

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia



**PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS
BRUTOS DAS SEMENTES DE *Annona muricata* L. E
Annona squamosa L. ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.**

Milena Duarte Lima

Dissertação apresentada
ao PPGQB da Universidade Federal
de Alagoas como parte dos requisitos
necessários para obtenção do título de
Mestre em Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió, julho de 2007

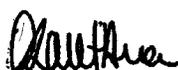


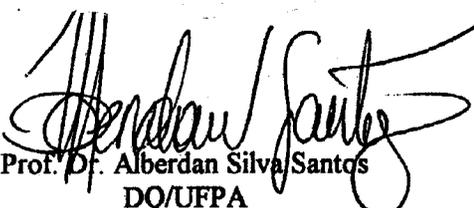
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

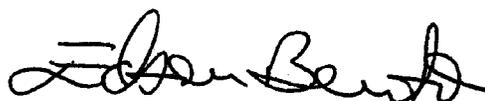
Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

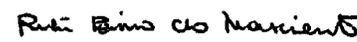
Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Milena Duarte Lima, intitulada: **"PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS DE ANNONA MURICATA L. E ANNONA SQUAMOSA L. ATRAVÉS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA"**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 06 de julho de 2007, às 14h na sala de Multimeios do bloco 13 da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana
Orientador – IQB/UFAL


Prof. Dr. Alberdan Silva Santos
DQ/UFPA


Prof. Dr. Edson de Souza Bento
IQB/UFAL


Prof. Dr. Ruth Rufino do Nascimento
IQB/UFAL

"Se vi mais longe foi por me erguer sobre os ombros de gigantes."

Isaac Newton

Dedico este trabalho a
Dennis Imbroisi
e a minha filha Ana Beatriz.

Este trabalho contou com o apoio
financeiro das seguintes instituições:

Universidade Federal de Alagoas,
CAPES, CNPq e FAPEAL

A todos o meu muito obrigada.

Agradecimentos

A Deus e a todos que de forma direta e indireta contribuíram para execução deste trabalho e em especial:

A minha família pelo exemplo de amor e dignidade.

Ao Prof. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana pelos ensinamentos e orientação, além da seriedade com que conduziu este trabalho.

Ao amigo Daniel de Melo Silva pelo incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais: Edjane, Ana Lucila, Luciana, Amélia, Emília, Cristiane, Beatriz, Natália, Monique, Samila, Williams, Élica, Rose, João, Rui, André, Jéferson, Carlos e Edilson.

A Prof. Quezia B. Cass pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelo rico aprendizado em cromatografia líquida e principalmente pelo encorajamento, amizade e preocupação, durante minha passagem por seu laboratório.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE da UFSCar que muito me ajudaram na realização deste trabalho e que me proporcionaram uma agradável convivência: Ângela, Vanessa, Alexandre, Bianca, Carmen, Lúcia, Marcela, Mariana, Fernando, Fernando 24, Roberta, Juliana, Kênia, Patrícia, Tiago.

Aos colegas do Laboratório de Síntese (LASO) pelo uso do laboratório e pelos bons momentos proporcionados: Carmen, Cley, Chico, Nívea, Roberta e Will.

A todos os professores do Instituto de Química e Biotecnologia, pela formação acadêmica.

1. INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL	1
1.1. Piretróides	4
1.2. Rotenóides	7
1.3. Rianóides	10
1.4. A busca por novos inseticidas naturais	10
2. ESPÉCIES VEGETAIS	12
2.1. Família Annonaceae	12
2.2. Acetogeninas de Annonaceae	12
2.2.1. Classificação das acetogeninas	13
2.2.2. Atividades biológicas	15
2.2.3. Relação estrutura x atividade	16
2.3. Gênero <i>Annona</i>	17
2.4. <i>Annona squamosa</i> L.	17
2.5. <i>Annona muricata</i> L.	19
3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	20
3.1. CLAE X CG	21
3.2. Instrumentação	21
3.3. Modos de Separação	23
3.3.1. Cromatografia de fase normal (CFN)	23
3.3.2. Cromatografia de fase reversa (CFR)	23
3.3.2.1. Triângulo de seletividade de solventes	31

3.3.3. Cromatografia de compostos iônicos	34
3.3.4. Cromatografia de troca iônica	34
3.3.5. Cromatografia de exclusão	35
3.3.6. Cromatografia quiral	36
3.4. Eluição por Gradiente	36
4. EXPERIMENTAL	
4.1. Equipamentos e Materiais	38
4.2. Técnicas Cromatográficas	39
4.2.1. .Sistemas de Cromatografia Líquida de alta eficiência	39
4.3. Colunas Cromatográficas	40
4.3.1. Procedimento para empacotamento das colunas analítica e semi- preparativa	40
4.4. Espécies Vegetais	41
4.4.1. .Coleta	41
4.4.2. .Procedimento Inicial	41
4.4.3. Preparo e Fracionamento do Extrato Bruto	41
4.4.4. Extração da clorofila do extrato em clorofórmio das folhas de <i>Annona muricata</i>	42
4.5. Testes Biológicos	42
5.5.1. Bioensaio Larvícida	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
5.1. Eluição por Gradiente	44
5.2. Eluição Isocrática	49

5.3. Escala Multi-Miligrama	52
5.3.1. CLAE Preparativa do Extrato Bruto Etanólico das Sementes de <i>A. muricata</i>	52
5.3.2. CLAE Preparativa do Extrato Bruto Etanólico das Sementes de <i>A. squamosa</i>	55
5.4. Triângulo De Otimização Sistemática No Modo Reverso	59
5.5. Identificação Do Composto Isolado ASS3 das Sementes de <i>Annona squamosa</i>	66
5.6. Identificação Do Composto Isolado AMS2 da Semente de <i>Annona muricata</i>	71
5.7. Bioensaio Larvicida	76
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

Lista de Figuras

Figura 1: Nicotina	2
Figura 2: Inseticidas organoclorados	3
Figura 3: Inseticidas organofosforados	3
Figura 4: Carbamatos	3
Figura 5: Piretrinas Naturais.....	5
Figura 6: Butóxido de piperonila	5
Figura 7: Piretróides ciclopropânicos	6
Figura 8: Piretróides não ciclopropânicos	7
Figura 9: Rotenona	8
Figura 10: Rotenóides	9
Figura 11: Rianodina	10
Figura 12: Azadirachtina	11
Figura 13: Uvaricina	13
Figura 14: Classificação das acetogeninas	15
Figura 15: Tipos de γ -lactona	15
Figura 16: Esquamona	17
Figura 17: Asimicina e Bulatacina	17
Figura 18: Equipamento de CLAE	22
Figura 19: Nomógrafo no modo reverso	24
Figura 20: Efeito da mudança do percentual orgânico em separação no modo reverso de uma amostra hipotética. Condições: coluna C ₁₈ , 15 x 0,46 cm, 1,5 mL/min de fluxo (t ₀ = 1 min)	26

Figura 21: Seletividade pela força do solvente: efeito da mudança no percentual orgânico em separação CFR para uma amostra hipotética. Condições: coluna C ₁₈ 15 x 0,46 cm, fluxo 1,5 mL/min.	28
Figura 22: Triângulo da seletividade – modo reverso	32
Figura 23: Esquema para otimização da separação no modo reverso.	33
Figura 24: Seletividade do tipo de solvente em CFR. (a) 50% MeOH/H ₂ O; (b) 25% THF/H ₂ O. Bandas: 1, p-nitrofenol; 2, p-dinitrobenzeno; 3, nitrobenzeno; 4, metilbenzoato	34
Figura 25: Gradiente exploratório da mistura rica em acetogeninas	45
Figura 26: <i>Fingerprint</i> da folha de <i>Annona muricata</i> (extrato bruto em clorofórmio) isenta de clorofila	46
Figura 27: <i>Fingerprint</i> da semente de <i>Annona muricata</i>	47
Figura 28: <i>Fingerprint</i> da semente de <i>Annona squamosa</i>	47
Figura 29: Sobreposição dos cromatogramas <i>fingerprint</i> das sementes de <i>A. muricata</i> (vermelho) e <i>A. squamosa</i> (preto)	48
Figura 30: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona muricata</i> , coluna C ₁₈ Hypersil [®] 15 x 0,46 cm, fase móvel ACN/H ₂ O 60:40, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	49
Figura 31: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona muricata</i> , coluna C ₁₈ Hypersil [®] 15 x 0,46 cm, fase móvel ACN/H ₂ O 80:20, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	50
Figura 32: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona muricata</i> , coluna C ₁₈ Hypersil [®] 15 x 0,46 cm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	50
Figura 33: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona muricata</i> , coluna C ₁₈ THERMOHypersil [®] 15 x 0,46 cm, partícula de 5µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	51

Figura 34: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona squamosa</i> , coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	52
Figura 35: Exemplo da <u>separação preparativa</u> de amostras do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona muricata</i> , coluna C ₁₈ SHIMADZU Shim Pack 25,0 X 2,0 cm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 10,0 mL/min, detecção 225 nm	53
Figura 36: Cromatograma analítico do composto isolado AMS2 das sementes de <i>Annona muricata</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15,0 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	54
Figura 37: Cromatograma analítico do composto isolado AMS3 das sementes de <i>Annona muricata</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	54
Figura 38: Exemplo da separação preparativa de amostras do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona squamosa</i> , coluna C ₁₈ SHIMADZU Shim Pack 25 X 2,0 cm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 10,0 mL/min, detecção 225 nm	55
Figura 39: Cromatograma analítico do composto isolado ASS2A das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	56
Figura 40: Cromatograma analítico do composto isolado ASS2B das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	57

Figura 41: Cromatograma analítico do composto isolado ASS2C das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	57
Figura 42: Cromatograma analítico do composto isolado ASSX das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	58
Figura 43: Cromatograma analítico do composto isolado ASS3 das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	58
Figura 44: Nomógrafo para modo reverso de eluição, com ajuste de força para os três solventes usados em CFR: ACN (85%), MeOH (88%) e THF (63%)	60
Figura 45: Triângulo de otimização sistemática para o composto ASS3 no extrato bruto etanólico das sementes de <i>A. squamosa</i>	60
Figura 46: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto etanólico das sementes de <i>Annona squamosa</i> , coluna C ₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm. Fase Móvel: (A) ACN/H ₂ O 85:15, (B) MeOH/H ₂ O 88:12	61
Figura 47: Triângulo de otimização sistemática, no modo reverso de eluição, para separação de acetogeninas	62
Figura 48: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona squamosa</i> , coluna C ₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/H ₂ O 21:66:13, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	63

