, 0,01 %, pH 3,6; vazão de 0,8 mL/min e detector ultravioleta 310 nm.

Tabela 4.25: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.

Concentração Nominal (µg/mL)	Média das áreas	Desvio Padrão (n = 3)	DPR (%) (Precisão)	Exatidão (%)
0,3	9227,7	40,10	0,4	108,0
0,7	21343,7	273,5	1,3	108,0
1,0	32298,7	235,9	0,7	98,8
2,0	64418,3	131,1	0,2	102,4
4,0	128368,7	1144,3	0,9	99,9
6,0	195613,0	1899,5	1,0	98,5
8,0	263589,7	3696,4	1,4	99,7

A exatidão é a correlação entre os resultados obtidos e os admitidos como verdadeiros (concentração nominal) e a precisão é a capacidade do método em repetir o mesmo resultado, embora isso não implique em ser o resultado correto, sempre que a análise é executada em uma amostragem múltipla da mesma amostra.

Na determinação da exatidão e precisão do método analítico foram preparadas soluções padrão em três níveis de concentrações diferentes (0,36; 4,5 e 7,5 µg/mL) para abranger toda a faixa dinâmica de trabalho. Entretanto, estes valores foram selecionados por serem diferentes dos já utilizados na curva de calibração.

Para determinação da precisão {Desvio padrão relativo [DPR (%)] = (desvio padrão/média) x 100; $n = 5$ } e exatidão [Exatidão = (média da concentração/concentração nominal) x 100, $n = 15$] intra e inter-dia, cada ponto foi analisado em quintuplicata em três dias não consecutivos. Os resultados encontram-se ilustrados nas Tabelas 4.26 e 4.27.

Tabela 4.26: Precisão [DPR (%)] de amostras de ricinina usadas na validação do método analítico.

Concentração (µg/mL)	Intra-dia 1 (n = 5)	Intra-dia 2 (n = 5)	Intra-dia 3 (n = 5)	Inter-dia (n = 15)
0,36	1,4	1,1	1,4	1,3
4,5	1,0	0,7	0,5	0,7
7,5	0,2	1,2	2,3	1,2

Tabela 4.27: Exatidão (%) de amostras de ricinina usadas na validação do método analítico.

Concentração (µg/mL)	Exatidão (n = 15)
0,36	101,6
4,5	102,4
7,5	101,1

O Limite de Detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração da substância em uma amostra que pode ser detectada em determinadas condições por um método específico. O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Neste trabalho, o limite de detecção foi calculado de acordo com o desvio padrão do intercepto (716,2) e o coeficiente angular (32954,0) da curva de calibração (0,3; 0,7; 1; 2; 4; 8 $\mu\text{g/mL}$). O LD e LQ foram estabelecidos em 0,07 e 0,22 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O LQ calculado foi menor do que o primeiro ponto da curva de calibração ($\leq 0,30 \text{ mg/mL}$), provando que o método utilizado foi linear, exato e preciso em toda a faixa de trabalho.

O tempo de retenção da ricinina foi igual a 4,0 min. O cromatograma é mostrado na Figura 4.84.

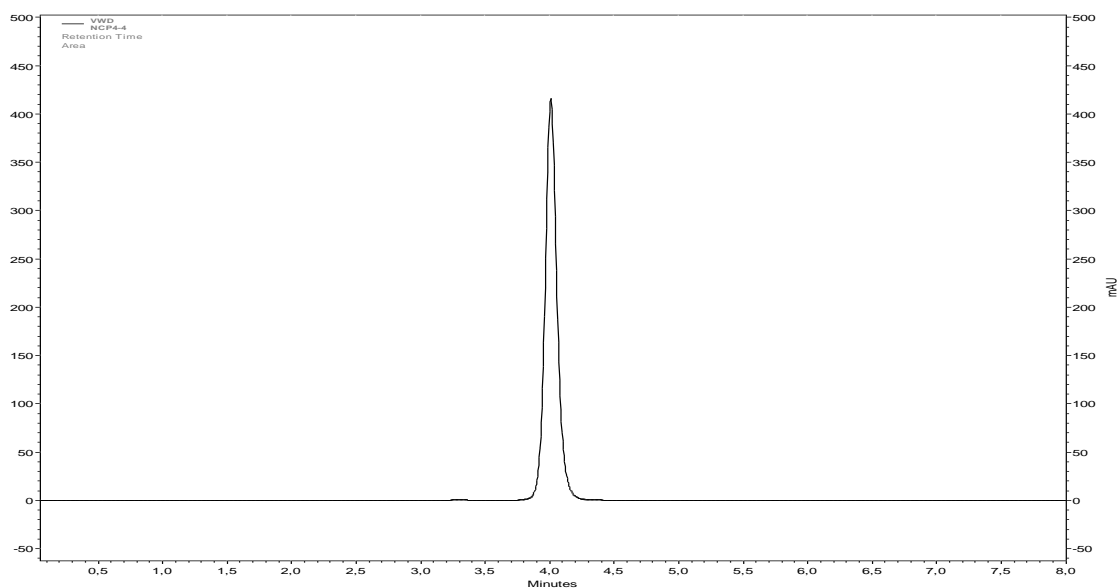


Figura 4.84: Cromatograma da ricinina. Equipamento Agilent 1200, coluna Phenomenex[®] fenil hexil, Luna (250 x 4,6mm d.i., 5 μm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 μm), fase móvel ACN : H₂O (45:55) contendo ácido acético, 0,01 %, pH 3,6; vazão de 0,8 mL/min e detector ultravioleta 310 nm.

4.9.2- Validação do método analítico para quantificação de xantiletina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os mesmos procedimentos de validação da ricinina foram realizados para a xantiletina e rauianina.

As curvas de calibração foram obtidas em função das áreas das bandas cromatográficas, relativas às concentrações 0,15; 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 6, 8 $\mu\text{g/mL}$. A curva analítica foi obtida através da regressão linear e está apresentada na Figura 4.85. A equação da reta ($y = 102.863,0x - 3.147,2$, onde y é a área da banda cromatográfica e x é a concentração da xantiletina na solução em $\mu\text{g/mL}$) foi linear na faixa de trabalho e o coeficiente de correlação linear (r^2) foi de 1,00.

A exatidão e precisão obtidas para cada concentração usada na construção da curva de calibração se encontram descritas na Tabela 4.28.

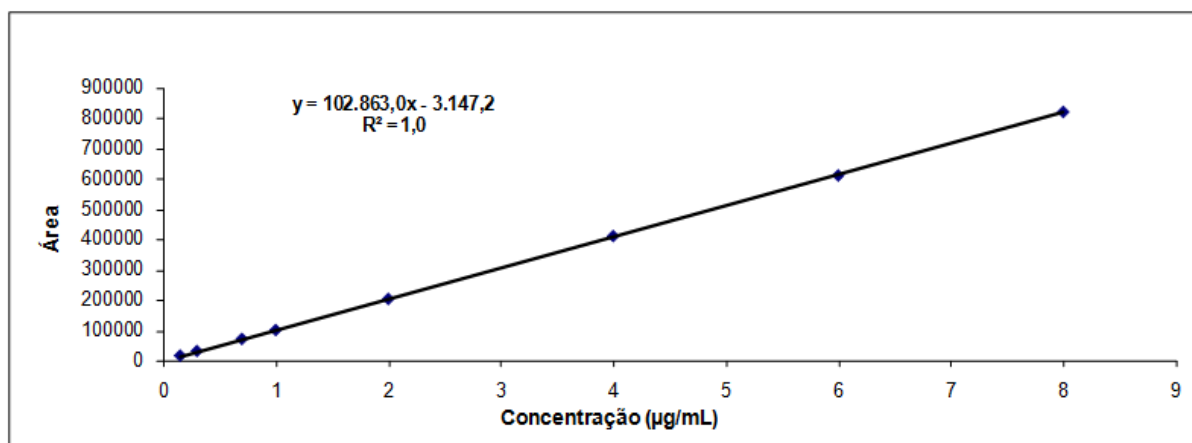


Figura 4.85: Curva de calibração por padronização externa para análise de xantiletina. As análises cromatográficas foram realizadas no Equipamento Agilent 1200, coluna Phenomenex[®] fenil hexil, Luna (250 x 4,6mm d.i., 5 μm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 μm), fase móvel ACN: H_2O (6:4 v/v), vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 263 nm.

Tabela 4.28: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.

Concentração Nominal (µg/mL)	Média das áreas	Desvio Padrão (n = 3)	DPR (%) (Precisão)	Exatidão (%)
0,15	13582,6	378,8	2,8	108,4
0,3	28689,0	79,7	0,3	103,2
0,7	68874,0	194,2	0,3	100,0
1,0	98230,6	309,4	0,3	98,6
2,0	201420,3	252,2	0,1	99,4
4,0	409714,0	490,0	0,1	100,3
6,0	610955,6	766,7	0,1	99,5
8,0	821770,6	1486,4	0,2	100,1

Três soluções padrão (0,18; 4,5 e 7,5 µg/mL) foram preparadas em quintuplicata para a determinação da exatidão e precisão do método analítico. O primeiro ponto, 0,18 µg/mL, representa 120% da concentração do primeiro ponto da curva de calibração. O segundo, 4,5 µg/mL e o terceiro ponto 7,5 µg/mL, referem-se a 56% e 94% do ponto de maior concentração da curva de calibração, respectivamente. As tabelas 4.29 e 4.30 mostram os dados da precisão e exatidão determinados intra e inter-dia. Cada ponto foi analisado em quintuplicata em três dias não consecutivos.

Tabela 4.29: Precisão [DPR (%)] de amostras de xantiletina usadas na validação do método analítico

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-dia 1 (n = 5)	Intra-dia 2 (n = 5)	Intra-dia 3 (n = 5)	Inter-dia (n = 15)
0,18	1,9	1,1	2,4	1,8
4,5	0,5	0,3	0,5	0,4
7,5	0,2	0,2	0,3	0,2

Tabela 4.30: Exatidão (%) de amostras de xantiletina usadas na validação do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Exatidão (n = 15)
0,18	100,6
4,5	99,3
7,5	100,0

Neste trabalho, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com o desvio padrão do intercepto (954,8) e o coeficiente angular (102863,0) da curva de calibração (0,15; 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 8 $\mu\text{g/mL}$). O LD e LQ foram estabelecidos em 0,03 e 0,09 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O LQ calculado foi menor do que o primeiro ponto da curva de calibração ($\leq 0,15$ mg/mL), provando que o método utilizado foi linear, exato e preciso em toda a faixa de trabalho.

O tempo de retenção da xantiletina foi igual a 7,2 min. O cromatograma está mostrado na Figura 4.86.

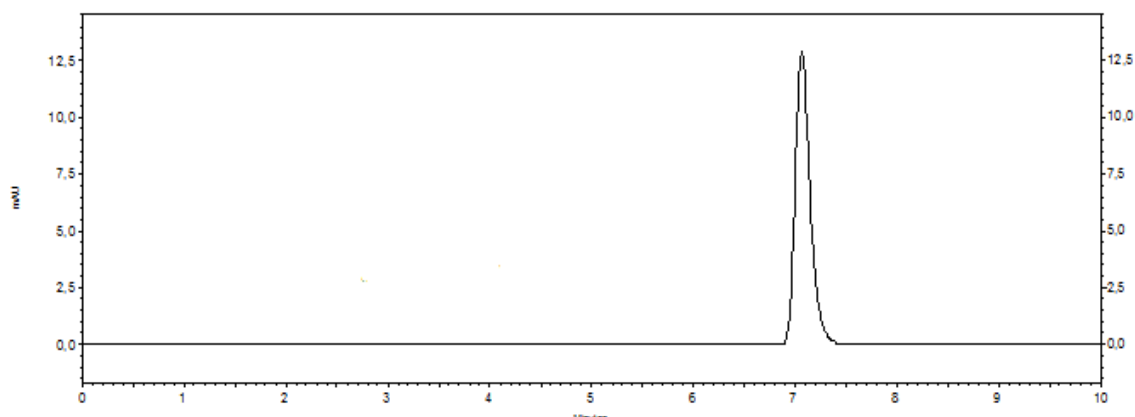


Figura 4.86: Cromatograma da xantiletina. Equipamento Agilent 1200, coluna Phenomenex[®] fenil hexil, Luna (250 x 4,6mm d.i., 5 μ m) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 μ m), fase móvel ACN : H₂O (6:4), vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 263 nm.

4.9.3- Validação do método analítico para quantificação de rauianina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A curva analítica foi obtida através da regressão linear, utilizando as concentrações 0,15; 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 6, 8 μ g/mL (Figura 4.87). A equação da reta ($y = 84.953,7 x - 4.472,3$, onde y é a área da banda cromatográfica e x é a concentração da ricinina na solução em μ g/mL) foi linear na faixa de trabalho e o coeficiente de correlação linear (r^2) foi de 1,00.

A exatidão e precisão obtidas para cada concentração usada na construção da curva de calibração se encontram descritas na Tabela 4.31.

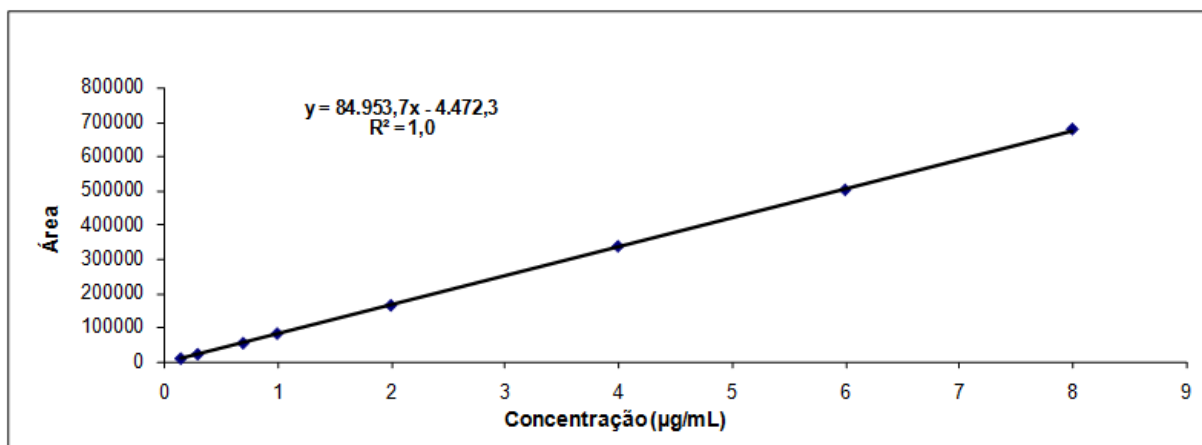


Figura 4.87: Curva de calibração por padronização externa para análise de rauianina. As análises cromatográficas foram realizadas no Equipamento Agilent 1200, coluna Phenomenex® fenil hexil, Luna (250 x 4,6mm d.i., 5 µm) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 µm), fase móvel ACN: H₂O (6:4 v/v), vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 297 nm.

Tabela 4.31: Precisão e exatidão obtidas na construção da curva de calibração por padronização externa.

Concentração Nominal (µg/mL)	Média das áreas	Desvio Padrão (n = 3)	DPR (%) (Precisão)	Exatidão (%)
0,15	9052,0	106,53	1,2	106,1
0,3	21577,3	121,53	0,6	102,2
0,7	54102,3	234,12	0,4	98,5
1,0	81742,0	415,45	0,5	101,5
2,0	164070,0	1045,10	0,6	99,2
4,0	336403,6	995,44	0,3	100,3
6,0	500834,0	1526,72	0,3	99,1
8,0	678164,6	100,72	0,0	100,1

Na determinação da exatidão e precisão do método analítico preparou-se soluções padrão em três níveis de concentrações diferentes (0,18; 4,5 e 7,5 µg/mL) para abranger toda a faixa dinâmica de trabalho.

As Tabelas 4.32 e 4.33 mostram os dados da precisão e exatidão, determinados intra e inter-dia. Cada ponto foi analisado em quintuplicata em três dias não consecutivos.

Tabela 4.32: Precisão [DPR (%)] de amostras de rauianina usadas na validação do método analítico.

Concentração (µg/mL)	Intra-dia 1 (n = 5)	Intra-dia 2 (n = 5)	Intra-dia 3 (n = 5)	Inter-dia (n = 15)
0,18	1,3	0,7	1,2	1,1
4,5	0,4	0,3	0,6	0,4
7,5	0,5	0,7	0,8	0,7

Tabela 4.33: Exatidão (%) de amostras de rauianina usadas na validação do método analítico.

Concentração (µg/mL)	Exatidão (n = 15)
0,18	104,8
4,5	101,7
7,5	100,7

Neste trabalho, o limite de detecção foi calculado de acordo com o desvio padrão do intercepto (1210,2) e o coeficiente angular (84953,7) da curva de calibração (0,15; 0,3; 0,7; 1; 2; 4; 8 µg/mL). O LD e LQ foram estabelecidos em 0,04 e 0,14 µg/mL, respectivamente.

A Figura 4.88 apresenta um cromatograma da amostra padrão de rauianina a 8 µg/mL em acetonitrila, cujo tempo de retenção foi de 5,0 min.

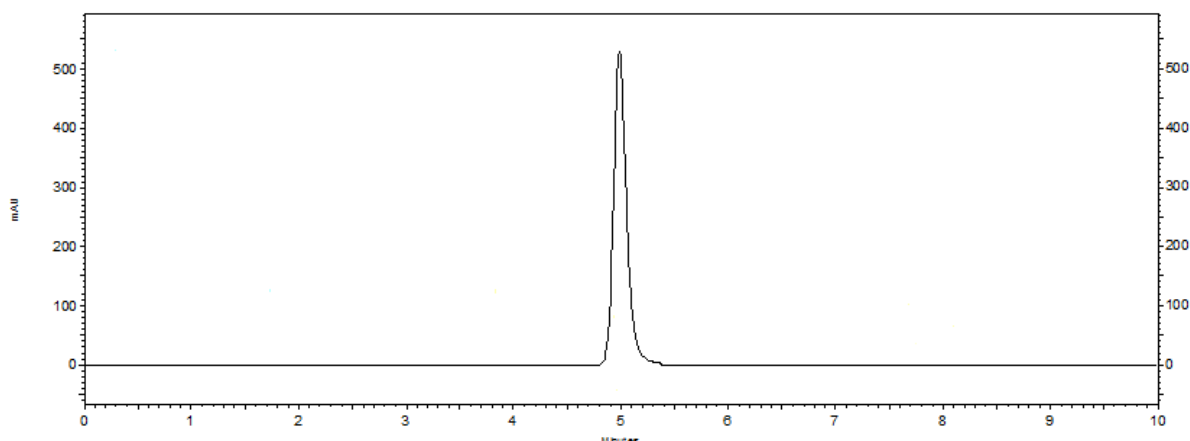


Figura 4.88: Cromatograma da rauianina. Equipamento Agilent 1200, coluna Phenomenex[®] fenil hexil, Luna (250 x 4,6mm d.i., 5 μ m) com coluna de segurança Phenomenex C18 (4x3 mm i.d., 5 μ m), fase móvel ACN: H₂O (6:4 v/v), vazão de 1,0 mL/min e detector ultravioleta 297 nm.

4.10- Coeficiente de partição

O coeficiente de partição (P) é a razão entre a concentração de uma substância, em condições de equilíbrio em um sistema bifásico constituído por uma fase oleosa e uma fase aquosa. Este valor é adimensional e por vias de regras é dado na forma de logaritmo na base de 10 ($\log P$).

O valor do coeficiente de partição ($\log P$) é um parâmetro freqüentemente usado como medida quantitativa da lipofilicidade de substâncias bioativas. O valor do $\log P$ de uma substância pode ser interpretado como sendo a somatória de dois termos: um relacionado com volume (estéricos) e o outro com interações intermoleculares (interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio). A investigação da natureza e grandeza destes termos pode contribuir para uma compreensão do comportamento das substâncias.

As Tabelas 4.34, 4.35 e 4.36 apresentam os valores dos coeficientes de partição ($\log P$) determinados para xantiletina, rauianina e ricinina, respectivamente, em diferentes óleos.

Tabela 4.34: Coeficientes de partição ($\log P$) Octanol, Myritol[®]812 e Miristato de isopropila /água para xantiletina.

Log P	Log P	Log P	Log P
Octanol/ água	Myglyol [®] 812/ água	Miristato de isopropila / água	Oleato de isodecila / água
3,39 ± 0,07	3,27 ± 0,20	3,26 ± 0,12	3,01 ± 0,09

Os valores representam a média ± o desvio padrão de seis amostras.

Tabela 4.35: Coeficientes de partição ($\log P$) Octanol, Miristato de isopropila/água para rauianina.

Log P	Log P
Octanol/água	Oleato de isodecila / água
1,72 ± 0,02	1,38 ± 0,01

Os valores representam a média ± o desvio padrão de seis amostras.

Os resultados dos coeficientes de partição nos óleos usados indicam que a xantiletina apresenta uma lipofilia elevada, uma vez que obteve-se valores de $\log P$ superiores a 3 (KIPP, 2007), enquanto a rauianina apresenta uma lipofilia menor.

Tabela 4.36: Coeficientes de partição ($\log P$) Octanol, Myritol[®]812 e Miristato de isopropila /água para a ricinina.

Log P	Log P	Log P	Log P	Log P
Octanol/ água	Myglyol [®] 812/ água	Miristato de isopropila / água	Óleo de ricino / água	Oleato de isodecila / água
-0,59 ± 0,05	-0,92 ± 0,03	-1,54 ± 0,08	-0,47 ± 0,13	-0,87 ± 0,11

Os valores representam a média ± o desvio padrão de seis amostras.

Os resultados dos coeficientes de partição nos cinco óleos usados indicam que a ricinina apresenta uma baixa lipofilia, sendo que o maior valor de coeficientes de partição da ricinina foi no óleo de rícino.

4.11- Caracterização físico-química das Nanopartículas

Todas as nanoformulações testadas foram caracterizadas observando os seguintes parâmetros: recuperação, eficiência de encapsulação, pH, potencial zeta e diâmetro das partículas.

A medição do pH das suspensões é um parâmetro importante para avaliar a estabilidade das nanopartículas, a alteração do pH pode estar relacionada com a degradação do polímero utilizado ou de algum outro componente da formulação. Em um trabalho realizado por SCHAFFAZICK e colaboradores (2002), verificou-se a redução dos valores de pH, num período de 3,5 meses em suspensões coloidais de nanopartículas preparadas com PCL. Este fato foi atribuído à exposição de maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas (processo de entumescimento). Em outro trabalho (CALVO *et al.*, 1996) foi verificada a diminuição da massa molar de PCL em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas, após 6 meses de armazenamento, com conseqüente diminuição do pH destas formulações.

O diâmetro médio e a polidispersão das partículas das suspensões coloidais estão relacionados com o método de preparação e a composição quali e quantitativa das nanopartículas poliméricas. Geralmente, as nanopartículas, mesmo

quando preparadas por diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm, no entanto, podem ser obtidas nanopartículas com diâmetros em torno de 50 a 70 nm (GOVENDER *et al.*, 2000, MULLER *et al.*, 2000, SEIJO *et al.*, 1990).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (MOSQUEIRA *et al.*, 2000). O potencial zeta pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões coloidais. Em módulo, quanto maior o potencial zeta mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.

4.11.1- Nanopartículas de xantiletina e rauianina

O método de deslocamento do solvente (nanoprecipitação) permite a preparação de nanoesferas e nanocápsulas a partir de uma variedade de polímeros, tais como, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), polilactato (PLA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e copolímeros do poli ácido láctico e do polietilenoglicol (PLA-PEG). Este método apresenta inúmeras vantagens, entre as quais, simples execução da metodologia, envolve um único passo, a dispersão da fase orgânica na fase aquosa. Além disso, o método utiliza solventes de baixa toxicidade, tais como acetona e etanol. Adicionalmente, vários trabalhos têm sido publicados sobre a transposição de escala deste método, tendo em vista a produção a nível industrial (GALINDO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2005).

Diante de várias vantagens do método de deslocamento do solvente, bem como à particular aplicabilidade na incorporação de compostos lipofílicos, este foi o método selecionado no presente trabalho para a preparação das nanopartículas.

Através do método de nanoprecipitação (FESSI *et al.*, 1989), foram preparadas suspensões de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS) contendo xantiletina e rauianina, utilizando-se polímeros poli- ϵ -(caprolactona) (PCL), poli- β -(hidroxibutirato) (PHB) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). A estrutura desses polímeros é mostrada na Figura 4.89.

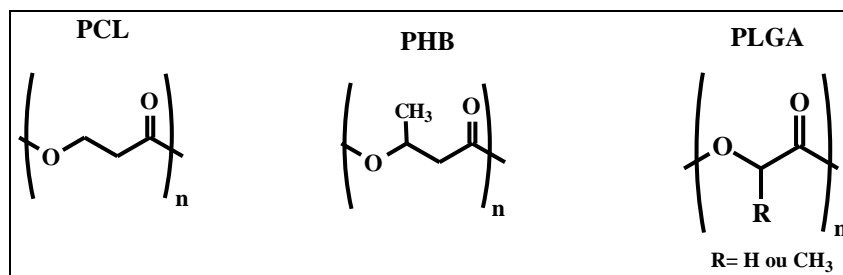


Figura 4.89: Estrutura dos polímeros poli-ε-(caprolactona) (PCL), poli-β-(hidroxibutirato) (PHB) e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).

Estes polímeros foram escolhidos por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade. Entende-se por degradação de um polímero toda mudança deletéria nas propriedades desse polímero, devido à alteração na sua estrutura química. Essa mudança pode ocorrer através do relaxamento da cadeia polimérica, da quebra da unidade monomérica localizada na extremidade da cadeia (erosão) ou ainda através da cisão aleatória de uma ligação em alguma posição ao longo da cadeia polimérica (degradação). Polímero biodegradável é o polímero em que a degradação é medida, total ou parcialmente, por um sistema biológico (RÉ & RODRIGUES, 2006; NOBES & MARCHESSAULT, 1999).

Entre os polímeros biodegradáveis, o poli-β-(hidroxibutirato) (PHB) é um dos que tem atraído mais a atenção dos pesquisadores. Essa substância é produzida por micro-organismos como, por exemplo, a bactéria *Alcaligenes eutrophorus*. O polímero é completamente degradado gerando CO₂ e água e é convertido à biomassa por bactérias, fungos e leveduras. Há muitas aplicações para esse polímero biodegradável, seja na indústria de embalagens, na agricultura ou na medicina. A poli(ε-caprolactona) (PCL), um poliéster alifático cuja aplicação está sendo investigada particularmente nos sistemas de liberação de fármacos. Acredita-se que, no solo, enzimas extracelulares sejam as responsáveis por quebrar as extensas cadeias de PCL antes que os microorganismos tenham a capacidade de assimilar o polímero (ROSA *et al.*, 2000). PLGA é sintetizado por meio da polimerização via abertura dos dímeros cíclicos de ácido glicólico e ácido láctico. Durante a polimerização, as sucessivas unidades monoméricas (de ácido glicólico e láctico) são ligados em PLGA por ligações éster, obtendo um poliéster alifático linear.

A finalidade dos tensoativos em sistemas nanométricos, é proporcionar estabilidade aos sistemas nanoparticulados. Sendo assim, o tensoativo de elevado EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico) evita a sedimentação das partículas e a difusão da substância ativa encapsulada; por sua vez o de baixo EHL é necessário para a obtenção de uma população de tamanho pequeno e homogêneo (GUTERRES *et al.*, 1995). Nesse trabalho foi utilizado os tensoativos lecitina de soja, span[®] 60, pluronic[®] F-68 e tween 80.

Iniciou-se os experimentos utilizando a xantiletina e a combinação dos componentes das nanopartículas baseados na experiência do grupo de pesquisa da Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia reportado por TEIXEIRA *et al.*, 2005. Para o preparo das nanoesferas foi utilizado PLGA e acetona como fase orgânica. As nanocápsulas foram preparadas utilizando PLGA, lecitina de soja, Myritol[®] 812 ou miristato de isopropila e acetona como fase orgânica. Em ambas as formulações foram utilizadas a solução de Pluronic[®] F-68 como fase aquosa.

Para as nanoesferas de concentração 20, 100 e 200 µg/mL obteve-se eficiência de encapsulação acima de 89%. Já para as nanocápsulas na concentração 200, 600 e 1400 µg/mL obteve-se eficiência de encapsulação acima de 86%. Embora obtive-se alta eficiência de encapsulação e partículas estáveis, resolveu-se testar a composição utilizada por CRUZ *et al.*, 2006, por se tratar de formulações com composição economicamente mais viáveis. Nessa formulação utiliza-se o PCL, span[®] 60, acetona como fase orgânica e solução de tween 80 como fase aquosa. Avaliou-se também a mistura dos polímeros PHB e PCL. O PHB por se tratar de um polímero com ramificações poderia acelerar o processo de degradação. Apesar de ter conseguido uma boa eficiência de encapsulação tanto com o PCL quanto com este em mistura com PHB, descartou-se a possibilidade de usar a mistura devido à baixa solubilidade do PHB em acetona.

De posse dos resultados de caracterização das nanopartículas, chegou-se à composição da formulação em que obtive-se as melhores propriedades e vantagens foram: PCL, span[®] 60, oleato de isodecila, acetona e tween 80. Realizou-se um planejamento experimental com objetivo de investigar a melhor concentração de cada componente na formulação, com poucos experimentos, proporcionando economia de tempo e de reagentes.

A Tabela 4.37 mostra os fatores escolhidos e seus respectivos níveis.

Tabela 4.37: Fatores e níveis escolhidos para o planejamento fatorial

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Xantiletina/rauvianina (mg/mL)	1,0	2,0	3,0
PCL (g)	0,05	0,10	0,15
Óleo (g)	0,0	0,5	1,0

As Tabelas 4.38 e 4.39 representam os resultados da eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 11 ensaios de nanopartículas de xantiletina e rauianina pelo planejamento fatorial 2^3 centrado na média.

Tabela 4.38: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 11 ensaios de nanopartículas de xantiletina.

Ensaio/ amostras	Concentração µg/mL	PCL (g)	Óleo (g)	EE (%)	pH	DP (nm)	PZ (mV)	Recup. (%)
NSX1	1000,0	0,050	0,0	91,6	6,18	185	-26,9	95,6
NSX2	3000,0	0,050	0,0	74,1	6,28	178	-28,1	96,7
NSX3	1000,0	0,150	0,0	92,3	5,87	201	-24,8	96,1
NSX4	3000,0	0,150	0,0	79,4	6,12	200	-27,0	100,3
NCX5	1000,0	0,050	1,0	98,5	6,33	295	-27,1	101,8
NCX6	3000,0	0,050	1,0	98,3	6,22	261	-32,3	101,1
NCX7	1000,0	0,150	1,0	89,5	5,97	294	-32,4	98,6
NCX8	3000,0	0,150	1,0	97,8	5,96	283	-32,4	98,7
NCX9	2000,0	0,100	0,5	98,5	5,86	292	-31,1	96,9
NCX10	2000,0	0,100	0,5	96,3	5,97	300	-33,1	99,6
NCX11	2000,0	0,100	0,5	96,0	6,35	310	-34,3	97,7

NS = nanoesferas, NC= nanocápsulas

Tabela 4.39: Resposta de eficiência de encapsulação (EE%), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 11 ensaios de nanopartículas de rauianina.

Ensaio/ amostras	Concentração µg/mL	PCL (g)	Óleo (g)	EE (%)	pH	DP (nm)	PZ (mV)	Recup.(%)
NSR1	1000,0	0,050	0,0	70,9	6,13	202	-26,5	96,5
NSR2	3000,0	0,050	0,0	76,9	5,96	200	-30,0	102,1
NSR3	1000,0	0,150	0,0	65,8	5,84	199	-29,2	94,3
NSR4	3000,0	0,150	0,0	75,8	5,70	195	-27,2	98,8
NCR5	1000,0	0,050	1,0	91,5	6,25	295	-30,0	97,3
NCR6	3000,0	0,050	1,0	90,6	6,00	291	-30,5	100,3
NCR7	1000,0	0,150	1,0	92,1	5,97	297	-33,6	97,6
NCR8	3000,0	0,150	1,0	90,9	5,70	311	-26,2	101,5
NCR9	2000,0	0,100	0,5	89,5	6,09	313	-28,9	96,0
NCR10	2000,0	0,100	0,5	92,2	5,95	312	-31,1	97,9
NCR11	2000,0	0,100	0,5	88,8	5,90	305	-30,9	99,7

NS = nanoesferas, NC= nanocápsulas

Os dados referentes a cada resposta (EE%), pH, (DP), (PZ) e recuperação foram processados pelo “software” Microsoft Excel (versão 2007), onde foram realizados os cálculos para obter os efeitos das variáveis e erros dos efeitos.

Em ambos os planejamentos fatoriais, apenas as respostas eficiência de encapsulação e diâmetro de partícula deram efeitos significativos. Dessa forma, as Tabelas 4.40 - 4.43 trazem os efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da xantiletina e rauianina tendo como resposta a (EE%) e o (DP).

Tabela 4.40: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da xantiletina tendo como resposta a eficiência de encapsulação.

Fatores	Estimativa dos efeitos ± erro padrão	Relação t
Média principal	92,0273 ± 0,41	223,6
Xant	-5,575 ± 0,96	5,77
PCL	-0,875 ± 0,96	0,90
Óleo	11,675 ± 0,96	12,1
Interação 2ª ordem		
Xant x PCL	3,275 ± 0,96	3,39
Xant x Óleo	9,625 ± 0,96	9,97
PCL x Óleo	-3,875 ± 0,96	4,01
Interação 3ª ordem		
Xant x PCL x Óleo	0,975 ± 0,96	1,01

*Os efeitos destacados em vermelho foram significativos pelo teste t.

Tabela 4.41: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da xantiletina tendo como resposta a diâmetro de partícula.

Fatores	Estimativa dos efeitos ± erro padrão	Relação t
Média principal	254,47 ± 2,69	94,59
Xant	-13,25 ± 6,31	2,10
PCL	14,75 ± 6,31	2,33
Óleo	92,25 ± 6,31	14,62
Interação 2ª ordem		
Xant x PCL	7,25 ± 6,31	1,14
Xant x Óleo	-9,25 ± 6,31	1,46
PCL x Óleo	-4,25 ± 6,31	0,67
Interação 3ª ordem		
Xant x PCL x Óleo	4,25 ± 6,31	0,67

*Os efeitos destacados em vermelho foram significativos pelo teste t.

Tabela 4.42: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da rauianina tendo como resposta a eficiência de encapsulação.

Fatores	Estimativa dos efeitos ± erro padrão	Relação t
Média principal	84,09 ± 0,54	155,3
RAU	3,47 ± 1,26	2,737
PCL	-1,32 ± 1,26	1,044
Óleo	18,92 ± 1,26	14,91
Interação 2ª ordem		
RAU x PCL	0,92 ± 1,26	0,729
RAU x Óleo	-4,52 ± 1,26	3,564
PCL x Óleo	1,77 ± 1,26	1,398
Interação 3ª ordem		
RAU x PCL x Óleo	-1,07 ± 1,26	0,847

*Os efeitos destacados em vermelho foram significativos pelo teste t.

Tabela 4.43: Efeitos e erros para os fatores estudados no planejamento fatorial da rauianina tendo como resposta a diâmetro de partícula

Fatores	Estimativa dos efeitos ± erro padrão	Relação t
Média principal	265,45 ± 1,31	202
RAU	1,00 ± 3,08	0,324
PCL	3,50 ± 3,08	1,136
Óleo	99,5 ± 3,08	32,28
Interação 2ª ordem		
RAU x PCL	4,00 ± 3,08	1,298
RAU x Óleo	4,00 ± 3,08	1,298
PCL x Óleo	7,50 ± 3,08	2,433
Interação 3ª ordem		
RAU x PCL x Óleo	5,00 ± 3,08	1,622

*Os efeitos destacados em vermelho foram significativos pelo teste t.

No planejamento fatorial da xantiletina observou-se que os fatores xantiletina e óleo influenciaram na eficiência de encapsulação. Pelos efeitos pode-se observar que diminuindo a quantidade de xantiletina, aumenta a EE e aumentando o óleo, aumenta a EE. Entretanto a quantidade de xantiletina e óleo devem estar no mesmo nível para que a EE aumente. (Tabela 4.40)

Já para a rauianina o único efeito observado foi que aumentando o óleo, aumenta a EE (Tabela 4.42).

Nos dois planejamentos fatoriais o óleo é um fator importante para o aumento da eficiência de encapsulação e valeria à pena manter na maior concentração possível. Entretanto todas as nanocápsulas que utilizaram 1,0 g de oleato de isodecila (NCX5, NCX6, NCX7, NCX8, NCR5, NCR6, NCR7 e NCR8) apresentaram óleo livre na superfície, resultante da coalescência de gotículas de óleo quando este não se encontra recoberto pelo polímero.

Para ambas as substâncias (xantiletina ou rauianina) o efeito mais pronunciado foi do óleo no diâmetro das partículas. A presença do óleo faz com que o tamanho das partículas aumente aproximadamente 100 nm (Tabela 4.41 e 4.43).

Nas amostras, NSX2 e NSX4 foram observadas a presença de cristais de xantiletina, indicando que nestas condições a capacidade máxima de carga das nanoesferas havia sido ultrapassada. No caso das nanopartículas de rauianina, em todas as formulações utilizando 3000 µg/mL (NSR2, NSR4, NCR6 e NCR8) foram observadas a presença de cristais de rauianina, indicando que nessa concentração a capacidade máxima de carga das nanopartículas havia sido ultrapassada.

Além disso, as amostras (NSX1 e NSX3) e (NSR1 e NSR3) em concentrações acima de 1500 µg/mL e 1000 µg/mL, respectivamente, já verificavam a presença de cristais. Assim, descartou-se a possibilidade de trabalhar com nanoesferas, pois em ambos os casos, a capacidade máxima de carga destas eram menores que nas nanocápsulas.