Figura 49: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto Extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona squamosa</i> , coluna C ₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/THF/H ₂ O 19:66:2:13, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	63
Figura 50: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona squamosa</i> , coluna C ₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/THF/H ₂ O 16:66:4:14, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	64
Figura 51: Cromatograma analítico do composto isolado ASS3 das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	64
Figura 52: Cromatograma analítico do composto isolado ASS3 das sementes de <i>Annona squamosa</i> . Condições de análise: coluna C ₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/THF/H ₂ O 16:66:4:14, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm	65
Figura 53: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona squamosa</i> , fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm, coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm	66
Figura 54: Espectro de infravermelho do composto ASS3, obtido em pastilha de KBr	67
Figura 55: γ-lactona α,β- insaturada mostrando os sinais de ¹ H e ¹³ C RMN	67
Figura 56: (A) Espectro de ¹ H RMN do composto ASS3 em CDCl ₃ , TMS como padrão interno, 400 MHz, (B), (C), (D) e (E) ampliações de regiões do espectro	68
Figura 57: Espectro de RMN de ¹³ C do composto ASS3	69
Figura 58: Esquamocina A ou Anonina I	69

Figura 59: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de <i>Annona muricata</i> , fase móvel ACN/H ₂ O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm, coluna C ₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm	71
Figura 60: espectro de infravermelho do composto AMS2, obtido em pastilha de KBr	72
Figura 61: γ -lactona α,β - insaturada mostrando os sinais de ¹ H e ¹³ C RMN	72
Figura 62: (A) Espectro de ¹ H RMN do composto AMS2 em CDCl ₃ , TMS como padrão interno, 400 MHz, (B), (C), (D), (E) e (F) ampliações de regiões do espectro	73
Figura 63: Espectro de RMN de ¹³ C do composto AMS2	74
Figura 64: Anonacina	74
Figura 65: DL ₅₀ das espécies (1) <i>Annona muricata</i> folha, (2) <i>Annona muricata</i> semente, (3) <i>Annona squamosa</i> semente, (4) rotenona	76

Lista de tabelas

Tabela A: Dados espectroscópicos de RMN da substancia ASS3 e do composto Esquamocina A 70

Tabela B: Dados espectroscópicos de RMN da substancia AMS2 e do composto Anonacina 75

Tabela C: Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* a 50 ppm 76

Estudos fitoquímicos realizados anteriormente em nossos laboratórios com a *Annona muricata* resultaram no isolamento de uma mistura de acetogeninas, uma classe de produtos naturais de difícil separação e com potentes e variadas atividades biológicas. As propriedades inseticidas desta classe de compostos até hoje exclusiva da família Annonaceae direcionou nossa atenção para o uso contra o mosquito *Aedes aegypti*.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/HPLC) no modo reverso de eluição aliada à detecção pelo espectrofotômetro de arranjos de diodos (UV/VIS), foi a técnica empregada no isolamento das acetogeninas presentes nos extratos preparados em etanol das sementes de *Annona muricata* e *Annona squamosa*. Foram isoladas sete acetogeninas. Duas das sementes de *A. muricata*, AMS2 ($t_R=8,5$) e AMS3 ($t_R=9,5$), e cinco das sementes de *A. squamosa*, ASS2A ($t_R=4,5$), ASS2B ($t_R=5,0$), ASS2C ($t_R=5,5$), ASSX ($t_R=7,5$) e ASS3 ($t_R=8,0$).

Baseado no triângulo da seletividade de solventes, uma composição de fase móvel foi desenvolvida especificamente para o composto marcador ASS3 das sementes de *A. squamosa*: ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14 v/v.

Dentre as sete acetogeninas extraídas duas tiveram suas estruturas químicas identificadas com o uso da ressonância magnética (¹H and ¹³C) e espectroscopia no infravermelho: AMS2 e ASS3, tratando-se das acetogeninas Anonacina e Esquamocina A também conhecida como Anonina I, respectivamente. O íon molecular foi estabelecido por espectrometria de massas usando a técnica de ionização química.

Abstract

Phytochemical studies performed previously under laboratory conditions using the species *Annona muricata* resulted in the extraction of a mixture of acetogenins, which is a class of substances very difficult to separate, despite its large spectra of biological activities. The insectidal properties of this class of compounds which is exclusive of the Annonaceae family have drive our attention to its use against the mosquito *Aedes aegypti*.

The methodology used to extract acetogenins from *Annona muricata* and *Annona squamosa* crude ethanolic extracts was the reversed phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). By means of this technique seven acetogenins, two from seeds of *Annona muricata* AMS2 ($t_R=8,5$), AMS3 ($t_R=9,5$) and five from seeds of *Annona squamosa* ASS2A ($t_R=4,5$), ASS2B ($t_R=5,0$), ASS2C ($t_R=5,5$), ASSX ($t_R=7,5$) and ASS3 ($t_R=8,0$) were extracted.

Based on the triangle of solvent selectivity an special mobile phase composition was developed for reference compound ASS3 from seeds of *A. squamosa* a betted ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14 v/v.

Among the seven acetogenins extracted from the seeds of *Annona muricata* and *Annona squamosa*, only two: AMS2 and ASS3 had their chemical structures identifiend as such: Anonacina and Squamocina A, also know as Anonine I, with the aid of nuclear magnetic ressonance (¹H and ¹³C) and infrared spectroscopy. The molecular ion of the identifiend acetogenins were determined by mass spectrometry using the chemical ionization as a technique.

Capítulo

1

INSETICIDAS DE ORIGEM VEGETAL

O uso de extratos vegetais com propriedades biológicas é tão antigo quanto a própria sociedade humana. Galeno e Hipócrates já utilizavam extratos vegetais aquosos e alcoólicos para conservar e concentrar os compostos ativos das plantas (Teske e Trentini, 1995).

Mais recentemente, o interesse pela utilização de compostos de origem vegetal com ação inseticida tem aumentado consideravelmente. Isto porque de uma forma geral os inseticidas naturais são considerados menos tóxicos que os compostos sintéticos na natureza. Este fator aliado a uma viabilidade econômica desses produtos tem feito com que grupos de pesquisas se formem nas universidades com o intuito de descobrir novos compostos de origem vegetal que apresentem uma ação inseticida relevante.

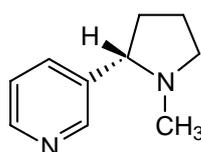
Diversas são as espécies de vegetais com potencial inseticida. Algumas espécies botânicas se encontram prontas para uso e outras ainda como objeto de estudos. Podendo ser citadas com grande potencial praguicida as espécies das famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiaceae e Canellaceae (Jacobson, 1986).

Os inseticidas derivados de produtos naturais são eficazes contra as pragas domésticas, principalmente sobre os insetos de pequeno porte como moscas e mosquitos e não apresentam severa toxicidade como se observa nos inseticidas sintéticos. Alguns requisitos devem ser considerados quando se avalia uma substância com potencial inseticida: seletividade, baixa toxicidade ambiental e

facilidade de degradação no ambiente. Além destes fatores, é necessário que sua produção seja viável: matéria-prima abundante, baixo custo, facilidade de caracterização e padronização de compostos “marcadores” do extrato ativo em variedades de plantas–fonte.

Este trabalho tem como objetivo o isolamento e a identificação de compostos marcadores nos extratos vegetais de folhas e sementes de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, via cromatografia líquida de alta eficiência, com o intuito de quantificar estes compostos para a preparação de uma formulação com ação inseticida contra o *Aedes aegypti*, vetor da doença da dengue e da febre amarela.

Os inseticidas derivados de produtos naturais já foram muito utilizados pelo homem. Existem relatos de gregos e romanos, ainda nos primórdios da agricultura, mostrando a importância da nicotina **(1)**, **figura 1**, um alcalóide extraído das folhas de *Nicotiana tabacum* e *Nicotiana rustica* (Solanaceae) no combate aos insetos fitófagos da agricultura (Ferreira et al., 2001).



(1)

Nicotina

Figura 1

A partir do desenvolvimento da Síntese Orgânica após a segunda metade do século XIX, várias substâncias foram preparadas para serem usadas como defensivos agrícolas. No início do século XX, os compostos naturais foram caindo em desuso devido a maior eficiência oferecida pelos inseticidas sintéticos.

Com o advento da Segunda Guerra Mundial os praguicidas naturais foram quase totalmente substituídos por derivados sintéticos. Dentre os inseticidas mais utilizados destacam-se os organoclorados (2-4), organofosforados (5-7) e os carbamatos (8-10), figuras 2-4.