De posse dos resultados dos planejamentos fatoriais e das observações, resolveu-se em ambos os casos, trabalhar no maior nível para todos os fatores. Entretanto era preciso diminuir a quantidade do óleo. Assim, preparou-se nanocápsulas vazias com diferentes volumes de núcleo oleoso (0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 g). Todas as nanocápsulas preparadas foram submetidas à centrifugação. As

amostras correspondentes às nanocápsulas preparadas com 0,7 e 0,8 g de oleato de isodecila apresentaram pouco estáveis, observando-se óleo livre na superfície.

Estes resultados sugerem que 0,6 g constitui o máximo de oleato de isodecila possível de ser usado para obtenção de nanopartículas estáveis, considerando 150 mg de polímero.

Realizou-se experimentos aumentando a quantidade de xantiletina e rauianina adicionada ao núcleo oleoso das nanocápsulas até verificar a ocorrência de precipitação. Com essa finalidade foram preparadas diferentes formulações de nanocápsulas contendo xantiletina (3000 e 3300 µg/mL) e rauianina (2000, 2250 e 3000 µg/mL). Para tal fixou-se a quantidade do polímero (150 mg), dos agentes tensoativos (100 mg de span 60 e tween® 80) e do óleo (0,6 mL de oleato de isodecila). Para as nanocápsulas de xantiletina na concentração igual ou superior a 3300 µg/mL observou-se a presença de cristais, já no caso das nanocápsulas de rauianina as formulações preparadas com uma concentração 2250 µg/mL foi detectada a presença de cristais o que indica que, nestas condições, a capacidade máxima de cargas das nanocápsulas foram ultrapassadas.

A eficiência de encapsulação de uma substância em nanocápsulas poliméricas depende da sua solubilidade no núcleo oleoso (GUTERRES *et al.*, 1995). No presente estudo, os valores de eficiência de encapsulação da xantiletina e rauianina apresentaram-se próximas (> 89%). No entanto, é importante ressaltar que a concentração final de xantiletina nas nanocápsulas (3000 µg/mL) é 1,5 vezes maior que a concentração final de rauianina (2000 µg/mL). Este resultado é consequência da maior solubilidade apresentada pela xantiletina no núcleo oleoso das nanocápsulas constituído por oleato de isodecila (Tabelas 4.34 e 4.35).

Estabelecidas as melhores condições, fez-se um segundo planejamento fatorial agora levando em conta os fatores tensoativos que são fatores que exercem menor influência sobre as características das nanopartículas.

As Tabelas 4.44 e 4.45 representam os resultados da eficiência de encapsulação (EE%), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 4 ensaios de nanopartículas de xantiletina e rauianina pelo planejamento fatorial 2².

Tabela 4.44: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 4 ensaios de nanocápsulas de xantiletina.

Ensaio	Span 60 (mg)	Tween 80 (mg)	EE (%)	pH	DP (nm)	P.Z (mV)	Recup. (%)
NCX12	50	50	99,05	5,33	324	-29,33	102,69
NCX13	150	50	99,42	6,08	280	-35,05	97,23
NCX14	50	150	98,44	5,66	300	-25,39	103,99
NCX15	150	150	98,11	6,10	307	-32,09	91,64

Tabela 4.45: Resposta de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para os 4 ensaios de nanocápsulas de rauianina.

Ensaio	Span 60 (mg)	Tween 80 (mg)	EE (%)	pH	DP (nm)	Zeta (mV)	Recup. (%)
NCR12	50	50	99,01	6,21	297,7	-28,07	101,14
NCR13	150	50	99,62	5,88	298,3	-33,35	96,67
NCR14	50	150	97,62	5,69	307,0	-24,28	93,55
NCR15	150	150	97,46	6,16	295,0	-32,77	110,02

Tratando-se os dados para ambas as substâncias (xantiletina ou rauianina) verificou-se que não houve diferença significativa nos efeitos na avaliação da eficiência de encapsulação, pH, diâmetro de partícula, potencial zeta e recuperação para os diferentes níveis avaliados. Dessa forma resolveu-se trabalhar utilizando o menor nível de tensoativos (50 mg), que confere estabilidade às nanopartículas de xantiletina e rauianina sendo ecologicamente recomendado.

As nanocápsula de xantiletina (3000 µg/mL) e rauianina (2000 µg/mL) finais (150 mg de PCL, 0,6 g de oleato de isodecila, 50 mg de span 60 e tween 80) foram avaliadas quando a morfologia, estudos de estabilidade: tempo de armazenamento, degradação acelerado na luz UV, degradação térmica (65 °C), estudo de liberação *in vitro* e ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote.

4.11.1.1 - Morfologia

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas.

A avaliação da morfologia das nanopartículas de PCL foi realizada utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A Figura 4.90 mostra fotomicroscopia de uma nanocápsula (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo xantiletina. Nessas fotomicroscopia pode-se notar a diferença na organização estrutural entre as nanocápsula e nanoesferas. As nanocápsulas (A) são constituídas por um núcleo oleoso revestido por uma camada polimérica sólida, já as nanoesferas (B) são formadas por uma matriz polimérica sólida, onde o princípio ativo pode ficar retido ou adsorvido nesta.

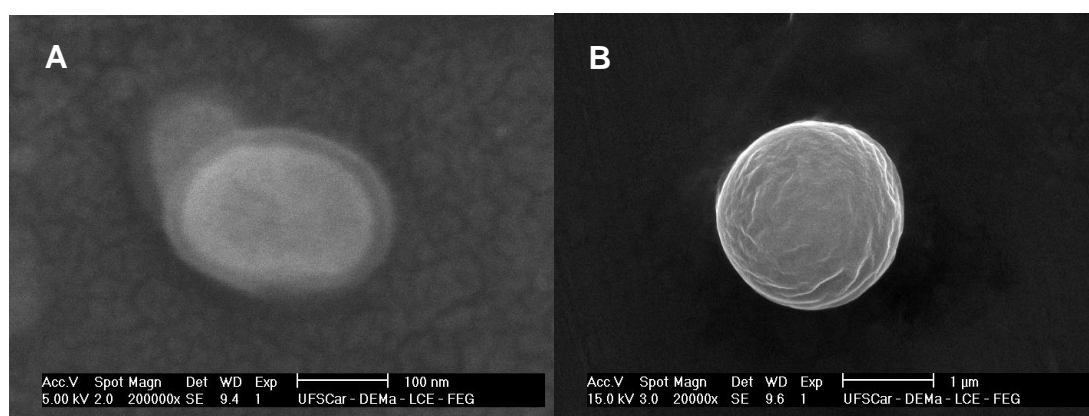


Figura 4.90: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das suspensões de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo xantiletina.

Ao depositar-se as suspensões de nanopartículas no porta amostra, com a evaporação da água, observa-se a formação de um filme polimérico resultante do agrupamento das nanopartículas. A análise da superfície destes filmes evidencia a presença de nanopartículas esféricas. A Figura 4.90 mostra as fotomicroscopias de nanocápsulas e nanoesferas de xantiletina.

As formulações desenvolvidas, com xantiletina e rauvina de nanocápsulas e nanoesferas, se apresentaram com diâmetros médios de 300 nm e 200 nm, respectivamente. A análise por MEV permitiu confirmar estes resultados e possibilitou a observação de formas esféricas das nanopartículas em suspensões de

xantiletina e rauianina (Figuras 4.91 e 4.93, respectivamente). Resultados semelhantes de diâmetro de partículas foram também reportados para nanocápsulas e nanoesferas de PCL contendo indometacina ou éster etílico de indometacina (CRUZ *et al.*, 2006). É importante salientar que os diâmetros médios das nanopartículas vazias não diferiram significativamente do apresentado para as nanocápsulas de xantiletina e rauianina.

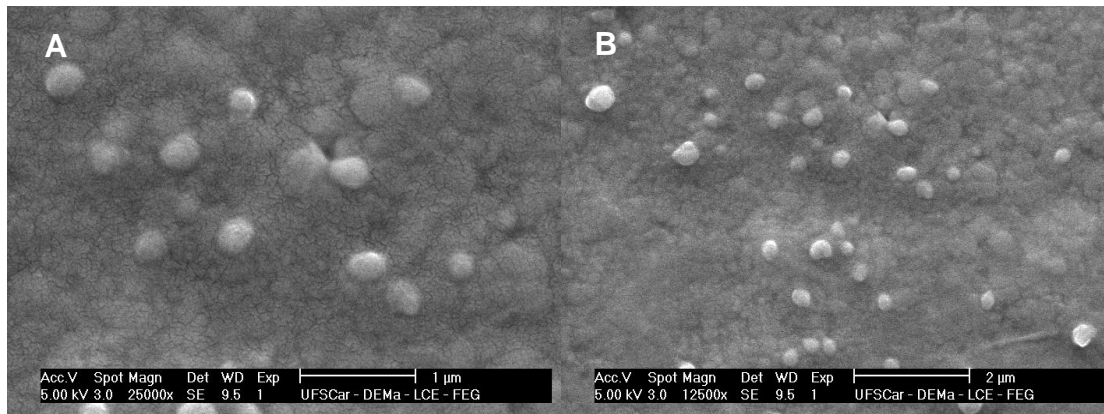


Figura 4.91: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das suspensões de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo xantiletina.

As suspensões coloidais não possuem tendência à separação de fases, pois o processo de sedimentação, nesses casos, é lento sendo minimizados pelo movimento Browniano. Entretanto, com o tempo, pode ocorrer a aglomeração das nanopartículas acompanhada de sedimentação.

O uso industrial das nanopartículas em suspensão se torna limitada por períodos longos de armazenamento, devido aos problemas de estabilidade físico-químico, tais como agregação das partículas, a estabilidade química do princípio ativo, do polímero e outros componentes da formulação. Além disso, as nanopartículas em suspensão podem apresentar uma liberação prematura do princípio ativo e a proliferação microbiana.

Dessa forma esses problemas físico-químicos e microbiológicos podem ser evitados através da secagem das suspensões coloidais. A técnica de secagem por nebulização (*spray-drying*) tem sido aplicada na secagem de suspensões de nanopartícula (MULLER *et al.*, 2000)

A secagem por nebulização, em equipamento de *Spray-dried*, consiste na passagem da suspensão de nanopartículas, através de um orifício atomizador, para a câmara de secagem sob a forma de gotículas, em co-corrente, contracorrente ou fluxo misto de ar quente, que promove a rápida secagem das gotículas. As partículas sólidas secas são, separadas e recolhidas, podendo apresentar-se sob a forma de pós finos, granulados ou aglomerados (POMBEIRO, 1998; BROADHEAD *et al.*, 1992). Utilizando esta metodologia, a partir de suspensões aquosas de nanopartículas pode-se obter produtos em pó.

As Figuras 4.92 e 4.94 mostram as fotomicroscopias de nanocápsulas e nanoesferas secas de xantiletina e rauianina, respectivamente. Nessas fotomicroscopias podem-se perceber as nanopartículas adsorvidas à superfície do adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal), após a secagem das suspensões através de nebulização.

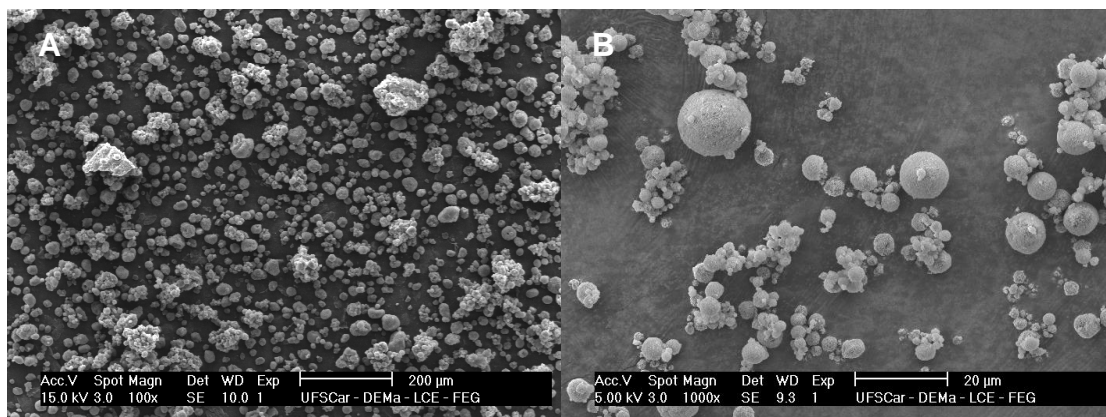


Figura 4.92: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das nanocápsulas secas (A) e nanoesferas secas (B) de PCL contendo xantiletina.

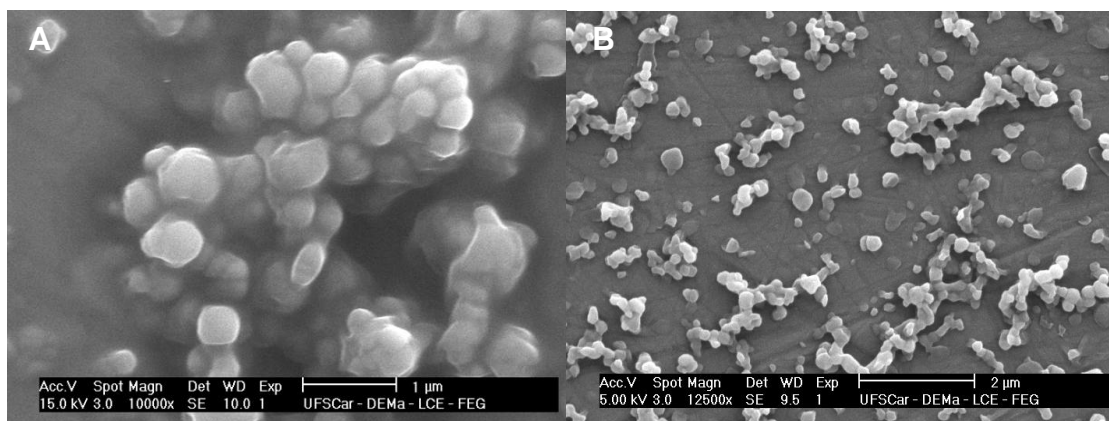


Figura 4.93: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das suspensões de nanocápsulas (A) e nanoesferas (B) de PCL contendo rauianina.

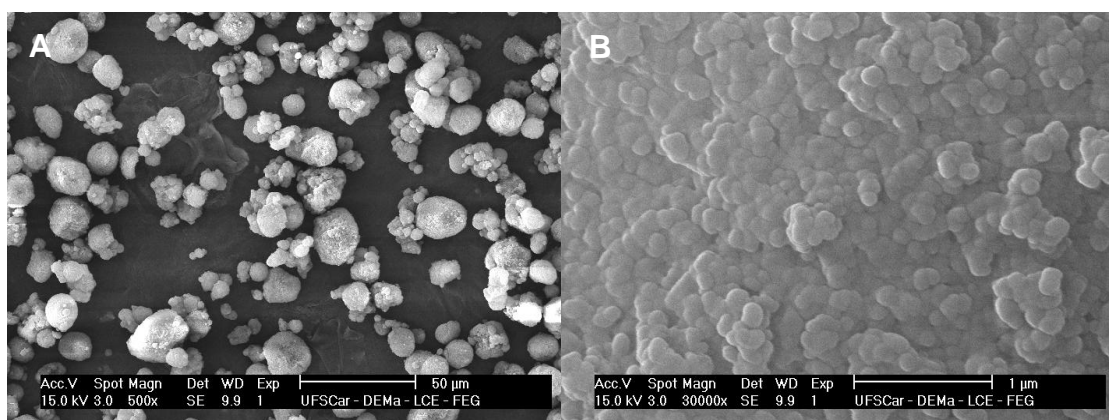


Figura 4.94: Fotomicroscopias obtidas por MEV, a partir das nanocápsulas secas (A) e nanoesferas secas (B) de PCL contendo rauianina.

4.11.1.2- Estudos de estabilidade:

A estabilidade é definida como o tempo (em dias, meses, anos) durante o qual um composto ativo ou mesmo a matéria-prima considerada, isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação (VADAS, 2000).

Diversos fatores podem alterar a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas, presença de tensoativos adsorvidos e a estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides.

Fatores extrínsecos, tais como temperatura, radiação, luz, ar, umidade e local de acondicionamento e fatores intrínsecos, tais como incompatibilidades, pH, hidrólise, racemização e oxidação também alteram a estabilidade.

Na busca de conhecimento sobre como fenômenos extrínsecos podem afetar no armazenamento das suspensões coloidais, foram avaliados os efeitos da temperatura e exposição ultravioleta sobre as nanoformulações.

O potencial zeta, tamanho de partícula, a distribuição da massa molar do polímero, o teor do princípio ativo e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para avaliar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas (CALVO *et al.*, 1996; FESSI *et al.*, 1989; GUTERRES *et al.*, 1995).

4.11.1.2.1- Tempo de armazenamento

As nanopartículas coloidais apresentam tendência para sofrer agregação ao longo do tempo, em especial quando são conservadas sob a forma de dispersões aquosas, dessa forma, avaliou-se as dimensões das nanopartículas durante o armazenamento, a 4 °C durante 4 meses, com o objetivo de estudar a estabilidade física (BALA *et al.*, 2004, BODMEIER & MAINCEINT, 1998, MAGENHEIM & BENITA, 1991).

Durante este tempo e nas condições estudadas, não se verificou diferença significativa do diâmetro médio das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de rauianina (NCRau) (Figura 4.95).

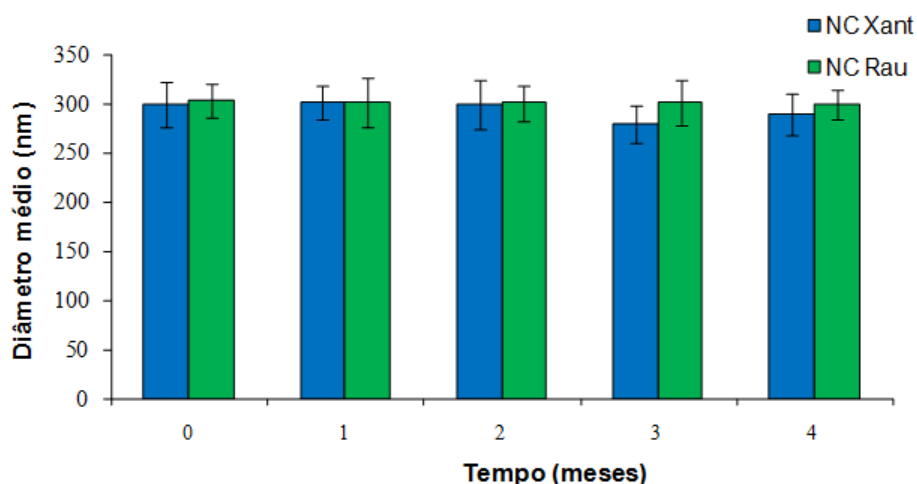


Figura 4.95: Variação do diâmetro médio das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de rauianina (NCRau), em nanocápsulas armazenadas a 4°C durante 4 meses. Cada barra representa os valores da média \pm desvio padrão de três lotes de nanocápsulas.

De maneira semelhante ao diâmetro de partículas, o potencial zeta das nanopartículas poliméricas também pode sofrer alterações durante o tempo de armazenamento, em resultado da degradação de alguns dos componentes da formulação. Novamente, não se verificou variações significativas nos valores do potencial zeta (Figura 4.96).

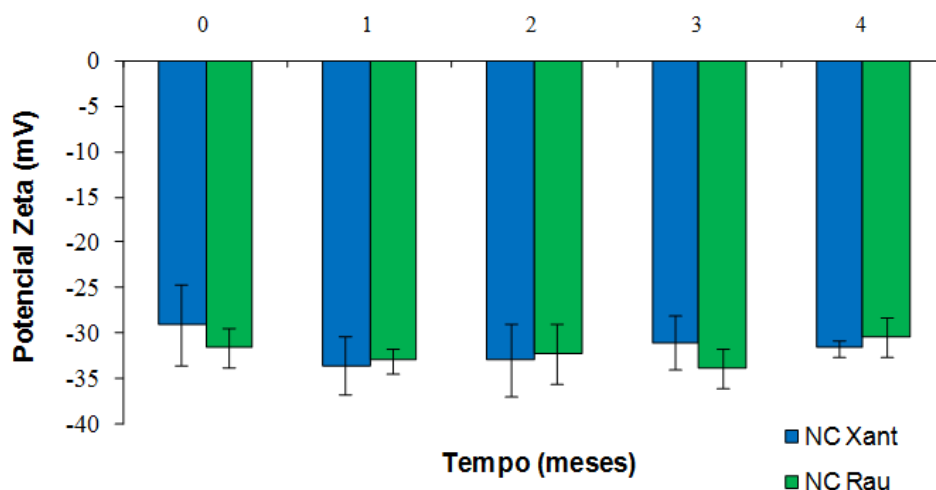


Figura 4.96: Variação do potencial zeta das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de rauianina (NCRau), em nanocápsulas armazenadas a 4°C durante 4 meses. Cada barra representa os valores da média \pm desvio padrão de três lotes de nanocápsulas.

A medida do pH é um dado importante na avaliação da estabilidade de sistemas coloidais. Alterações neste parâmetro podem estar relacionadas a degradação do polímero, uma vez que, a relaxação das cadeias poliméricas de PCL poderia ocasionar uma exposição de um maior número de grupos ácidos carboxílicos terminais, assim como o pH levemente ácido poderia ocasionar a hidrólise do poliéster, o que alteraria o pH das suspensões (LOPES *et al.*, 2000, SCHAFFAZICK *et al.*, 2002).

Nesse trabalho, os valores de pH para nanocápsulas de xantiletina e raunianina foram obtidos durante 4 meses de armazenamento (4 °C) não demonstrando uma significativa variação. Ou seja, nas condições em que foram realizados os ensaios, não houve degradação perceptível do polímero (PCL) ou de qualquer outro componente das nanocápsulas (Figura 4.97).

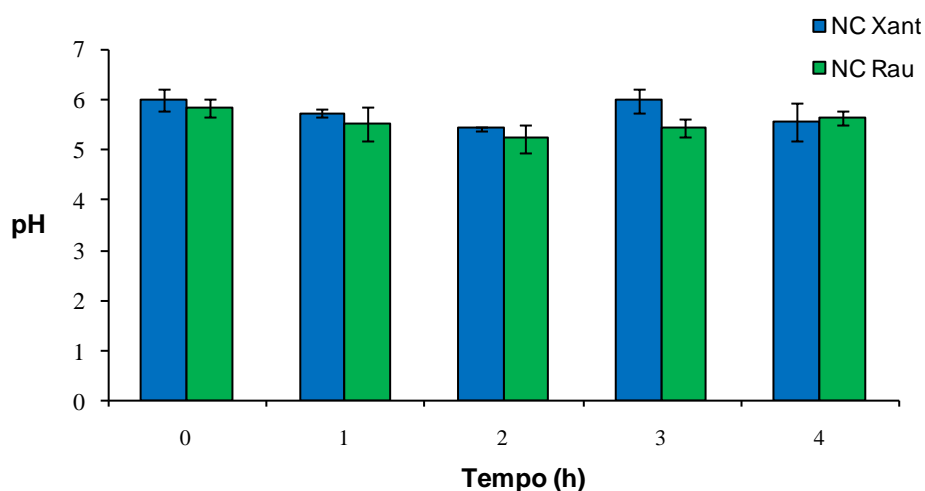


Figura 4.97: Variação do pH das nanocápsulas de xantiletina (NCXant) e de raunianina (NCRaui), em nanocápsulas armazenadas a 4°C durante 4 meses. Cada barra representa os valores da média ± desvio padrão de três lotes de nanocápsulas.

As nanocápsulas de xantiletina e raunianina conservaram seus aspectos visuais quase inalterados. Não foi observado o surgimento de suspensões cremosas ou com óleo livre à superfície. No final dos 3 mês, verificou-se a presença de pequenos cristais nestas suspensões. De acordo com a literatura, a obtenção destes cristais está associado à formação de nanocristais da substância encapsulada,

durante a preparação das nanocápsulas que, durante o armazenamento, tendem a crescer e a precipitar (GUTERRES, *et al.*, 1995; SCHAFFAZICK, *et al.*, 2002).

4.11.1.2.2- Degradação acelerado na luz UV

Comumente, o princípio ativo, quando aplicado em campo, se encontra diretamente exposto a irradiação solar, temperatura e umidade sendo este ambiente, totalmente favorável a sua degradação. Os processos de degradação podem ser rápidos ou lentos, podendo refletir ou não nas características inseticidas. Estas alterações podem levar à perda parcial ou total da atividade ou à formação de produtos cuja toxicidade é elevada. Desta forma, mecanismos de proteção são fundamentais para o pleno funcionamento de inseticidas e/ou fungicidas.

Estudos de estabilidade acelerada por Ultravioleta foram realizados na Câmara de degradação (UVA-UVB) sendo monitorados pelo conteúdo de xantiletina ou rauianina. Nestes estudos foram avaliados o ganho de estabilidade fotoquímica destas substâncias pela técnica de nanoencapsulação. Foram comparadas amostras de xantiletina ou rauianina nanoencapsuladas com estas “*in natura*” (livres em solução). Um controle foi preparado mantendo amostras de xantiletina ou rauianina livres em solução e nanoencapsuladas, dentro da câmara, porém revestida ao abrigo da luz. As amostras foram analisadas no início do estudo ($t=0$) e durante um período de 7 horas. Não foi observado fenômenos de degradação para as amostras (xantiletina ou rauianina) protegida da irradiação ultravioleta.

Analisando a Figura 4.98, observa-se que a xantiletina (sem nenhum mecanismo de proteção) foi completamente degradada nos primeiros trinta minutos de ensaio, já a xantiletina encapsulada teve uma degradação mais lenta.

A Figura 4.99 apresenta o perfil de degradação da rauianina “*in natura*” (sem nenhum mecanismo de proteção) e encapsulada. Diferentemente da xantiletina, a rauianina livre se degrada mais lentamente. A diferença na velocidade de degradação da rauianina livre e encapsulada é bastante considerável. Ao final de 7h de ensaio, observou-se 73,1% de rauianina *in natura* degradada e apenas 20% quando esta foi encapsulada.

Estes resultados disponibilizam a técnica de preparação de nanopartículas de PCL como um procedimento que pode ser aplicado no aumento da estabilidade ultravioleta de xantiletina e rauianina.

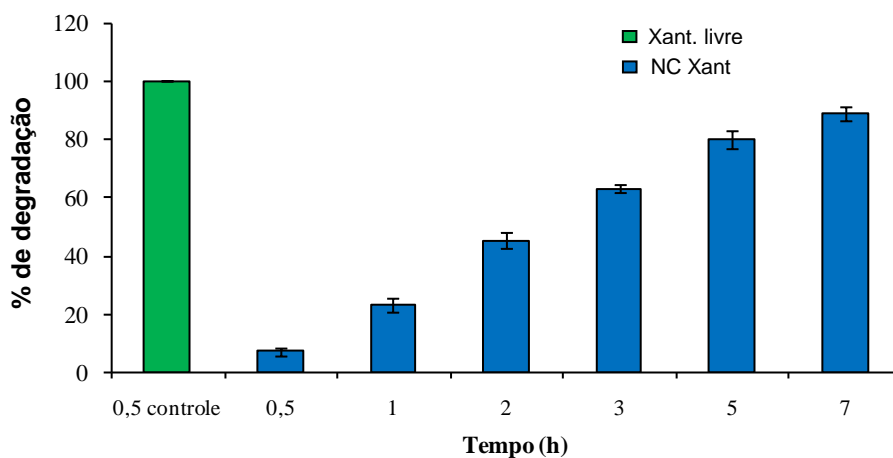


Figura 4.98: Estudo de degradação da luz da xantiletina livre (Xant. Livre) e encapsulada (NC de Xant). Cada barra representa os valores da média \pm desvio padrão de três lotes de nanocápsulas.

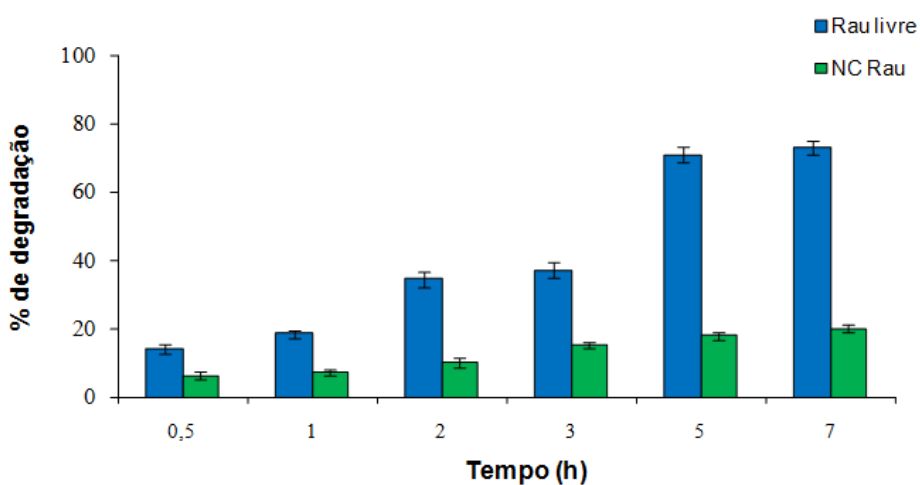


Figura 4.99: Estudo de degradação da luz da rauianina livre (Rau. Livre) e encapsulada (NC de Rau). Cada barra representa os valores da média \pm desvio padrão de três lotes de nanocápsulas.

4.11.1.2.3- Degradação térmica (65 °C)

O estudo da degradação térmica foi conduzido condicionando três amostras de nanocápsulas de xantiletina ou rauianina em estufa térmica, previamente ambientada e com temperatura média constante de $65 \pm 2^\circ\text{C}$.

As análises de xantiletina e rauianina livres, referentes a um período de 24 horas, apresentaram uma ligeira redução nos teores de aproximadamente 6 %. Já para estes compostos encapsulados, não houve alterações significativas nos teores (Figuras 4.100 e 4.101). Este resultado é significativo para amostras submetidas a estresses momentâneos de temperatura durante um período de armazenagem, transporte, processo ou exposição em campo.

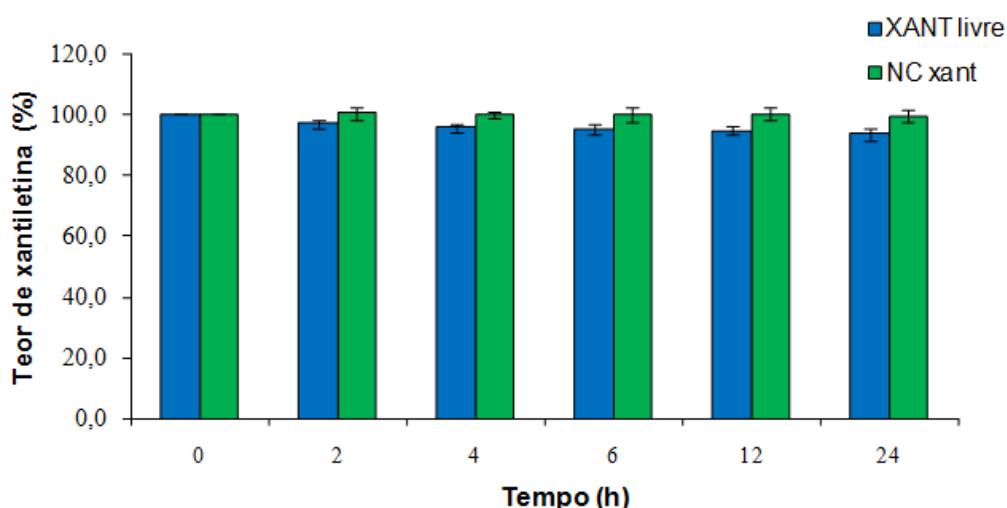


Figura 4.100: Estudo de degradação da temperatura (65 °C) da xantiletina livre (Xant. Livre) e encapsulada (NC Xant). Cada barra representa os valores da média \pm desvio padrão de três lotes de nanocápsulas.

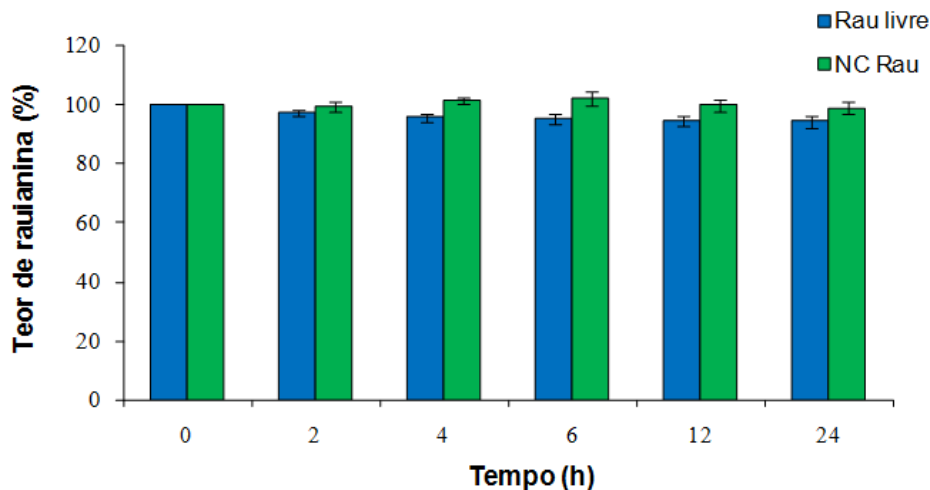


Figura 4.101: Estudo de degradação da temperatura (65 °C) da rauianina livre (Rau. Livre) e encapsulada (NC Rau). Cada barra representa os valores da média \pm desvio padrão de três lotes de nanocápsulas

4.11.1.3- Estudo da liberação *in vitro*

A liberação do princípio ativo a partir de nanopartículas poliméricas depende de alguns fatores, tais como dessorção do princípio ativo na superfície das partículas; difusão do princípio ativo através da matriz das nanoesferas; difusão através da parede polimérica das nanocápsulas; da erosão físico-química ou microbiana da matriz polimérica ou da combinação de dois ou mais processos (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Algumas técnicas têm sido utilizadas no estudo da cinética de liberação *in vitro*, tais como difusão em sacos de diálise (CALVO *et al.*, 1996) e separação através ultracentrifugação (GREF *et al.*, 2001), filtração a baixa pressão (MAGENHEIM *et al.*, 1993) ou ultrafiltração-centrifugação (LOPES *et al.*, 2000).

Os perfis de liberação permitem determinar o mecanismo de associação do princípio ativo (fármaco, inseticida ou fungicida).

Os perfis de liberação da xantiletina e rauianina a partir das formulações de nanocápsulas de PCL desenvolvidas no presente trabalho são apresentados nas Figuras 4.102 e 4.103, respectivamente. O experimento foi realizado em condições *sink*, evitando-se deste modo a interferência da baixa hidrossolubilidade destes compostos nos resultados obtidos.

Apesar de se verificar, para os dois sistemas coloidais, uma liberação inicial rápida, observa-se que entre a primeira hora e o fim do experimento houve uma diferença significativa entre os perfis de liberação. Ao fim de 48 horas de ensaio verificou-se a difusão de 60% de xantiletina e 81% de rauianina do meio para o interior dos sacos de diálise. As diferenças verificadas nos perfis de liberação entre a xantiletina e rauianina pode ser decorrente do coeficiente de partição entre a fase oleosa (oleato de isodecila) e o meio de liberação (água) como reportado na literatura para outros fármacos (CALVO *et al.*, 1996, LOSA *et al.*, 1993, MARCHAIS *et al.*, 1998).

A maior afinidade da xantiletina pelo óleo pode explicar e ser a responsável pela liberação mais lenta quando comparada a liberação da rauianina. Alguns autores relatam que a liberação bifásica, rápida liberação inicial, seguida por uma fase de liberação muito lenta, pode estar relacionada com uma quantidade de princípio ativo adsorvido à superfície das nanopartículas (FRESTA *et al.*, 1996).

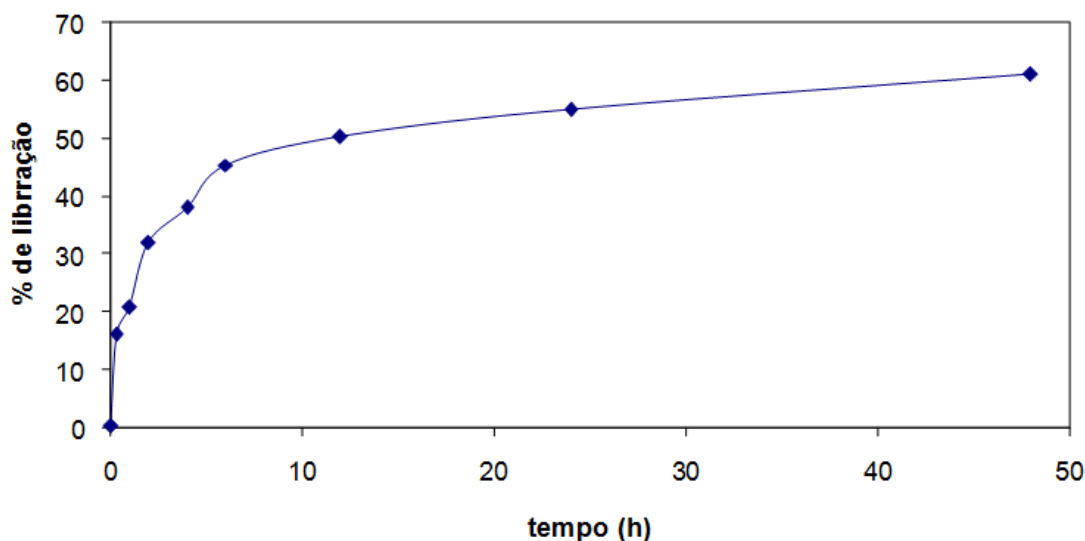


Figura 4.102: Perfil de liberação *in vitro* da xantiletina a partir da dispersão de nanocápsulas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica da dispersão é de 36 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de três lotes diferentes de nanocápsulas.

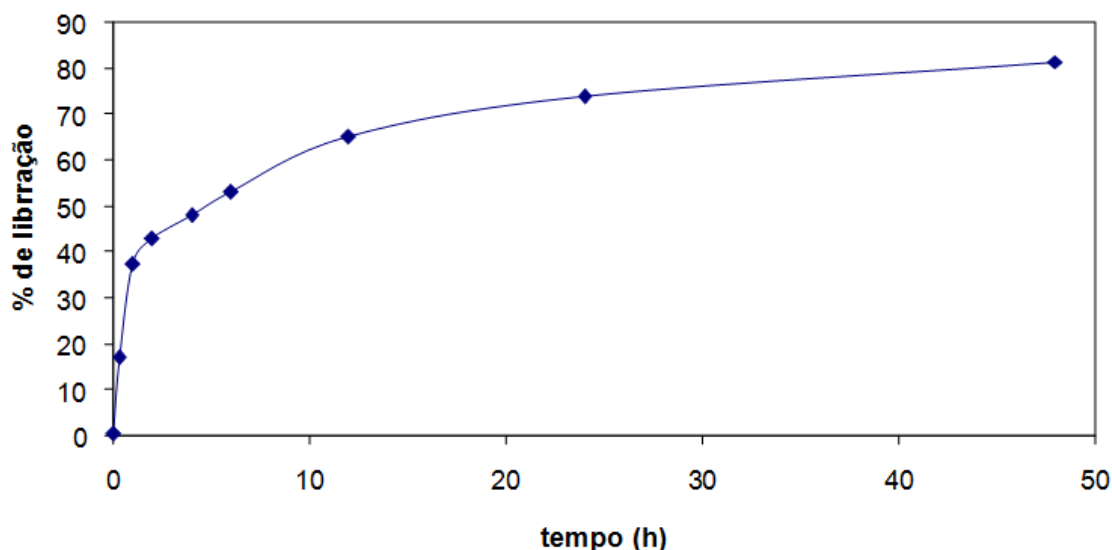


Figura 4.103: Perfil de liberação *in vitro* da rauianina a partir da dispersão de nanocápsulas seguida da sua difusão através do saco de diálise. A concentração teórica da dispersão é de 59 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de três lotes diferentes de nanocápsulas.

4.11.2- Nanopartículas de ricinina

Devido à dificuldade em encapsular a ricinina, foram investigadas as técnicas de nanoprecipitação, Dupla-Emulsão, Gelificação iônica e deposição interfacial/deslocamento do solvente, visando uma maior eficiência de encapsulação.

Todas as formulações testadas foram caracterizadas conforme a eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação.

Os experimentos de encapsulação da ricinina iniciou-se utilizando a técnica de nanoprecipitação de um polímero pré-formado (FESSI *et al.* 1988a e b, 1989). Foram preparadas suspensões de nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NS) utilizando PLGA em acetona como fase orgânica no preparo das nanoesferas e PLGA, lecitina de soja, Myritol[®] 812 ou miristato de isopropila, óleo de rícino em acetona no caso das nanocápsulas. Em ambas as formulações foram utilizadas a solução de Pluronic[®] F-68 na fase aquosa (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

As nanoesferas desenvolvidas apresentaram diâmetro médio inferiores 160 nm e carga superficial negativa, com valores de potencial zeta compreendidos entre -35 mV e -40 mV. Todavia, utilizando esta técnica, os resultados da

incorporação da ricinina em nanoesferas de PLGA exibiram uma baixa eficiência de encapsulação com valor médio de $15,24 \pm 0,02\%$ na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$. Essa baixa eficácia de encapsulação pode ser explicada pelo fato de que o princípio ativo apresenta baixa afinidade com o polímero. Assim, ricinina teve tendência de difundir da fase orgânica para a fase aquosa durante a formação das nanoesferas, o que leva a baixos valores de eficiência de encapsulação.

O melhor resultado de eficiência de encapsulação foi encontrado para nanocápsulas com valores médios de $38,81 \pm 0,24 \%$ ($64,58 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$) na formulação com núcleo oleoso contendo myglyol[®]812. Formulações com núcleo oleoso de óleo de rícino apresentou uma eficiência de encapsulamento de $34,21 \pm 1,68\%$ ($108,08 \pm 2,42 \mu\text{g/mL}$). Essa quantidade de ricinina incorporada ligeiramente maior para nanocápsulas usando óleo de rícino pode ser explicada pelo coeficiente de partição do óleo de rícino/água ser ligeiramente maior, demonstrando uma maior afinidade da ricinina por esse núcleo oleoso em relação aos outros testados, Myritol[®] 812 ou miristato de isopropila. Nanocápsulas preparadas com miristato de isopropila apresentou uma eficiência de encapsulação inferior a 25%. O diâmetro médio dessas partículas foram menores a 260 nm e valores de potencial zeta variando entre -36 mV e -40 mV.

Com objetivo de melhorar a eficiência de encapsulação e diminuir o custo das formulações, testou-se a composição proposta por CRUZ *et al.*, 2006. Nessa formulação utilizou-se o PCL, span 60 e acetona como fase orgânica e solução de tween 80 como fase aquosa. O oleato de isodecila ou óleo de rícino foram utilizados no preparo das nanocápsulas.

Os resultados do diâmetro de partícula ($237,5 \pm 7,32$ nm para nanocápsulas e $155,1 \pm 3,67$ nm para as nanoesferas), potencial zeta ($-31,28 \pm 0,32$ nm para nanocápsulas e $-28,35 \pm 1,67$ nm para as nanoesferas) e pH ($6,6 \pm 0,09$ para nanocápsulas e $6,48 \pm 0,05$ para as nanoesferas) ficaram dentro dos valores esperados. Entretanto eficiência de encapsulação continuou não sendo satisfatória, não ultrapassando a 12%.

Segundo GOVENDER *et al.*, 1999 ácidos graxos, por exemplo, o ácido laúrio ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) e o ácido caprílico ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$), podem ser empregados para aumentar a eficiência de encapsulação de drogas hidrofílicas catiônicas. Os grupos carboxilas dos ácidos poderiam complexar com substância catiônica por interações

iônicas e como os ácidos são insolúveis na fase aquosa, coprecipitaria com PCL diminuindo a migração da droga para a fase aquosa, assim aumentando a taxa de encapsulação. Apesar da ricinina ser uma molécula neutra, variações no pH do meio pode levar a formas protonadas da mesma ou sua hidrólise. Assim, testou-se os ácidos láurico e caprílico em diferentes concentrações no preparo de nanoesferas. O tamanho médio das nanoesferas variou de 128 nm a 144 nm e os valores de potencial zeta variaram de -18 mV à - 32 mV. Com o uso dos ácidos, obteve-se um aumento na eficiência de encapsulação, entretanto essa não ultrapassou 24 %.

Nessa etapa do trabalho recorreu-se a outra ferramenta utilizada por GOVENDER *et al.*, 1999, baseada no uso de solução tampão para o preparo das nanopartículas. O uso do tampão tem o intuito de diminuir a solubilidade do fármaco na fase aquosa assim forçando sua co-precipitação com o polímero ao formar as nanoesferas.

Diferentes tampões (glicina, carbonato e fosfato) e pH foram testados. O tamanho médio das nanoesferas variou de 151 nm a 164 nm e os valores de potencial zeta entre - 33 mV à - 42 mV. Dos tampões testados os melhores resultados foram obtidos com o tampão carbonato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 10,6 e tampão fosfato ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 8,38 com eficiências de encapsulação de $28,54 \pm 2,59\%$ e $25,39 \pm 1,9 \%$, respectivamente. Novamente os resultados obtidos não foram satisfatórios ficando aquém dos obtidos para a técnica de nanoprecipitação. Além disso, as suspensões de nanoesferas utilizando tampão se mostraram muito instáveis onde, em apenas 48 horas era possível notar a formação de precipitado no fundo dos recipientes.

Soluções aquosas de CaCl_2 na razão molar de (1:1, 2:1, 4:1 e 6:1) com a ricinina, também foram utilizadas para substituir a fase aquosa, afim de reduzir a solubilidade do princípio ativo nessa fase e aumentar a eficiência de encapsulação. Novamente, a eficiência de encapsulação foi inferior a 20%.

Diante dos testes e resultados obtidos com o método de nanoprecipitação, resolveu-se testar o método de dupla-emulsão de solvente (emulsificação-evaporação do solvente) água/óleo/água (A/O/A) (BLANCO & ALONSO, 1997; TEWES *et al.*, 2007). As nanoesferas do tipo A/O/A (emulsão múltipla) são preparadas a partir de uma emulsão A/O, adicionando-se uma solução aquosa contendo o princípio ativo a uma solução de um solvente orgânico apolar

(acetato de etila ou diclorometano) contendo um polímero. A emulsão formada é dispersa em uma fase aquosa contendo um tensoativo, assim formando a emulsão múltipla. Este método tem sido utilizado com sucesso na incorporação de substâncias hidrossolúveis. As nanopartículas desenvolvidas apresentaram diâmetro médio inferiores 200 nm e carga superficial negativa, com valores de potencial zeta compreendidos entre -39 mV e -42 mV. Entretanto a eficácia de incorporação não ultrapassou a 18%.

Em 2009, COHEN-SELA e colaboradores propuseram um novo método de dupla emulsão utilizando CaCl_2 na fase aquosa (fase 3) como contra-íon do princípio ativo, afim de reduzir a solubilidade do mesmo nessa fase e aumentar a eficiência de encapsulação o núcleo aquoso (fase 1). Utilizando os recursos desses autores com algumas modificações, os resultados mostram que com o aumento da quantidade de cloreto de cálcio adicionado nas formulações houve uma melhoria na eficiência de encapsulamento. Utilizando 6,5 mg/mL de CaCl_2 na fase aquosa (fase 3) obteve-se $31,62 \pm 1,36$ % de eficiência de encapsulação.

Outro método investigado foi o de gelificação iônica utilizando a quitosana como polímero de trabalho (CALVO *et al.*, 1997). A quitosana (CS) (Figura 4.104), polissacarídeo obtido pela hidrólise alcalina da quitina derivada de casca de artrópodes, age como floculante em tratamentos de efluentes líquidos e como resina quelante na remoção de metais pesados. Este polissacarídeo vem sendo estudado como uma possível matriz para o desenvolvimento dos métodos de liberação controlada, pois esta mantém forma de gel em pH baixos, sendo a liberação do agente bioativo retardada nesta condição, podendo haver uma liberação constante (BODMEIER *et al.*, 1989). A quitosana apresenta biocompatibilidade e baixa toxicidade. Formulações revestidas por quitosana se comportam como géis em soluções de baixo pH e são adequados para liberação de substâncias solúveis em água. O método de gelificação iônica tem atraído muita atenção por ser um processo muito simples. O método baseia-se na complexação de moléculas com cargas opostas. O tripolifosfato (TPP) (Figura 4.105), um poliânion, interage com a quitosana catiônica (em meio ácido) por forças eletrostáticas (KAWASHIMA *et al.*, 1985 a e b). Resumidamente, no método de gelificação iônica, a quitosana é dissolvida em solução aquosa ácida para obter a quitosana catiônica. A solução de TPP polianiônico é então adicionada a solução de quitosana catiônica. Devido à

complexação entre espécies de cargas opostas, a quitosana sofre gelificação iônica e precipita para formar partículas esféricas. Diferentes razões molares entre TPP/CS foram estudadas no intuito de preparar esferas contendo ricinina com maior eficiência de encapsulação. Entretanto, em todas as formulações a eficiência de encapsulação não ultrapassou 15%. As nanoesferas desenvolvidas apresentaram diâmetro médio inferiores 300 nm e carga superficial positiva, entre +37 mV e +41 mV.

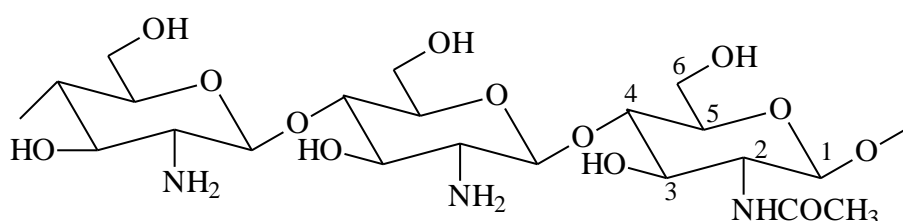


Figura 4.104: Estrutura da quitosana.

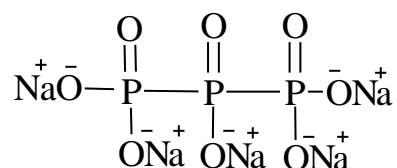


Figura 4.105: Estrutura do tripolifosfato (TPP).

Diante desses resultados, foi necessário desenvolver uma nova metodologia para a encapsulação da ricinina. O novo método consistiu em preparar uma primeira solução dissolvendo o polímero em um solvente (acetona) parcialmente miscível em água. Esta solução foi vertida sob agitação magnética moderada e fluxo controlado sobre uma nanoemulsão pré-formada de óleo/água. A nanoemulsão pode ser preparada pela homogeneização sob agitação vigorosa dos constituintes da fase interna, neste caso óleo, princípio ativo e tensoativo de baixo EHL. Vertendo-se a fase orgânica sobre a nanoemulsão, ocorreu da dispersão do solvente na fase aquosa com a precipitação do polímero na interface água nanoemulsão.

Uma terceira fase contendo o tensoativo de alto EHL foi então adicionada à suspensão coloidal. A principal função da terceira fase foi adicionar tensoativos na superfície das nanopartículas melhorando a dispersão coloidal e

estabilidade. A adição de excesso de água, também favoreceu a difusão do solvente e o posicionando o polímero na interface óleo/água. Com a evaporação do solvente e do excesso de água em evaporador rotativo foi completada a formação das nanocápsulas. O tensoativo se localizou na interface nanocápsula/água estabilizando o sistema.

Os resultados obtidos para a caracterização destas nanocápsulas estão dispostos na Tabela 4.46. Como se pode observar através desse novo método, foram alcançados valores de eficiência de encapsulação próximos de 85% para as formulações de nanocápsulas de ricinina preparadas com concentrações de 1.500 µg/mL.

Tabela 4.46: Resultados de eficiência de encapsulação (EE), pH, diâmetro de partícula (DP), potencial zeta (PZ) e recuperação para as nanocápsulas de ricinina pelo novo método de deposição interfacial/deslocamento do solvente..

Amostra	EE (%)	pH	DP (nm)	PZ (mV)	Recup.(%)
NCricinina	84, 85 ± 2,2	6,01 ± 0,2	229, 5 ± 2,7	-25,42 ± 3,7	91 ± 5,7

Essa formulação foi avaliada quanto a morfologia, estudo de liberação *in vitro* e ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote.

As nanocápsulas apresentaram diâmetros médios de 229, 5 ± 2,7nm. A análise por MEV permitiu confirmar estes resultados e possibilitou a observação de formas esféricas nas nanocápsulas de ricinina (Figuras 4.106).



Figura 4.106: Fotomicroscopia de suspensões coloidais de nanocápsulas obtidas por MEV, contendo ricinina. As nanocápsulas foram obtidas pelo método proposto por deposição interfacial/deslocamento do solvente.

A Figura 4.107 mostra as fotografias de nanocápsulas secas por spray-Dried de PCL contendo ricinina. Na figura 4.106B pode-se notar as nanocápsulas adsorvidas à superfície do dióxido de silício coloidal usado como suporte de secagem.

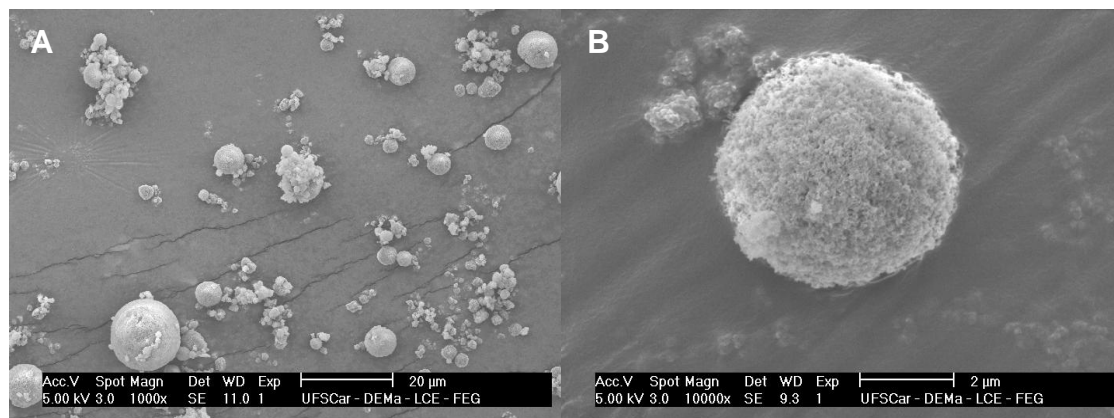


Figura 4.107: Fotomicroscopia obtidas por MEV, a partir das nanocápsulas secas PCL contendo ricinina pelo novo método de deslocamento do solvente/deposição interfacial.

Os perfis de liberação da ricinina a partir das formulações de nanocápsulas de PCL (NCricinina) obtidas pelo novo método de deslocamento do solvente/deposição interfacial, são apresentadas nas Figuras 4.108.

Diferentemente dos perfis de liberação da xantiletina e rauianina, a liberação foi bastante acelerada. Ao fim de 30 minutos a quantidade de ricinina liberada a partir das nanocápsulas foi de 50 %. Com 24 horas de ensaio, verificou-se a difusão da totalidade de ricinina do meio para o interior dos sacos, através das membranas de diálise.

A maior afinidade da ricinina pela água pode explicar a liberação mais rápida, quando comparada a liberação da xantiletina e rauianina. Uma das propostas de liberação pode ocorrer via o intumescimento, ou seja, inchaço do polímero com a água em condições sink possibilitando a migração da ricinina para o meio de dispersão.

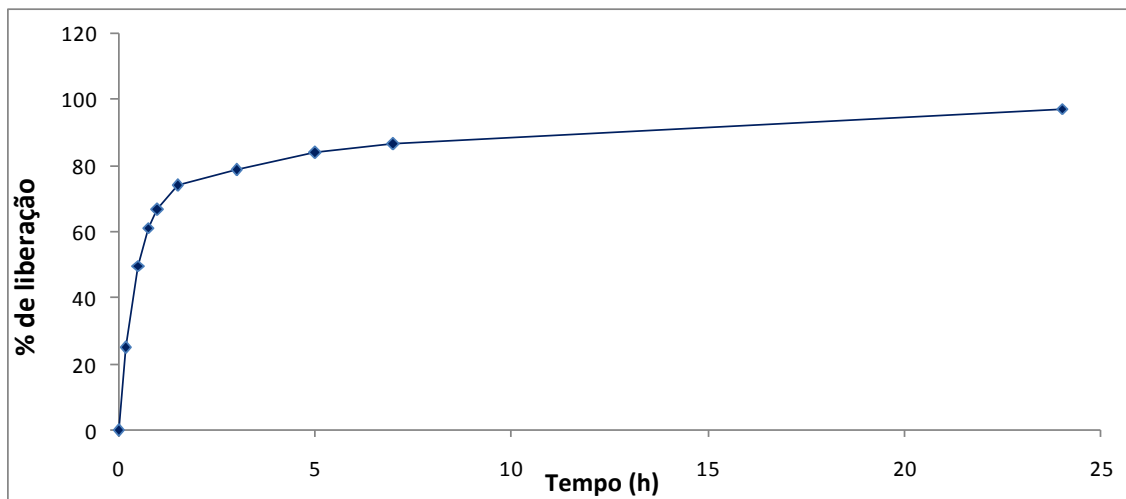


Figura 4.108: Perfil de liberação *in vitro* de ricinina a partir da dispersão de nanocápsulas, pelo método proposto de deposição interfacial/deslocamento do solvente. A concentração teórica da dispersão é de 59 $\mu\text{g/mL}$. Cada ponto representa a média de três lotes diferentes de nanocápsulas.

4.12- Ensaio Biológicos

4.12.1- Ensaio biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com nanopartículas poliméricas

Além das nanoformulações, os constituintes usados no preparo das nanocápsulas, tais como PCL, oleato de isodecila, span[®] 60 e tween[®] 80, também foram ensaiados frente à *Atta sexdens rubropilosa* conforme metodologia descrita na parte experimental.

Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, as curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Na análise estatística dos resultados obtidos após um período de 25 dias de experimento, foi empregado o teste “log-rank”, comparando as curvas de sobrevivência de formigas submetidas ao tratamento com aquelas dos controles em dieta pura.

Para os tratamentos realizados somente com PCL, oleato de isodecila (OIS), span[®] 60 e tween[®] 80, houve sobrevivência mediana (Md) de 50% no 14^o, 11^o, 25^o e 25^o dia de tratamento, respectivamente. Exceto para o oleato de isodecila, estes valores não tiveram diferença significativa em relação ao controle. Isto significa que estes constituintes utilizados no preparo das nanocápsulas não apresentam atividade (span[®] 60 e tween[®] 80) ou fraca atividade [PCL e oleato de isodecila (OIS)] frente às formigas cortadeiras. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.47 e Figuras 4.109 e 4.110.

Tabela 4.47: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com os constituintes das nanocápsulas

Amostras	S ₅₀	S ₅₀ controle
PCL	14	21
OIS	11 ^d	21
S60	25	23
T80	25	23

PCL (poli-ε-(caprolactona)), OIS (oleato de isodecila), S60 (span 60) e T80 (tween 80).

S₅₀= sobrevivência mediana/dias

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

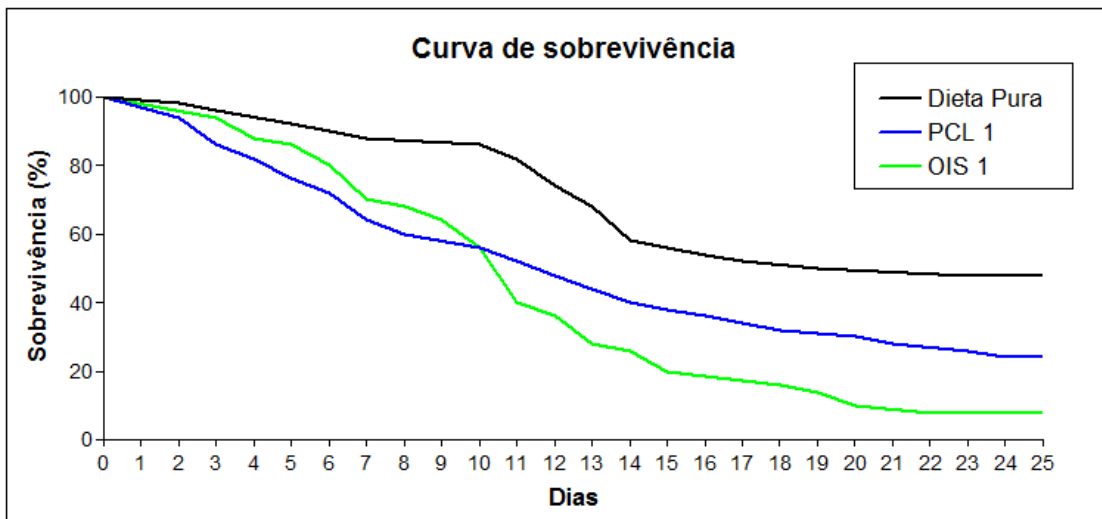


Figura 4.109: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com poli-γ-(caprolactona) (PCL 1) e oleato de isodecila (OIS 1).

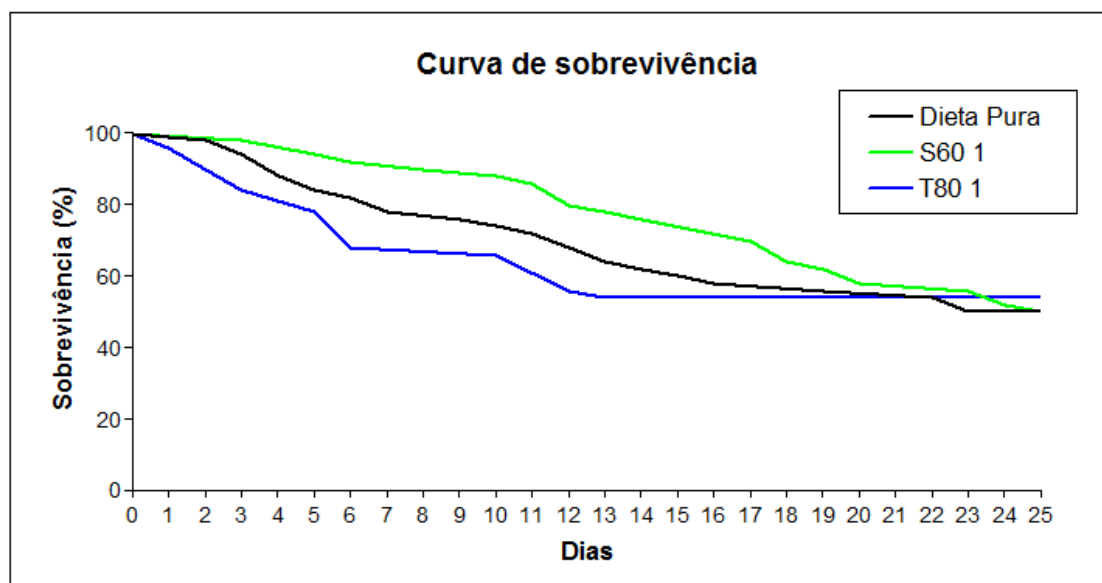


Figura 4.110: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com os tensoativos span 60 (S60 1) e Tween 80 (T80).

As substâncias puras e as nanopartículas de ricinina, xantiletina e rauaianina, também foram submetidas aos ensaios frente a *Atta sexdens rubropilosa*. Todas as amostras foram ensaiadas na concentração de 100 µg/mL (Tabela 4.48).

Ao preparar a dieta artificial com xantiletina e rauianina puras obteve-se mortalidade de 26% e 50% das formigas ao final do experimento, respectivamente. O controle com dieta pura teve a mortalidade total acumulada de 42% no 25º dia. Assim, não houve diferença significativa entre estes resultados. Já a xantiletina (NCXF) e rauianina (NRXF) nanoencapsuladas teve 50% de saúvas mortas no 3º e 4º dia de tratamento, com mortalidade total de 100% para ambas no 10º e 25º dia, respectivamente. Essa atividade conferida aos compostos após a nanoencapsulação pode estar relacionada ao mecanismo de ação, pois tanto a xantiletina quanto a rauianina são compostos com características hidrofóbicas, já o material encapsulados, torna-se hidrofílico. Esta característica pode favorecer o transporte do princípio ativo a uma determinada parte do inseto, antes não acessível, devido a algumas barreiras fisiológicas em função de seu caráter hidrofóbico. Além disso, a atividade pode ter sido intensificada pela presença do óleo utilizado para o seu processo de preparação.

Comparando os resultados da atividade biológica para nanocápsulas em suspensão coloidal com as microcápsulas secas, nota-se uma diferença significativa entre os resultados. As nanocápsulas secas de xantiletina (NCXFseca) e rauianina (NRXFseca) teve 50% de saúvas mortas no 17º e 10º dia de tratamento, respectivamente, sendo que o resultado da nanocápsula de xantiletina seca não diferenciou significativamente do controle. Já a rauianina nanoencapsulada em suspensão ou seca tiveram mortalidade acumulada de 98% no 25º dia. A diferença está na sobrevivência mediana (Md) de 50%. As nanocápsulas de rauianina em suspensão foram mais ativas que as mesmas secas. Essa diferença de potencialidade pode estar relacionada à cinética de liberação, o meio de cultura pode ter dificultado a dispersão das nanopartículas secas e com isso houve uma liberação mais lenta do que as em suspensão. O material seco não favorece a difusão (intumescimento) e assim poderá ocorrer apenas se houver uma gradativa hidratação do polímero ou por erosão, um processo mais lento.

Os resultados estão apresentados na Tabela 4.48 e nas Figuras 4.111 a 4.114.

Tabela 4.48: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com as substâncias puras e encapsuladas

Amostras	S ₅₀	S ₅₀ controle
Xantiletina	>25	>25
NCXF	3 ^d	>25
NCXFseca	17	>25
rauvianina	25	>25
NCXF	4 ^d	>25
NCXFseca	10 ^d	>25
ricinina	5 ^d	>25
NCP53	3 ^d	>25
NCP62	11 ^d	13

nanocápsulas de xantiletina em suspensão (NCXF), nanocápsulas de xantiletina secas (NCXFseca), nanocápsulas de rauianina em suspensão (NCRF) e nanocápsulas de xantiletina secas (NCRFseca), nanocápsulas de ricinina em suspensão (NCP53) e NCP62 (branco das nanocápsulas).

S₅₀= sobrevivência mediana/dias, Concentração: 100 µg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

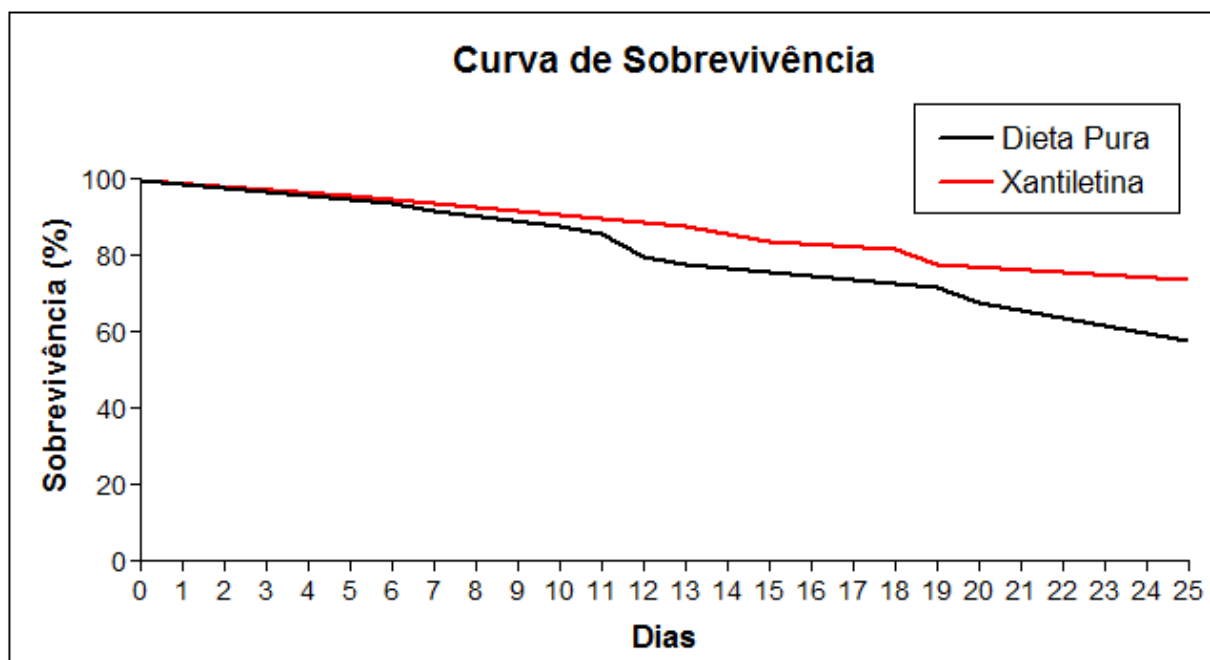


Figura 4.111: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com xantiletina.

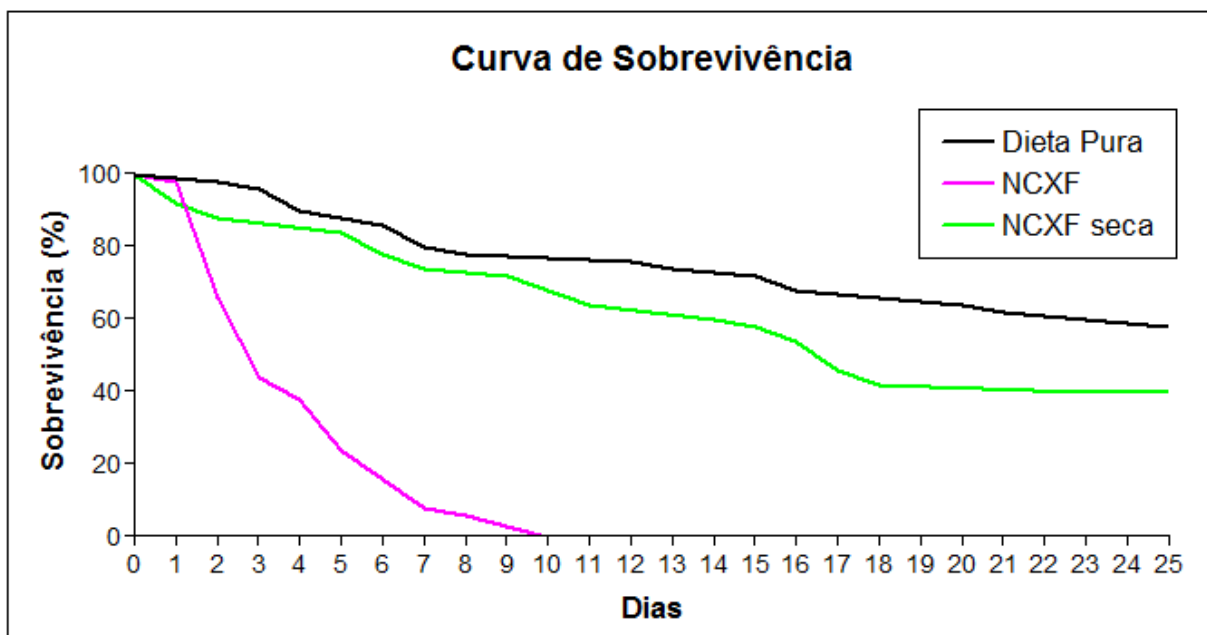


Figura 4.112: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas de xantiletina em suspensão (NCXF) e nanocápsulas de xantiletina secas (NCXFseca).

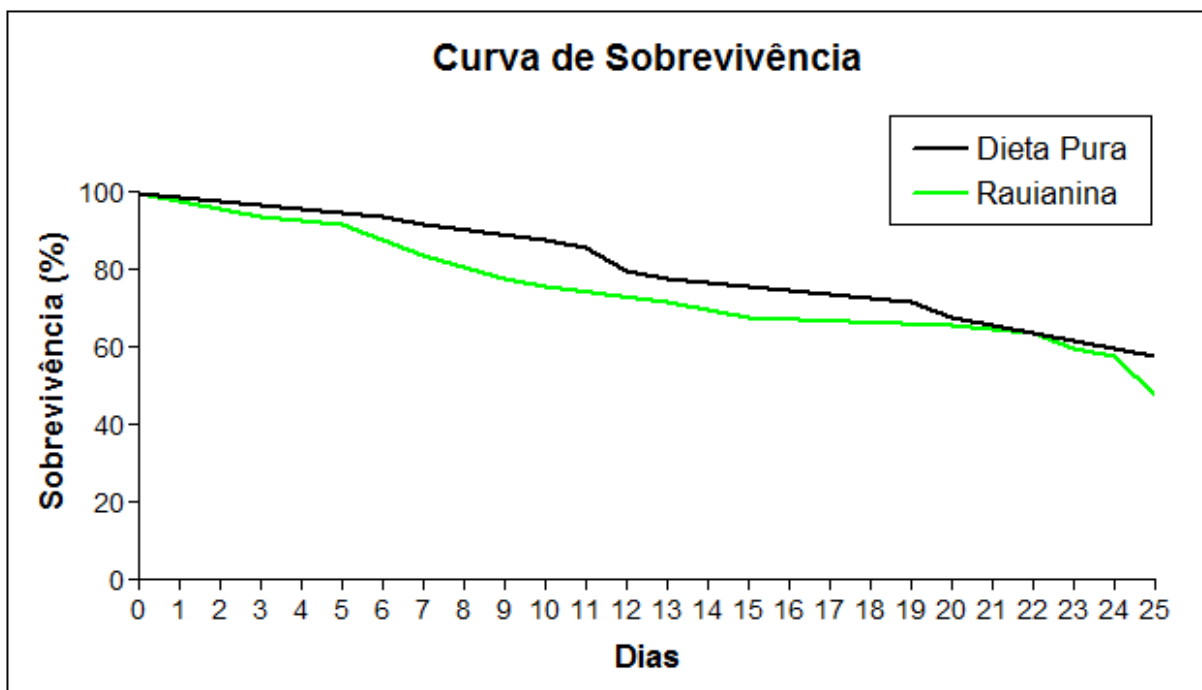


Figura 4.113: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com rauianina.

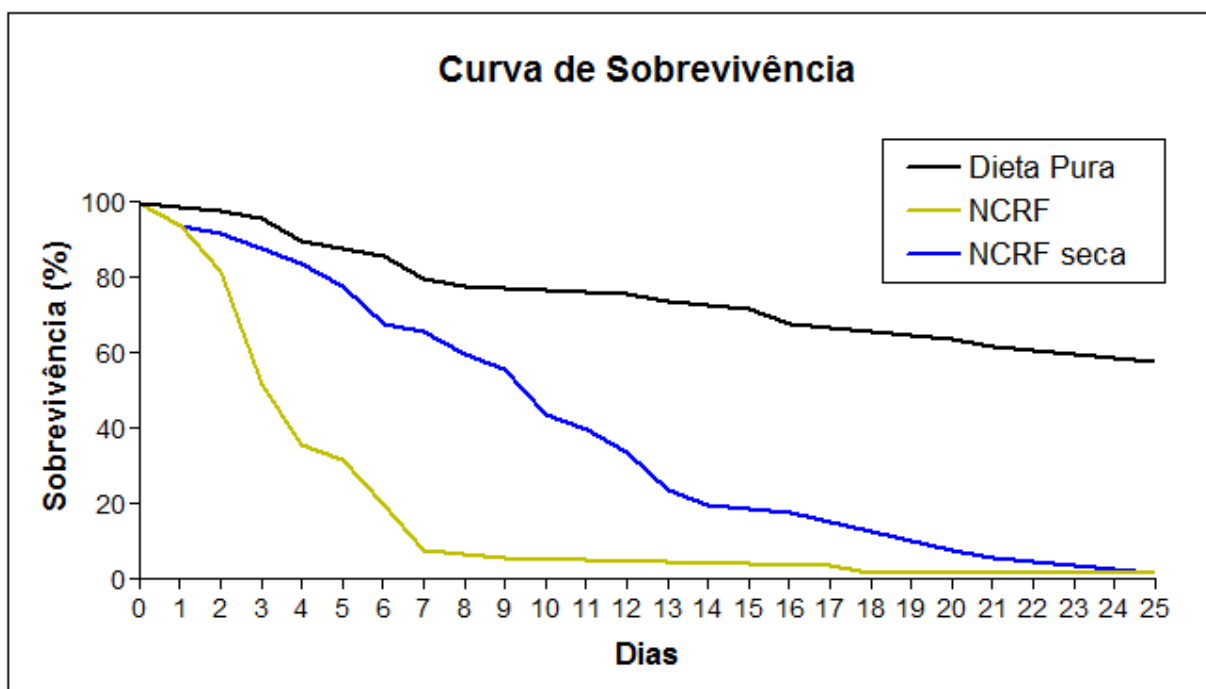


Figura 4.114: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas de rauianina em suspensão (NCRF) e nanocápsulas de xantiletina secas (NCRFseca).