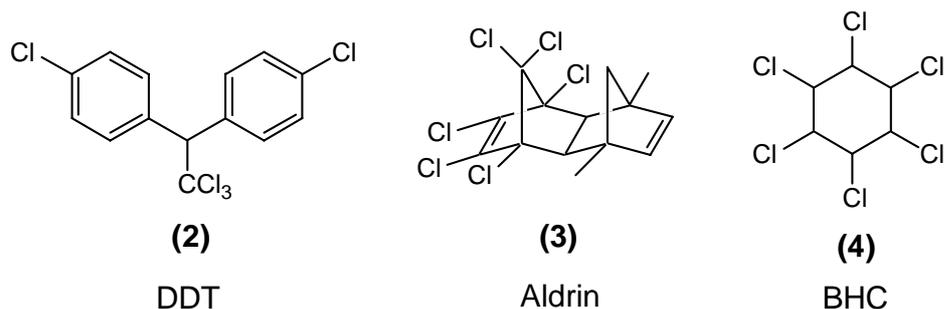


Figura 2: Inseticidas organoclorados

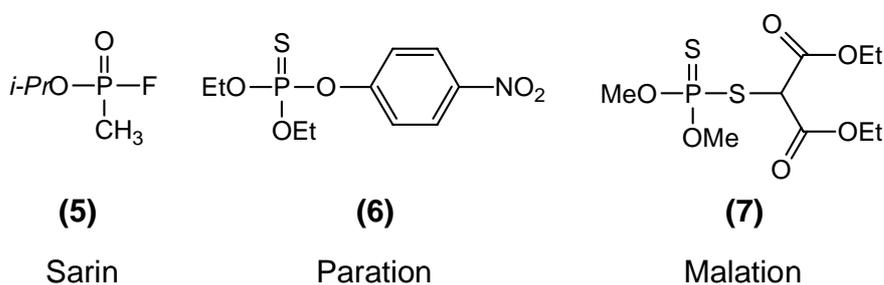


Figura 3: Inseticidas organofosforados

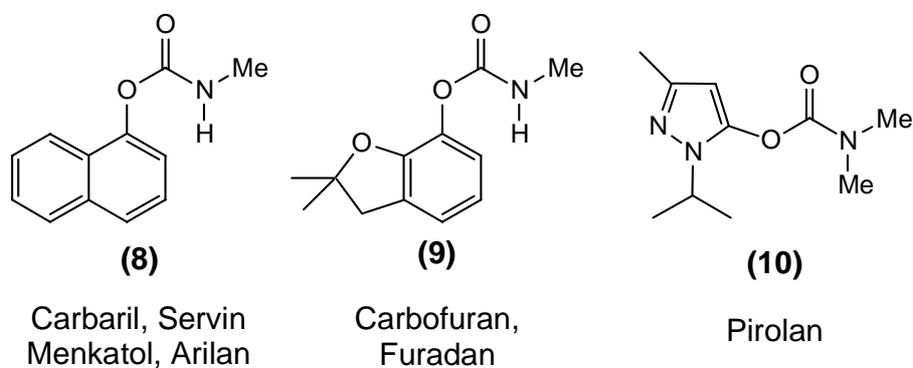


Figura 4: Carbamatos

Devido à tolerância que os insetos desenvolveram aos defensivos agrícolas sempre exigindo uma maior quantidade do inseticida na aplicação seguinte aumentou conseqüentemente os custos da produção agrícola. Além disto, a baixa seletividade dos inseticidas sintéticos e o seu amplo espectro de ação, visto que aniquilam sem distinção insetos praga e benéficos e a alta toxicidade ao homem e ao ecossistema, a busca por inseticidas naturais ganhou enorme impulso após os anos 60 do século XX.

Os praguicidas naturais de maior relevância, piretróides, rotenóides e rianóides, também têm sido utilizados como compostos protótipos para síntese de análogos sintéticos mais eficazes, menos tóxicos e economicamente mais acessível ao agricultor.

1.1. Piretróides

O piretro, também conhecido como pó da Pérsia, foi usado na região do Cáucaso e no norte do Irã ainda no século XVII. Foi originalmente extraído das flores de crisântemos de várias espécies do gênero *Chrysanthemum* (Asteraceae), tendo como espécie mais comum o *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Boyce e Metcalf, 1974). Este inseticida foi amplamente empregado tanto nos países que cultivavam as plantas fornecedoras como por outros que as importavam. Suas propriedades inseticidas foram evidenciadas cientificamente a partir da metade do século passado. O extrato piretro é um dos mais antigos inseticidas conhecidos pelo homem (Fukami et al., 1971).

Os compostos naturais ativos são coletivamente chamados de piretrinas, sendo que na realidade seis compostos ocorrem nas flores: Piretrina I [éster do ácido **(11)** e o álcool **(13)**], Piretrina II [éster do ácido **(12)** e o álcool **(13)**], Jasmolina I [éster do ácido **(11)** e o álcool **(14)**], Jasmolina II [éster do ácido **(12)** e o álcool **(14)**] Cinerina I [éster do ácido **(11)** e o álcool **(15)**], Cinerina II [éster do ácido **(12)** e o álcool **(15)**], **figura 5**.

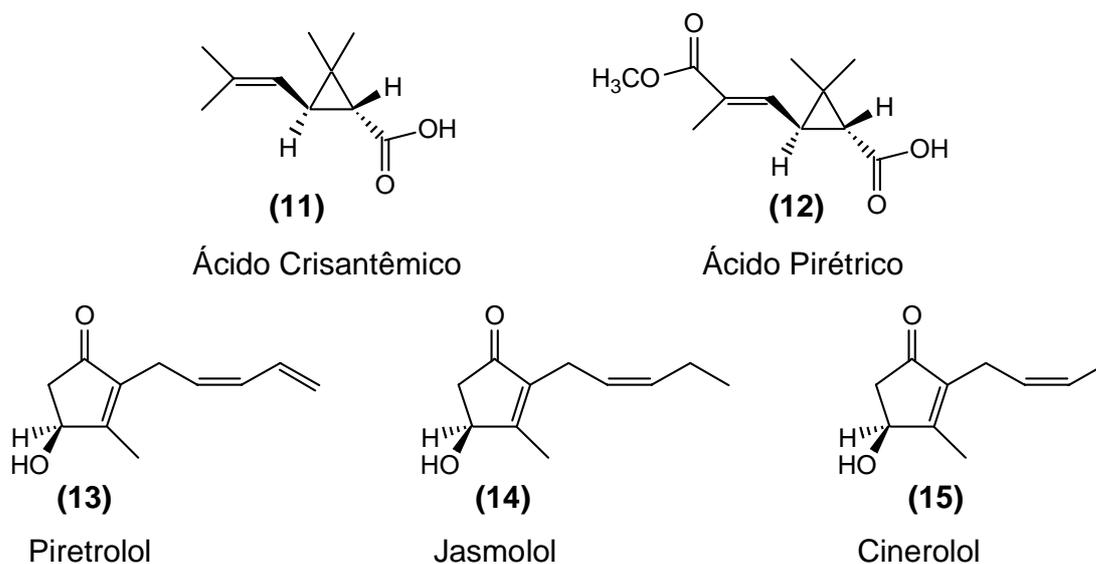


Figura 5: Piretrinas Naturais

A Piretrina I é o composto mais ativo como inseticida e a Piretrina II se destaca pelo forte efeito paralisante. Insetos atingidos pelas piretrinas perdem a mobilidade ou capacidade de voar em questão de minutos (Larini, 1999). Tanto o efeito inseticida como o paralisante são reversíveis porque enzimas no corpo dos insetos decompõem rapidamente as piretrinas. Devido a esta baixa estabilidade devem ser acrescentados compostos sinergistas às formulações como o butóxido de piperonila **(16)**, figura 6, que inibe estas enzimas, mantendo o efeito das piretrinas por mais tempo, até a morte dos insetos (Cremllyn,1978).

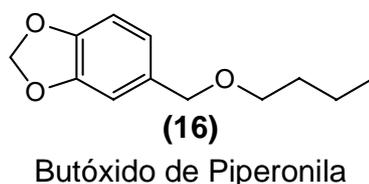


Figura 6

As piretrinas naturais são pouco persistentes no meio ambiente e são dotadas de grande atividade inseticida, principalmente para insetos de pequeno porte. Atualmente é a classe de compostos de maior presença em residências,

sendo comercializada sob diversas formas: líquidos, aerossóis e cartuchos empregados em pequenos aquecedores elétricos (Ferreira et al, 2001).

A grande vantagem que impulsionou a utilização e pesquisas na busca de compostos inseticidas derivados do piretro que perduram até nossos dias é a baixa toxicidade aos mamíferos ao contrário do que se observa nos insetos. Porém sua eficácia no campo é limitada devido a sua baixa estabilidade térmica e por decompor rapidamente pela radiação ultravioleta solar. Por este motivo a busca por análogos das piretrinas se fez necessária.

Dentre os avanços na síntese de compostos análogos à piretrina se destacam a aletrina **(17)**, fenotrina **(18)**, resmetrina **(19)** e deltametrina **(20)**, **figura 7**. Estes compostos passaram a ser conhecidos como piretróides, compostos sintéticos derivados de ácidos crisantêmicos. Mais recentemente surgiram os derivados não ciclopropânicos tais como o fenvalerato **(21)** e o esfenvalerato **(22)**, **figura 8**, (Cremllyn,1978).

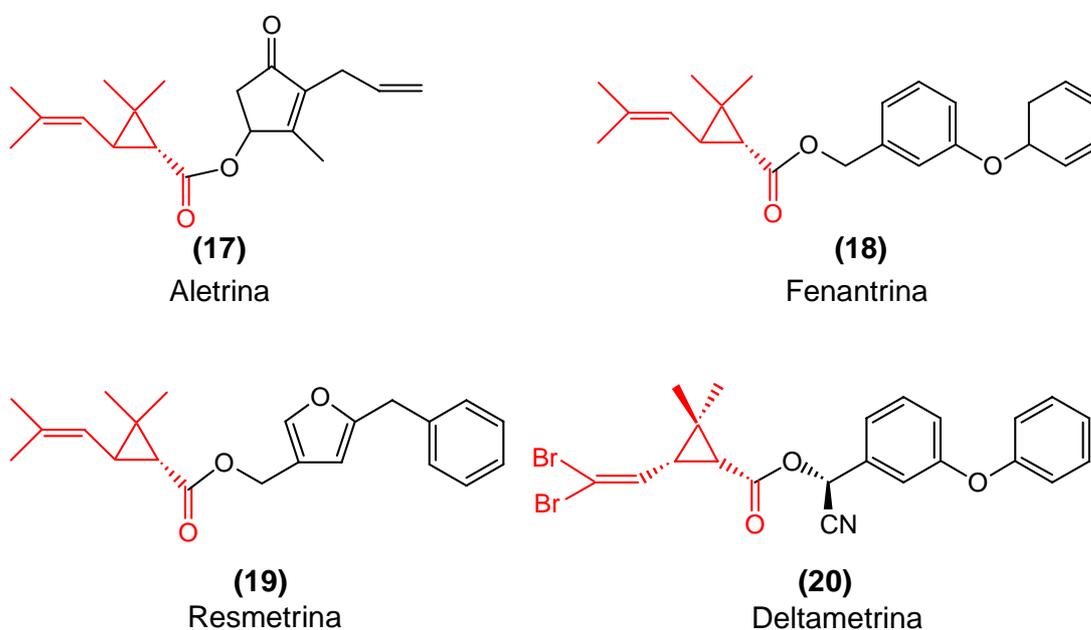


Figura 7: Piretróides ciclopropânicos

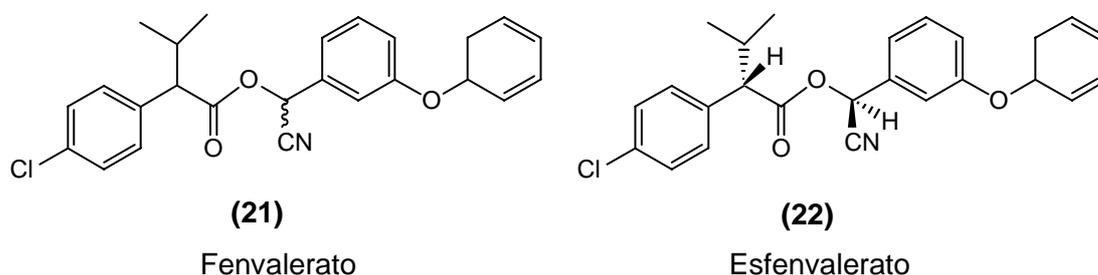


Figura 8: Piretróides não ciclopropânicos

Os piretróides são compostos neurotóxicos que atuam no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico induzindo uma paralisia temporária do inseto. O principal efeito ocorre sobre os axônios, mantendo abertos os canais de entrada de sódio. Isto provoca um desequilíbrio iônico interrompendo a transmissão normal de impulsos. Seu modo de ação é semelhante ao do DDT, (Oga, 2003). Uma peculiaridade destes inseticidas é que são mais eficientes quando a temperatura ambiente é mais baixa (Larini, 1999).