A Tabela 4.48 e as Figuras 4.115 e 4.116 apresentam os resultados da ricinina e nanocápsulas de ricinina (NCP53) submetidas a ensaios frente à *Atta sexdens rubropilosa*. Para os tratamentos com ricinina pura e encapsulada houve sobrevivência mediana (Md) de 50% no 5º e 3º dia, respectivamente. Apesar de resultados similares, a diferença entre eles está quando se analisa a mortalidade diariamente. Para a ricinina pura observou-se mortalidade de 92% ao fim do experimento (25º dia), já para a ricinina nanoencapsulada no 6º dia se observa 90% de mortalidade e 100% no 14º dia. Esses resultados, como observado para a xantiletina e rauianina, novamente permite propor um modo de ação diferente entre a ricinina nanoencapsulada e não encapsulada.

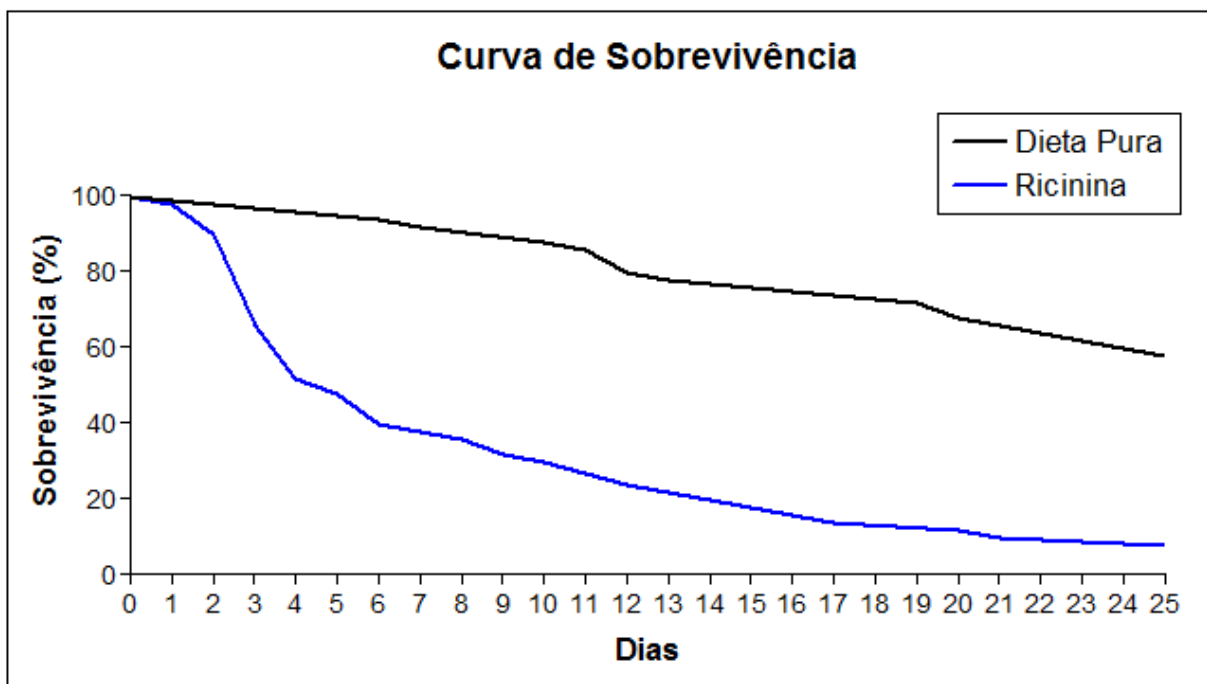


Figura 4.115: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com ricinina.

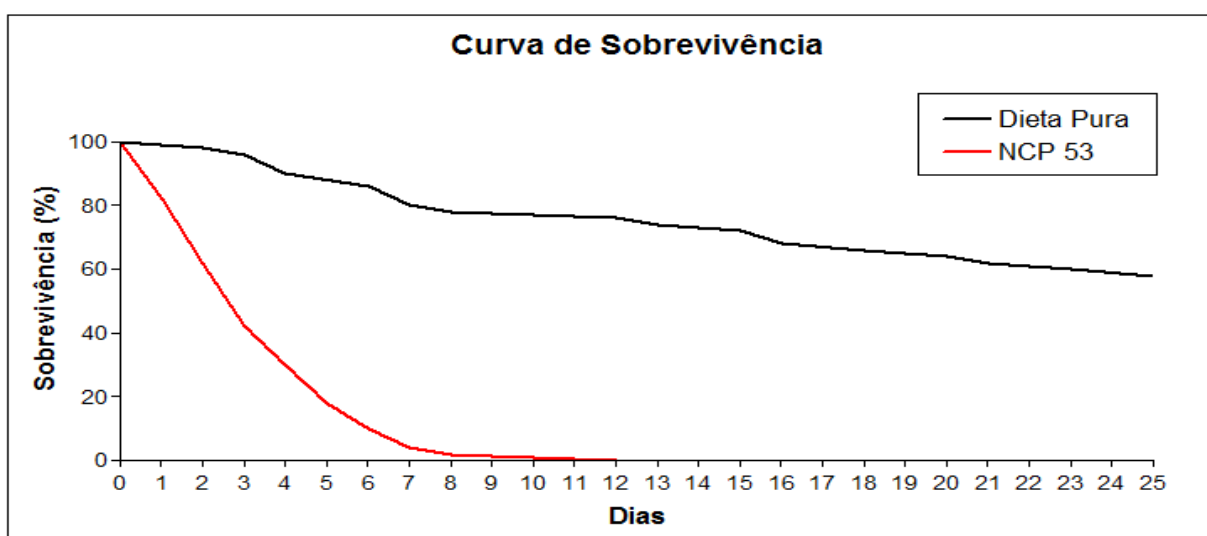


Figura 4.116: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas de ricinina em suspensão (NCP 53).

A Figura 4.117 apresenta o resultado de nanocápsulas isentas de compostos ativos em suspensão coloidal (branco). As nanocápsulas vazias

atingiram a taxa de 50% de mortalidade no 11º dia e o controle no 13º dia. Sendo interpretado como significativamente diferente do controle com dieta pura pelo teste “log-rank”. Dessa maneira pode-se inferir que mesmo nanocápsulas vazias em suspensão conferem certa atividade sobre as formigas, sendo assim elas por si só já devem somar na atividade da substância encapsulada.

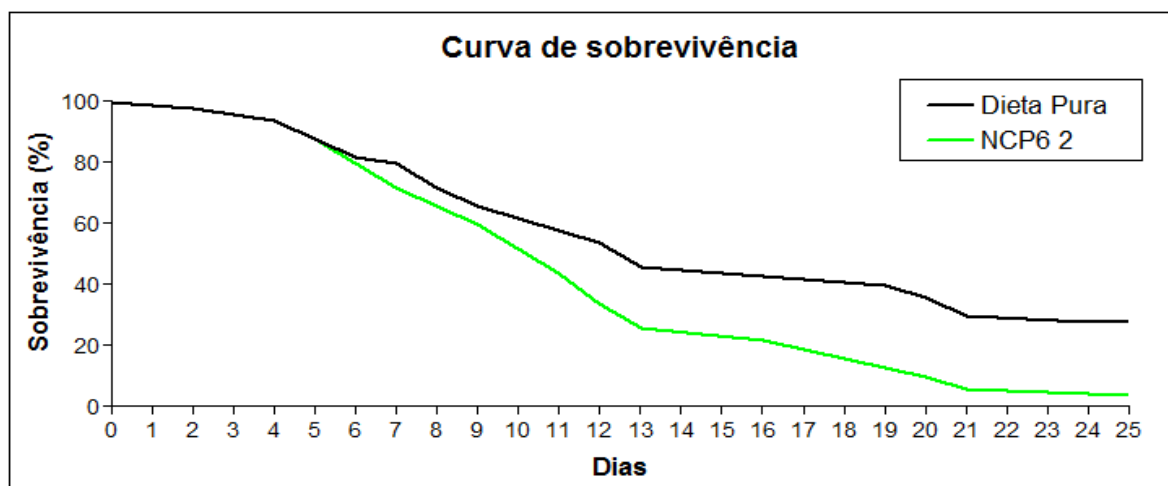


Figura 4.117: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com nanocápsulas vazias em suspensão (NCP 62).

4.12.2- Ensaios Biológicos com o Fungo Simbionte com nanopartículas poliméricas

As substâncias puras e nanoencapsuladas de xantiletina e rauianina foram submetidas a ensaios *in vitro* sobre o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus* de acordo com a metodologia descrita na parte experimental. Todas as amostras foram ensaiadas na concentração de 100 µg/mL. As amostras que exibiram inibição maior ou igual a 50% do crescimento do micélio foram consideradas ativas.

A xantiletina pura exibiu 85% de inibição no crescimento micelial, enquanto que a nanoencapsulada exibiu 76% (Figuras 4.118 a 4.121). Houve uma perda de aproximadamente 10% da atividade quando a xantiletina estava encapsulada. O mesmo foi observado para a rauianina, que quando não encapsulada exibiu 89% de inibição no crescimento micelial contra 79% quando nanoencapsulada (Figuras 4.122 a 4.125).

Essa diminuição da atividade pode estar relacionada com o meio em que o ensaio foi realizado. Como não se trata de um ensaio por ingestão, a inibição do crescimento micelial depende a liberação do princípio ativo para o meio. Como as nanopartículas foram incorporadas em dietas contendo ágar, ou seja, meio sólido, isso pode ter dificultado a liberação do princípio ativo (xantiletina e rauianina) e conseqüentemente redução na atividade fungicida.

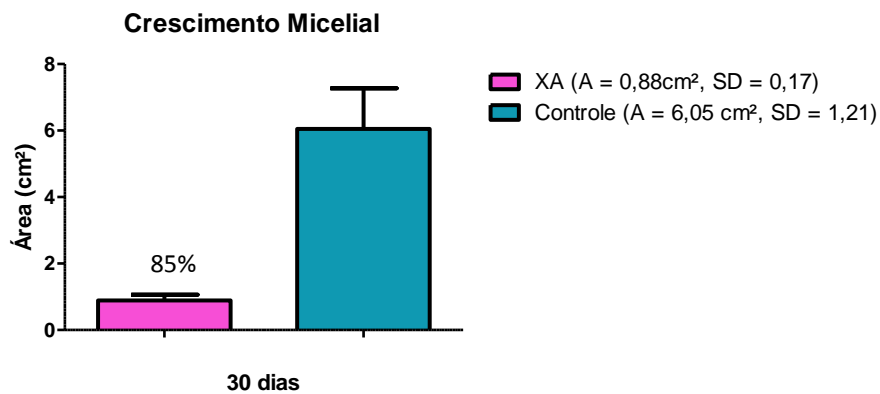


Figura 4.118: Efeito da xantiletina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

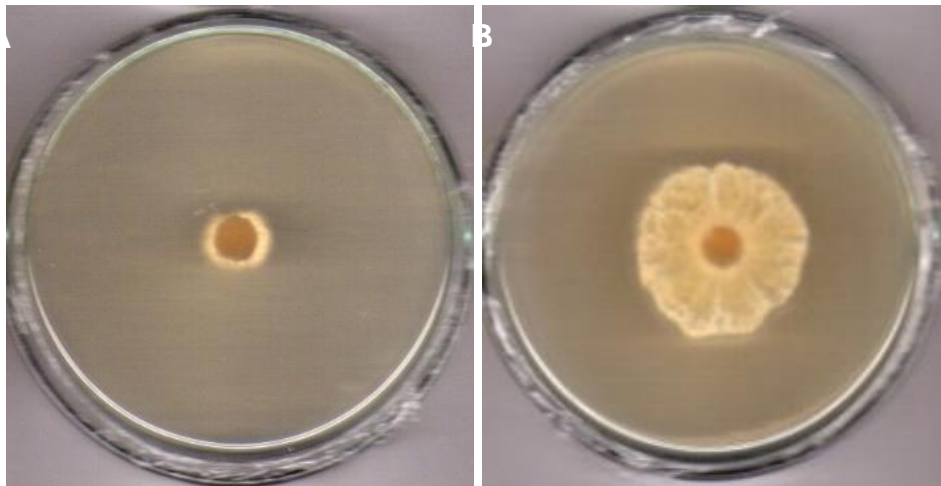


Figura 4.119: Imagens do fungo simbiote: na presença de xantiletina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) e controle (B)

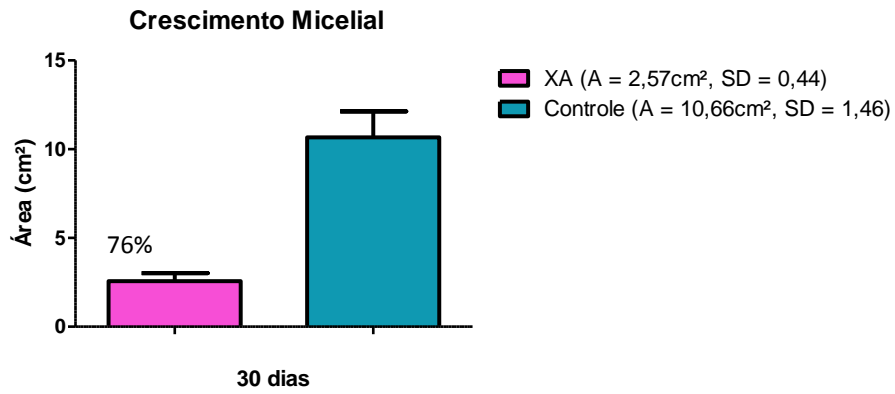


Figura 4.120: Efeito das nanocápsulas de xantiletina (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

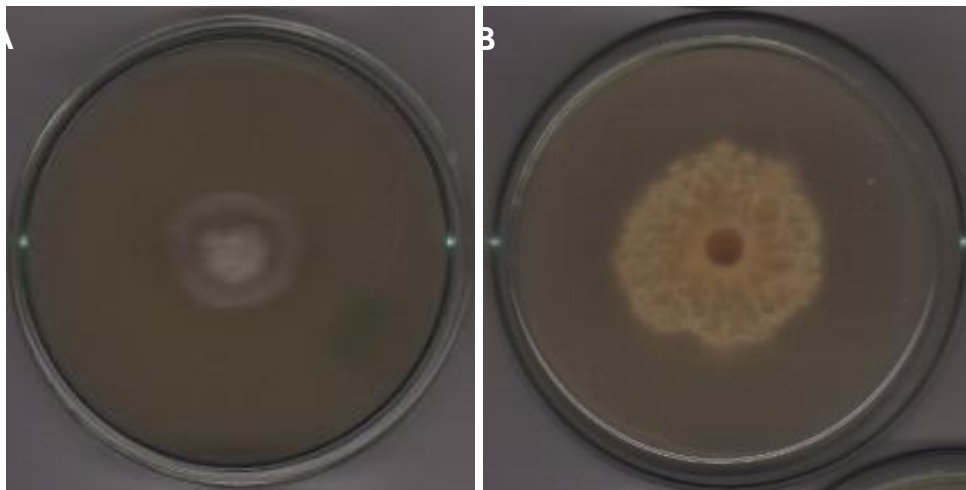


Figura 4.121: Imagens do fungo simbiote: na presença de nanocápsulas xantiletina (100 µg/mL) (A) e controle (B)

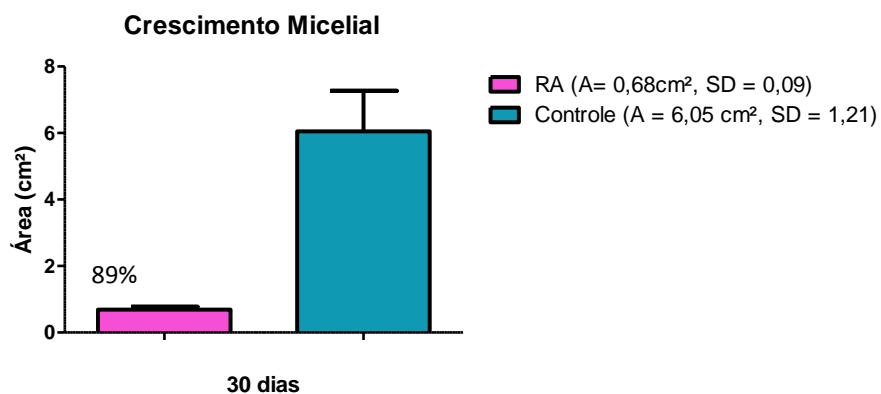


Figura 4.122: Efeito da rauianina (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

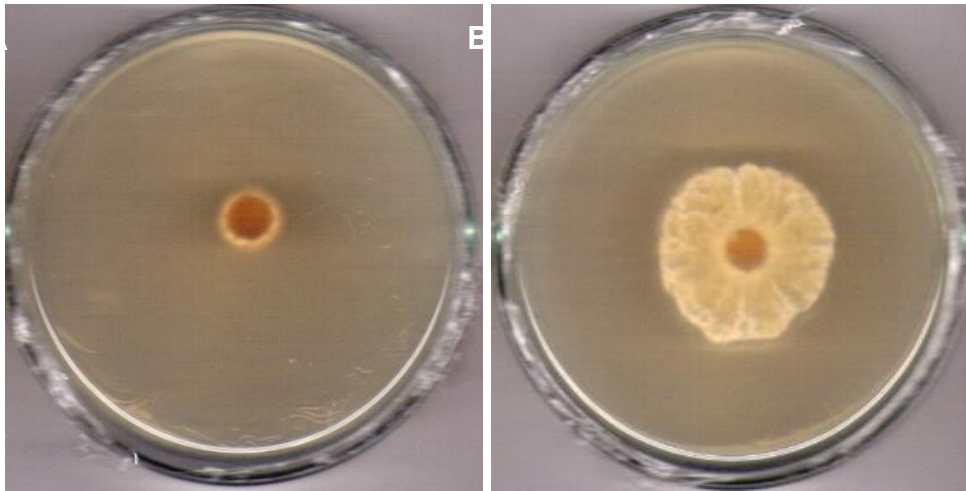


Figura 4.123: Imagens do fungo simbiote: na presença de rauianina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) e controle (B).

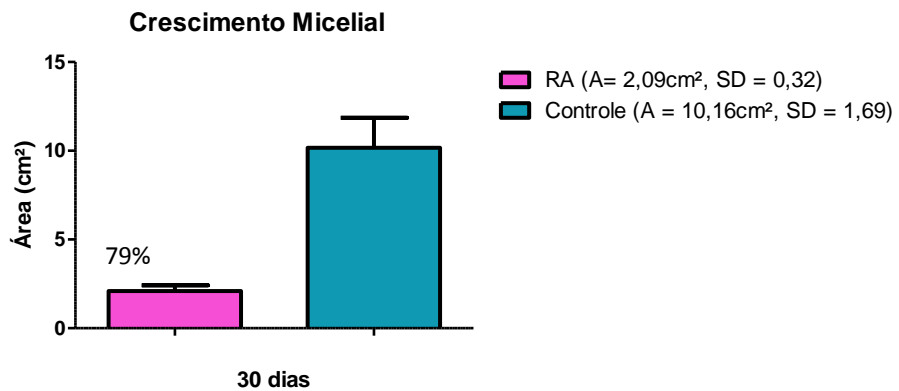


Figura 4.124: Efeito das nanocápsulas de rauianina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

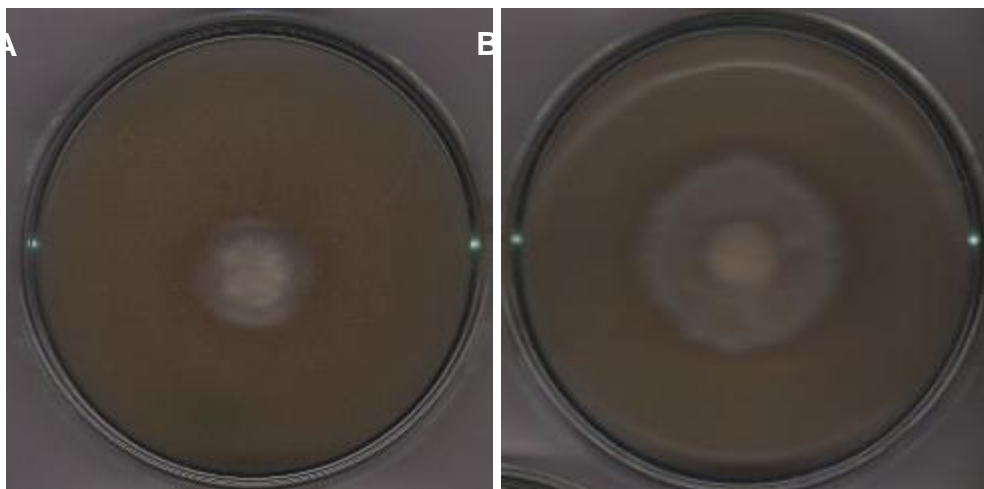


Figura 4.125: Imagens do fungo simbiote: na presença de nanocápsulas de rauianina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (A) e controle (B)

Os constituintes utilizados no preparo das nanocápsulas, tais como PCL, oleato de isodecila (OIS), span[®] 60 (SPA), tween[®] 80 (TW), mistura de todos os constituintes (Mis) e as nanocápsulas isenta dos compostos testados (Branco) também foram submetidas a ensaios *in vitro* sobre o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Figura 4.126).

O polímero (PCL) exibiu 5% de inibição no crescimento micelial, enquanto que o oleato de isodecila e o tensoativo, span 60, exibiram 1% e 17%, respectivamente. Já o tensoativo, tween[®] 80, promoveu o aumento no crescimento micelial em relação ao controle.

A mistura de todos estes constituintes exibiu 25% de inibição, isso pode estar relacionado ao efeito sinérgico.

Nanocápsulas vazias foram preparadas segundo o mesmo procedimento das nanopartículas de xantiletina e rauianina, diferindo apenas no fato destes compostos não serem adicionados à fase oleosa. As nanocápsulas vazias exibiram 46% de inibição. No entanto esse valor é significativamente inferior ao das nanocápsulas contendo xantiletina ou rauianina.

Mesmo que a substância encapsulada não aumente a sua atividade, o uso das nanopartículas ainda é justificado, pois estas oferecem outras vantagens tais como, liberação controlada, aumento da solubilidade e da estabilidade, reduz o contato dos ingredientes ativos com os trabalhadores rurais e as taxas de escorrimento (GRUPO ETC, 2005).

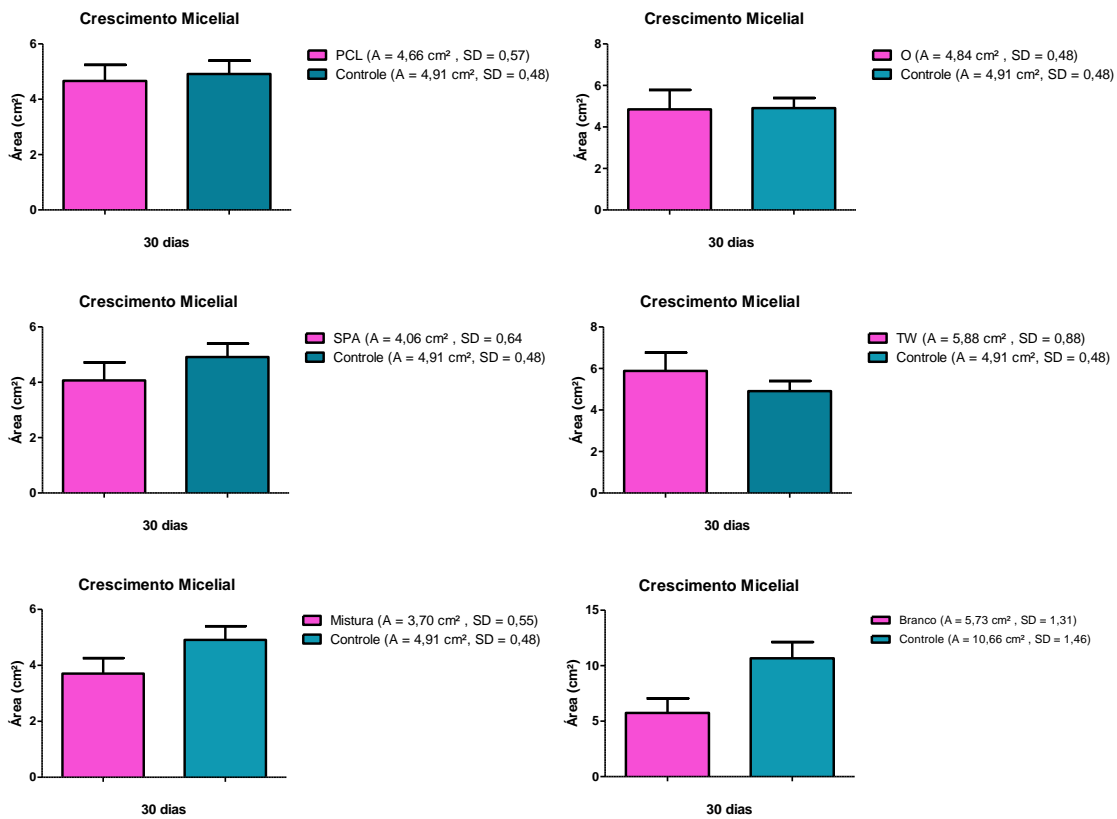


Figura 4.126: Efeito dos constituintes das nanocápsulas PCL (poli- γ -caprolactona), O (oleato de isodecila), SPA (span 60), TW (tween 80), mistura (mistura de todos os componentes) e o branco (nanocápsula vazia) sobre o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.

4.12.3- Ensaios biológicos realizados sobre as formigas cortadeiras com *Trichilia elegans* e *Trichilia catigua*

Os extratos brutos hexânico, diclorometânico e metanólico de folhas, caule, casca e galhos de *Trichilia elegans* e arilo de *Trichilia catigua* foram ensaiados sobre as operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, as curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Na análise estatística dos resultados obtidos, após um período de 25 dias de experimento, foi empregado o teste “log-rank”, comparando as curvas de sobrevivência de formigas submetidas ao tratamento com aquelas dos controles com dieta pura. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.49 e nas Figuras 4.127 - 4.129. Para os extratos **TFM, TCD, TCM, TCAM, TGD e TGM**, houve um acréscimo gradativo da mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do tempo de experimento com taxas de mortalidade significativas indicando alta atividade sobre as formigas cortadeiras. A maior toxicidade foi apresentada pelo extrato **TGD**, onde tiveram 50% de saúvas mortas no 5º dia de tratamento, com mortalidade total acumulada de 84% no 25º dia.

Com base nos resultados obtidos conclui-se que os extratos de *T. elegans* são promissores para uso no controle de *Atta sexdens rubropilosa* e merecem ser estudados nesse sentido.

Nos ensaios com extratos de arilo de *T. catigua* observou-se que somente o extrato hexânico teve uma diferença significativa em relação ao controle, apresentando mortalidade média atingida no 19º dia de experimento e mortalidade de 78% no final do experimento, contra 54% do controle (Tabela 4.49 e Figura 4.128). Apesar desses extratos não terem apresentado atividade interessante. O RMN destes extratos já apresentavam sinais de limonóides e seria importante o isolamento destes e posteriormente ensaiá-los uma vez que compostos dessa classe foram considerados promissores no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (AMBROZIN *et al.*, 2006).

Tabela 4.49: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com os extrato diclorometânico das folhas (TFD), caule (TCD), casca (TCAD), galhos (TGD), extrato metanólico das folhas (TFM), caule (TCM), casca (TCAM), galhos (TGM) de *Trichilia elegans* e extratos hexânico (TAH), diclorometânico (TAD) e metanólico (TAM) do arilo de *Trichilia catigua*

Planta	Amostras	S ₅₀	S ₅₀ controle
<i>Trichilia elegans</i>	TFD	19	24
	TFM	8 ^d	24
	TCD	6 ^d	24
	TCM	10 ^d	24
	TCAD	20	24
	TCAM	6 ^d	24
	TGD	5 ^d	24
	TGM	8 ^d	24
<i>Trichilia catigua</i>	TAH	19 ^d	24,5
	TAD	24	24,5
	TAM	25	24,5

T= *Trichilia elegans*, TT= *Trichilia catigua*, F = folhas, C = caule; CA= casca, G = galhos; A= arilo, H = hexano; J =hexano+diclorometano, D= diclorometano; M = metanol

S50= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

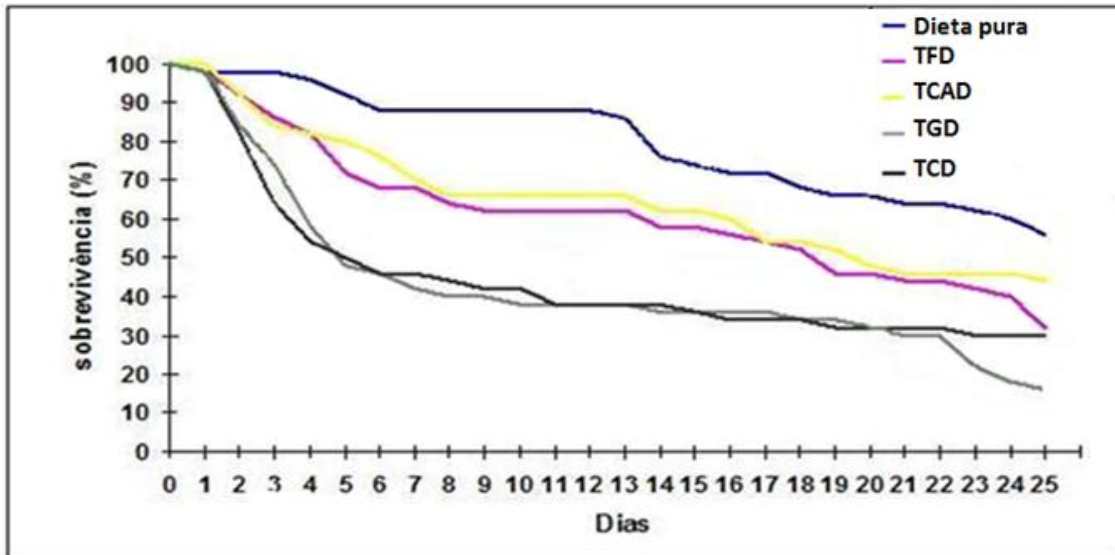


Figura 4.127: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com extratos diclorometânico das folhas (TFD), caule (TCD), casca (TCAD), galhos (TGD) de *Trichilia elegans*.

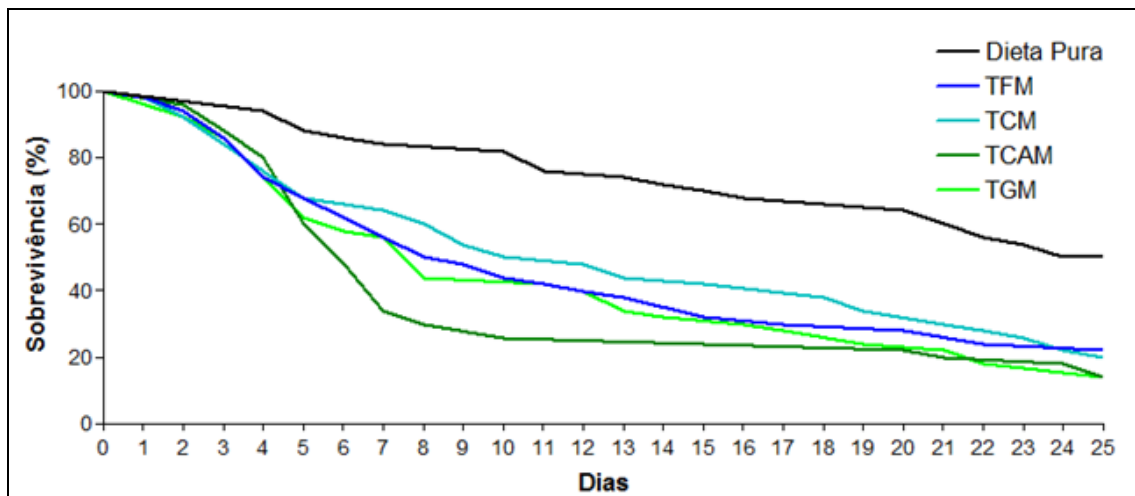


Figura 4.128: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com extratos metanólicos das folhas (TFM), caule (TCM), casca (TCAM), galhos (TGM) de *Trichilia elegans*.

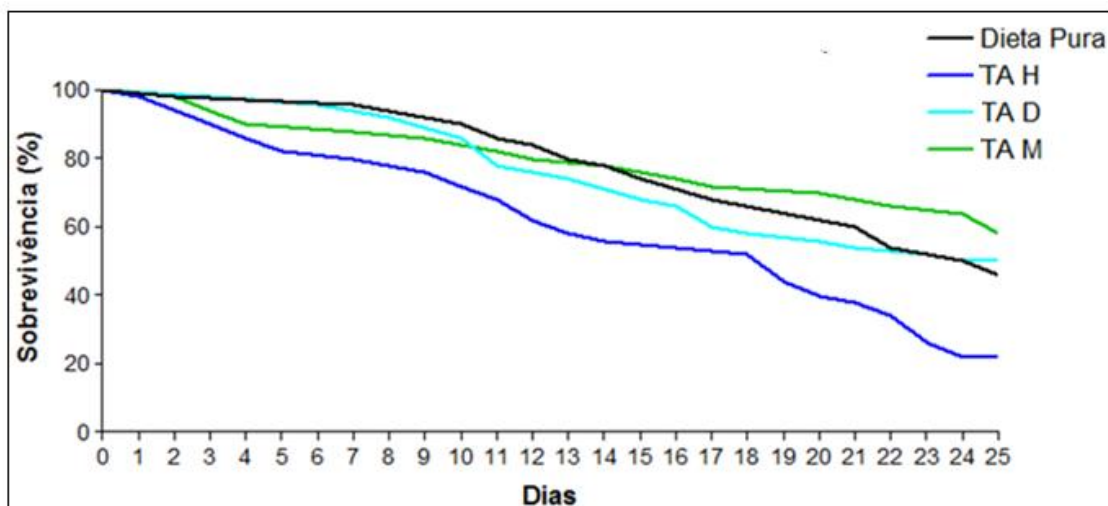


Figura 4.129: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com extratos hexânico (TAH), diclorometânico (TAD) e metanólico (TAM) do arilo de *Trichilia catigua*.

4.12.3.1- Efeito das frações e substâncias puras do extrato diclorometânico do caule

As frações do extrato bruto diclorometânico do caule de *Trichilia elegans* (**TCD**) foram ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Analisando os dados obtidos nos ensaios (Tabela 4.50 e Figura 4.129) observou-se que todas as frações, exceto **TCD6**, causaram taxa de mortalidade de 80 a 100% no 25º dia experimento e mortalidade média atingida entre 2º e o 4º dia de experimento.

A fração que apresentou resultado de atividade inseticida mais significativo foi a **TCD12** com mortalidade de 100% no 14º dia, com sobrevivência mediana das operárias de 2º dia de experimento.

Na fração **TCD6**, não ativa, foram identificadas as substâncias campesterol (**1**), estigmasterol (**2**) e sitosterol (**3**). Estes resultados estão de acordo com LEITE, 2005, que ensaiou a mesma mistura sobre *A. sexdens rubropilosa* a 100 µg/mL.

Das frações **TCD10**, **TCD11**, **TCD13**, **TCD14**, **TCD15** e **TCD16** foram isoladas as substâncias **6**, **7**, **8**, **4**, **5** e **10**, respectivamente, além de ácidos graxos de cadeia longa. As substâncias foram submetidas aos ensaios sobre *A. sexdens rubropilosa* e surpreendentemente nenhuma delas foi ativa. Isso levou a acreditar

que a atividade dessas frações estava relacionada aos ácidos graxos presentes nas originais frações (Tabela 4.51 e Figura 4.131).

HILL & SCHOONHOVEN (1981) observaram que alguns ácidos graxos presentes nos óleos vegetais têm efeito inseticida. Estudos mostraram que os óleos devem agir no sistema nervoso do inseto pelo aumento da permeabilidade da membrana do neurônio para troca de íons, causando acentuada excitabilidade das células nervosas. Alguns trabalhos consideram que a atividade inseticida dos óleos vegetais está relacionada, principalmente, com a composição de ácidos graxos (DON PEDRO, 1990, MESSINA & RENWICK, 1983, VARMA & PANDEY, 1978).

Tabela 4.50: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações dos extratos diclorometânico do caule de *Trichilia elegans*

Amostras	S ₅₀	S ₅₀ controle
TCD2	4 ^d	12
TCD4	3 ^d	12
TCD6	6	12
TCD8	3 ^d	12
TCD9	2 ^d	12
TCD10	2 ^d	12
TCD11	3 ^d	12
TCD12	2 ^d	12
TCD13	2 ^d	12
TCD14	3 ^d	12
TCD15	2 ^d	12
TCD16	2 ^d	12

T= *Trichilia elegans*, C= caule; C= diclorometano

S50= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

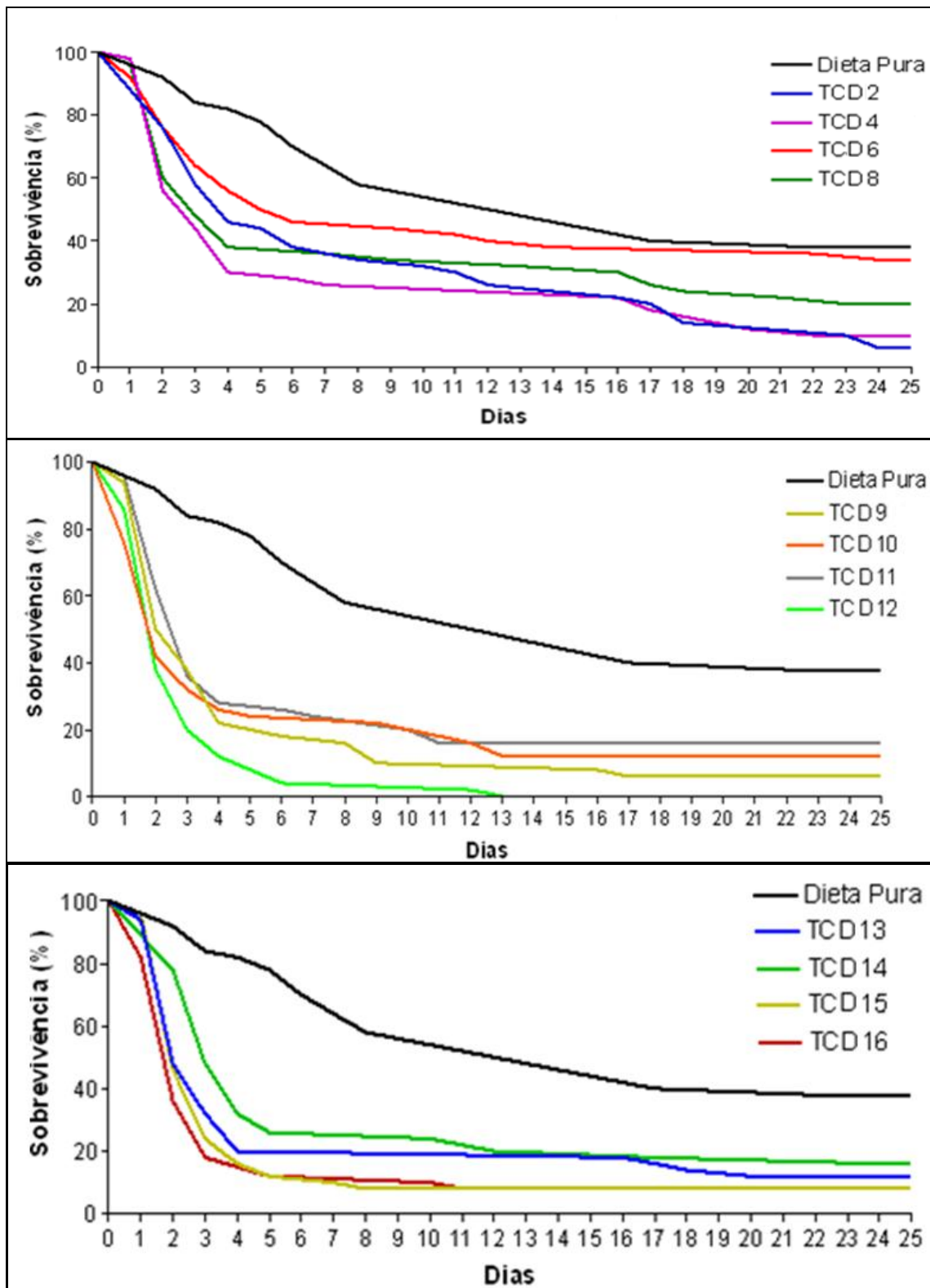


Figura 4.130: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans*.

Segundo PENÃFLOR e colaboradores (2004), os ácidos graxos C5-C9, são tóxicos para as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* quando incorporados na dieta artificial, enquanto os ácidos graxos C10-C12 não apresentaram ação tóxica para as formigas. Além do efeito tóxico para as formigas, os ácidos graxos de cadeia com 6 a 12 carbonos apresentaram atividade inibitória para o desenvolvimento do fungo simbiote (VICTOR, 2001).

MORINI *et al.* (1997) em ensaio por aplicação tópica testaram ácidos graxos C14 a C24 para as formigas cortadeiras e concluíram que somente os ácidos palmítico (C16), esteárico (C18), oléico (C18:1) e tricosanóico (C23) provocaram queda significativa na sobrevivência das operárias.

Tabela 4.51: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das substâncias puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans*

Substância	S₅₀	S₅₀ controle
4	25	25
5	25	25
6	25	25
7	25	25
8	25	25
10	25	25

S₅₀= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 100 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

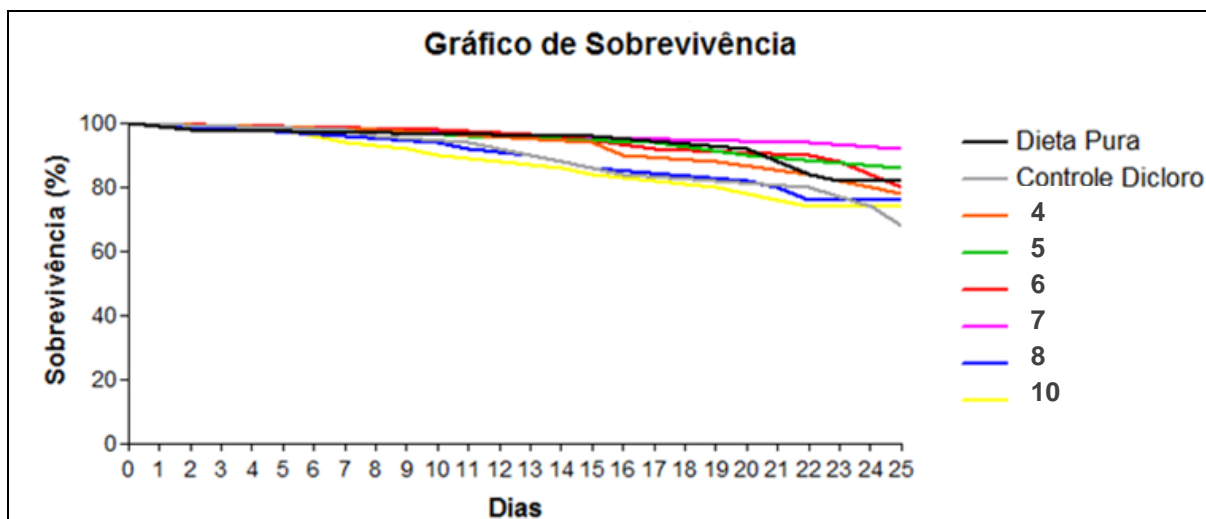


Figura 4.131: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com as substâncias puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans*.

4.12.3.2- Efeito das frações do extrato diclorometânico dos galhos

As frações do extrato bruto diclorometânico dos galhos de *Trichilia elegans* (**TGD**) foram ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Analisando os resultados obtidos apresentados na Tabela 4.52 e na Figura 4.132 observou-se que, exceto as frações **TGD5**, **TGD7** e **TGD9**, os valores não diferiram muito do controle quanto ao tempo necessário para a mortalidade de 50% das operárias. Das frações, as que se destacaram com maior ação sobre a sobrevivência mediana dos indivíduos e mais alta atividade inseticida foram as frações **TGD5** e **TGD7**, com taxa de 96% de mortalidade no final do experimento contra 40% de mortalidade do controle.

Essas frações foram analisadas via CG-EM e foram identificadas uma mistura complexa de ácidos graxos e sesquiterpenos.

Tabela 4.52: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações do extrato diclorometânico dos galhos de *Trichilia elegans*

Amostras	S₅₀	S₅₀ controle
TGD-1	25	>25
TGD-2	19 ^d	>25
TGD-3	19 ^d	>25
TGD-4	21 ^d	>25
TGD-5	15 ^d	>25
TGD-7	9,5 ^d	>25
TGD -8	25	>25
TGD -9	13 ^d	>25
TGD -12	22	>25

S₅₀= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

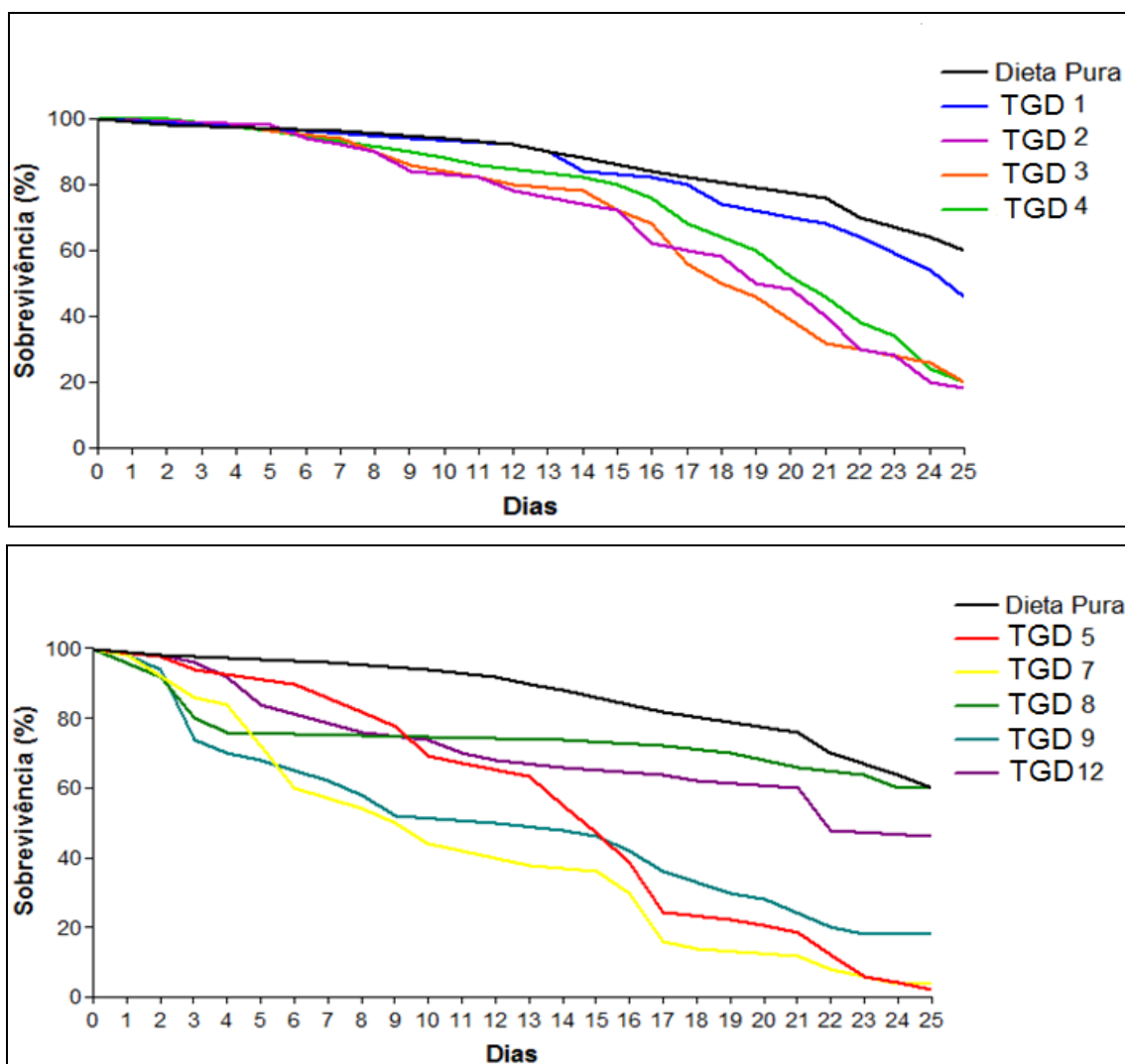


Figura 4.132: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações do extrato diclorometânico dos galhos de *Trichilia elegans*.

4.12.3.3- Efeito das frações do extrato metanólico dos galhos

As frações do extrato bruto metanólico dos galhos de *Trichilia elegans* (TGM) foram ensaiadas sobre as operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Para os tratamentos com frações **TGMD**; **TGMA** e **TGMI** houve sobrevivência mediana (Md) de 50% no 12º, 22º e 15º dia de tratamento, respectivamente. Estes valores não tiveram diferença significativa em relação ao controle, isto significa estas frações não apresentam atividade frente às formigas cortadeiras (Tabela 4.53 e Figura 4.133).

Já a fração **TGMH** possui atividade sobre a sobrevivência média das formigas, com mortalidade média atingida no 4,5° dia de experimento e 92% de mortalidade no final do experimento. A análise dessa fração levou a identificação de ácidos graxos. Mais uma vez a atividade dos extratos está associada aos ácidos graxos presentes.

Tabela 4.53: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de *Trichilia elegans*

Substância	S ₅₀	S ₅₀ controle
TGMH	4,5 ^d	13
TGMD	12	13
TGMA	22	13
TGMI	15	13

T= *Trichilia elegans*, G= galhos, M= metanol, H= hexano, D= diclorometano, A= acetato de etila, I= hidroalcoólica.

S₅₀= sobrevivência mediana/dias, Concentração: 2 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

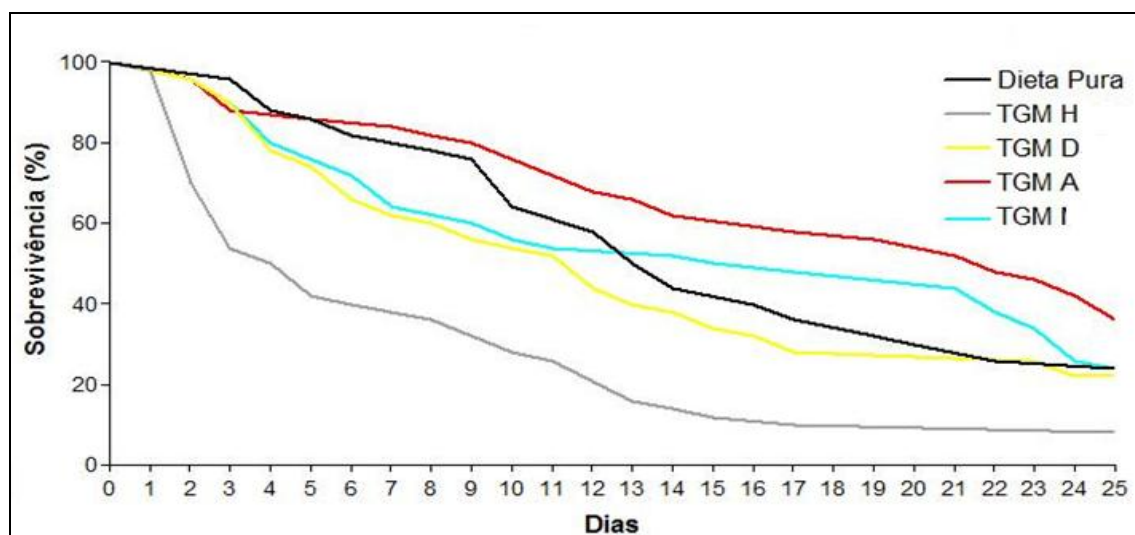


Figura 4.133: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações da partição líquido-líquido do extrato metanólico dos galhos de *Trichilia elegans*.

4.12.3.4- Efeito das frações do extrato metanólico das folhas

As frações obtidas do particionamento líquido-líquido do extrato bruto metanólico de folhas de *Trichilia elegans* foram submetidas ao ensaio inseticida sobre as operárias de formigas cortadeiras.

Analisando os resultados obtidos, apresentados na Tabela 4.54 e no Figura 4.134, observou-se que ao tratar as formigas com dieta artificial contendo **TFMH**, **TFMD** e **TFMA** houve um acréscimo gradativo de mortalidade acumulada (%) por dia durante o decorrer do experimento. Destes a partição diclorometânica (TFMD) foi a mais ativa, tendo sobrevivência mediana (Md) de 50% no 3º dia e 98% de mortalidade no final do experimento. Já quando a dieta foi tratada com **TFMI** não apresentou diferença significativa comparada ao controle (dieta pura) de acordo com o teste log-rank ($p < 0,05$).

Tabela 4.54: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão das frações da partição líquido-líquido do extrato do extrato metanólicos das folhas de *Trichilia elegans*

Substância	S ₅₀	S ₅₀ controle
TFMH	4 ^d	25
TFMD	3 ^d	25
TFMA	4 ^d	25
TFMI	5,5	25

T= *Trichilia elegans*, F= folhas, M= metanol, H= hexano, D= diclorometano, A= acetato de etila, l= hidroalcoólica.

S₅₀= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank ($p < 0,05$)

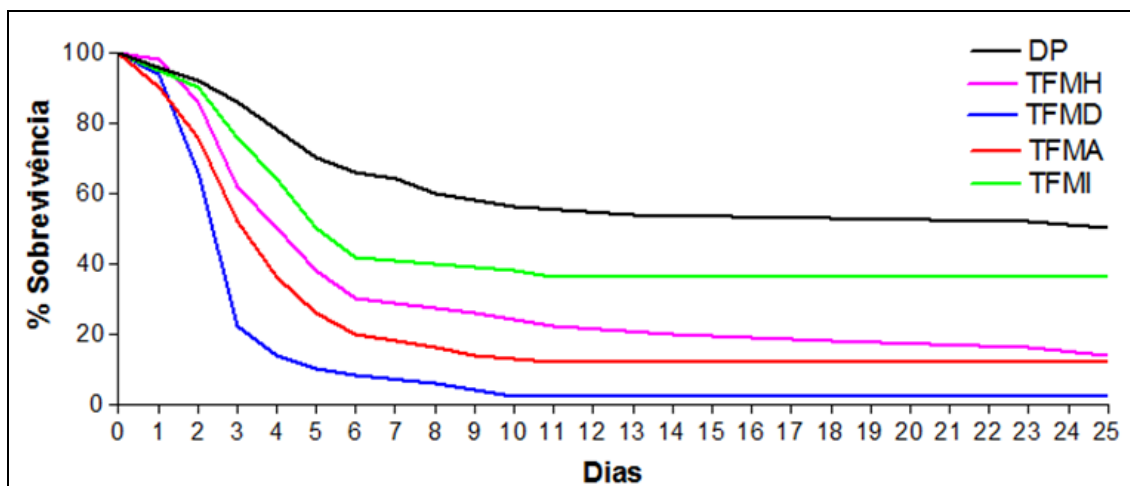


Figura 4.134: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com frações da partição líquido-líquido do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

Algumas das substâncias isoladas da partição acetato do extrato metanólico das das folhas de *Trichilia elegans* (**TFMA**) foram incorporadas à dieta artificial das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e os resultados estão apresentados na Tabela 4.55 e Figuras 4.135 e 4.136. Observou-se que os valores não diferem muito do controle quanto ao tempo para mortalidade total. Das substâncias ensaiadas, a que se destaca com ação sobre a sobrevivência mediana dos indivíduos e mais alta atividade inseticida é a substância **14**, com valores de 13 dias para mortalidade de 50% das operárias e 90% de taxa de mortalidade no fim do experimento diferindo do controle pelo teste “log-rank” ($p < 0,05$).

Tabela 4.55: Sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de incorporação em dieta artificial por ingestão com as substâncias (9, 11, 12, 13, 14, 18 e 19) puras isoladas da partição acetato do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*.

Substâncias	S ₅₀	S ₅₀ controle
9	>25	>25
11	>25	>25
12	>25	>25
13	>25	>25
14	13 ^d	>25
18	>25	>25
19	>25	>25

S₅₀= sobrevivência mediana/dias

Concentração: 2 mg/mL

^d diferença significativa de acordo com o teste estatístico log-rank (p<0,05)

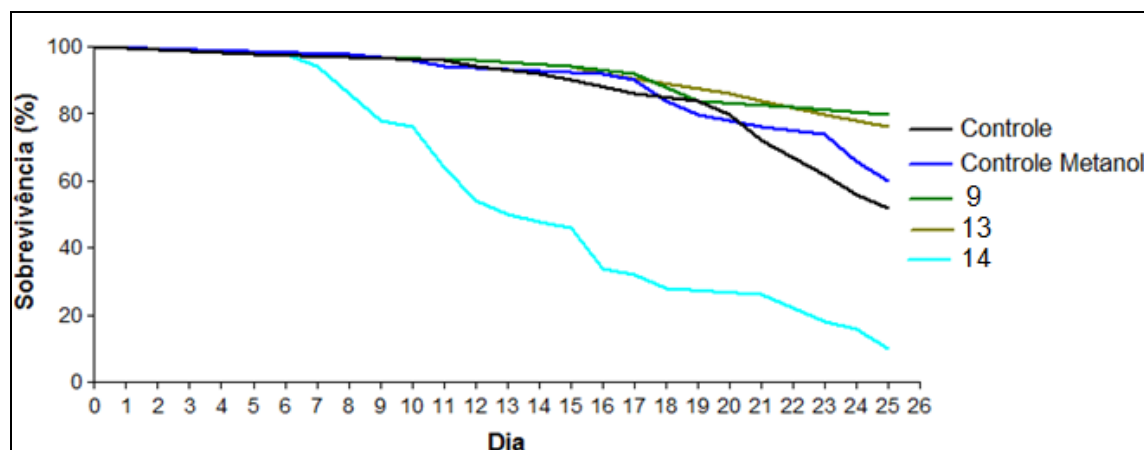


Figura 4.135: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com as substâncias (9, 13 e 14) puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans*.

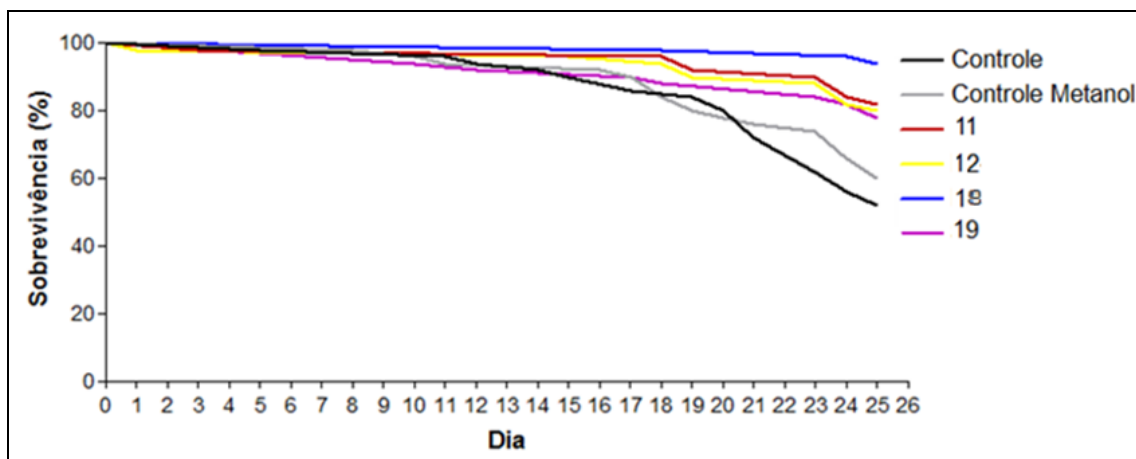


Figura 4.136: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com as substâncias (11, 12, 18 e 19) puras isoladas do extrato diclorometânico do caule de *Trichilia elegans*.

4.12.3.5- Efeito da cedrelona isolada do extrato diclorometânico e Hexânico do arilo de *Trichilia catigua*

A cedrelona isolada do extrato diclorometânico do arilo de *T. catigua* foi incorporada à dieta artificial das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (Figura 4.137). A cedrelona não apresentou diferença significativa comparada ao controle (dieta pura) de acordo com o teste log-rank ($p < 0,05$) e por isso foi considerada não ativa.

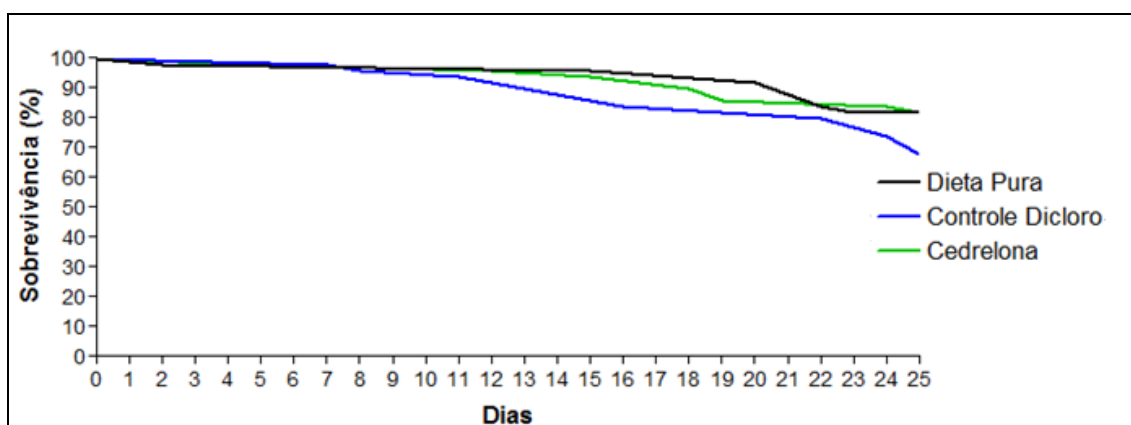


Figura 4.137: Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao tratamento por ingestão de dieta artificial com cedrelona isolada do extrato diclorometânico do arilo de *Trichilia catigua*.

4.12.4 – Ensaios Biológicos com o Fungo Simbionte de com cedrelona isolada de *Trichilia catigua*

A cedrelona, isolada do extrato diclorometânico do arilo de *Trichilia catigua*, foi submetida a ensaios *in vitro* sobre o fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. A cedrelona exibiu 54% de inibição no crescimento micelial na concentração de 100 µg/mL (Figuras 4.138 e 4.139).

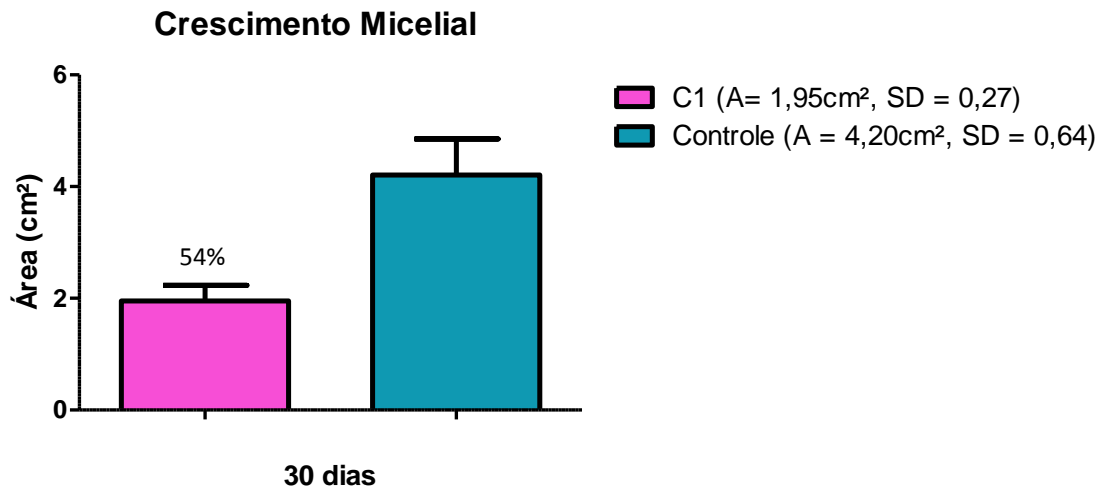


Figura 4.138: Efeito de cedrelona (100 µg/mL) sobre o crescimento do fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*.

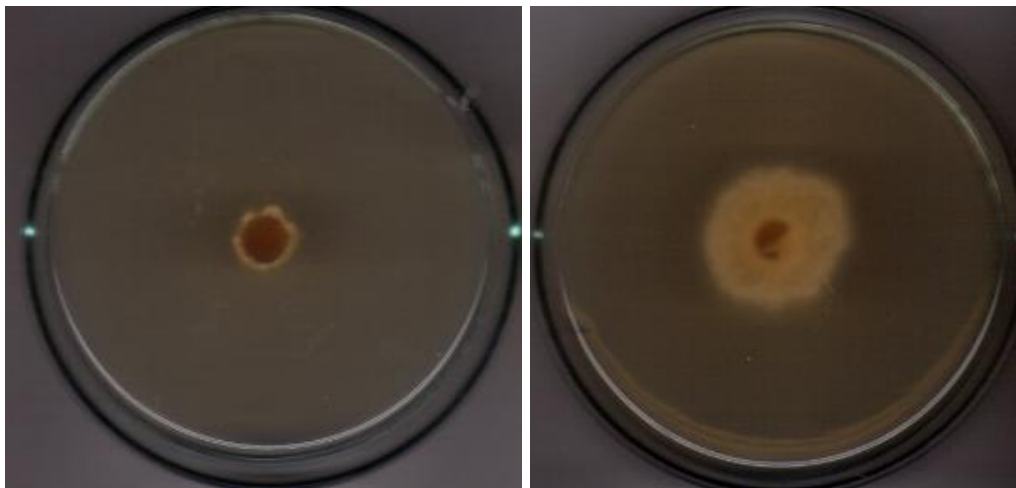


Figura 4.139: Imagens do fungo simbionte: na presença de cedrelona (100 µg/mL) (A) e controle (B).

5-Conclusões

O estudo fitoquímico biomonitorado de *Trichilia elegans* e *T. catigua* levou ao isolamento e identificação de 23 substâncias, sendo 3 delas inéditas na literatura de acordo com o levantamento bibliográfico realizado, incluindo um derivado de oxazole e dois limonóides.

O estudo do caule de *Trichilia elegans* mostrou que o mesmo é rico em cumarinas e compostos fenólicos e nas folhas além dos compostos fenólicos foi encontrado também flavonóides.

Já o estudo do arilo de *Thichilia catigua* mostrou-se extremamente rico em limonóides. Entretanto, como o extrato foi preparado no final desse trabalho, apenas 3 limonóides foi possível ser isolado e identificado, sendo dois deles inéditos na espécie e na literatura, o que contribui para o conhecimento do perfil químico do gênero.

Os ensaios realizados com os extratos brutos do caule, folhas, casca e galhos de *Trichilia elegans* sobre *Atta sexdens rubropilosa* mostraram que todos os extratos brutos metanólicos foram ativos e os extratos diclorometânico de folhas e cascas não apresentaram diferença significativa comparada ao controle de acordo com o teste log-rank ($p < 0,05$) e por isso foi considerada não ativa. O extrato diclorometano do galho (**TGD**) foi o que apresentou resultado mais significativo com Md (sobrevivência mediana das operárias de *A. sexdens rubropilosa*) de 5 dias e 84% de mortalidade no 25º dia de experimento. Todas as frações do extrato diclorometano do caule, exceto **TCD6**, foram consideradas ativas. Entretanto nenhuma das substâncias isoladas dessas frações apresentou atividade frente *A. sexdens rubropilosa*. Comparando-se os resultados das atividades com os obtidos para as substâncias puras pode-se concluir que a atividade dessas frações pode estar relacionada aos ácidos graxos presentes nas frações testadas. Nos ensaios realizados com as frações do extrato diclorometano dos galhos, as frações **TGD5** e **TGD7** apresentaram mais alta atividade inseticida, com taxa de 96% de mortalidade no final do experimento contra 40% de mortalidade do controle. Essas frações foram analisadas via CG-EM e foram identificadas uma mistura complexa de ácidos graxos e sesquiterpenos. A atividade do extrato metanólico de galho partição hexano (**TGMH**) também deve estar associada aos ácidos graxos presentes neste. Das partições do extrato metanólico das folhas de *Trichilia elegans*, a diclorometânica

(**TFMD**) foi a mais ativa, tendo sobrevivência mediana (Md) de 50% no 3º dia e 98% de mortalidade no 25 dia e seguido pela partição acetato de elita (**TFMA**), tendo sobrevivência mediana (Md) de 50% no 4º dia e 88% de mortalidade no final do experimento. Algumas das substâncias isoladas da partição acetato (**TFMA**) foram ensaiadas e a substância **14** foi a única que apresentou atividade frente a *A. sexdens rubropilosa*, com sobrevivência mediana (Md) de 50% no 13º dia e 90% de mortalidade no 25 dia.

Nos ensaios com extrato do arilo de *Trichilia catigua* observou-se que somente o extrato hexânico apresentou atividade. A cedrelona isolada do extrato diclorometânico e hexânico do arilo de *Trichilia catigua* não apresentou diferença significativa comparada ao controle da formiga (dieta pura) de acordo com o teste log-rank ($p < 0,05$) e por isso foi considerada não ativa. Entretanto esta mesma substância exibiu 54% de inibição no crescimento micelial do fungo simbiote das formigas na concentração de 100 µg/mL.

A HSCCC se mostrou eficiente no isolamento de substâncias em grande escala a partir do extrato bruto, apresentando vantagens em relação a outras técnicas tais como economia de solvente e de tempo e recuperação total da amostra. Além disso, o método mostrou-se eficiente e reprodutível.

O método de nanoprecipitação se mostrou eficiente para encapsulação de xantiletina e rauianina. Um método novo, deposição interfacial/deslocamento do solvente, foi desenvolvido visando a encapsulação de ricinina. As nanopartículas mostraram-se promissoras no controle de formigas, além de oferecerem vantagens tais como aumento da solubilidade, proteção do princípio ativo e a liberação controlada.

6- Referências Bibliográficas

- AHLUWALIA, V. K.; PRAKASH, C.; GUPTA, M. C. Structures of isofraxetin, umckalin, arscotin and 7-geranyloxy-5-6-dimethoxycoumarin. *Indian J. Chem.*, **16B**: 286-288, 1978.
- ALBARICI, T. R. “*Estudo fitoquímico de Rauia sp e Conchocarpus macrophyllum (Rutaceae) e avaliação da atividade antiparasitária de extratos e substâncias isoladas*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2006. Tese de doutorado. 182 p.
- ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; GURNY R. Drug loaded poly (lactic acid) nanoparticles produced by a reversible salting-out process: purification of an injectable dosage form. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**: 13-18, 1993a.
- ALLÉMANN, E.; GURNY, R.; DOELKER, E. Drug loaded nanoparticles - preparation methods and in vivo studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **39**: 173-191, 1993b.
- AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO, O. C.; DA SILVA, M. G. F.; PAGNOCCA, F. C. M.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M. Limonoids from Andiroba Oil and and *Cedrela fissilis* and their Insecticidal Activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**: 542-547, 2006.
- BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 2788-2798, 2001.
- BALA, I.; HARIHARAN, S.; KUMAR, M. N. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **21**: 387-422, 2004.
- BANERJI, B.; NIGAM, S. K. Wood constituents of Meliaceae: a review. *Fitoterapia*, **55**: 3-36, 1984.
- BASS, M. & CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leafcutting ant *Atta sexdens*. *Physiol. Entom.*, **20**: 1-6, 1995.
- BELLÉS, J. M.; GARRO, R.; FAYOS, J.; NAVARRO, P.; PRIMO, J.; CONEJERO, V. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **12**: 227-235, 1999.
- BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; DE GROOTE, S. T. C.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. G. F.; Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, (Hymenoptera: Formicidae) and to the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Pest Manag. Sci.*, **60**: 933-938, 2004.
- BLANCO, M. D. & ALONSO, M. J. Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoespheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **43**: 287-294, 1997.
- BOARETTO, M, A. C. & FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*, **11**: 31-46, 1997.

- BODMEIER, R. D. & MAINCEINT, O. "Polymer dispersions as drug carriers." IN: LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. (Eds.). *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 87.
- BODMEIER, R.; OH, K.; PRAMAR, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. *Drug Dev. and Ind. Pharm.*, **15**: 1475-1494, 1989.
- BROADHEAD, J.; ROUAN, S. K. E.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **18**: 1169-1206, 1992.
- BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dieta artificial. *An. Soc. Entomol. Brasil.*, **26**: 107-113, 1997.
- BUTTERWORTH J. H. & MORGAN E. D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 23-24, 1968.
- CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Pol. Sci.*, **63**: 125-132, 1997.
- CALVO, P.; VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticle, nanocapsules and nanoemulsion, as ocular carriers. *J. Pharm. Sci.*, **85**: 530-536, 1996.
- CARPINELLA, M. C.; GIORDA, L. M.; PALACIOS S. M. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 2506-2511, 2003.
- CAZAL, C. M.; BATALHÃO, J. R.; DOMINGUES, V. C.; BUENO, O. C.; FILHO, E. D.; FORIM, M. R.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J. B. High-speed counter-current chromatographic isolation of ricinine, an insecticide from *Ricinus communis*. *J. Chrom. A*, **1216**: 4290-4294, 2009.
- CAZAL, C. M.; DOMINGUES, V. C.; BATALHÃO, J. R.; BUENO, O. C.; FILHO, E. D.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J. B. Isolation of xanthyletin, an inhibitor of ants' symbiotic fungus, by high-speed counter-current chromatography. *J. Chrom. A*, **1216**: 4307-4312, 2009b.
- CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E. TOWERS, G. H. N. Biological activity of limonoids from the Rutales. *Phytochemistry*, **31**: 377-394, 1992.
- CHAURET, D. C.; DURST, T.; ARNASON, J. T.; SANCHEZ-VINDAS, P.; ROMAN, L. S.; POVEDA, L.; KEIFER, P.A. Novel steroids from *Trichilia hirta* as identified by nanoprobe INADEQUATE 2D-NMR spectroscopy. *Tetraedron Lett.*, **37**: 7875-7878, 1996.
- CHEN, Q.; YAO, S.; HUANG, X.; LUO, J.; WANG, J.; KONG, L. Supercritical fluid extraction of *Coriandrum sativum* and subsequent separation of isocoumarins by high-speed counter-current chromatography. *Food Chem.*, **117**: 504-508, 2009.
- CHERRETT, J. M. "The economic importance and control of leaf-cutting ants". IN: VINSON, B. (Ed.). *Economic impact and control of social insects*. New York: Praeger Publishers, 1986. p. 165-190.