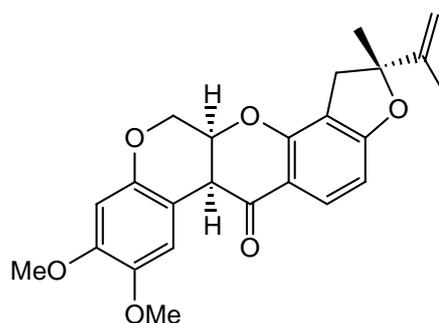
Piretróides são muito eficientes contra um grande espectro de pragas, excluindo-se, de modo geral, pulgões, ácaros, mosca-branca e pragas do solo. O espectro de ação varia um pouco de produto a produto. Atualmente são utilizados na agricultura, na pecuária, em domicílios, nas campanhas de saúde pública e no controle de ectoparasitoses (BASF, 2004).

1.2. Rotenóides

Este grupo de compostos inseticidas é encontrado principalmente em leguminosas, nas raízes de espécies dos gêneros *Derris* e *Lonchocarpus*. As preparações obtidas pela secagem das raízes das plantas do gênero *Lonchocarpus* são denominadas timbó e as do gênero *Derris* são denominadas derris ou trombeta (Larini, 1999). As primeiras escrituras remontadas há mais de dois mil anos, revelam que estas plantas eram usadas para matar os peixes e

para aumentar os rendimentos da pesca. Usava-se na Malásia, na África equatorial, e na Amazônia. Durante milênios estes povos que não se conheciam empregavam-na com o mesmo fim. Lançava-se extratos da planta aos riachos e aos pântanos e os peixes estavam envenenados. Mais tarde, as suas virtudes inseticidas foram descobertas.

Os rotenóides apresentam a rotenona **(23)**, **figura 9**, como principal substância inseticida. A molécula foi primeiramente examinada no Japão por ROTEN (do qual tem o seu nome), quando foi isolada da espécie *Lonchocarpus nicou*, e posteriormente também foi isolada da espécie *Derris chinensis*. Na década de 1920, houve um uso importante pelo mundo do pó inseticida (milhares de toneladas circulavam pelo mercado mundial).



(23)

Rotenona

Figura 9

Além da rotenona existem compostos sintéticos, genericamente denominados de rotenóides. Os mais importantes representantes desta classe de substâncias são a eliptona **(24)**, a manduserona **(25)** e a denguelina **(26)**, **figura 10** (Fukami et al., 1971).

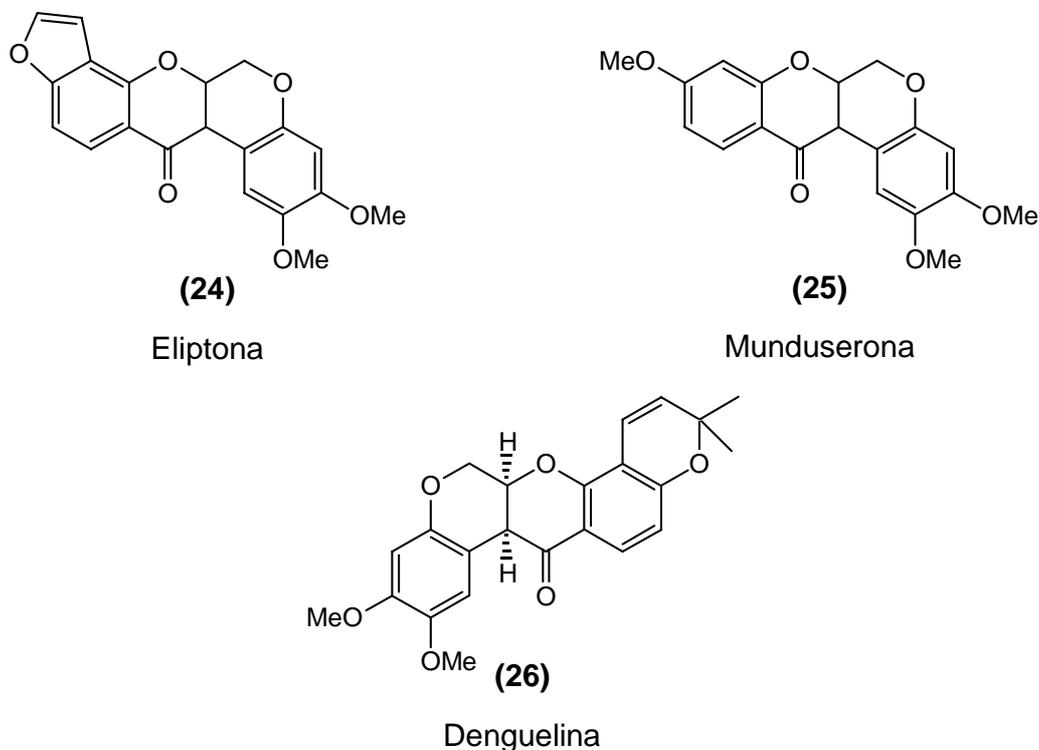
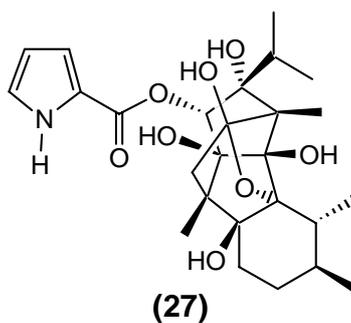


Figura 10: Rotenóides

A rotenona é inibidora de uma enzima de um dos complexos envolvidos com a oxidação do NADH na cadeia transportadora de elétrons. No envenenamento agudo em animais, ocorre inicialmente uma estimulação seguida de depressão respiratória, convulsões tônico-clônicas, tremores musculares e morte por insuficiência respiratória. Quando há ingestão da substância ocorrem náuseas e vômitos intensos provocados pela ação irritante nas mucosas, podendo determinar conjutivite, rinite e laringite. (Larini, 1999). A denguelina (26) se apresenta como um óleo de cor amarelado, praticamente insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, causa irritação à pele e quando inalada pode causar danos pulmonares.

1.3. Rianóides

Os compostos extraídos da espécie *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae) têm ação inseticida comprovada desde 1945. Nesta família existem outras espécies que também apresentam compostos pesticidas, dentre elas podem ser destacadas a *R. tomentosa*, *R. acuminata*, *R. sagotiana* e *R. subtiflora*. Todas estas espécies podem ser encontradas na flora brasileira, especialmente, no norte da América do Sul e Bacia Amazônica. (Ferreira et al, 2001). A rianodina (**27**), **figura 11**, é o composto que apresenta atividade inseticida nestas espécies. Ela pode ser obtida de extratos aquosos, alcoólicos e em acetônicos. O composto (**27**) é pouco solúvel em hexano e benzeno (Larini, 1999).



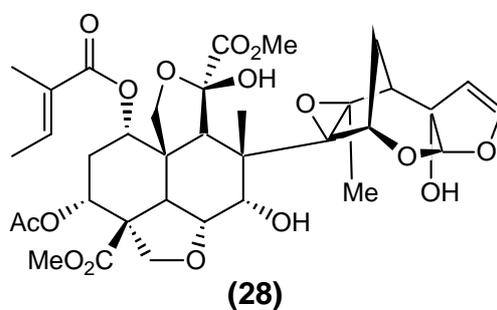
Rianodina

Figura 11

1.4. A BUSCA POR NOVOS INSETICIDAS VEGETAIS

Algumas espécies de plantas vêm sendo amplamente estudadas no momento devido ao seu alto poder pesticida. O composto azadiractina (**28**), **figura 12**, extraído de espécies da família Meliaceae, é um limonóide que contém o anel C-seco, com alto potencial pesticida. Esta molécula (**28**), já foi isolada em duas espécies, *Azadiracta indica*, conhecida na Índia como “neem” onde é usada há séculos como planta medicinal, e *Melia azedaracth* de origem asiática. A *M. azedaracth* já foi introduzida em vários países e no Brasil é mais conhecida como “cinamomo” ou santa-bárbara (Ferreira et al, 2001). Seu uso como inseticida

começou a ser difundido há cerca de trinta anos, quando a azadiractina **(28)** foi isolada na espécie *Azadiracta indica* (Mordue e Blackwell, 1993). O composto levou dezessete anos para ter a estrutura elucidada e sua molécula ainda não foi sintetizada devido à grande complexidade de sua estrutura química (Martinez, 2001). Defagó e col. demonstraram recentemente que extratos da *M. azedaracth* com concentração entre 1-10% são suficientes para provocar a inibição da alimentação e conseqüentemente a morte de besouros da espécie *Xanthogaleruca luteola* (Defagó et al., 2006).



(28)

Azadirachtina
Figura 12

Os inseticidas naturais do neem são biodegradáveis, possuem uma ação repelente, anti-alimentar, reguladora do crescimento e inseticida. Os extratos de neem são mundialmente aprovados para uso em cultivos orgânicos. A planta possui mais de 50 compostos de origem terpênica, a maioria com ação tóxica sobre os insetos. Estes terpenóides são encontrados em todas as partes da planta, sendo o fruto o local de maior concentração. Por serem solúveis em água extratos contendo estes compostos podem ser preparados, de maneira simples e barata, por pequenos e médios produtores.

Outras espécies de meliáceas têm propriedades semelhantes. Entretanto, seus extratos são mais tóxicos aos vertebrados e são menos eficazes contra os insetos. Os extratos de neem são inofensivos aos vertebrados e ao homem (Martinez, 2001).