- COHEN-SELA, E.; CHORNY, M.; KOROUKHOV, N.; DANENBERG, H. D.; GOLOMB, G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Controlled Rel.*, **133**: 90–95, 2009.
- CONNOLLY, J. D. “Chemistry of the limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae”. IN: WATERMAN, P. G. & GRUNDON, M. F. (Eds.). *Chemical and Chemical Taxonomy of the Rutales*. Londres, Academic Press, 1983. p. 175-213.
- CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; PIRANI, J. R. Meliacin butenolides from *Trichilia stipulata*. *Phytochemistry*, **49**: 2493-2496, 1998.
- CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int. J. Pharm.* **313**: 198–205, 2006.
- CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MANDENHALL, J.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungusgrowing ants. *Science*, **311**: 81-83, 2006.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCK, D. Fungusgrowing ants use antibiotics-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, **398**: 701-704, 1999.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, **299**: 386- 388, 2003.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. New York: John Wiley & Sons, 2^a ed., 2001, 507 p.
- DIB, M. A.; DJABOU, N.; ALLALI, H.; TABTI B. Identification of Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Roots of *Arbutus unedo* L. *Asian J. Chem.*, **22**: 4045-4053, 2010.
- DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quim. Nova*, **3**: 1966-1972, 2008.
- DON PEDRO, K. N. Inseticidal activity of fatty acid constituents of fixed vegetable oils against *Callosobruchus maculatus* (F.) on cowpea. *Pest. Sci.*, **30**: 295-302, 1990.
- FACCHINI, P. H. “*Química biomonitorada de Protium heptaphyllum, Tapirira guianensis, Rauia sp, Conchocarpus longifolius atividades de extratos e constituintes isolados contra bacterias, saúva limão e seu fungo simbiote*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, 2005. Tese de Doutorado. 240p.
- FEBVAY, G. & KERMARREC, A. Activites enzymatiques des glandes salivaires etle l’intestin moyen dune fourmi Attine (aductes et larves): *Acromyrmex octospinosus* (Formicidae, Attini). *Arch. Biol.*, **92**: 299-316, 1981.

- FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. Ph.; PUISIEUX, F.; THIES, C. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. Centre National de La Recherche Scientifique- França. Patente Francesa 2608988-A1, 1988a.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, **55**: R1-R4, 1989.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.Ph. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanoparticules. Centre National de La Recherche Scientifique- França. Patente Europeia 0274961, 1988b.
- FLAMINI, G.; ANTOGNOLI, E.; MORELLI, I. Two flavonoids and other compounds from the aerial parts of *Centaurea bracteata* from Italy. *Phytochemistry*, **57**: 559–564, 2001.
- FORTI, L. C. & ANDRADE, A. P. P. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera, Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. *Naturalia*, **24**: 61-63, 1999.
- FORTI, L. C. & BOARETTO, M. A. C. *Formigas Cortadeiras. Biologia, Ecologia, Danos e Controle*. Botucatu – SP, 61 p, 1997.
- FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; SILVA, V. P.; SAES, M. B. "Economic of grasscutting ants." IN: LOFGREN, C. S. & VANDERMEER, R. K. (EDS). *Fire ants and leaf-cutting ants. Biology and Management*. Westview Press, Bolder, Colorado, and London. 1986. p. 18-35.
- FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; WEHRLI, E.; PUGLISI, G. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials*, **17**: 751-758, 1996.
- FRIEDRICH, R. B.; FONTANA, M. C.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. *Quim. Nova*, **31**: 1131-1136, 2008.
- GALINDO-RODRÍGUEZ, S. A.; PUEL, F.; BRIANÇON, S.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **25**: 357-67, 2005.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; RODRIGUES, E. D.; POTT, V. J.; ROQUE, N. F. Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, **42**: 1399-1403, 1996.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; TSUTSUMI, M. T. & ROQUE, N. F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, **45**: 141-148, 1997a.
- GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; RAMOS, I.; CAMARGO, M. J. Sesquiterpenes from *Trichilia catigua*. *Fitoterapia*, **68**: 87-88, 1997b.
- GIBALDI, M & FELDMAN, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. *J. Pharm. Sci.*, **56**: 1238-1242, 1967.

- GODOY, M. F. P.; VICTOR, R. S.; BELLINI, A. M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR., M.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**: 669-672, 2005.
- GOVENDER, T.; RILEY, T.; EHTEZAZI, T.; GARNETT, M. C.; STOLNIK, S.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, **199**: 95-110, 2000.
- GOVENDER, T.; STOLNIK, S.; GARNETT, M. C.; ILLUM, L.; DAVIS S. S. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Controlled Rel.*, **57**: 171-185, 1999.
- GREENE, L. C.; MEYERS, P. A.; SPRINGER; J. T.; BANKS, P. A. Biological evaluation of pesticides released from temperature-responsive microcapsules. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 2274-2278, 1992.
- GRAF, R.; QUELLEC, P.; SANCHEZ, A.; CALVO, P.; DELLACHERIE, E.; ALONSO, M. J. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**: 111-118, 2001.
- GRUPO ETC (Action Group on Erosion Technology and Concentration). Tradução: PEDROZO, J. F.; BORGHETTI, F. Nanotecnologia: os riscos da tecnologia do futuro. Porto Alegre: L & PM, 2005.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET; J. P.; PUISIEUX, F. Poly-(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, **113**: 57-63, 1995.
- HARBONE, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman & Hall, London: p. 57-87; 337-365; 441-471; 499-526, 1994.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; MAROTI, P. S.; PAGNOCCA, F. C; SILVA, O. A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* L. (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entom.*, **124**: 249-252, 2000a.
- HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C; SILVA, O. A. MAROTI, P. S. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entom.*, **124**: 33-35, 2000b.
- HEBLING, M. J. A.; MAROTI, P. S.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; PAGNOCCA, F. C. Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Bull. Entom. Res.*, **86**: 253-256, 1996.
- HILL, J. & SCHOONHOVEN, A. V. Effectiveness of vegetable oil fractions in controlling the Mexican bean weevil on stored beans. *J. Econ. Entomol.*, **74**: 478-479, 1981.

- HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O. *The Ants*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 732p.
- INADA, A.; KONISHI, M.; MURATA, H. & NAKANISHI, T. Structures of a new limonoid and a new triterpenoid derivative from pericarps of *Trichilia connaroides*. *J. Nat. Prod.*, **57**: 1446-1449, 1994.
- ITO, Y. Ginden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatog. A.*, **1065**: 145-168, 2005.
- ITO, Y.; CONWAY, W. D. High-Speed Countercurrent Chromatography. *A Wiley Interscience Publication*, **132**: 454, 1995.
- JANUÁRIO, A. H. *Estudo fitoquímico de Esenbeckia grandiflora e Almeidea rubra (Rutaceae)*. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, UFSCar, 1995. Tese de Doutorado. 200 p.
- JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; COLE, J. R. Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 2. A new triterpenoid, hispidone and bourjotinolone A. *J. Org. Chem.*, **45**: 3132-3135, 1980.
- JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H. COLE, J. R. Constituents of *Trichilia hispida* (Meliaceae). 4. Hispidols A and B, two new tirucallane triterpenoids. *J. Org. Chem.*, **46**: 4085-4088, 1981.
- JUSTI-JUNIOR, J.; IMENES, S. de L.; BERGMANN, E. L.; CAMPOS-FARINHA, A. E. C. ZORZENON, F. J. Formigas Cortadeiras. *Bol. Técn. Inst. Biol.*, **4**: 5-31, 1996.
- KAMPERDICK, C.; VAN, N. H.; SUNG, T. V.; ADAM, G. Bisquinolinone alkaloids from *Melicope ptelefolia*. *Phytochemistry*, **50**: 177-181, 1999.
- KAWASHIMA, Y.; HANDA, T.; KASAI, A.; TAKENAKA, H.; LIN, S.Y. The effect of thickness and hardness of the coating film on the drug release of theophylline granules. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**: 2469–2474, 1985b.
- KAWASHIMA, Y.; HANDA, T.; TAKENAKA, H.; LIN, S.Y.; ANDO, Y. Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. *J. Pharm. Sci.* **74**: 264– 268, 1985a.
- KETWARU, P.; KLASS, J.; TINTO, W. F. Pregnane steroids from *Trichilia schomburgkii*. *J. Nat. Prod.*, **56**: 430-431, 1993.
- KIPP, J. E. "Solubilizing systems for parenteral formulation development – small molecules." IN: AUGUSTIJNS, P. & BREWSTER, M. E. (Eds.). *Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*. New York: Springer New York. 2007, p. 309-339.
- KOST, C.; LAKATOS, T.; BOTTCHEER, I.; ARENDHOLZ, W. R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, **94**: 821-828, 2007.
- KOUL, O.; SING, G.; SINGH, R.; DANIEWSKI, W. M.; BERLOZECKI S. Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *J. Biosc.*, **29**: 409-416, 2004.

- KUBO, I & KLOCKE, J. A. An insect growth inhibitor from *Trichilia roka* (Meliaceae). *Experientia*, **38**: 639-640, 1982.
- LEE, S. M.; KLOCKE, J. A.; BARNABI, M. A.; YAMASAKI, R. B.; BALANDRIN, M. F. "Insecticidal constituents of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae)". IN: HEDIN, P. H. (Eds.). *Naturally Occurring Pest Bioregulators, ACS Symposium Series 449*. Washington, ACS, 1991. 293 p.
- LEITE, A. C.; CABRAL, E. C.; DOS SANTOS, D. A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de cromatografia em contracorrente. *Quim. Nova*, **28**: 983-985, 2005a.
- LEITE, A. C. "Estudos químicos e atividades biológicas de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa frutidosa* (Meliaceae)." São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCAR, 2005b. Tese de doutorado. 329 p.
- LEROUX, J. C.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; GURNY, R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *Europ. J. Pharmac. Biopharm.*, **41**: 14-18, 1995.
- LI, H. B & CHEN, F. Simultaneous separation and purification of five bioactive coumarins from the Chinese medicinal plant *Cnidium monnieri* by high-speed countercurrent chromatography. *J. Separ. Sci.*, **28**: 268-272, 2005.
- LITTLEDYKE, M. & CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). *Bul. Entom. Res.*, **66**: 205-217, 1976.
- LIU, R.; LI, A.; SUN, A. Preparative isolation and purification of coumarins from *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm) Benth, et Hook. f (Chinese traditional medicinal herb) by high-speed counter current chromatography. *J. Chrom. A*, **1052**: 223–227, 2004.
- LIU, R.; SUN, Q.; SUN, A.; CUI, J. Isolation and purification of coumarin compounds from *Cortex fraxinus* by high-speed counter-current chromatography. *J. Chrom. A*, **1072**: 195–199, 2005.
- LOECK, A. E. & NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigatta* (Smith, 1858) (Hymenoptera – Formicidae). *O Solo*, **1**: 25-30, 1984.
- LOPES, E. C.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. *Die Pharmazie*, **55**: 527-530, 2000.
- LOSA, C.; MARCHAL-HEUSSLER, L.; ORALLO, F.; VILA JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Design of new formulations for topical ocular administration: polymeric nanocapsules containing metilpranolol. *Pharm. Res.*, **10**: 80-87, 1993.
- LUO, X.; WU, S.; MA, Y.; WU, D. Tetranortriterpenoids from *Walsura yunnanensis*. *J. Nat. Prod.*, **63**: 947-951, 2000.

- MA, C. H.; KE, W.; SUN, Z. L.; PENG, J. Y.; LI, Z. X.; ZHOU, X.; FAN, G. R.; HUANG, C. G. Large-scale isolation and purification of scoparone from *Herba artemisiae scopariae* by high-speed counter-current chromatography. *Chromatographia*, **64**: 83-87, 2006.
- MAFEZOLI, J. “Atividade tripanocida e antimicrobiana de plantas da família Rutaceae”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2001. Tese de Doutorado. 240p.
- MAGENHEIM, B. & BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *Pharma Sciences*, **1**: 221-241, 1991.
- MAGENHEIM, B.; LEVY, M. Y.; BENITA, S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers. Ultrafiltration technique at low pressure. *Int. J. Pharm.*, **94**: 115-123, 1993.
- MANEERAT, W.; LAPHOOKHINEO, S.; KOYSOMBOON, S.; CHANTRAPROMMA, K. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine*, **15**: 1130-1134, 2008.
- MANNERS G. D. Citrus limonoids: analysis, bioactivity and biomedical prospects. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 8285-8294, 2007.
- MARCHAIS, H.; BENALI, S.; IRACHE, J. M.; THARASSE-BLOCH, C.; LAFONT, O.; ORECCHIONI, A. M.; Entrapment efficiency and initial release of phenylbutazone from nanocapsules prepared from different polyesters. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**: 883-888, 1998.
- MARICONI, F. A. M. *As saúvas*. São Paulo: Ceres, 1970.
- MARICONI, F. A. M. *As saúvas: insetos daninhos às plantas cultivadas*. 3. ed. São Paulo. Livraria Nobel, 1974. 251p.
- MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. *Bahia Agríc.*, **7**: 18-21, 2006.
- MARTINEZ, S. S. *O Nim Azadirachta indica: Natureza, usos múltiplos, produção*. Londrina, Instituto Agrônômico do Paraná, IAPAR. 2002, 142 p.
- MATOS, A. P.; NEBO, L.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES, R. R. Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Quim. Nova*, **32**: 1553-1556, 2009.
- MEDEIROS, E. S. & MATTOSO, L. H. C. “Aplicações da Nanotecnologia no Agronegócio.” IN: DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (Eds.). *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. São Paulo: Artliber Editora, 2006. p. 195-201.
- MESSINA, F. J. & RENWIK, J. A. A. Effectiveness of oils in protecting stored cowpeas from the cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae). *J. Econ. Entomol.*, **76**: 634-636, 1983.
- MIKOLAJCZAK, K. L. & REED, D. K. Extractives of seeds of the Meliaceae: Effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. *J. Chem. Ecol.*, **13**: 99-111, 1987.

- MIYASHIRA, C. H. “*Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas Atta sexdens rubropilosa (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento in vitro de seu fungo mutualista.*” Departamento de Botânica, Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, 2007. Dissertação de Mestrado, 61 p.
- MONTEIRO, M. R.; TORKOMIAN, V. L. V.; PAGNOCCA, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Activity of extracts and fatty acids of *Canavalia ensiformis* (Leguminosae) against the fungus of the leaf-cutting ants *Atta sexdens*. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, **70**: 733-736, 1998.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Intern. J. Pharmac.*, **385**: 113–142, 2010.
- MORGAN, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 4096, 2009.
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; LEITE, A. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). *Sociobiology*, **45**: 194-204, 2005.
- MORINI, M. S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C. Efeitos tóxicos de ácidos graxos para operárias de *Atta sexdens* Forel (Hym., Formicidae). IN: INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM & ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA. *Anais. Ilhéus*: 1997. 356 p.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly-(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J. Pharm. Sci.*, **89**: 614-626, 2000.
- MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between Attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Evolution*, **62**: 2894-2912, 2008.
- MULLER, C. R.; BASSANI, V. L.; POHLMANN, A. R.; MICHALOWSKI, C. B.; PETROVICK, P. R.; GUTERRES, S. S. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **26**: 343-347, 2000.
- MURRAY, R. D. H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S. A. *The Natural Coumarins: Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. 1a ed. London, John Wiley & Sons. 1982, p. 36.
- NAKATANI, M.; IWASHITA, T.; NAOKI, H.; HASE, T. Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. *Phytochemistry*, **24**: 195-196, 1985.
- NAKATANI, M.; JAMES, J. C.; NAKANISHI, K. Isolation and structures of trichilins, antifeedants against the southern army worm. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**: 1228-1230, 1981.
- NEBO, L. “Atividade inseticida de espécies de *trichilia* frente à lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química, UFSCar, 2008. Dissertação de mestrado. 157 p.

- NIU, F.; CUI, Z.; CHANG, H.; JIANG, Y.; CHEN, F.; TU, P. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*. *Chin. J. Chem.*, **24**: 1788-1791, 2006.
- NOBES, G. A. R. & MARCHESSAULT, R. H. "Enzymology of the synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates." IN: IMAM, S. H.; GREENE, R. V.; ZAIDI, B. R. (Eds.). *Biopolymers utilizing nature's advanced materials*. ACS Symposium Series 723. American Chemical Society. Washington, D C: 1999. p. 110-145, p. 305.
- NOBES, G. A. R. & MARCHESSAULT, R. H. "Enzymology of the synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates." IN: IMAM, S. H.; GREENE, R. V.; ZAIDI, B. R. (Eds.). *Biopolymers utilizing nature's advanced materials*. ACS Symposium Series 723. American Chemical Society. Washington, D C: 1999. p. 110-145, p. 305.
- OECD. Partition coefficient (octanol/water): Shake flask method. Paris. http://www.oecd.org/documentos/23/0,2340,en_2649_34379_1948503_111_1,00.htm. OECD Guideline for testing of chemicals n 107. 1995.
- OHTSUBO, T.; TSUDA, S.; TSUJI, K. A study of the physical strength of fenitrothion microcapsules. *Polymer*, **32**: 2395-2399, 1991.
- OLUGBADE, T. A. & ADESANYA, S. A. Priurianoside, a protolimonoid glucoside from the leaves of *Trichilia priuriana*. *Phytochemistry*, **54**: 867-870, 2000.
- PAGNOCCA, F. C.; TORKOMIAN, V. L. V.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, A. G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *J. Chem. Ecol.*, **22**: 1325-1330, 1996.
- PEÑAFLORES, M. F. G. V.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; JÚNIOR, M. B.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; LEITE, A. C.; DA SILVA, M. F. G. V. Efeitos tóxicos de ácidos graxos para formigas cortadeiras, em laboratório. *Arq. Inst. Biol.*, **71**: 151, 2004.
- PENG, J.; FAN, G.; QU, L.; ZHOU, X.; WU, Y. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for isolation and separation of schizandrin and gomisins A from *Schisandra chinensis*. *J. Chrom. A*, **1082**: 203-207, 2005.
- PENG, X.; ZHENG, Z.; CHENG, K.; SHAN, F.; REN, G.; CHEN, F.; WANG, M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chem.*, **106**: 475-481, 2008.
- PENNINGTON, T. D & STYLES, B. D. A generic monograph of Meliaceae. *Blumea*, **22**: 419-540, 1975.
- PETTIT, G. R.; MELODY, N.; THORNHILL, A.; KNIGHT, J. C.; GROVY, T. L.; HERALD, C. L. Antineoplastic Agents. 579. Synthesis and Cancer Cell Growth Evaluation of *E*-Stilstatin 3: A Resveratrol Structural Modification. *J. Nat. Prod.*, **72**: 1637-1642, 2009.
- PIZZOLATTI, M. G.; VENSON, A. F.; SMÂNIA JR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; BRAZ-FILHO, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catiguá* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.*, **57c**: 483-488, 2002.

- PIZZOLATTI, M. G.; VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Minor γ -lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-M. *Nat. Prod. Res.*, **18**: 433-438, 2004.
- POMBEIRO, A. J. L. O. *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*, 3a ed., Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1998. 1069 p.
- POTT, A. & POTT, V. J. *Plantas do Pantanal*. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994, p. 204.
- PUDHOM, K.; SOMMIT, D.; NUCLEAR, P.; NGAMROJANAVANICH, N.; PETSOM A. Moluccensins H-J, 30-ketophragmalin limonoids from *Xylocarpus moluccensis*. *J. Nat. Prod.*, **73**: 263-266, 2010.
- PUISIEUX, F.; BARRAT, G.; COUARRAZE, G.; COUVREUR, P.; DEVISSAGUET, J.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; FESSI, H.; VAUTHIER, C.; BENITA, S. *Polymeric Biomaterials*. Dumitriu, S. (Ed.) Marcel Dekker: New York, 1994. cap. 16.
- QUINLAN, R. J. & CHERRET, J. M. Role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecol. Entomol.*, **4**: 151-160, 1979.
- RAMÍREZ, M. C.; TOSCANO, R. A.; ARNASON, J.; OMAR, S.; CERDAGARCÍA-ROJAS, C. M.; MATA, R. Structure, conformation and absolute configuration of new antifeedant dolabellanes from *Trichilia trifolia*. *Tetrahedron*, **56**: 5085-5091, 2000.
- RASAGA, C.Y.; NACPIL, Z.D.; NATIVIDAD, GM.; TADA, M.; COLL, J.C.; RIDEOUT, J.A. Tetranortiterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, **46**: 555-558, 1997.
- RÉ, M. I. & RODRIGUES, M. F. A. "Polímeros biodegradáveis." IN: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C (Eds.). *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. São Paulo: Artliber Editora, 2006. p. 195-201.
- REMBOLD, H. "Azadirachtins". IN: *Insecticides of Plant Origin, ACS Symposium Series 387*. ARNASON, J. T.; PHILÓGENE, B. & MORAND, P. (Eds.) Washington, ACS, 1989, p. 150.
- REYNOLDS, H. T. & CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attini ant-microbe symbiosis directly consumes the ant cultivated fungus. *Mycologia*, **96**: 955-959, 2004.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; COLLINS, C.; JARDIM, I.; MELO, L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, **27**: 771-780, 2004.
- RIBEIRO, S. B.; PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, R. S.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI Jr., M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Activity of sesame leaf extracts against the symbiotic fungus of *Atta sexdens* L. *An. Soc. Entomol. Bras.*, **27**: 421-426, 1998.
- RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. *Microb. Ecol.*, **56**: 604-614, 2008.

- RODRÍGUEZ, B.; CABALLERO, C.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P. A new tetranortriterpenoid from *Trichilia havanensis*. *J. Nat. Prod.*, **66**: 452-454, 2003.
- ROSA, D. S.; PENTEADO, D. F.; CALIL, M. R. Thermal properties and biodegradability of PCL and PHB submitted in fungi pool. *Rev. Ciênc. Tecn.*, **15**: 75-80, 2000.
- SAKAKIBARA, J.; KAIYA, T.; FUKUDA, H.; OHKI, T. 6 β -Hydroxyursolic acid and other triterpenoids of *Enkianthus cernuus*. *Phytochemistry*, **22**: 2553-2555, 1983.
- SAKAKIBARA, N.; NAKATSUBO, T.; SUZUKI, S.; SHIBATA, D.; SHIMADA, M.; UMEZAWA, T. Metabolic analysis of the cinnamate/monolignol pathway in *Carthamus tinctorius* seeds by a stable-isotope-dilution method. *Org. Biomol. Chem.*, **5**: 802-815, 2007.
- SCHAFFAZICK, S. R. & GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, **26**: 726-737, 2003.
- SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, **21**: 99-106, 2002.
- SEAMAN, D. Trends in the formulation of pesticides-an overview. *Pestic. Sci.*, **29**: 437-449, 1990.
- SEIJO, B.; FATTAL, E.; TREUPEL, L. R.; COUVREUR, P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int. J. Pharm.*, **62**: 1-7, 1990.
- SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; MAHMOOD, T.; SIDDIQUI, B. S. Two New Insect Growth Regulator Meliacins From *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.*, 1021-1025, 1986
- SIDDIQUI, B. S.; FARHANA, B.; GHASUDDIN, A.; FAIZI, S.; NAQVI, S. N. H.; TARIQ, R. M. Two insecticidal tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, **53**: 371-376, 2000.
- SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, B. S.; FAIZI, S.; MAHMOOD, T. Isolation of a tetranortriterpenoid from *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, **23**: 2899-2901, 1984.
- SILVA, A.; BACCI, R. Jr.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* works on different food sources. *J. Insect Phys.*, **49**: 307-313, 2003.
- SIMMONDS, M. S. J.; STEVENSON, P. C.; PORTER, E. A.; VEITCH, N. C.; J. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. *Nat. Prod.*, **64**: 1117-1120, 2001.
- SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the ant *Atta sexdens* L. *Appl. Envir. Microb.*, **64**: 4820-4822, 1998.

- SLIMESTAD, R.; ANDERSEN, O. M.; FRANCIS, G. W.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Syringetin 3-O-(6"-acetyl)- β -glucopyranoside and other flavonols from needles of norway spruce, *Picea abies*. *Phytochemistry*, **40**: 1537-1542, 1995.
- SONG, X.; ZHAO, Y.; WU, W.; BI, Y.; CAI, Z.; CHEN, Q.; LI, Y.; HOU S. PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Int. J. Pharm.*, **350**: 320–329, 2008.
- SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Controlled Rel.*, **70**: 1-20, 2001.
- SOUZA, R. J. “*Estudos de Pilocarpus grandiflorus, Hyparrhenia rufa e Pennicetum purpureum relacionados as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote*”. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2003. Tese de Doutorado. 217 p.
- SPARKS, R. E. Microencapsulation. In: Kirk-Othmer. *Encyclopedia of chemical technology*, 3. ed. John Wiley and Sons, New York, 1981. p 470.
- STRADLING, D. J. “An introduction to the fungus growing ants Attini” IN: *Ant-plant Interactions*. HUXLEY, C. R. e CUTLER, D. F. (Eds.) Oxford University Press, p. 15-18, 1991.
- SUGA, T. & KONDO, S. Alkanes and triterpenoids of *Quercus glauca*. *Phytochemistry*, **13**: 522-523, 1974.
- TAYLOR, D. A. H.; “The chemistry of the limonoids from Meliaceae”. IN: *Progress in the chemistry of organic natural products*. Herz, W.; GRISEBACH, H., KIRBY, G. W. (Eds.) New York, Springer, 1984. p. 1-102.
- TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, **59**: 491–500, 2005.
- TEWES, F.; MUNNIER, E.; ANTOON, B.; OKASSA, L. N.; COHEN-JONATHAN, S.; MARCHAIS, H.; DOUZIECH-EYROLLES, L.; SOUCE, M.; DUBOIS, P.; CHOURPA, I. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Europ. J. Pharmac. Biopharm.*, **66**: 488–492, 2007.
- THOMAS, B. Regulatory pressures on pesticide formulations. *Pestic. Sci.*, **29**: 415-419, 1990.
- VADAS, E. B. “Stability of pharmaceutical products.” IN: GENARO, A. R. Remington's: *The science and practice of pharmacy*. 20.ed. Easton Pennsylvania: Mack Publishing Company, p. 986-994, 2000.
- VARMA, B. K. & PANDEY, G. P. Treatment of stored greengram seed with edible oils of protection from *Callosobruchus maculatus* (Fabr.). *Ind. J. Agric. Sci.*, **48**: 72-75, 1978.

- VAUTHLER-HOLTZSCHERER, C.; BENABBOU, S.; SPENLEHAUER, G.; VEILLARD, M.; COUVREUR, S. T. P. Methodology for the preparation of ultra-dispersed polymer systems. *Pharma Sci.*, **1**: 109-116, 1991.
- VICTOR, S. G. "Efeito de extratos vegetais de espécies de Rutaceae, Picramniaceae, Meliaceae e Convolvulaceae e de produtos sintéticos sobre o fungo simbiote de *Atta sexdens* L." Rio Claro, Instituto de Biociências, UNESP, 2001. Tese de Doutorado, 169 p.
- VILELA, E. F. "Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brasil." IN: LOFGREN, C. S. & VANDER MEER, R. K. (Ed.). *Fire leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder and London: Westview Press, p. 399-408, 1986.
- WANG, X.; FAN, C.; YIN, S.; GRAN, L.; YUE, J. Structural elucidation of limonoids and steroids from *Trichilia connaroides*. *Phytochemistry*, **69**: 1319-1327, 2008.
- WATTS, P. J.; DAVIES, M. C.; MELIA, C. D. Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Crit. Rev. Ther. Drug Car. Syst.*, **7**: 235-259, 1990.
- WEI, Y.; ZHANG, T.; ITO, Y. Preparative isolation of osthol and xanthotoxol from common *Cnidium* Fruit (Chinese traditional herb) using stepwise elution by high-speed counter-current chromatography. *J. Chrom. A*, **1033**: 373-377, 2004.
- WERLI, F. W. & NISHIDA, T. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. *Forts. Chem. Org. Nat.*, **36**: 1-229, 1979.
- WHEELER, D. A.; ISMAN, M. B.; SANCHEZ-VINDAS, P. E.; ARNASON, J. T. Screening of Costa Rican *Trichilia* species for biological activity against the larvae of *Spodoptera litura* (Lepdoptera: Noctuidae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**: 347, 2001.
- XIE, Y. S.; ISMAN, M.B.; GUNNING, P.; MACKINNON, S.; ARNASON, J.T.; TAYLOR, D.R.; SÁNCHEZ, P.; HASBUN, C.; TOWERS, G.H.N. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidoptera larvae. *Biochem. Syst. Ecol.*, **22**: 129-136, 1994.
- YAN, J.; TONG, S.; SHENG, L.; LOU, J. Preparative Isolation and purification of two coumarins from *Edgeworthia chrysantha* lindl by high speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chrom. & Related Tech.*, **29**: 1307-1315, 2006.
- Sites: http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=72 acessado em 02/10/ 2010.
- http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=420

PARTE II

Busca de novas substâncias naturais com atividade antitumoral

1- Introdução

O cancro ou câncer, nomes comuns dados à neoplasia maligna, é uma doença caracterizada por um crescimento anormal de uma população de células que cresce e se divide sem respeitar os limites esperados, invade e destrói tecidos adjacentes, e pode se espalhar para lugares distantes no corpo, através de um processo chamado metástase. Estas propriedades malignas do câncer o diferenciam dos tumores benignos, que são auto-limitados em seu crescimento e não invadem tecidos adjacentes embora alguns tumores benignos sejam também capazes de evoluir para malignos. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada por mais que um tipo de células. Por exemplo, se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Por outro lado, uma vez iniciado em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é então chamado de sarcoma. O câncer pode afetar pessoas de todas as idades, entretanto o risco para a maioria dos tipos de câncer aumenta com o acréscimo da idade. O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, aliado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por um maior período de tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica ao menos parcialmente o motivo de o câncer ser mais freqüentemente observado nesses indivíduos (Cancer Research UK, 2009; Instituto Nacional do Câncer, 2010). Os cânceres são causados, em sua maioria, por anomalias no material genético das células. Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de agentes carcinógenos, como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos. Outros tipos de anormalidades genéticas podem ser adquiridas através de erros na replicação do DNA, ou são herdadas, e conseqüentemente presentes em todas as células ao nascimento. As complexas interações entre agentes carcinógenos e o genoma hospedeiro podem explicar as razões pelas quais somente alguns hospedeiros desenvolvem câncer após a exposição à um agente carcinógeno conhecido. Novos aspectos da genética da patogênese do câncer, como a metilação do DNA e os microRNAs estão cada vez mais

sendo reconhecidos como importantes para o processo (PATRA, 2008; XU *et al.*, 2010).

O processo de formação de câncer, carcinogênese, em geral ocorre lentamente. Dessa forma, vários anos podem ser necessários para que uma célula cancerosa prolifere e, conseqüentemente, dê origem a um tumor visível. Esse processo ocorre por três estágios denominados iniciação, promoção e progressão. O estágio de iniciação é o primeiro da carcinogênese. Nesse estágio, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos que provocam modificações em um ou mais de seus genes. Nesta fase não é possível detectar clinicamente um tumor. No estágio de promoção, as células iniciadas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos e são transformadas em células malignas, de forma lenta e gradativa. O terceiro e último estágio, se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. (Instituto Nacional do Câncer, 2010). O câncer causa cerca de 13% de todas as mortes no mundo, sendo os cânceres de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama os que mais matam (World Health Organization, 2009).

A utilização das plantas no tratamento do câncer iniciou-se com a medicina popular há mais de 3.500 anos. Todavia, seu uso intensificou-se somente na década de 1950, com o descobrimento e desenvolvimento dos alcalóides derivados da vinca (*Catharanthus roseus sp.*) (CRAGG & NEWMAN, 2005) assim como das avaliações do potencial antiproliferativo dos extratos brutos de plantas. Dessa forma, grande parte dos fármacos antitumorais utilizados atualmente são produtos naturais de plantas, microrganismos, animais ou derivados destes. Muitos modelos moleculares naturais fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade (SAR) e inspiraram o desenvolvimento de novas moléculas bioativas através de biotransformação ou síntese orgânica clássica. As plantas constituem uma importante fonte de novos fármacos devido à grande diversidade de substâncias químicas presentes em seu organismo, utilizadas para conferir proteção contra predadores, para atrair polinizadores e para inibir o crescimento de outras

espécies que competem por espaço ou água (BEIRA, 2000, ALEXANDROVA *et al.*, 2000).

Nesse sentido, os produtos naturais continuam sendo uma importante fonte de protótipos e de possíveis fármacos para o tratamento de diferentes patologias.

Dentre os compostos naturais presentes em plantas, triterpenos, esteróides e limonóides têm uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo a antimalárica (KOUL *et al.*, 2004), antimicobacteriana (MANEERAT *et al.*, 2008, PUDHOM *et al.*, 2010), antifúngica (GOVINDACHARI *et al.*, 2000, ABDELGALEIL *et al.*, 2004), antiviral (MANNERS, 2007), inseticida (AMBROZIN *et al.*, 2006), antialimentar (SURESH *et al.*, 2002), anti-inflamatória (OKOYE *et al.*, 2010) e antitumoral (MANEERAT *et al.*, 2008, QIU *et al.*, 2001, KASHIWADA *et al.*, 2007, HU *et al.*, 2007, PHONGMAYKIN *et al.*, 2008, UDDIN *et al.*, 2007, RÍOS, 2010, EL-READI *et al.*, 2010). Os flavonóides compreendem um grande grupo de metabólitos secundários em várias espécies de plantas (TOHGE & FERNIE, 2010). Alguns estudos epidemiológicos defendem uma dieta rica em alimentos contendo flavonóides, acreditando reduzir o risco de desenvolver câncer e doenças cardiovasculares (MOJZISOVA & KUCHTA, 2001, LE MARCHAND, 2002, NEUHOUSER, 2004, MARON, 2004, HU *et al.*, 2010). As cumarinas constituem uma importante classe de compostos naturais com ampla distribuição, exibindo uma variedade de atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória (GARCIA-ARGAEZ *et al.*, 2000, WITAICENIS *et al.*, 2010), antimalárica (ROSS *et al.*, 2008), antimicrobiana (COLLING *et al.*, 2010), antiviral (LEE *et al.*, 2009) e antitumoral (RUIZ-MARCIAL *et al.*, 2007, NGO *et al.*, 2010, VALENTE *et al.*, 2010, YANG *et al.*, 2010). Os alcalóides são metabólitos secundários com grande diversidade estrutural e apresentam diferentes atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, moluscicida, anti-inflamatórios (VIEIRA & KUBO, 1990, LEWIS, 1983, COLLING *et al.*, 2010) e antitumoral (MIN *et al.*, 2010, DUARTE *et al.*, 2010, SUN *et al.*, 2010).

Verifica-se, portanto, que o uso de substâncias naturais trata-se de uma ferramenta atrativa para a busca de novos fármacos, pois podem ser utilizados diretamente ou como modelos (*lead structures*) para o

desenvolvimento de novas classes de fármacos (VIEGAS, *et al.*, 2006). Muitos produtos naturais biologicamente ativos são parcialmente solúveis na água e como uma consequência do processo de seleção natural, podem apresentar bioatividade em concentrações muito baixas (DUKE *et al.*, 2000). Tudo isso aliado a possibilidade de obtenção de compostos que apresentem um baixo impacto ambiental.

2- Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade de oito triterpenos (**1-8**), um esteroide (**9**), dez limonóides (**10-19**), quinze flavonóides (**20-34**), treze alcalóides (**35-47**) e oito cumarinas (**48-55**) frente a três linhagens celulares tumorais humanas: MCF-7, adenocarcinoma da mama; A375-C5, melanoma e NCI-H460, câncer de células não pequenas de pulmão. Com o objetivo de avaliar o possível mecanismo de ação celular subjacente ao efeito inibidor do crescimento observado para os compostos mais ativos ($GI_{50} < 12 \mu M$), células de NCI-H460 foram usadas e o perfil do ciclo celular bem como os níveis de apoptose foram avaliados por citometria de fluxo após tratamento destas células com os compostos selecionados.

3- Procedimento Experimental

3.1-Materiais

3.1.1-Reagentes

O meio RPMI-1640 com vermelho de fenol foi adquirido da Cambrex (New Jersey, EUA). A L-glutamina, o soro bovino fetal (SBF), o tampão fosfato salino (PBS) e a tripsina foram adquiridos da Gibco Invitrogen Co. (Escócia, Reino Unido). O ácido acético, o azul de tripano, o dimetilsulfóxido (DMSO), o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), a penicilina/estreptomicina, RNase e a sulforodamina B (SRB) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA). O ácido tricloroacético (TCA), o citrato de sódio, o etanol, o paraformaldeído e o tampão Tris foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.1.2- Equipamentos

Câmara de fluxo laminar vertical- The baker company.Class II Biological Safety cabinet - P.O. Drawer E., Stanford, ME 04073.

Estufas de incubação de CO₂ -LeeC MkII Proportional Temperature Controller.

Estufa 37C - Ehret-Bk 3064.

Microscópio Invertido de Contraste de Fase - Nikon Diaphot.

Microscópio óptico-Nikon Eclipse E400.

Microscópio de fluorescência - Nikon Japan, Eclipse TS 100, Elw D 0.3/0D75.

Vórtex- Reagente 5-R5-ZX3.

Autoclave - raypa AE – 12.

Centrífuga SIGMA 3K-2, Osterode am Harz, Alemanha.

Banho de água - memmeet

Lavador automático de placas - diagnostics pasteur LP35

Espectrofotômetro de placas (Bio-tek Instruments Inc., PowerWave XS, Winooski, EUA).

Citômetro - Epics XL-MCL Coulter flow cytometer.

3.1.3- Compostos estudados

Foram ensaiados 55 compostos de origem natural, entre esses flavonóides, alcalóides, cumarinas, terpenos e limonóides. Todos os compostos foram isolados de plantas da família Rutaceae ou Meliaceae coletadas em território brasileiro e gentilmente cedidos pelo laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, SP- Brasil.

3.1.4- Linhagens celulares

Foram utilizadas três linhagens celulares tumorais humanas, representativas de três diferentes tipos de tumores:

- MCF-7, adenocarcinoma da mama;
- NCI-H460, câncer de células não pequenas de pulmão;
- A375-C5, melanoma;

A linhagem celular NCI-H460 foi gentilmente cedida pelo National Cancer Institute (NCI) (Bethesda, Maryland, EUA) e as linhagens celulares MCF-7 e A375-C5 foram adquiridas junto à *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) (Salisbury, Reino Unido).

3.2 Métodos

3.2.1 Culturas Celulares

As linhagens celulares estudadas cresceram em monocamada mantidas em frascos de cultura celular de 25 cm² contendo 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 com vermelho de fenol, suplementado com 5% de SBF inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O SBF inativado foi obtido por aquecimento durante 1 hora a 56°C em banho de água. Este meio foi designado ao longo do trabalho somente por meio de cultura RPMI.

As culturas celulares foram mantidas sob incubação a 37°C em estufa (LEEC) contendo uma atmosfera umidificada e com 5% de CO₂. As células foram mantidas em crescimento exponencial tendo-se, para tal, procedido à sua subcultura, por tripsinização, uma a duas vezes por semana.

A tripsinização consiste no destacamento das células em monocamada por ação da tripsina. Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS e em seguida adicionadas de uma solução de tripsina-EDTA, e incubadas em estufa a 37°C por 2 minutos. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio de cultura através dos inibidores presentes no SBF. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 1200 r.p.m. durante 5 minutos à temperatura ambiente. As células sedimentadas depois de separadas do meio de cultura sobrenadante foram então ressuspensas em 5 mL de meio de cultura RPMI e transferidas para novo frasco de cultura.

As manipulações das culturas celulares foram realizadas em câmara de fluxo laminar vertical.

3.2.2 Avaliação da viabilidade celular e obtenção de células em crescimento exponencial

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o corante de exclusão, azul de tripano. Após tripsinização, em todas as suspensões celulares, foi determinada o número total de células viáveis tendo-se, para tal, adicionado a 50 µL de suspensão celular a 50 µL de azul de tripano e procedido à contagem em câmara de Neubauer das células que apresentaram capacidade de excluir o corante (incolores), correspondentes às células viáveis. Os resultados obtidos foram apresentados em número de células viáveis/mL de suspensão celular.

Células em crescimento exponencial foram obtidas ajustando a cultura inicial de cada uma das linhagens às seguintes densidades celulares: 1.5×10^5 células viáveis/mL para MCF-7 e $7,5 \times 10^4$ células viáveis/mL para NCI-H460 e A375-C5, em meio de cultura RPMI.

3.2.3 Ensaio SRB (Sulforodamina B)

Os ensaios SRB foram realizados no laboratório de Microbiologia, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

O efeito inibidor do crescimento celular de 55 compostos de origem natural foi estudado utilizando três linhagens celulares tumorais humanas, de acordo com a metodologia (ligeiramente modificada) adoptada

pelo NCI (Bethesda, EUA) inserida no programa “*In vitro Anticancer Drug Screening*” (MONKS *et al.*, 1991; SKEHAN *et al.*, 1990). O método avalia a capacidade dos compostos inibirem o crescimento exponencial de células tumorais humanas após uma exposição contínua de 48 horas, através da quantificação do conteúdo protéico celular pelo corante de proteínas SRB.

As linhagens celulares MCF-7, NCI-H460 e A375-C5 foram inoculadas em placas de 96 poços de fundo plano (100 µL/poço) e incubadas durante 24 horas de modo a permitir a aderência e a estabilização das células antes da adição do composto. Foram testadas cinco concentrações diferentes para cada composto (150 a 0,2 µM), as quais foram preparadas por diluição seriada (1:2 ou 1:3) em meio de cultura (100 µL/poço). Em cada ensaio o composto foi testado em duplicata para cada linhagem. Nas células controle não tratadas, foi adicionado apenas meio de cultura. Para cada ensaio foi preparada uma placa, a qual foi designada por placa T0 (tempo zero), que serviu para determinar o conteúdo protéico celular no momento de adição do composto e, deste modo, avaliar a sua toxicidade. Esta placa foi fixada antes da adição do composto às placas teste com uma solução de TCA 50% (50 µL/poço), durante 60 minutos a 4°C, à qual se seguiu uma lavagem com água destilada. Após 48 horas de exposição ao composto as células das placas teste foram fixadas do mesmo modo que a placa T0. Depois de totalmente secas as células foram coradas com uma solução SRB (50 µL/poço) por 30 minutos à temperatura ambiente. O excesso de SRB foi removido por lavagem da placa com solução de ácido acético 1%. O SRB foi posteriormente solubilizado com tampão Tris (100 µL/poço). A placa T0, previamente fixada, foi corada de igual modo. Procedeu-se à leitura da absorvância a 492 nm num espectrofotómetro de placas (Bio-tek Instruments Inc., PowerWave XS, Winooski, EUA).

Para cada linhagem celular foi obtida uma curva dose-resposta que permitiu determinar por interpolação gráfica com base no programa de cálculo fornecido pelo NCI (Bethesda, EUA), o valor de GI₅₀, concentração do composto que causou uma redução de 50% no crescimento celular (MONKS *et al.*, 1991). A doxorubicina, utilizada como controle positivo, foi testada de igual modo.

3.2.4- Análise do perfil do ciclo celular por citometria de fluxo e dos níveis de apoptose

Os compostos com valor de GI_{50} menores ou iguais a $10 \mu\text{M}$ foram selecionados para subsequente análise do seu efeito no ciclo celular e na indução da apoptose. Estes ensaios foram realizados utilizando a linhagem celular tumoral humana do câncer do pulmão (NCI-H460). Assim, as células foram inoculadas em placas de 6 poços ($7,5 \times 10^4$ células/mL) e incubadas a 37°C durante 24 horas de forma a garantir a sua aderência e a estabilização das células antes da adição dos compostos. Após 24 horas de incubação as células foram tratadas com meio de cultura (controle), com o solvente dos compostos (DMSO) ou com os próprios compostos na sua concentração de GI_{50} (determinada através do ensaio de SRB) e incubadas a 37°C durante 48 horas. Após este período as células foram tripsinizadas e em seguida processadas para análise do ciclo celular e determinação dos níveis de apoptose.

Relativamente ao ciclo celular, as células foram fixadas com etanol 70% e em seguida ressuspensas em PBS contendo $0,1 \text{ mg/mL}$ RNase A e $5 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio. O conteúdo celular foi posteriormente analisado por citometria de fluxo (Epics XL-MCL Coulter flow cytometer) como anteriormente descrito por (PALMEIRA *et al.*, 2010), tendo sido contadas pelo menos 20,000 eventos por amostra.

A apoptose foi analisada utilizando o kit comercial “Human Annexin V-FITC/PI (Bender MedSystems, Vienna, Austria), segundo as instruções do fabricante. A determinação da externalização da fosfatidilserina foi usada para quantificar os níveis de apoptose por citometria de fluxo, tendo sido pelo menos contadas 20,000 células.

Ambas as metodologias foram analisadas pelo programa de software FlowJo 7.2 (Tree Star, Inc.). Três ensaios independentes ou mais foram realizados e os resultados apresentados correspondem à média mais o desvio padrão (DP).

Estes ensaios foram realizados no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (IPATIMUP) da Universidade do Porto, com colaboração da aluna Kantima Choosang sob orientação professora Helena Vasconcelos.

4- Resultados e discussão

4.1- Efeito dos compostos sobre o crescimento das linhagens celulares tumorais humanas

Neste trabalho o efeito de 55 compostos naturais foram avaliados no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas, MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (câncer de células não pequenas de pulmão) e A375-C5 (melanoma) (Figura 4.1). Para tal, células em crescimento exponencial foram expostas, durante 48 horas, a cinco concentrações de cada composto, e o crescimento celular foi avaliado através da quantificação do conteúdo protéico celular pelo corante SRB.

A Figura 4.2 e Tabela 4.1 apresentam as estruturas dos compostos utilizados assim como os resultados obtidos com os triterpenos e esterol sobre o crescimento das linhagens celulares tumorais humanas ora testadas.

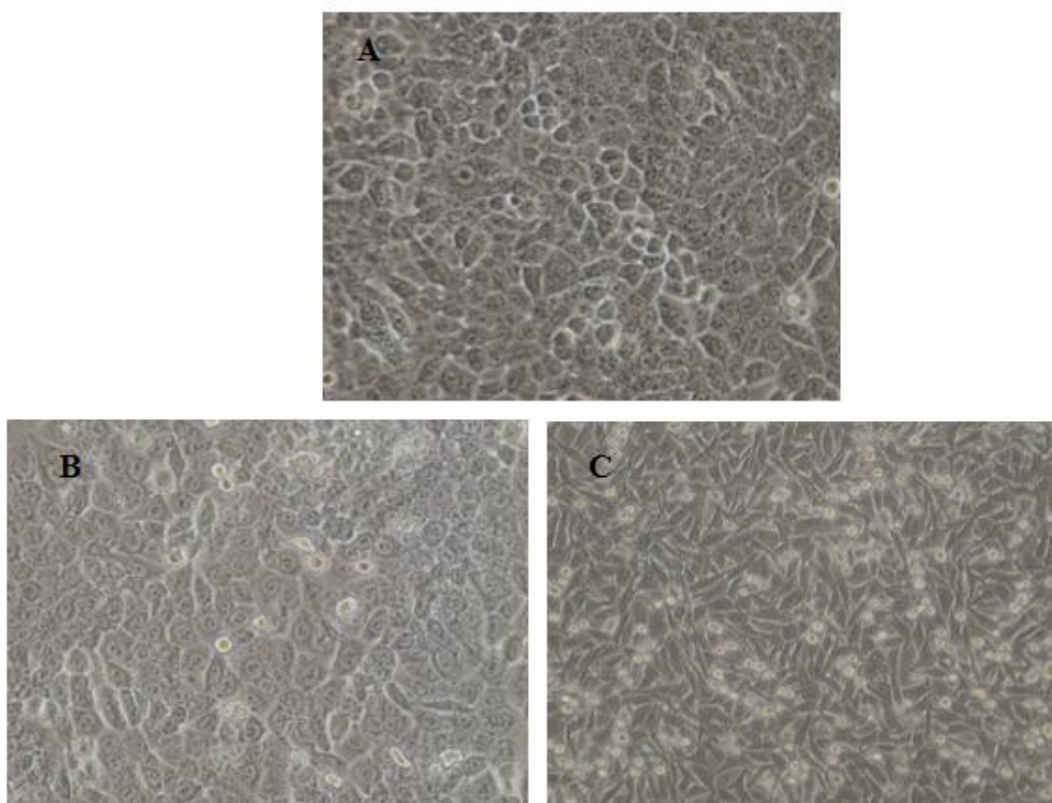


Figura 4.1: Fotografias obtidas em microscópio das linhagens celulares, MCF-7, adenocarcinoma da mama (A); NCI-H460, cancro de células não pequenas de pulmão (B) e A375-C5, melanoma (C).

Dentre os compostos apresentados na Figura 4.2 e Tabela 4.1, o composto **4** foi o mais ativo. Os compostos **1**, **3** e **6** apresentaram um moderado efeito inibidor do crescimento celular sobre as linhagens MCF-7 e NCI-H460, no entanto, enquanto o composto **1** teve um efeito moderado na linhagem celular A375-C5, os compostos **3** e **6** tiveram um efeito mais potente nessa linhagem ($GI_{50} \leq 13 \mu M$). O terpeno **2** apresentou baixo efeito inibitório do crescimento das linhagens celulares MCF-7 e NCI H460 e moderado na linhagem A375-C5 ($GI_{50} \leq 36 \mu M$). A razão pela qual estes compostos são mais ativos na linhagem A375-C5 do que nas outras duas linhagens celulares testadas está provavelmente relacionada com o mecanismo de ação e os alvos moleculares exibidos por estes compostos, que possivelmente diferem de acordo com o tipo de tumor.

Os compostos **7** e **8** foram inativos contra as três linhagens de células tumorais, mesmo na maior concentração testada ($150 \mu M$). Em adição, o composto **9**, que apresentou GI_{50} de $140 \mu M$ na linhagem celular NCI-H460 também-se mostrou inativo nas demais linhagens utilizadas .

PHONGMAYKIN *et al.* (2008) previamente demonstrou à baixa atividade do composto **1** frente ao câncer de mama, com GI_{50} de $17,5 \mu g/mL$. Nesse estudo, a elipticina foi utilizada como controle positivo e apresentou um valor de GI_{50} igual a $0,35 \mu g/mL$. Além disso, este composto mostrou-se inativo contra as linhagens de células humanas LNCaP (câncer de próstata hormônio-dependente), KB (carcinoma epidermóide oral), e Col 2 (câncer de cólon) (QIU *et al.*, 2001). Adicionalmente, em 2007, KASHIWADA e colaboradores demonstraram que a ocotilona (**2**) não teve efeito sobre uma variedade de linhagens celulares tumorais, tais como KB (descrito como um carcinoma epidermóide, embora mais tarde confirmado como um subclone HeLa ou seja, carcinoma do colo do útero humano), K562 (leucemia), MCF-7 e COLO205 (carcinoma de cólon).

No presente trabalho, os compostos **1** e **2** exibiram atividade frente as três linhagens testadas. Entretanto o composto **1** exibiu um valor de GI_{50} três vezes menor para as linhagens MCF-7 e NCI-H460, enquanto que para a linhagem A375-C5 os valores GI_{50} de ambos os compostos foram próximos de $30 \mu M$. Uma vez que a Cabraleadiol (**1**) difere da Ocotilona (**2**)

apenas no substituinte da posição 3 e na estereoquímica em C-24, pode-se inferir que o grupo hidroxila em C-3 e / ou a estereoquímica S no C-24 parece favorecer o efeito antiproliferativo do composto **1** nas linhagens MCF-7 e NCI H460.

Ao comparar os compostos **3** (odoratona) e **4** (odoratol), conclui-se que a existência do grupo hidroxila em C-3 parece ser importante para a atividade inibitória nas células MCF-7 e NCI H460, visto que o composto **4** é, aproximadamente duas vezes, mais potente que o composto **3** nestas linhagens de células tumorais (Tabela 4.1).

Adicionalmente o tratamento do composto **4** com acetona e uma quantidade catalítica de ácido sulfúrico à temperatura ambiente deu origem ao acetonídeo correspondente (**5**). Verifica-se portanto que a presença deste grupo pode estar associada a uma perda do efeito inibidor do crescimento celular.

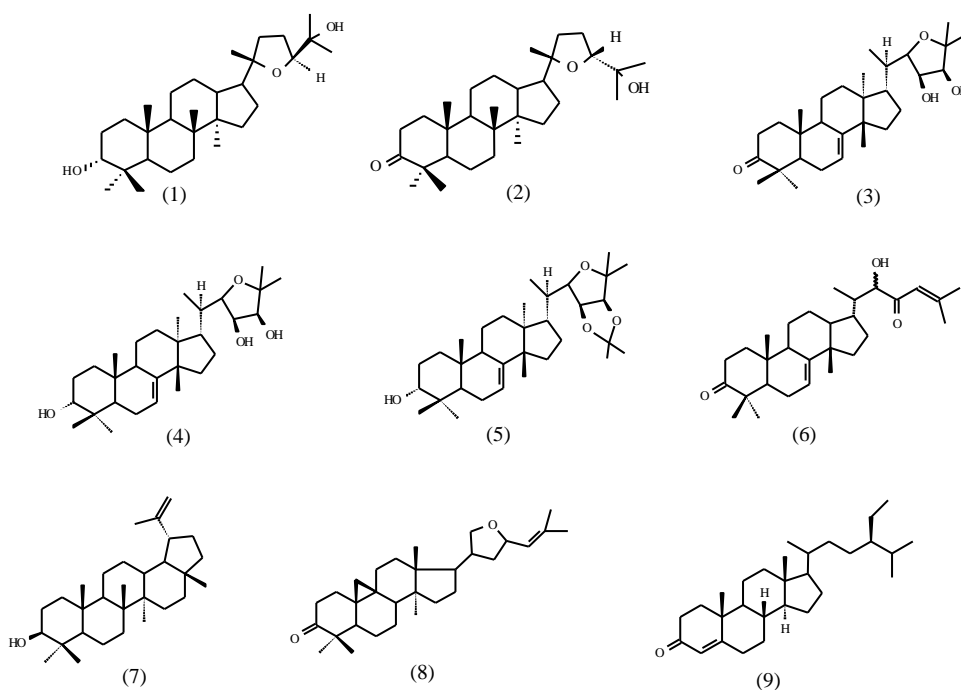


Figura 4.2: Estrutura química dos triterpenos e esterol.

Tabela 4.1: Efeito dos triterpenos e esterol no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas

Compostos	MCF-7	NCI-H460	A375-C5
	(mama)	(pulmão)	(melanoma)
GI ₅₀ (µM)			
1	31,67±1,33	31,00±2,00	31,00±3,61
2	105,00±5,00	92,33±0,67	36,00±3,46
3	26,00±1,73	24,67±2,40	11,46±1,08
4	10,50±0,50	11,67±1,2	11,67±0,67
5	120 ^a	99 ^a	150 ^a
6	39,33±0,88	40,33±2,60	13,00±1,73
7	> 150	> 150	> 150
8	> 150	> 150	> 150
9	> 150 ^a	140 ^a	150 ^a

Os resultados estão expressos em GI₅₀ (concentração de composto que causou uma inibição de 50% no crescimento celular) após contínua exposição de 48 horas. Os resultados representam a média ± SEM de 3-5 ensaios, realizados em duplicata, e obtidos em experiências independentes. ^aResultados de um ou dois experimentos independentes e realizados em duplicata. A doxorrubicina foi usada como controle positivo nas linhagens celulares tumorais humanas (GI₅₀: MCF-7 = 0.0428 ± 0.0082; NCI-H460 = 0.0940 ± 0.0087 e A375-C5 = 0.1142 ± 0.0070 µM).

A Figura 4.3 e a Tabela 4.2 apresentam, respectivamente, as estruturas dos compostos e os resultados obtidos com os limonóides sobre o crescimento das linhagens celulares tumorais humanas ora testadas. Dentre os compostos analisados os compostos **11**, **14** e **15** foram os mais ativos, sendo o limonóide **15** o mais potente, apresentando GI₅₀ menor que 4,20 µM para todas as linhagens celulares testadas. Por outro lado os limonóides **16** e **19** apresentaram baixo efeito inibitório do crescimento das linhagens MCF-7, NCI-H460 e A375-C5. Adicionalmente os compostos **10**, **12**, **13**, **17** e **18** foram inativos contra as três linhagens de células, mesmo na maior concentração testada (150 µM), exceto para o composto **18** que apresentou GI₅₀ de 94 µM na linhagem celular A375-C5. Como previamente mencionado o limonóide mais ativo testado foi a cedrelona (**15**) (Tabela 4.2). Embora as propriedades

antitumorais da cedrelona, como inibidor do crescimento de linhagens celulares *in vitro*, ainda não tenham sido relatadas na literatura anteriormente, este composto é conhecido por demonstrar inúmeras outras atividades, dentre as quais inseticida (KOUL & ISMAN., 1992, ARNASON *et al.*, 1987), antialimentar (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2000, SURESH *et al.*, 2002) e atividade antifúngica contra *Puccinia arachidis* (GOVINDACHARI *et al.*, 2000).

Em 2008, MANEERAT e colaboradores estudaram a atividade citotóxica do limonóide 6 α -acetoxiepoxiazadiradiona contra três linhagens celulares tumorais, NCI-H187 (cancro de células pequenas de pulmão), KB e MCF-7 e não observaram indução do crescimento celular em nenhuma das linhagens testadas. No entanto, no presente trabalho, o limonóide 6 α -acetoxi-14 β ,15 β -epoxiazadriona (**14**) exibiu um valor de GI₅₀ de 11,67 \pm 1.20 μ M na linhagem celular MCF-7. Considerando o limonóide já referido (MANEERAT *et al.*, 2008) e o limonóide **14** do presente trabalho, apenas diferem no substituinte C-16, sugerindo que o grupo carbonila em C-16 contribui para uma perda completa da atividade contra a linhagem celular MCF-7.

Os limonóides **10**, **11**, **12** e **13** são análogos diferindo apenas nos substituintes localizados no anel B (Figura 4.3). Em relação ao substituintes no anel B, a presença de uma carbonila ou um grupo hidroxila na posição C-7 (compostos **10** e **12**, respectivamente) e um grupo extra de acetato na posição C-6 do composto **13**, comparando com **11**, parecem estar diretamente associadas à perda de atividade. Com efeito, os resultados apresentados na Tabela 4.2 mostram que apenas gedunina (**11**) apresenta atividade inibitória do crescimento das três linhagens celulares estudadas. De maneira interessante os resultados ora apresentados são diferentes daqueles previamente relatados (BRANDT *et al.*, 2008), onde os mesmos compostos foram registrados como ativos contra a linhagem celular MCF-7. Ressalte-se aqui que tais diferenças devem ser comparadas com cautela uma vez que os resultados obtidos por tais autores foram obtidos com o kit de proliferação celular MTS/PMS.

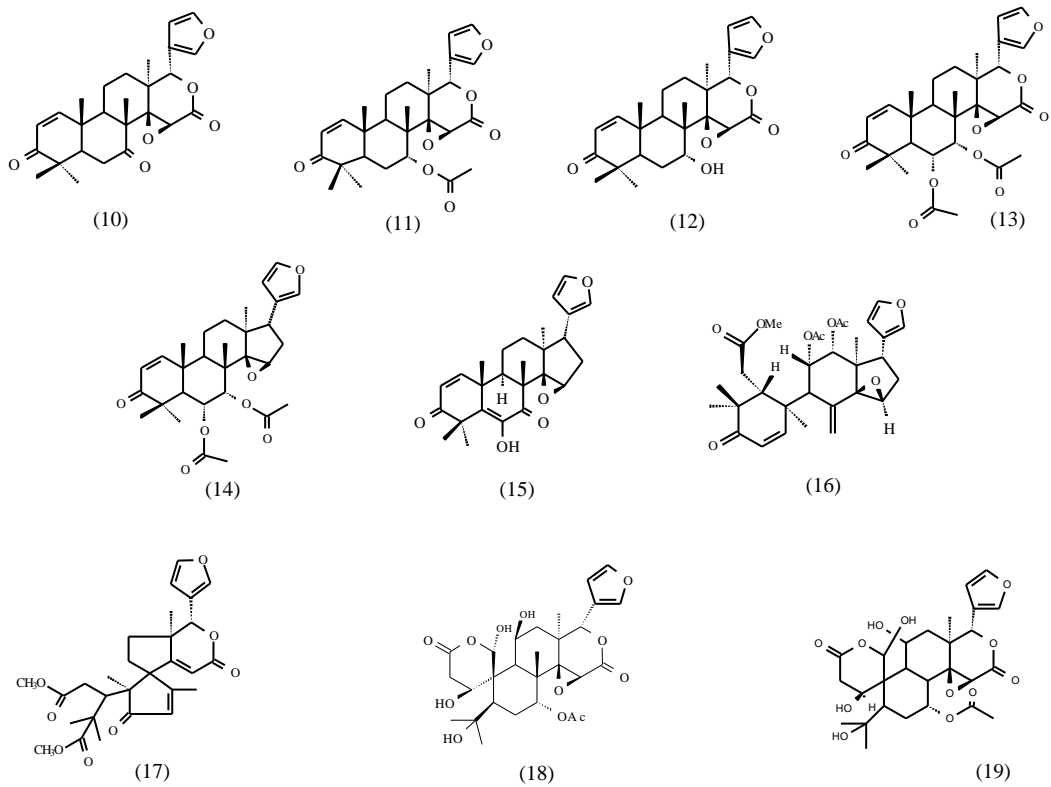


Figura 4.3: Estrutura química dos limonóides.

Tabela 4.2: Efeito dos limonóides no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas

Compostos	MCF-7	NCI-H460	A375-C5
	(mama)	(pulmão)	(melanoma)
GI ₅₀ (µM)			
10	> 150	> 150	> 150
11	9,06±0,43	8,36±0,84	8,80±0,92
12	> 150	> 150	> 150
13	> 150	> 150	> 150
14	11,67±1,20	10,63±0,68	9,27±0,37
15	4,20±0,73	2,77±0,07	2,60±0,21
16	73,00±0,73	62,03±1,12	44,45±0,97
17	> 150	> 150	> 150
18	> 150	> 150	94 ^a
19	93 ^a	77 ^a	60 ^a

Os resultados estão expressos em GI₅₀ (concentração de composto que causou uma inibição de 50% no crescimento celular) após contínua exposição de 48 horas. Os resultados representam a média ± SEM de 3-5 ensaios, realizados em duplicata, e obtidos em experiências independentes. ^aResultados de um ou dois experimentos independentes e realizados em duplicata. A doxorrubicina foi usada como controle positivo nas linhagens celulares tumorais humanas (GI₅₀: MCF-7 = 0.0428 ± 0.0082; NCI-H460 = 0.0940 ± 0.0087 e A375-C5 = 0.1142 ± 0.0070 µM).

A Figura 4.4 e Tabela 4.3 apresentaram, respectivamente, as estruturas dos compostos e os resultados obtidos com os flavonóides sobre o crescimento das linhagens celulares tumorais humanas ora testadas. Dentre os compostos analisados os compostos **25** e **30** foram os mais ativos, apresentando GI₅₀ menores que 11,57 µM para todas as linhagens celulares testadas. O composto **32** exibiu moderado efeito inibitório do crescimento das três linhagens celulares estudadas. Adicionalmente, os compostos **22**, **23**, **24** e **34** apresentaram um fraco efeito, enquanto os compostos **20**, **21**, **26**, **27**, **28**, **29**, **31** e **33** foram inativos em todas as linhagens testadas, mesmo na maior

concentração testada (150 μM). Ressalte-se, todavia, que o composto **26** apresentou GI_{50} de 120 μM e 110 μM nas linhagens celulares NCI-H460 e A375-C5 respectivamente.

Os flavonóides **24** e **25** são análogos diferindo apenas no anel C. A existência do grupo hidroxila em C-3 parece ser importante para a atividade inibitória do crescimento das três linhagens celulares avaliadas, uma vez que o composto **25** é dez vezes mais potente que o composto **24** nestas linhagens celulares. A fraca atividade antiproliferativa do composto **24** frente a linhagem celular MCF-7 foi previamente observada (POUGET *et al.*, 2001) corroborando os resultados aqui apresentados. Recentemente, as atividades citotóxicas de cinquenta e três flavonóides, incluindo a flavona (**24**), foram avaliadas frente às linhagens celulares tumorais TK-10 (células humanas de carcinoma de rim), MCF-7 e HT-29 (adenocarcinoma do cólon). Nesse trabalho o composto **24** também exibiu fraca atividade frente às linhagens testadas na concentração de 100 μM (CABRERA *et al.*, 2007). Em adição, CHANG e colaboradores (2008) mostraram que a flavona (**24**) apresenta valores de GI_{50} superiores a 100 μM para uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas, incluindo MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma da mama), LoVo e DLD-1 (carcinoma colorretal) e PC3 (câncer da próstata) utilizando, entretanto, o ensaio do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio].

Em relação a 3-hidroxiavona (**25**), KUNTZ e colaboradores (1999) relataram um fraco efeito citotóxico desta flavona sobre as linhagens celulares, Caco-2 (linhagem celular humana do câncer do cólon, IC_{50} 65,8 μM) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon, IC_{50} 58,6 μM). Além disso, BRUSSELMANS e colaboradores (2005) mostraram que este composto não afetou a síntese de lipídios em ambas as células tumorais, LNCaP (câncer de próstata) ou MDA-MB-231. No entanto recentemente, LIN e colaboradores (2007), mostraram que a 3-hidroxiavona (**25**) exibia uma atividade inibitória sobre E2 (17 β -estradiol)/ IGF-I (Fator de Crescimento Semelhante a Insulina) na proliferação de células MCF-7.

Neste trabalho, o composto 5,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (**26**) foi inativo sobre MCF-7 e apresentou fraca atividade sobre as linhagens celulares NCI-H460 e A375-C5. Por outro lado, um efeito inibitório moderado em células

HT-29 foi observado para o mesmo composto utilizando o ensaio MTT (HIRATA *et al.*, 2009). De qualquer modo, deve-se salientar que esta diferença pode estar relacionada com o fato do mecanismo de ação celular deste composto não estar expresso nas linhagens celulares tumorais estudadas no presente trabalho, pois foram comparados diferentes tipos de tumores e ensaios.

Os compostos **29** e **30** são estruturalmente semelhantes (Figura 4.4), porém, a 2,3',4,4',5',6-hexametoxichalcona (**30**) demonstrou ser um potente inibidor das linhagens celulares analisadas (GI_{50} menor que $10,57 \mu M$), ao passo que a flavanona (**29**) foi inativa contra todas as linhagens celulares mesmo na maior concentração utilizada ($150 \mu M$). O fechamento do anel C da flavanona (**29**) provavelmente seja responsável pela diminuição da atividade deste composto.

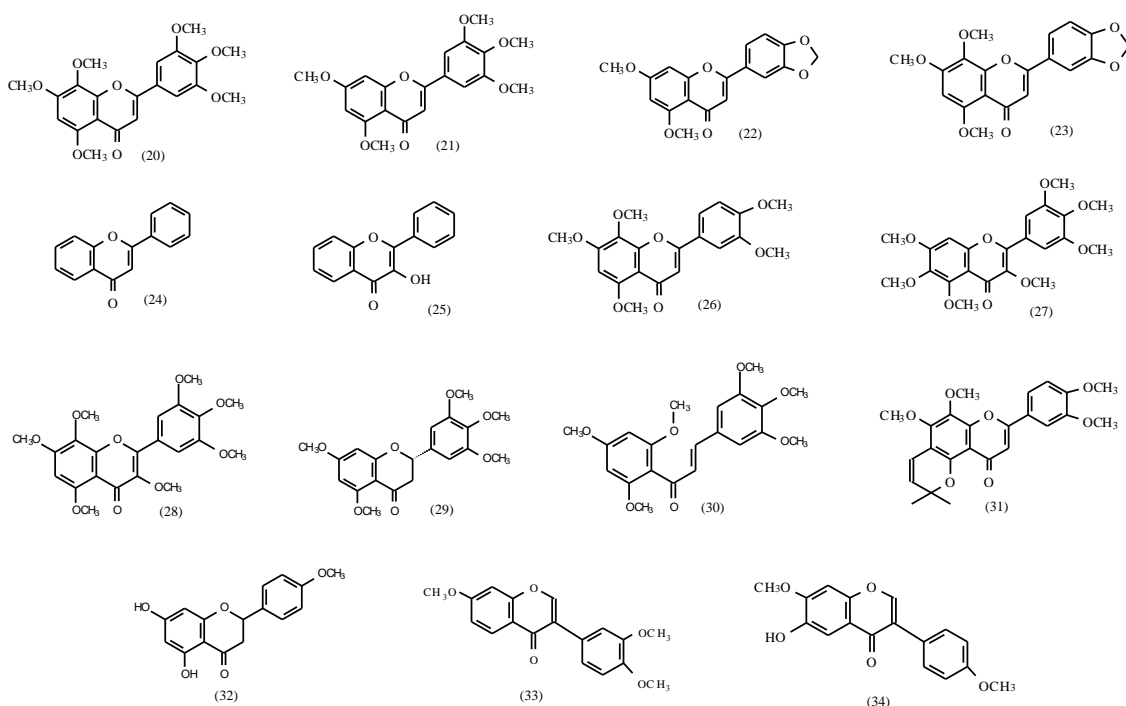


Figura 4.4: Estrutura química dos flavonóides.

Tabela 4.3: Efeito dos flavonóides no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas

Compostos	MCF-7	NCI-H460	A375-C5
	(mama)	(pulmão)	(melanoma)
GI ₅₀ (µM)			
20	> 150	> 150	> 150
21	> 150	> 150	> 150
22	94 ^a	94 ^a	68 ^a
23	140 ^a	110 ^a	81 ^a
24	77,00±4,00	67,67±5,36	75,67±7,22
25	8,29±1,08	5,40±0,80	6,84±2,54
26	> 150	120 ^a	110 ^a
27	> 150	> 150	> 150
28	> 150	> 150	> 150
29	> 150	> 150	> 150
30	10,57±0,43	10,15±0,69	6,77±0,55
31	> 150	> 150	> 150
32	29,50±3,50	35,00±1,00	32,50±2,50
33	> 150	> 150	> 150
34	84 ^a	94 ^a	96 ^a

Os resultados estão expressos em GI₅₀ (concentração de composto que causou uma inibição de 50% no crescimento celular) após contínua exposição de 48 horas. Os resultados representam a média ± SEM de 3-5 ensaios, realizados em duplicata, e obtidos em experiências independentes. ^aResultados de um ou dois experimentos independentes e realizados em duplicata. A doxorrubicina foi usada como controle positivo nas linhagens celulares tumorais humanas (GI₅₀: MCF-7 = 0.0428 ± 0.0082; NCI-H460 = 0.0940 ± 0.0087 e A375-C5 = 0.1142 ± 0.0070 µM).

As estruturas dos alcalóides estudados e os resultados obtidos com estes compostos sobre o crescimento das linhagens celulares avaliadas são apresentados na Figura 4.5 e Tabela 4.4, respectivamente. O composto

5',6'-[5-metil-5-(7-indol-5"-il-eteno-6,7-diil)-3-(metilprop-2-en-2-il)]-ciclopentano-5',6'-diil-indol (**43**) foi o mais ativo dos alcalóides avaliados, apresentando GI_{50} menor que 10,67 μ M para todas as linhagens celulares avaliadas. O composto **46** exibiu moderado efeito inibitório no crescimento das três linhagens celulares estudadas ao passo que os compostos **35**, **36**, **37**, **39**, **40**, **41**, **42**, **44** e **47** mostraram fraco efeito. Em adição os compostos **38** e **45** não exibiram efeitos no crescimento das células nas concentrações avaliadas. Ressalte-se, todavia, que o composto **38** apresentou GI_{50} de 94,0 μ M na linhagem celular A375-C5.

No presente trabalho o composto **35** exibiu valores de IC_{50} compreendidos entre 71,0 e 99,9 μ M para todas as linhagens celulares avaliadas. Todavia, esse mesmo composto foi inativo para uma série de linhagens celulares, dentre as quais A-549 (carcinoma de pulmão), HCT-8 (carcinoma ileocecal), RPMI-7951 (melanoma), KB, P-388 e L1210 (leucemia murina), na concentração de 10 μ g/mL (KUO *et al.*, 1993). Adicionalmente, o efeito citotóxico da rutaecarpina (**36**) foi previamente estudado em células A375-S2 (melanoma maligno humano), HeLa, MCF-7, THP-1 (leucemia aguda monocítica), L929 (fibrossarcoma murino). Os valores de IC_{50} da rutaecarpina contra estas cinco linhagens de células tumorais variou entre 150 e 239 μ M, com 24 horas de tratamento utilizando o ensaio do MTT (ZHANG *et al.*, 2004).

Os alcalóides **39** e **40** são similares diferindo apenas quanto ao grupo ligado ao nitrogênio. Assim, o N-metilflindersina (**40**), que apresenta um grupo metil ligado ao nitrogênio, é duas vezes mais ativo nas linhagens celulares MCF-7 e NCI-H460 e três vezes na linhagem A375-C5 do que a flindersina (**39**), que apresenta apenas um hidrogênio ligado ao nitrogênio. Tomados em conjunto, esses resultados permitem pressupor que a presença do grupo metil ligado ao nitrogênio seja importante para a atividade inibitória do crescimento em todas as três linhagens celulares estudadas. Investigando as propriedades citotóxicas de flindersina (**39**) em sete linhagens de células tumorais humanas, HeLa, HCT-116, HT-29, OVCAR-3 (adenocarcinoma de ovário), MCF-7, MDA-MB-231 e SKBR-3 (adenocarcinoma de mama), JANSEN e colaboradores (2006) observaram que esse composto é inativo na concentração de 100 μ M contra todas as linhagens avaliadas, exceto na

linhagem celular HeLa ($IC_{50} = 49,37 \pm 6,84. \mu M$) utilizando o método de cligavem do sal tetrazólio WST-1 (Roche Biomolecular) produzindo o sal de formazan.

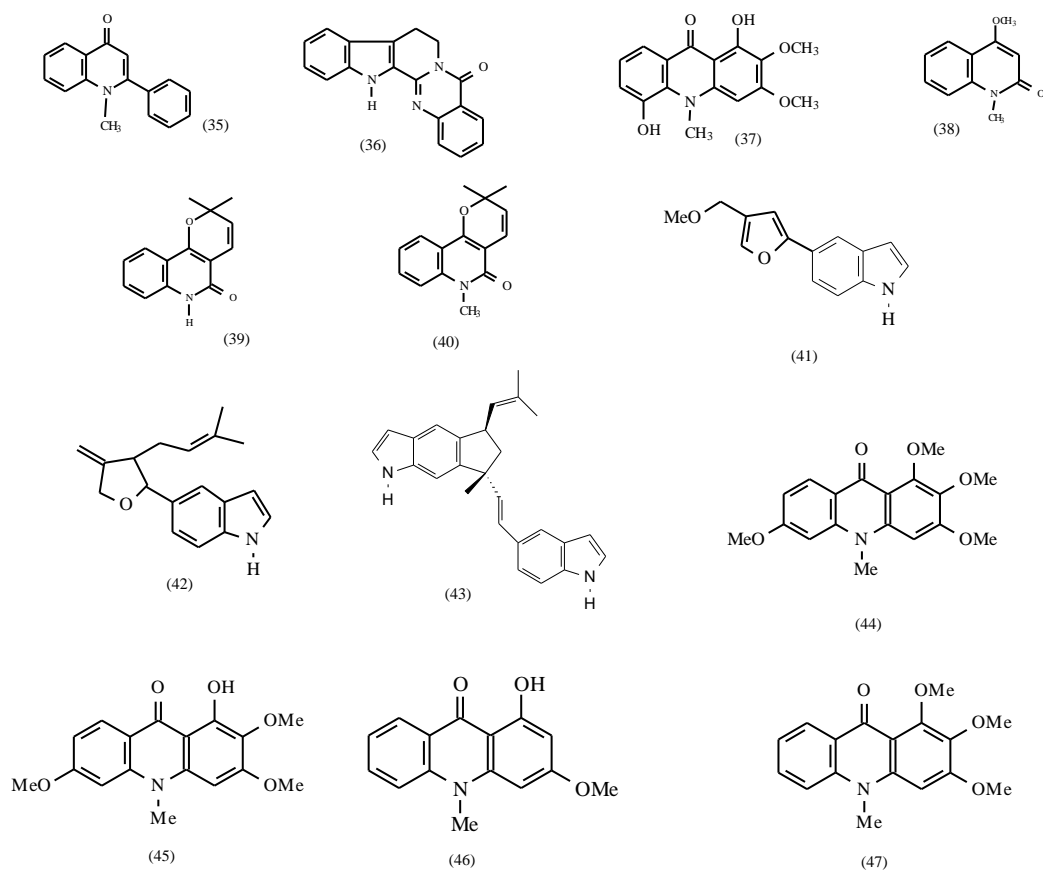


Figura 4.5: Estrutura química dos alcalóides.