Capítulo

2

ESPÉCIES VEGETAIS

2.1. FAMÍLIA ANNONACEAE

Outra fonte promissora de compostos inseticidas é o gênero Annonaceae. Esta família compreende um grande número de gêneros e espécies, a maioria nativa das regiões tropicais ou subtropicais. As anonáceas são sistematicamente colocadas na classe Magnoliopsida e subclasse Magnolidae (Maas et al., 2001). Possui cerca de 120 gêneros e mais de 2300 espécies, sendo que dos gêneros conhecidos de Annonaceae, o gênero *Annona* é o de maior importância como fonte de frutos comestíveis, aminoácidos e proteínas.

Do ponto de vista fitoquímico, este gênero se destaca pelos variados tipos de classes estruturais encontradas: alcalóides, amidas, diterpenos, esteróides, flavonóides e acetogeninas (Pontes et al., 2004). A maioria dos estudos da fitoquímica de Annonaceae não se concentra mais nos alcalóides, mas numa nova classe de compostos extremamente bioativos que são referidos como acetogeninas de anonáceas (Rupprecht et al., 1990 e Fang et al., 1993).

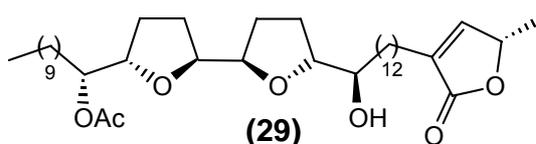
2.2. ACETOGENINAS DE ANNONACEAE

As acetogeninas são metabólitos secundários obtidos pela via do ácido acético - policetídicos - derivados de ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 35 a 39 átomos de carbono. Estas substâncias são exclusivas da família Annonaceae e são encontradas em sete gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Disepalum*, *Goniothalamus*,

Rollinia, *Uvária* e *Xylopia*. (Alali et al., 1999). São caracterizadas pela presença de uma cadeia alifática longa com grupos funcionais: hidroxila, acetila e carbonila e um anel γ -lactona terminal. Podem também conter de 1 a 3 anéis tetraidrofurânico (THF) (Fang et al., 1993). Existem também acetogeninas que ao invés de apresentar anel THF, apresentam anel tetraidropirânico (THP) (Alali et al., 1999).

As acetogeninas isoladas até o momento contêm em sua estrutura vários centros estereogênicos, o que dificulta a elucidação de suas configurações absolutas. Devido a sua natureza graxa, as acetogeninas não formam cristais adequados para uma análise por cristalografia de raios X. Desta forma, a determinação da estereoquímica tem sido feita mediante a comparação do produto natural com modelos sintéticos via preparação do éster de Mosher, ésteres do ácido α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético, seguida de uma análise detalhada dos espectros de RMN de alta resolução destes derivados (Rieser et al., 1992).

Desde 1982, quando a primeira acetogenina foi isolada, a uvaricina **(29)** figura 13, o interesse por estas substâncias vêm crescendo devido a grande variedade de atividades biológicas encontradas (Jolad et al., 1982). Como fonte de compostos com variadas ações biológicas, é relevante nestas espécies as marcantes e conhecidas atividades citotóxica, antitumoral, antiparasitária, imunossupressiva e pesticida (Zeng et al., 1993).



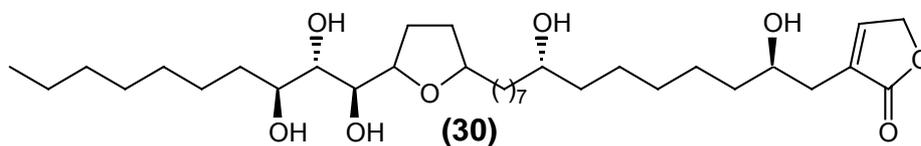
(29)
Uvaricina

Figura 13

2.2.1. Classificação das acetogeninas

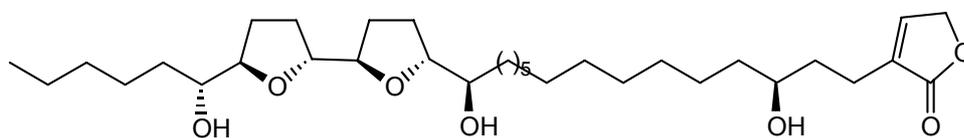
As acetogeninas são classificadas de acordo com a quantidade de anéis tetraidrofurânicos e de sub-unidades de γ -lactonas. Elas podem ser *mono*-THF, annopentocina **(30)**, *bis*-THF adjacentes, uvarigrandina A **(31)**, *bis*-THF não

adjacentes, gigantecina **(32)**, as que não possuem anéis THF **(33)**, e as não-clássicas, acetogeninas que possuem anel THP, mucocina **(34)**, figura 14.



(30)
Annopentocina C

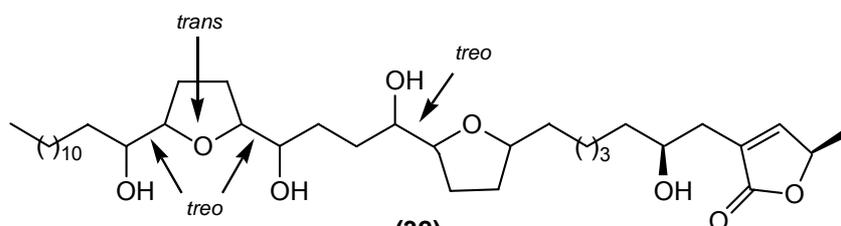
Acetogenina *mono*-THF



(31)

Uvarigrandina A

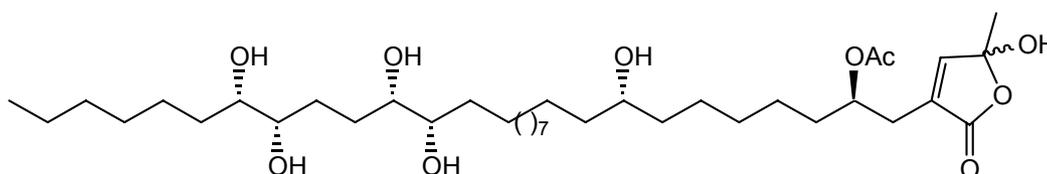
Acetogenina *bis*-THF adjacente



(32)

Gigantecina

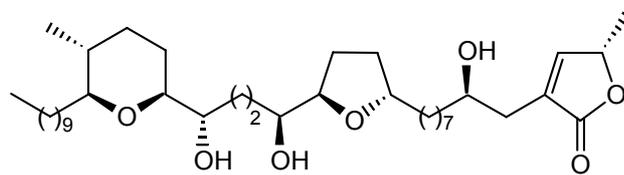
Acetogenina *bis*-THF não adjacente



(33)

Donnaienina D

Acetogenina sem anel THF



(34)
Mucocina
Acetogenina não-clássica

Figura 14: Classificação das acetogeninas

Nas estruturas das acetogeninas podem variar o padrão de substituição do anel lactônico. Eles são classificados em γ -lactona substituída, cetolactonas (cis ou trans) ou anel hidroxilado, **figura 15** (Rupprecht et al., 1990).

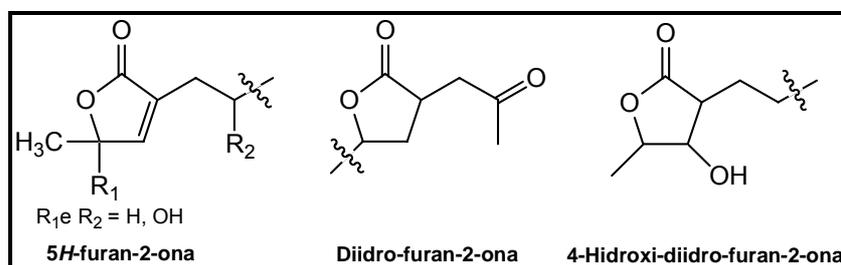


Figura 15: Tipos de γ -lactona

2.2.2. Atividades biológicas

A utilização de plantas da família Annonaceae na medicina popular tem sido amplamente relatada. Atividades biológicas das mais variadas foram observadas: antimicrobiana, antiemética, pesticida, vermífuga, abortiva, antitumoral, citotóxica, inibidora de apetite e antimalárica (Leboeuf et al., 1982). Muitas delas foram atribuídas às acetogeninas, cujo estudo intensivo nos últimos anos já mostraram sua potente ação pesticida, citotóxica e antitumoral. (Rupprecht et al., 1990).

Estes compostos atuam sobre o NADH-desidrogenase inibindo o complexo I da fosforilação oxidativa mitocondrial. Esta ação sugere o uso das acetogeninas como inseticida. As propriedades inseticidas das acetogeninas são comparadas com a da rotenona e da pericidina, potentes inibidores do complexo I mitocondrial (Esposti et al., 1994).

2.2.3. Relação estrutura x atividade (SAR)

Algumas avaliações de citotoxicidade com relação à estrutura-atividades (SAR) biológicas já foram estudadas para às acetogeninas de anonáceas (Rupprecht et al., 1990; Fang et al., 1993). Estes estudos mostram que:

1. Em todos os casos as acetogeninas do tipo *bis*-THF com anéis adjacentes são as mais potentes, seguidas em ordem decrescente de atividade pelas *bis*-THF não adjacentes, pelas *mono*-THF e por último aquelas que não possuem anéis THF.
2. As unidades hidroxila são extremamente importantes para bioatividade destes compostos. A acetilação ou a preparação de outros derivados destes grupos reduzem a atividade citotóxica. Redução das carbonilas cetônicas da esquamona (**35**) resulta em um aumento substancial da citotoxicidade, **figura 16**.

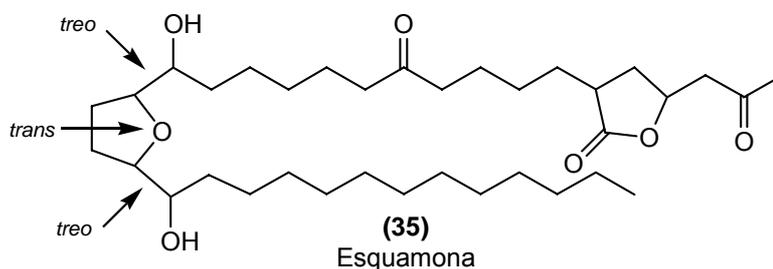


Figura 16

3. A subunidade γ -lactona α,β -insaturadas é essencial para a atividade citotóxica. Redução da ligação dupla diminui a atividade.

4. A estereoquímica da molécula é fundamental para SAR. A mudança na estereoquímica de um centro assimétrico pode resultar em aumento na atividade citotóxica. A asimicina (**36**) é um bilhão (10^6) de vezes menos ativa do que a bulatacina (**37**), figura 17.

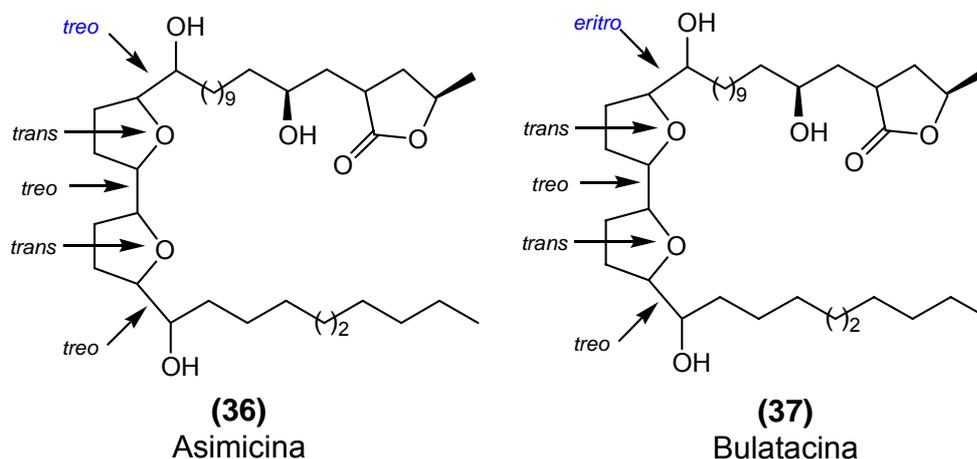


Figura 17

5. A presença de dióis vicinais e dupla ligação ao longo da cadeia também aumentam a atividade.

2.3. GÊNERO *ANNONA*

O gênero *Annona* compreende cerca de 120 espécies entre árvores arbusto e lianas, apresenta distribuição tropical, com 30 gêneros na Amazônia, que é a área de maior concentração de espécies dessa família no continente americano. Suas várias espécies produzem frutos comestíveis como graviola (*Annona muricata*), pinha ou fruta-do-conde (*Annona squamosa*) e araticum (*Annona crassiflora*).

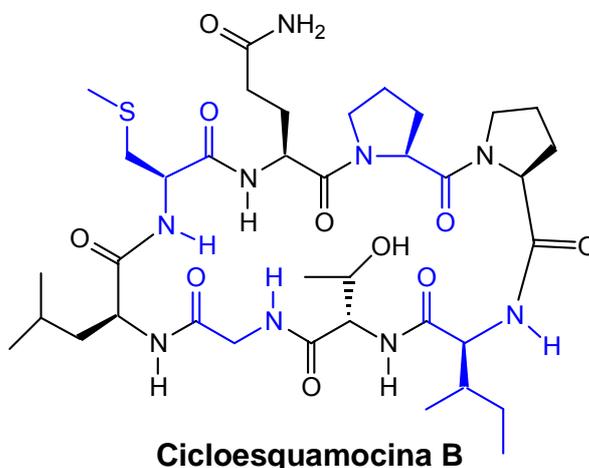
2.4. *ANNONA SQUAMOSA* L.

A *A. squamosa*, nativa da América Central, é uma pequena árvore encontrada em várias partes do mundo. No Brasil frutifica uma vez por ano e seu fruto é conhecido como pinha ou fruta-do-conde.

As sementes da *Annona squamosa* já foram descritas como sendo poderoso inseticida (Kumar et al., 2005). Suas folhas também já foram registradas como tendo propriedades anti-espasmótica, antitumoral, inseticida e anti-helmíntica (Chopra et al., 1956). Extrato das sementes de *A. squamosa* mostrou-se eficiente como inseticida contra *Aphis phabae*, *Macrosiphoniella sanbornii*, com toxicidade semelhante à rotenona. Os extratos etanólicos de folhas e semente da *A. squamosa* causam a mortalidade do inseto *Musca doméstica* (63%) e *Tribolium castaneum* (43%) (Harper et al., 1947).

O fracionamento das sementes da *A. squamosa* resultou no isolamento de 26 diferentes acetogeninas (Fujimoto et al., 1994). A atividade hipoglicemiante, em ratos, foi evidenciada na polpa do fruto desta espécie (Gupta et al., 2005). O extrato aquoso das folhas de *Annona squamosa* demonstrou ação anti-helmíntica em doses de 400, 800, 1200 µg/mL (Choudhary, 2007).

Recentemente foi atribuída atividade vasorelaxante ao composto cicloesquamocina B (**38**), um octapeptídeo cíclico isolado das sementes de *A. squamosa* (Morita et al., 2006).



A preparação de uma lactona antitumor oriunda da *Annona squamosa* foi recentemente desenvolvida (Zhang-Patente nº 1869031/2006). O produto obtido pode inibir o crescimento de células no carcinoma hepático em ratos. Esta lactona mostrou-se ser mais ativa como antitumoral do que os quimioterápicos cisplatina e fluoracil.

Atividade contraceptiva também foi observada na administração intravaginal do extrato hidroalcoólico de *A. squamosa* devido a sua ação espermicida (Singh et al., 2006 - Patente nº. 2006087733/2006). Atividade antioxidante também é evidenciada nesta espécie (Kaur e Kapoor, 2006).

2.5. ANNONA MURICATA L.

Annona muricata, no Brasil é conhecida como graviola, é uma árvore pequena, que mede entre 5 e 6 m de altura, com folhas largas de cor verde escuro, de aparência tenra e brilhante. Produz um fruto espesso e comestível, em forma de coração, que possui entre 15-23 cm de diâmetro de coloração amarelo esverdeada e polpa branca (Corrêa, 1984 e Maas et al, 2001).

A graviola tem uma história longa e rica de uso na fitoterapia assim como um extenso e documentado uso indígena. Seu uso como inseticida e antiparasitário já tem seus estudos comprovados (Zeng et al, 1997). A *A. muricata* é a espécie de onde foi isolado o maior número de acetogeninas, sendo as sementes a maior fonte destes compostos.

Preparações feitas a partir da graviola são indicadas para fins diversos como: abscesso, analgésico, anti-parasitas, asma, hipertensão, calmante e principalmente como antitumoral já são comercializadas sob diversas formas farmacêuticas como pós, líquidos e cápsulas (Raintree, 2007).

Lako e col. publicaram em 2006 as propriedades antioxidantes da polpa do fruto da *A. muricata* (Lako; et al., 2006). Esta atividade foi relacionada à presença de antocianinas e polifenóis encontrados nesta espécie (Kuskoski et al., 2005).

O extrato em etanol das folhas de *Annona muricata* mostrou-se tóxico frente às larvas do molusco *Biophalaria glabrata* (LC₅₀ 9,32 µg por mL) e também contra larvas de *Artemia salina* (LC₅₀ 0,49 µg por mL) (Luna et al., 2006).

Capítulo

3

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Cromatografia é um processo físico de separação, no qual os componentes de uma mistura a serem separados são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra que se move em uma direção definida. A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido, dispostos sobre um suporte sólido. Quanto maior a área superficial mais eficiente é a separação. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou um fluido supercrítico, passa através da fase estacionária arrastando consigo os diversos componentes da mistura a ser separada. A possibilidade de combinar uma variedade de fases móveis com outra variedade de fases estacionária faz com que esta técnica tenha uma enorme aplicabilidade (Cass e Degani, 2001).

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 pelo botânico russo Michael S. Tswett ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Praticamente todo seu trabalho foi dedicado ao estudo de pigmentos vegetais, principalmente a clorofila, convencido de que ela seria uma mistura de substâncias (Ciola, 2003). A cromatografia tem cerca de 100 anos. Ela tem se mostrado como uma técnica importante de separação para as mais variadas estruturas.

3.1. CLAE X CG

Atualmente, a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são duas das técnicas de separação mais utilizadas. A CG é a técnica mais eficiente para separação de misturas complexas de substâncias voláteis ou que podem ser volatilizadas por derivação. Ela é o método cromatográfico que realiza separações mais rápidas e mais eficientes para este tipo de substância. Entretanto muitas amostras simplesmente não podem ser analisadas por CG, compostos polares com alto peso molecular e baixa volatilidade ou termicamente instáveis são incompatíveis com a técnica. É estimado que apenas 20% dos compostos orgânicos conhecidos podem ser satisfatoriamente separados por CG sem modificação química da amostra.

A cromatografia líquida, no entanto, não é limitada pela volatilidade da amostra ou instabilidade térmica e por isto é ideal para separação de macromoléculas de interesse biológico e espécies iônicas. Ela pode ser usada para purificar metabólitos lábeis de animais e plantas e compostos menos estáveis tais como: proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, polímeros sintéticos, surfactantes, aminoácidos, lipídeos polares, corantes, explosivos e fármacos (Snyder e Kirkland, 1979).

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

O equipamento de CLAE **figura 18** é composto por um reservatório de solvente, uma bomba de alta pressão, injetor de amostra, coluna cromatográfica, detector e um registrador de dados. Hoje em dia, os módulos são interligados por um computador. Os softwares disponíveis são capazes de detectar problemas de funcionamento e também a necessidade de troca de alguma peça (Cass e Degani, 2001).

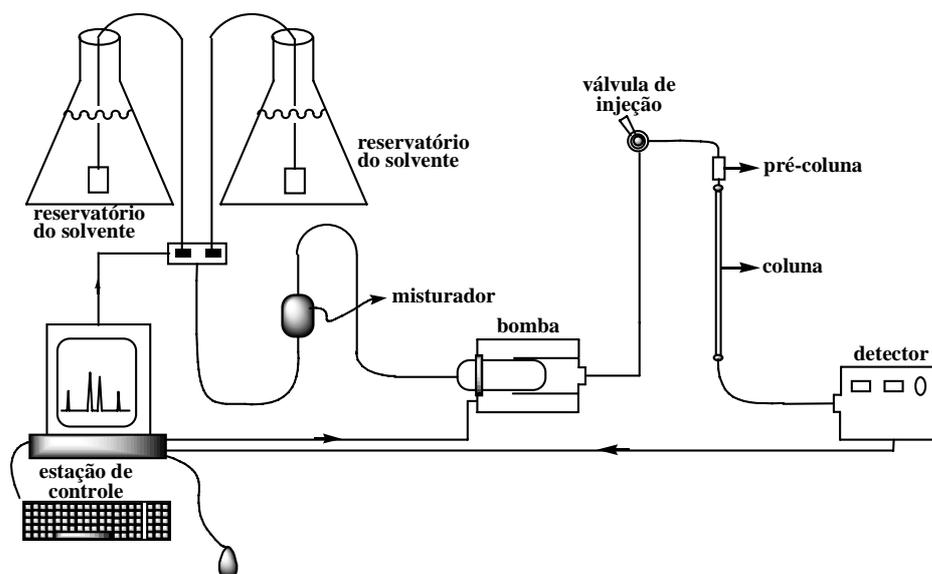


Figura 18: Equipamento de CLAE

Os detectores mais empregados em CLAE são os espectrofotômetros no UV/VIS que determinam a diferença de absorvância na região do ultra-violeta ou no visível. Detectores de fluorescência, eletroquímico, dicroísmo circular, índice de refração e espalhamento de luz (*light-scattering*) também são muito utilizados. Mais recentemente a utilização do detector de espectrometria de massas vem se tornando mais comum. Apesar do seu alto preço, da necessidade de um operador especializado e dos gastos com manutenção, é um detector universal. Embora destrutivo, apresenta alta sensibilidade, fornece a massa molecular dos compostos, permitindo também a elucidação estrutural destes via análise de seu fragmentograma (Cass e Degani, 2001).