Tabela 4.4: Efeito dos alcalóides no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas

Compostos	MCF-7	NCI-H460	A375-C5
	(mama)	(pulmão)	(melanoma)
GI ₅₀ (µM)			
35	71 ^a	99 ^a	74 ^a
36	110 ^a	100 ^a	63 ^a
37	110 ^a	52 ^a	52 ^a
38	> 150	> 150	94 ^a
39	113,00±8,77	121,00±9,00	140,00±10,00
40	56,00±2,08	59,00±6,00	43,33±6,57
41	87,33±4,84	83,33±1,20	77,67±2,33
42	61,00±6,11	61,33±3,53	52,33±0,88
43	10,67±0,33	9,85±0,13	9,27±0,37
44	58,00±0,00	45,00±9,00	37,50 ±7,50
45	> 150	> 150	> 150
46	27,00±2,00	19,50±0,5	25,5±3,50
47	82,00±2,00	80,00±3,00	62,00±6,00

Os resultados estão expressos em GI₅₀ (concentração de composto que causou uma inibição de 50% no crescimento celular) após contínua exposição de 48 horas. Os resultados representam a média ± SEM de 3-5 ensaios, realizados em duplicata, e obtidos em experiências independentes. ^aResultados de um ou dois experimentos independentes e realizados em duplicata. A doxorrubicina foi usada como controle positivo nas linhagens celulares tumorais humanas (GI₅₀: MCF-7 = 0.0428 ± 0.0082; NCI-H460 = 0.0940 ± 0.0087 e A375-C5 = 0.1142 ± 0.0070 µM).

A estrutura das cumarinas estudadas é apresentada na Figura 4.6 e os resultados obtidos com estes compostos sobre o crescimento das linhagens celulares avaliadas são apresentados na Tabela 4.5. A siderina (**48**) foi a cumarina mais ativa dentre as testadas, apresentando GI₅₀ entre 3,60 µM

e 6,33 μM . Adicionalmente, os compostos **49** e **53** exibiram fraco efeito, enquanto os compostos **50**, **51**, **52**, **54** e **55** foram inativos frente às linhagens celulares testadas, exceção feita ao composto **55** que exibiu GI_{50} de 85,0 μM para a linhagem celular A375-C5 (Tabela 4.5).

Diferentes atividades biológicas têm sido relatadas para a siderina (**48**) dentre elas antibacteriana contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri* (CHOWDHURY *et al.*, 2003) além da atividade inibitória do fotossistema II em tilacóides de espinafre (VEIGA *et al.*, 2007). Em relação à sua atividade citotóxica, a siderina foi previamente relatada apresentando GI_{50} 17 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem celular tumoral KB, mas foi considerada ativa na maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$) para as linhagens celulares NCI-H187, MCF-7 e Vero (fibroblastos de rim de macaco verde Africano) utilizando o ensaio de microplaca proteica verde fluorescente (ISAKA *et al.*, 2009). Curiosamente, a siderina (**48**) é, dentre os compostos aqui examinados, um dos mais ativos (Tabela 4.5).

As cumarinas xantiletina (**49**) e 5-metoxiseselina (**50**) previamente estudadas em linhagens de células K562, Raji, Jurkat (eritroleucemia), Calu-1 (carcinoma do pulmão humano) e HeLa (LIN *et al.*, 2003) apresentaram valores de GI_{50} superiores a 100 μM , contra todas as linhagens celulares, utilizando o ensaio de incorporação de [^3H]-timidina.

Embora a xantotoxina (**52**) não tenha apresentado atividade frente a todas as linhagens celulares testadas neste trabalho mesmo na maior concentração utilizada (150 μM), vários estudos relatam suas atividades relacionadas ao câncer (SUZUKI *et al.*, 2006, HAN *et al.*, 2008, HAFEZ *et al.*, 2009, VIA *et al.*, 2009).

Cumprе ressaltar que, diferentes resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa sugerem que os resultados de tais análises devem ser consideradas com relativa cautela. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que muita pesquisa é ainda necessária para o completo entendimento e elucidação dos mecanismos capazes de mediar a ação desses compostos.

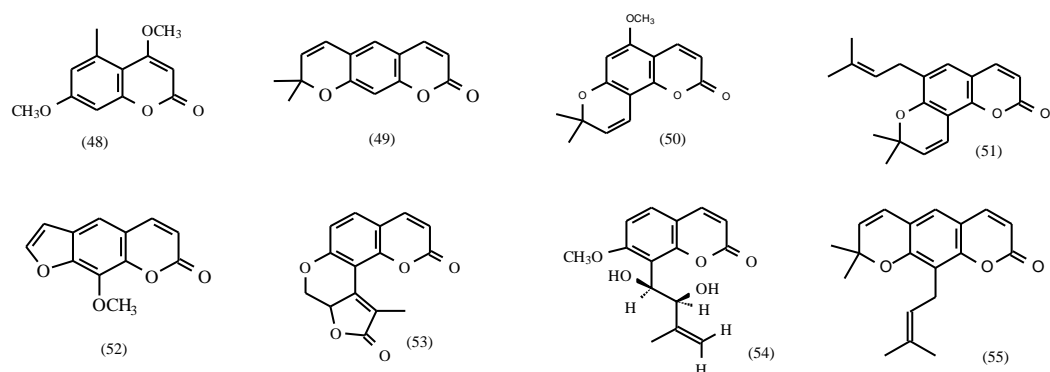


Figura 4.6: Estrutura química das cumarinas

Tabela 4.5: Efeito das cumarinas no crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas.

Compostos	MCF-7	NCI-H460	A375-C5
	(mama)	(pulmão)	(melanoma)
GI ₅₀ (µM)			
48	6,33±0,43	3,73±0,20	3,60±0,10
49	93 ^a	110 ^a	110 ^a
50	> 150	> 150	> 150
51	> 150	> 150	> 150
52	> 150	> 150	> 150
53	120 ^a	120 ^a	110 ^a
54	> 150	> 150	> 150
55	> 150	> 150	85 ^a

Os resultados estão expressos em GI₅₀ (concentração de composto que causou uma inibição de 50% no crescimento celular) após contínua exposição de 48 horas. Os resultados representam a média ± SEM de 3-5 ensaios, realizados em duplicata, e obtidos em experiências independentes. ^aResultados de um ou dois experimentos independentes e realizados em duplicata. A doxorrubicina foi usada como controle positivo nas linhagens celulares tumorais humanas (GI₅₀: MCF-7 = 0.0428 ± 0.0082; NCI-H460 = 0.0940 ± 0.0087 e A375-C5 = 0.1142 ± 0.0070 µM).

4.2- Avaliação dos efeitos dos compostos mais potentes na distribuição do ciclo celular e na indução da apoptose em células de NCI-H460

As células utilizam o ciclo celular para a sua reprodução. A resultante duplicação celular constitui uma resposta às necessidades do crescimento durante o desenvolvimento do organismo ou a reparação dos tecidos lesionados. O ciclo celular é dividido em 4 fases (Figura 4.7). A fase G₁ (Gap 1) é onde ocorre o crescimento e preparação para a replicação do DNA. Nessa fase há um ponto de checagem, se caso as células tenham os nutrientes necessários, podem continuar, se não ficam interrompidas na fase G₀. A fase S (Síntese) é onde ocorre a replicação do DNA. Na fase G₂ (Gap 2) ocorre o crescimento e preparação para a mitose e a fase M (Mitose) é onde ocorre a separação dos cromossomas seguida da divisão da célula (citocinese).

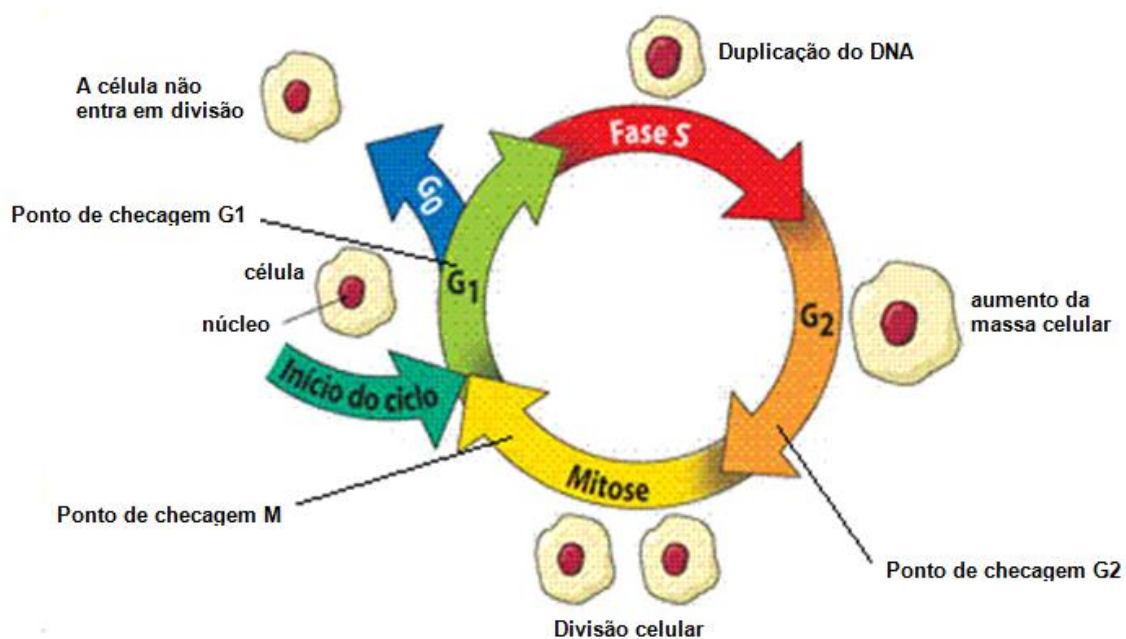


Figura 4.7: Ciclo celular.

Nesse trabalho os efeitos dos compostos mais ativos ($GI_{50} \leq 12 \mu M$) foram avaliados sobre a distribuição do ciclo celular e indução da apoptose em células NCI-H460. As células NCI-H460 foram tratadas com os compostos **4, 11, 14, 15, 25, 30 e 48** em suas respectivas concentrações de GI_{50} (valores de GI_{50} para NCI-H460 apresentados nas Tabelas 4.1 a 4.5), por 48 horas e

depois processadas para análise do ciclo celular. Em suma, os resultados mostraram que a maioria dos compostos testados afetaram a distribuição do ciclo celular normal das células NCI-H460 (Figuras 4.8 e 4.9).

Assim, os compostos **4** e **30** induziram uma parada do ciclo celular na fase G1, provocando uma diminuição nas porcentagens de células nas fases S e G2/M do ciclo celular de NCI-H460. Por outro lado, após o tratamento com o composto **11**, a progressão do ciclo celular foi interrompida na fase S, promovendo uma diminuição da porcentagem de células na fase G1 do ciclo celular. Em adição, a incubação com os compostos **15** e **48** culminou com um acúmulo de células nas fases S e G2/M do ciclo celular, aliado a uma concomitante diminuição na porcentagens de células em G1. Ademais, fortes indícios de que os compostos **4**, **11**, **15**, **25**, **30** e **48** induzem a apoptose devido ao aumento da população de células na sub-G1 (células com grande número de pequenos fragmentos de DNA) quando comparados com o controle. Portanto, um ensaio de apoptose específica foi posteriormente realizado.

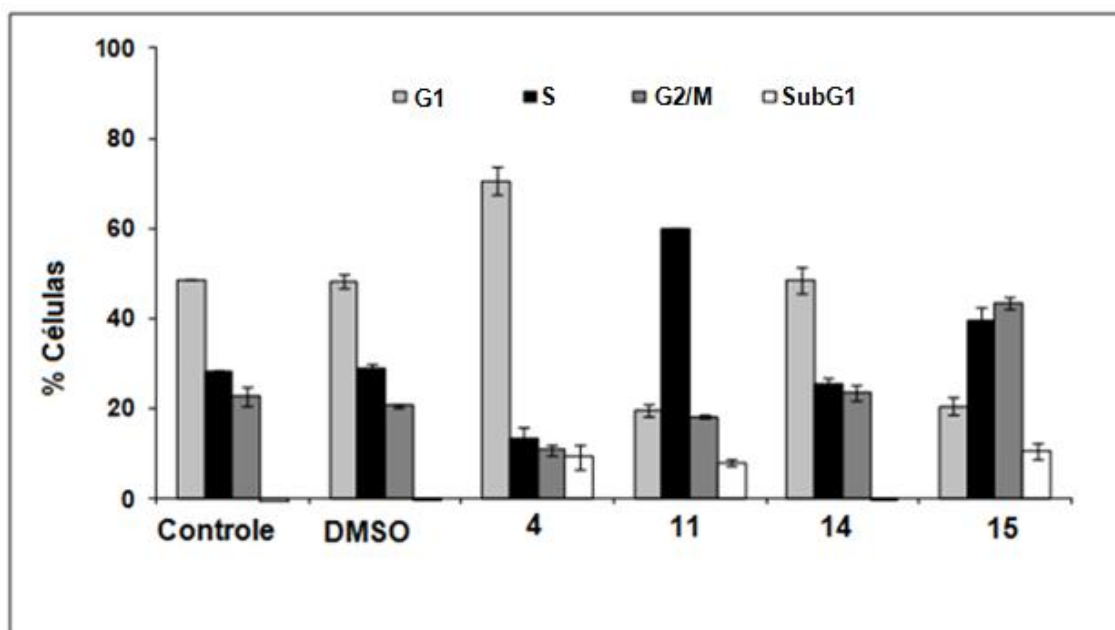


Figura 4.8: Distribuição do ciclo celular de células NCI-H460 após 48 horas de tratamento sem compostos (controle), DMSO (solvente como controle) ou na presença dos compostos **4**, **11**, **14** ou **15** na concentração GI_{50} específica para cada um dos compostos. Valores representam a média \pm desvio padrão de ao menos três experimentos independentes.

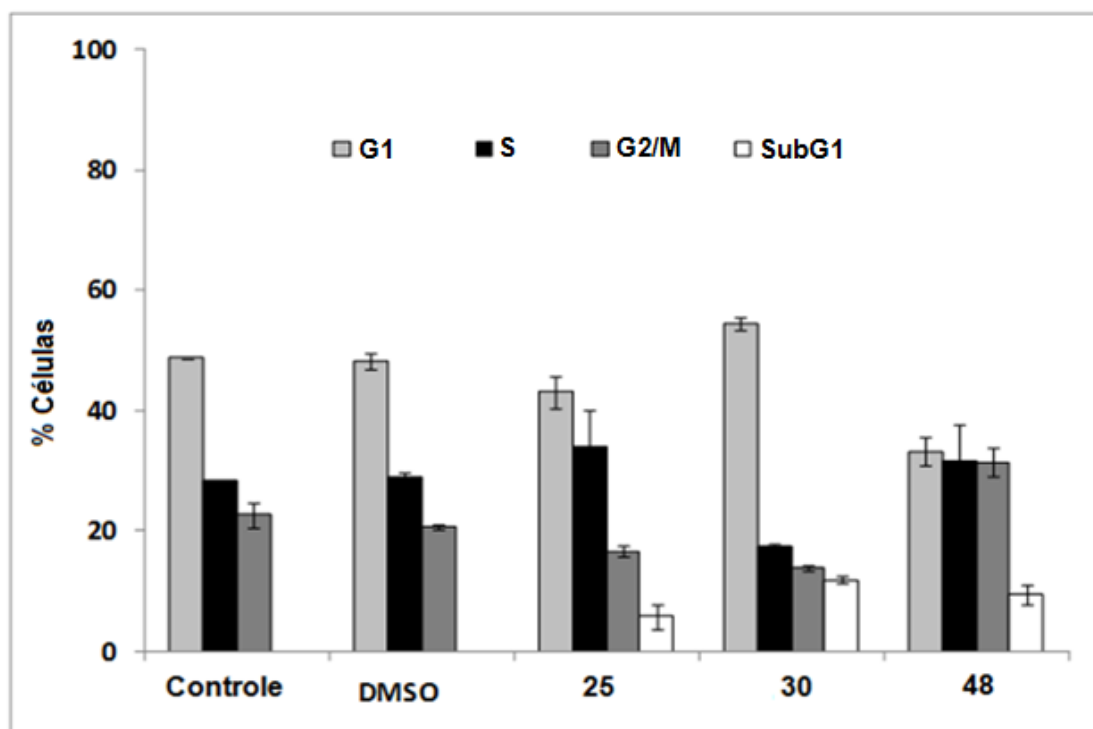


Figura 4.9: Distribuição do ciclo celular de células NCI-H460 após 48 horas de tratamento sem compostos (controle), DMSO (solvente como controle) ou na presença dos compostos **25**, **30** ou **48** na concentração GI_{50} específica para cada um dos compostos. Valores representam a média \pm desvio padrão de ao menos três experimentos independentes.

O ensaio da Annexin-V-FITC/PI foi utilizado para determinar as porcentagens de células em apoptose precoce e tardia por citometria de fluxo, após o tratamento das células NCI-H460 com os compostos **4**, **11**, **14**, **15**, **25**, **30** e **48**, resultados esses apresentados na Tabela 4.6 para todos os compostos testados. A anexina V é uma proteína de ligação aos fosfolípidos dependente do cálcio, que apresenta especial afinidade para a fosfatidilserina. Um dos principais acontecimentos que caracterizam um estágio inicial de apoptose é a deslocação de fosfatidilserina da camada interna para a camada externa da membrana citoplasmática. Assim, a anexina ao ligar-se à fosfatidilserina exposta na superfície celular vai identificar células num estágio inicial de apoptose e a determinação da externalização da fosfatidilserina foi usada para quantificar os níveis de apoptose por citometria de fluxo.

O tratamento com os compostos **4** e **14** exibiram baixas porcentagens de células em apoptose precoce ou tardia em relação ao controle.

Quando as células NCI-H460 foram tratadas por 48 horas com o composto **11** na concentração de GI_{50} , os resultados revelaram porcentagens de 47,2% de células apoptóticas vs. 12,6% do controle (ou 11,2% no controle DMSO). O composto **15** foi o mais eficiente promovendo 80,3 % de morte celular por apoptose após 48 horas de tratamento das células na concentração de GI_{50} . O composto **30** foi o segundo mais eficaz causando cerca 60% de células apoptóticas nas células tratadas com esse composto versus 12,6% do controle (ou 11,2% no controle DMSO).

Adicionalmente, os compostos **25** e **48** induziram cerca de 30% de morte celular por apoptose, um aumento quase três vezes maior que à quantidade de células em apoptose encontrada nos controles.

Tabela 4.6: Indução de apoptose em células de NCI-H460 após 48 horas de tratamento com os compostos **4**, **11**, **14**, **15**, **25**, **30** e **48** na concentração de GI_{50} .

Compostos	% células em apoptose precoce	% células em apoptose tardia	% total de células em apoptose
Controle	5,2 ± 0,9	7,3 ± 2,0	12,6 ± 2,6
DMSO	5,0 ± 1,3	6,2 ± 1,8	11,2 ± 1,2
4	7,8 ± 1,2	6,5 ± 1,9	14,3 ± 2,8
11	30,5 ± 3,2	16,7 ± 4,2	47,2 ± 3,7
14	7,3 ± 0,7	7,9 ± 2,9	15,2 ± 2,6
15	43,5 ± 6,2	36,9 ± 8,6	80,3 ± 4,5
25	19,8 ± 2,8	10,8 ± 2,7	30,6 ± 1,9
30	36,9 ± 7,6	22,6 ± 4,7	59,4 ± 4,1
48	16,6 ± 11,1	13,8 ± 9,6	30,4 ± 19,4

Os resultados foram determinados por citometria de fluxo utilizando o ensaio da Annexin V-FITC/PI. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

5-Conclusões

Oito triterpenos, um esterol, dez limonóides, quinze flavonóides, treze alcalóide e oito cumarinas isolados das famílias Meliaceae e Rutaceae, foram avaliados quanto ao crescimento de três linhagens celulares tumorais humanas, MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro de células não pequenas de pulmão) e A375-C5 (melanoma) pelo método do SRB. Em resumo, os compostos **4**, **11**, **14**, **15**, **25**, **30**, **43** e **48** foram os mais promissores na inibição do crescimento de todas as linhagens celulares tumorais estudadas, exibindo valores de GI_{50} entre 2,6 μ M e 11,67 μ M.

A partir da análise do perfil de ciclo celular em células NCI-H460, foi possível concluir que os compostos **4** e **30** induziram uma interrupção na progressão do ciclo celular na fase G1, os compostos **11** e **25** provocaram uma parada do ciclo celular na fase S e os compostos **15** e **48** nas fases S e G2/M. Por outro lado, o composto **14** não afetou o perfil de ciclo celular destas células. Além disso, a análise da porcentagem de células em apoptose por citometria de fluxo revelou que todos os compostos foram capazes de aumentar os níveis de apoptose. Os compostos **4** e **14** originaram um aumento relativamente pequeno na porcentagem de células em apoptose, conquanto os compostos **11**, **15**, **25**, **30** e **48** foram mais potentes apresentando porcentagens de 47,2%, 80,3%, 30,6%, 59,4% e 30,4% de células apoptóticas vs. 12,6% do controle (ou 11,2% no controle DMSO), respectivamente.

Os compostos **15** (cedrelona B, um limonóide) e **48** (siderina, uma cumarina) mostraram ser os mais potentes inibidores no crescimento de todas as linhagens celulares estudadas, apresentando GI_{50} abaixo de 6,33 μ M, tornando-se, dessa maneira, interessantes compostos para estudos futuros com o intuito de se investigar seu potencial como agentes antitumorais e ainda para avaliação da toxicidade celular.

6- Referências Bibliográficas

- ABDELGALEIL, S.; IWAGAWA, T.; DOE, M.; NAKATANI, M. Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis*. *Fitoterapia*, **75**: 566-572, 2004.
- ALEXANDROVA, R.; ALEXANDROV, I.; VELCHEVA, M.; VARADINOVA, T. Phytoproducts and Cancer. *Exp. Pathol. Parasitol.*, **4**: 15-26, 2000.
- AMBROZIN, A. R. P.; LEITE, A. C.; BUENO, F. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; BUENO O. C.; DA SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI, M. Jr. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, **17**: 542-547, 2006.
- ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R.; DONSKOV, N.; KUBO, I. Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilalis*. *Entomol. Exp. Appl.*, **43**: 221-226, 1987.
- BEIRA, F. T. A. Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de la planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn. Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Barcelona, 2000. Tesis (Doctor em Farmacia).130 p.
- BRANDT, G.; SCHMIDT, M. D.; PRISINZANO, TE; BLAGG, B. S. J. Gedunin, a novel HSP90 inhibitor: semisynthesis of derivatives and preliminary structure-activity relationships. *J. Med. Chem.*, **51**: 6495-6502, 2008.
- BRUSSELMANS, K.; VROLIX, R.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.*, **280**: 5636–5645, 2005.
- CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A. MONGE, A.; CERAIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; CERECETTOA, H.; GONZALEZA, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**: 3356–3367, 2007.
- CHANG, H.; MI, H. C. M.; LING, W.; ZHU, J.; ZHANG, Q.; WEI, N.; ZHOU, Y.; TANG, Y.; YUAN, J. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*. *Arch. Pharm. Res.*, **31**: 1137-1144, 2008.
- CHOWDHURY, R.; HASAN, C. M.; RASHID, M. A. Antimicrobial activity of *Toona ciliata* and *Amoora rohituka*. *Fitoterapia*, **74**: 155-158, 2003.
- COLLING, J.; GROENEWALD, JH.; MAKUNGA, N. P. Genetic alterations for increased coumarin production lead to metabolic changes in the medicinally important *Pelargonium sidoides* DC (Geraniaceae). *Metab. Eng.*, **12**: 561-572, 2010.
- CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharm.*, **100**: 72-79, 2005.

- DUARTE, R. A.; MELLO, E. R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V. D. S.; SILVA, D. H. S. E.; REGASINI, L. O.; SILVA, T. G. A.; DE MORAIS, M. C. C.; XIMENES, V. F.; SOARES, C. P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. *Tumor Biology*, **31**: 513-522, 2010.
- DUKE, S. O.; ROMAGNI, J. G.; DAYAN, F. E. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection*, **19**: 583-589, 2000.
- EL-READI, M. Z.; HAMDAN, D.; FARRAG, N.; EL-SHAZLY, A.; WINK, M. Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from *Citrus* species in human colon and leukaemia cell lines. *Europ. J. Pharmac.*, **626**: 139-145, 2010.
- GARCIA-ARGAEZ, A. N.; APAN, T. O. R.; DELGADO, H. P.; VELAZQUEZ, G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on tpa ear mice model. *Planta Med.*, **66**: 279-281, 2000.
- GOPALAKRISHNAN, G.; SINGH, N. D. P.; KASINATH, V.; MALATHI, R.; RAJAN, S. S. Photooxidation of cedrelone, a tetranortriterpenoid from *Toona ciliata*. *Photochem. Photobiol.*, **72**: 464-466, 2000.
- GOVINDACHARI, T. R.; SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; MASILAMANI, S.; BANUMATHI, B. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. *Fitoterapia*, **71**: 317-320, 2000.
- HAFEZ, O. M. A.; AMIN, K. M.; ABDEL-LATIF, N. A.; MOHAMED, T. K.; AHMED, E. Y.; MAHER, T. Synthesis and antitumor activity of some new xanthotoxin derivatives. *Europ. J. Med. Chem.*, **44**: 2967–2974, 2009.
- HAN, H. Y.; WEN, P.; LIU, H. W.; WANG, N. L.; YAO, X. S. Coumarins from *Campylotropis hirtella* (FRANCH.) SCHINDL. and their inhibitory activity on prostate specific antigen secreted from LNCaP cells. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**: 1338-1341, 2008.
- HIRATA, T.; FUJII, M.; AKITA, K.; YANAKA, N.; OGAWA, K.; KUROYANAGI, M.; HONGO D. Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**: 25, 2009.
- HU, J.; YE, H. Y.; FU, A.; CHEN, X. A.; WANG, Y. S.; CHEN, X. C.; YE, X.; XIAO, W. J.; DUAN, X. M.; WEI, Y. Q.; CHEN, L. J. Deguelin-an inhibitor to tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by downregulation of vascular endothelial cell growth factor-D in lung tumor model. *Int. J. Cancer*, **127**: 2455-2466, 2010.
- HU, Y.; HOU, T.; XIN, H.; ZHANG, Q.; ZHENG, H.; RAHMAN, K.; QIN, L. Estrogen-like activity of volatile components from *Vitex rotundifolia* L. *Indian J. Med. Res.*, **126**: 68-72, 2007.
- ISAKA, M.; YANGCHUM, A.; RACHTAWEE, P.; KHOYAIKLANG, P.; BOONYUEN, N.; LUMYONG, S. Dihydronaphthalenones from the endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. BCC 8200. *Phytochem. Letters*, **2**: 207-210, 2009.

- JANSEN, O.; AKHMEDJANOVA, V.; ANGENOT, L.; BALANSARD, G.; CHARIOT, A.; OLLIVIER, E.; TITS, M.; FRÉDÉRICH, M. Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. *J. Ethnopharmac.*, **105**: 241-245, 2006.
- KASHIWADA, Y.; SEKIYA, M.; YAMAZAKI, K.; IKESHIRO, Y.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; KITAGAWA, S.; TAKAISHI, Y. Triterpenoids from the floral spikes of *Betula platyphylla* var. *japonica* and their reversing activity against multidrug-resistant cancer cells. *J. Nat. Prod.*, **70**: 623-627, 2007.
- KOUL, O. & ISMAN, M. B. Toxicity of the allelochemical cedrelone to noctuid larvae. *Entomol. Exp. Appl.*, **64**: 281-287, 1992.
- KOUL, O.; SING, G.; SINGH, R.; DANIEWSKI, W. M.; BERLOZECKI, S. Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *J. Biosc.*, **29**: 409-416, 2004.
- KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.*, **38**: 133-142, 1999.
- KUO, S. C.; LEE, H. Z.; JUANG, J. P.; LIN, Y. T.; WU, T. S.; CHANG, J. J.; LEDNICER, D.; PAULL, K. D.; LIN, C. M.; HAMEL, E.; LEE, K. H. Synthesis and cytotoxicity of 1,6,7,8-substituted 2-(4'-Substituted phenyl)-4-quinolones and related compounds: Identification as antimetabolic agents interacting with tubulin. *J. Med. Chem.*, **36**: 1146-1156, 1993.
- LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids - a review. *Biomed. Pharmacother.*, **56**: 296-, 2002.
- LEE, C. L.; CHIANG, L. C.; CHENG, L. H.; LIAW, C. C.; EL-RAZEK, M. H. A.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Influenza A (H1N1) Antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *J. Nat. Prod.*, **72**: 1568-1572, 2009.
- LEWIS, J. R. "Biological activity of some Rutaceous." IN: Waterman, P. G. & Grundon, M. F. (Eds). *Chemistry and chemical taxonomy of the Rutales*, London, Academic Press, 1983, p. 301-318.
- LIN, C.; YANG, L.; SHEN, S.; CHEN, Y. IGF-I Plus E2 Induces Proliferation via Activation of ROS-Dependent ERKs and JNKs in Human Breast Carcinoma Cells. *J. Cellular Phys.*, **212**: 666-674, 2007.
- LIN, L. C.; YANG, L. L.; CHOU, C. J. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry*, **62**: 619-622, 2003.
- MANEERAT, W.; LAPHOOKHINEO, S.; KOYSOMBOON, S.; CHANTRAPROMMA, K. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. *Phytomedicine*, **15**: 1130-1134, 2008.
- MANNERS, G. D. *Citrus* limonoids: analysis, bioactivity and biomedical prospects. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 8285-8294, 2007.

- MARON, D. J. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Curr. Atheroscler. Rep.*, **6**: 73-78, 2004.
- MIN, H. Y.; CHUNG, H. J.; KIM, E. H.; KIM, S.; PARK, E. J.; LEE, S. K. Inhibition of cell growth and potentiation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-induced apoptosis by a phenanthroindolizidine alkaloid antofine in human colon cancer cells. *Biochem. Pharm.*, **80**: 1356-1364, 2010.
- MOJZISOVA, G. & KUČHTA, M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol. Res.*, **50**: 529-535, 2001.
- MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D. Feasibility of high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.*, **83**: 757-766, 1991.
- NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr. Cancer*, **50**: 1-7, 2004.
- NGO, N. T.; NGUYEN, V. T.; VO, H. V.; VANG, O.; DUUS, F.; THUY-DUONG HO, T.; PHAM, H. D.; NGUYEN, L. H. Cytotoxic Coumarins from the Bark of *Mammea siamensis*. *Chem. Pharm.*, **58**: 1487-1491, 2010.
- OKOYE, F. B. C.; OSADEBE, P. O.; PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R. A.; NWORU, C. S.; ESIMONE, C. O. Anti-inflammatory and membrane-stabilizing stigmastane steroids from *Alchornea floribunda* leaves. *Planta Med.*, **76**: 172-177, 2010.
- PALMEIRA, A.; PAIVA, A.; SOUSA, E.; SECA, H.; ALMEIDA, G. M.; LIMA, R. T.; FERNANDES, M. X.; PINTO, M.; VASCONCELOS, M. H. Insights into the in vitro antitumor mechanism of action of a new pyranoxanthone. *Chem. Biol. Drug Des.*, **76**: 43-58, 2010.
- PATRA, S. K. Ras regulation of DNA-methylation and cancer. *Experim. Cell Reas.*, **314**: 1193-1201, 2008.
- PHONGMAYKIN, J.; KUMAMOTO, T.; ISHIKAWA, T.; SUTTISRI, R.; SAIFAH E. A new sesquiterpene and other terpenoid constituents of *Chisocheton penduliflorus*. *Arch. Pharm. Res.*, **31**: 21-27, 2008.
- POUGET, C.; LAUTHIER, L.; SIMON, A.; FAGNERE, C.; BASLY, J. P.; DELAGE, C.; CHULIA, A. J. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**: 3095-3097, 2001.
- PUDHOM, K.; SOMMIT, D.; NUCLEAR, P.; NGAMROJANAVANICH, N.; PETSOM, A. Moluccensins H-J, 30-ketophragmalin limonoids from *Xylocarpus moluccensis*. *J. Nat. Prod.*, **73**: 263-266, 2010.
- QIU S. X.; HUNG, N.; XUAN, L. T.; GU, J. Q.; LOBKOVSKY, E.; KHANH, T. C.; SOEJARTO, D. D.; CLARDY, J.; PEZZUTO, J. M.; DONG, Y.; TRI, M. V.; HUONG, L. M.; FONG, H. H. S. A pregnane steroid from *Aglaiia lawii* and structure confirmation of cabraleadiol monoacetate by X-ray crystallography. *Phytochemistry*, **56**: 775-780, 2001.

- RÍOS J. L. Effects of triterpenes on the immune system. *J. Ethnopharmacol.*, **128**: 1-14, 2010.
- ROSS, S. A.; KRISHNAVEN, K.; RADWAN, M. M.; TAKAMATSU, S.; BURANDT, C. L. Constituents of *Zanthoxylum flavum* and their antioxidant and antimalarial activities. *Nat. Prod. Comm.*, **3**: 791-794, 2008.
- RUIZ-MARCIAL, C.; CHILPA, R. R.; ESTRADA, E.; REYES-ESPARZA, J.; FARIÑA, G.; G.; RODRÍGUEZ-FRAGOSO. L. Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *J. Pharm. Pharmacol.* **59**: 719–725, 2007.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**: 1107-1112, 1990.
- SUN, L.; VEITH, J. M.; PERA, P.; BERNACKI, R. J.; OJIMA, I. Design and synthesis of de novo cytotoxic alkaloids by mimicking the bioactive conformation of paclitaxel. *Bioorg. Med. Chem.*, **18**: 7101-7112, 2010.
- SURESH, G.; GOPALAKRISHNAN, G.; WESLEY, S. D.; SINGH, N. D. P.; MALATHI, R.; RAJAN, S. S. J. Insect antifeedant activity of tetranortriterpenoids from the Rutales. A perusal of structural relations. *Agric. Food Chem.*, **50**: 4484-4490, 2002.
- SUZUKI, M.; NAKAGAWA-GOTO, K.; NAKAMURA, S.; TOKUDA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; KOZUKA, M.; NISHINO, H.; LEE, K. H. Cancer Preventive Agents. Part 5. Anti-tumor-Promoting Effects of Coumarins and Related Compounds on Epstein-Barr Virus Activation and Two-stage Mouse Skin Carcinogenesis. *Pharm. Biol.*, **44**: 178–182, 2006.
- TOHGE, T. & FERNIE, A. R. Combining genetic diversity, informatics and metabolomics to facilitate annotation of plant gene function. *Nat. Protoc.*, **5**: 1210-1227, 2010.
- UDDIN, S. J.; NAHAR, L.; SHILPI, J. A.; SHOEB, M.; BORKOWSKI, T.; GIBBONS, S.; MIDDLETON, M.; BYRES, M.; SARKER, S. D. Gedunin, a limonoid from *Xylocarpus granatum*, inhibits the growth of CaCo-2 colon cancer cell line in vitro. *Phytother. Res.*, **21**: 757-761, 2007.
- VALENTE, S.; BANA, E.; VIRY, E.; BAGREL, D.; KIRSCH, G. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**: 5827-5830, 2010.
- VEIGA, T. A. M.; GONZÁLES-VÁZQUEZ, R.; OIANO NETO, J.; DA SILVA, M. F. G. F.; KING-DÍAZ, B.; LOTINA-HENNSSEN, B. Siderin from *Toona ciliata* (Meliaceae) as photosystem ii inhibitor on spinach thylakoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **465**: 38–43, 2007.
- VIA, L. D.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, J. C.; PÉREZ-MONTOTO, L. G.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; MAGNO, S. M.; GIA, O. A new psoralen derivative with enlarged antiproliferative properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**: 2874–2876, 2009.

- VIEGAS, C.; BOLZANE, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, **29**: 326-337, 2006.
- VIEIRA, P. C. & KUBO, I. Moluscicidal quinoline alkaloids from *Galipea bracteata*. *Phytochemistry*, **29 (3)**: 813-815, 1990.
- WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DI STASI, L. C. Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Chemico-Biological Inter.*, **186**: 211-218, 2010.
- XU, H.; YAO, Y.; SMITH, L. P.; NA, V. Micro RNA-26a-mediated regulation of interleukin-2 expression in transformed avian lymphocyte lines. *Cancer Cell Int.*, **10**: 15-21, 2010.
- YANG, D. P.; GU, T. W.; WANG, T.; TANG, Q. J.; MA, C. Y. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**: 1430-1434, 2010.
- ZHANG A. Y.; QI-HUI ZHANG B; LI-JUN WU B; SHIN-ICHI TASHIRO C; SATOSHI ONODERA C; TAKASHI IKEJIMA. Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **6**: 19–27, 2004.