A técnica de CLAE tem uma difusão crescente desde o começo dos anos 70. Hoje representa uma ferramenta indispensável nos laboratórios de química, farmacologia, biologia e bromatologia entre outros; uma vez que consegue separar misturas que contem um grande número de compostos similares (Quattrocchi; Andrizzi; Laba, 1992). O avanço tecnológico desta técnica é notável especialmente após o desenvolvimento de micropartículas para uso como fase estacionária e de colunas capilares.

3.3. MODOS DE SEPARAÇÃO

A classificação da cromatografia líquida de acordo com as modificações químicas realizadas na fase estacionária (sílica gel), levou a uma grande variedade de tipos. A separação em cromatografia líquida pode ser encontrada explorando a variedade de processos existentes, dos quais os mais importantes são: cromatografia de fase normal, fase reversa, de compostos iônicos, de troca iônica, cromatografia de exclusão e cromatografia quiral.

3.3.1. Cromatografia de fase normal (CFN)

A fase estacionária é mais polar do que a fase móvel. As características polares da sílica podem ser modificadas pela incorporação de outros grupos polares tais como: ciano, diol, fenil, amino. Os solventes utilizados neste modo de separação são normalmente uma mistura de solventes orgânicos sem a adição de água (Snyder, 1997).

O solvente para eluição no modo normal é selecionado escolhendo-se um solvente fraco (apolar) e misturando com um solvente forte (polar) para conseguir a força desejada. A presença de traços de água na fase móvel é provavelmente a causa mais comum da pobre reprodutibilidade na retenção em CFN, especialmente quando se usa sílica não-modificada como fase estacionária. Este problema tem sido contornado usando solventes anidros com um volume conhecido de água, metanol ou ácido acético para desativar os grupos silanóis mais reativos da fase estacionária, melhorando assim não só a reprodutibilidade, mas também o formato das bandas. O mesmo efeito pode ser obtido adicionando trietilamina, especialmente para separação de aminas em gel de sílica (Snyder, 1997).

3.3.2. Cromatografia de fase reversa (CFR)

Neste modo de cromatografia a fase móvel é mais polar que a fase estacionária. É sem dúvida o modo de cromatografia mais utilizado em CLAE, uma vez que permite a separação de um grande número de solutos e a utilização de

fases móveis aquosas. A fase móvel mais comumente usada é uma mistura entre acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída por metanol ou tetraidrofurano. O uso de apenas três solventes se deve à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis com a água. O princípio da retenção na fase reversa é a hidrofobia. A separação na fase reversa se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária. A separação simultânea de solutos iônicos e neutros é possível e a rapidez de equilíbrio da fase estacionária pela fase móvel facilita o uso de gradiente por este modo de cromatografia (Cass e Degani, 2001).

A força da fase móvel em cromatografia de fase reversa (CFR) depende do tipo de solvente orgânico escolhido (solvente B) e sua percentagem em água (solvente A). Estes efeitos de ajuste de força estão ilustrados no nomógrafo no modo reverso **figura 19**, que indica a relação entre as diferentes concentrações para três solventes comumente usados em CFR: acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e tetraidrofurano (THF) (Snyder e Kirkland, 1979).

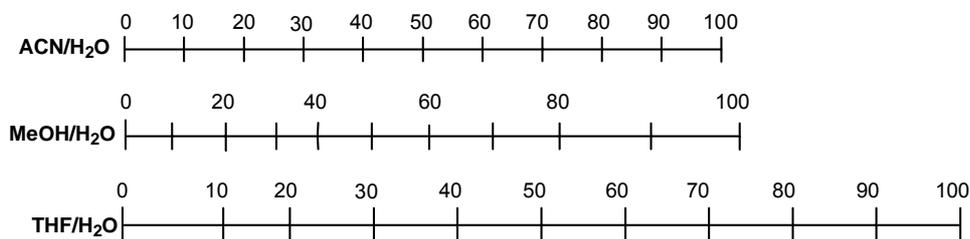


Figura 19: Nomógrafo no modo reverso

O acerto principal no desenvolvimento de um método em CFR é certamente a escolha correta da fase móvel, que é obtida através de uma aproximação dos valores de k (constante de retenção) de cada composto que é representado pela equação:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

onde t_R é o tempo de retenção da banda e t_0 o tempo morto da coluna, ou seja, o tempo que leva para o eluente da mistura a ser separada chegar ao detector.

Inicialmente deve-se ajustar a constante de retenção para os componentes da mistura em um intervalo entre $0,5 < k < 20$, todavia separações mais eficientes podem ser realizadas com a diminuição deste intervalo, $1 < k < 10$.

Deve-se lembrar sempre que neste modo de cromatografia a força aumenta com o decréscimo da polaridade do solvente. Dessa forma, a água (solvente mais fraco) < metanol < acetonitrila < tetraidrofurano (Cass e Degani, 2001).

A acetonitrila (ACN) é a primeira opção para início dos testes de escolha da fase móvel. A mistura ACN/H₂O pode ser bem usada pela detecção no UV, pois absorve a baixos comprimentos de onda (185 – 210 nm). A mistura possui também baixa viscosidade, resultando em maior número de pratos teóricos e em pressões mais baixas na coluna. A próxima escolha como melhor modificador orgânico (solvente B) é o metanol (MeOH), seguido de tetraidrofurano (THF). O THF possui algumas desvantagens como a absorção em maior comprimento de onda no UV, forma peróxido na presença de oxigênio, e gera um lento equilíbrio da coluna quando a fase móvel é modificada, dificultando seu uso em eluição por gradiente (Snyder, 1997).

A **figura 20** ilustra como a força do solvente interfere em uma separação cromatográfica. O cromatograma **A** representa uma separação onde foi utilizada uma fase móvel muito forte (100% de B), neste caso o tempo de análise será convenientemente curto, entretanto os compostos da mistura não irão sofrer interação com a coluna e serão todos eluídos de uma só vez. Para 100% de ACN, o conjunto dos compostos eluirão próximo ao t_0 ($k < 0,2$), sendo necessário uma fase móvel mais fraca (< %B), **figura 20**. Dupla redução de 20% na concentração de B, 80% e 60% de ACN (cromatograma **B** e **C** da **figura 20**), resulta em uma melhora na separação, mas ambas separações ainda são inaceitáveis para a primeira banda ($t_0 = 1$ min, $k < 0,5$). As análises cromatográficas adequadas são encontradas para 50% e 40% de ACN (cromatograma **D** e **E** da **figura 20**) aonde as constantes de retenção dos componentes da mistura variam $0,5 < k < 20$. Com o uso de fases móveis muito fracas (< 30% ACN), a retenção do composto D é inaceitavelmente longa ($k > 20$).

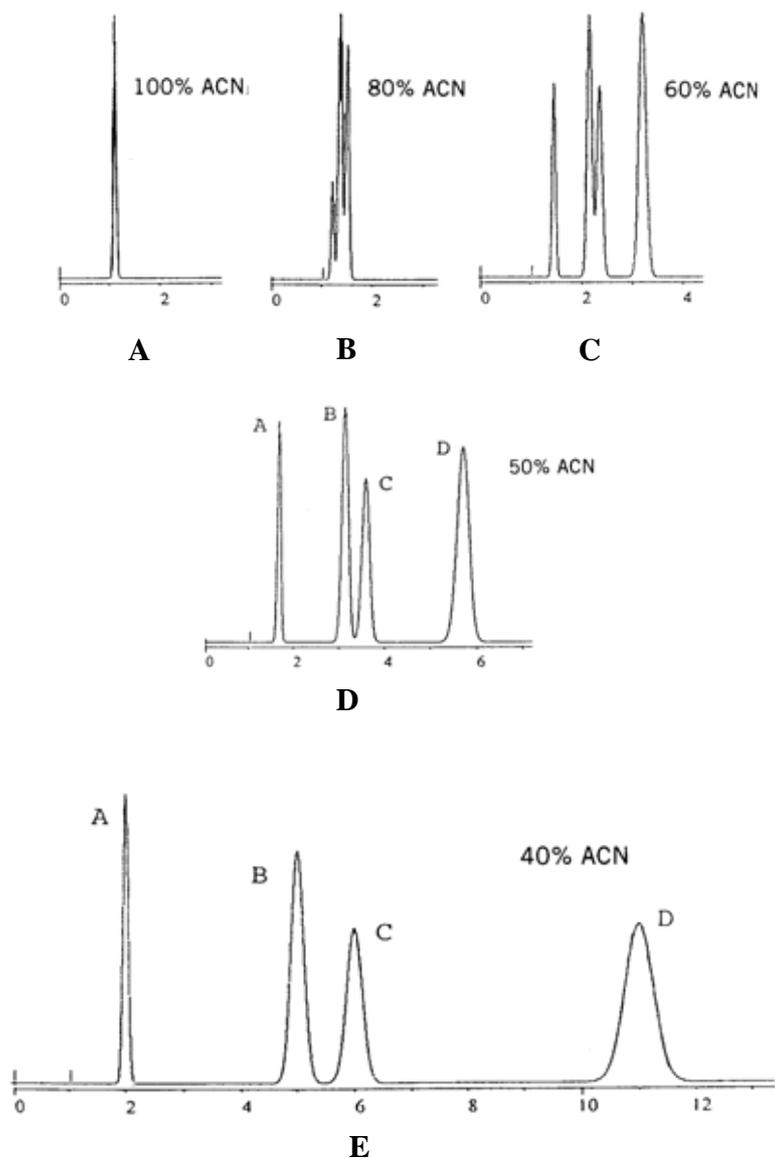


Figura 20: Efeito da mudança do percentual orgânico em separação no modo reverso de uma amostra hipotética. Condições: coluna C_{18} , 15 x 0,46 cm, 1,5 mL/min de fluxo ($t_0 = 1$ min)

O ajuste dos valores de k das amostras é apenas o passo inicial de uma separação adequada. Muitas vezes os valores do fator de retenção das amostras estão dentro de um intervalo aceitável ($0,5 < k < 20$), mas ainda é necessário a mudança entre o espaçamento entre as bandas ou seletividade (α) de diferentes bandas. A seletividade é definida pela razão entre duas bandas adjacentes, ou seja:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

São três as principais variáveis usadas em CFR para a mudança de seletividade de amostras neutras: composição da fase móvel, tipo de coluna, e temperatura. A mudança na composição da fase móvel é geralmente muito efetiva e conveniente, mostrando ser a alternativa principal.

Composição da fase móvel: O efeito primário da diminuição do solvente B é o aumento dos valores de k para todos os componentes da amostra. Muitas vezes, um bom ajuste de k para uma determinada banda implica em uma piora na resolução das demais, como pode ser observado na **figura 21**. Empregando 100% ACN os componentes da mistura não sofrem a interação necessária com a coluna, fazendo com que a mistura passe pela coluna sem ser separada. Diminuindo esta força para 60% algumas bandas apresentam uma boa resolução, todavia este ajuste ainda não é suficiente para todos os compostos da mistura, visto que os compostos A e B estão eluindo juntamente. Com 40% ACN, a análise foi mais demorada e algumas bandas começaram a sofrer um alargamento, aumentando o risco de sobreposição. A melhor resolução das amostras ocorre quando a percentagem de B para todos os componentes da amostra for encontrado. No exemplo da **figura 21**, a melhor separação foi obtida usando um solvente com força intermediária, 45% ACN, onde a separação para todas as bandas cromatográficas foi encontrada.

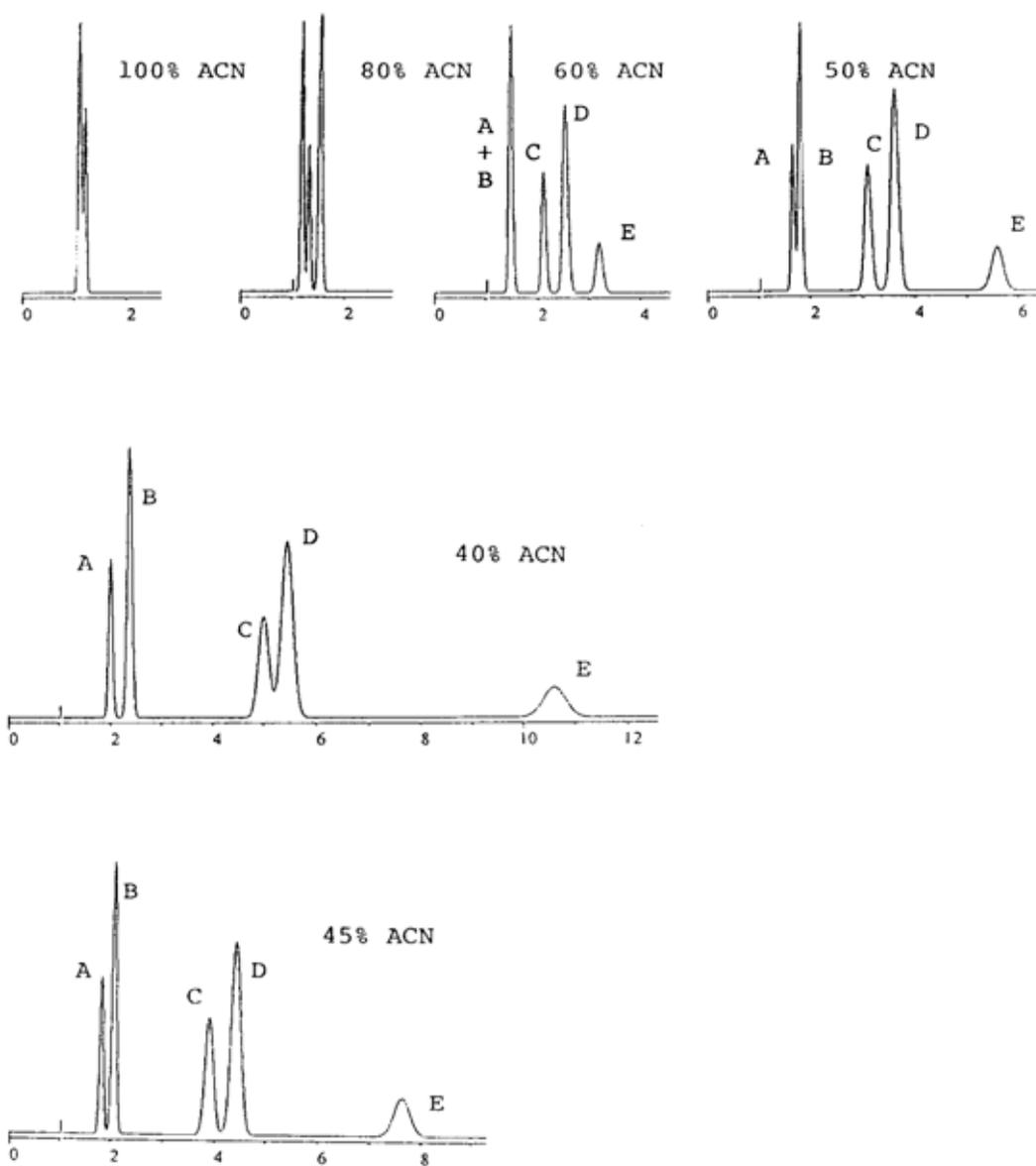


Figura 21: Seletividade pela força do solvente: efeito da mudança no percentual orgânico em separação CFR para uma amostra hipotética. Condições: coluna C₁₈15 x 0,46 cm, fluxo 1,5 mL/min.

Tipo de coluna A grande vantagem do suporte em sílica é poder ter sua superfície quimicamente modificada por uma série de substituintes com diferentes propriedades. Materiais empacotados com base em sílica são compatíveis com a água e com todos os solventes orgânicos. Porém a sílica possui uma característica desfavorável que é solubilizar na presença de altos valores de pH. Para um tempo de vida satisfatório algumas colunas à base de sílica não devem ser usadas sob pH acima de 8 (Snyder, 1997).

A retenção das amostras depende de três características da coluna: tipo e concentração da fase quimicamente modificada e da área superficial.

As fases estacionárias quimicamente modificadas são atualmente as mais importantes da cromatografia líquida moderna. Todas elas se baseiam na possibilidade de preparar derivados fazendo modificação no grupo silanol situado na superfície da sílica. As fases apolares são as mais utilizadas na atualidade. As mais freqüentes modificações realizadas na superfície da fase estacionária (gel de sílica) e seus principais usos são mostrados abaixo:

-C₄ Butila: Fase reversa, pareamento de íons, separação de peptídeos e proteínas.

-C₈ Octila: Fase reversa e pareamento de íons. Recomendada para materiais ligeiramente ou altamente polares, tais como, peptídeos pequenos e proteínas, esteróides, nucleosídeos, fármacos polares, etc.

-C₁₈ Octadecila (ODS): Fase reversa e pareamento de íons. Recomendada para materiais não polares ou moderadamente polares, tais como ácidos graxos, glicerídeos, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares, ésteres, vitaminas lipossolúveis, esteróides, prostaglandinas, aminoácidos, etc. Produz tempo de retenção maior do que as fases C₈ e C₄.

-C₆H₅ Fenila: Fase reversa, pareamento de íons. Compostos moderadamente polares. Tempo de retenção semelhante aos da C₈, porém com uma seletividade diferente para aromáticos policíclicos, aromáticos polares, ácidos graxos, etc.

-CN Ciano (nitrila): Fase normal ou fase reversa. Como fase normal, empregando solventes pouco polares, ela se comporta praticamente como a sílica pura. Devido a sua facilidade em reequilibrar rapidamente, tem mais emprego do que a sílica pura em cromatografia envolvendo programação por gradiente. Quando empregada como fase reversa ela tem uma seletividade diferente das C₁₈, C₈ e fenila.

-NO₂ Nitro: Separação de compostos com duplas ligações, por exemplo aromáticos mono e polinucleares.

-NH₂ Amina: Fase extremamente versátil, pode se comportar como fase normal, fase reversa e trocadora aniônica fraca. Como fase reversa separa carboidratos. Como fase normal empregando uma mistura de hexano ou diclorometano com isopropanol, pode separar compostos polares como anilinas substituídas, ésteres, pesticidas, e etc. Empregando com a fase móvel tampões, por exemplo acetatos, fosfatos e etc. na presença de alguns solventes orgânicos, por exemplo, acetonitrila pode separar ânions e ácidos orgânicos.

-N(CH₃)₂ Dimetilamino: Trocadora de íons aniônica fraca. Tem os mesmos usos da amina.

-OH Diol: Uso em cromatografia normal e em fase reversa. A estrutura do diol é menos polar do que a da sílica e facilmente molhada pela água. Empregada na separação de peptídeos e proteínas.

SA Ácido sulfônico: Troca iônica forte, catiônica.

SB Íon de amônio quaternários: Cromatografia por troca iônica. Trocadora aniônica, fortemente básica.

A retenção da amostra na coluna no modo reverso é mais forte com o aumento do comprimento da cadeia carbônica e com a hidrofobicidade do grupo

substituente quimicamente ligado à sílica. Por exemplo, a retenção com a coluna C₁₈ é significativamente maior do que a coluna C₈.

(fraca) sílica não ligada << ciano < C₁ < C₃ < C₄ < fenil < C₈ < C₁₈ (forte)

O tamanho da partícula da coluna é uma característica importante. Partículas com diâmetro em torno de 5µm em colunas analíticas representam colunas eficientes, com pressões mais baixas, e bom tempo de vida, realizam a maioria das separações em CLAE. Partículas menores (p.e. 3µm) são usadas para separações mais rápidas. Para uma separação rápida de macromoléculas tais como as proteínas são usadas no recheio da coluna partículas extremamente pequenas com 1,5µm.

Temperatura O aumento na temperatura de 1°C leva a uma diminuição no valor de k de 1 a 2% para compostos não-iônicos. A mudança na temperatura pode ser usada no controle da retenção da amostra tal como a mudança na %B, todavia isto é raramente usado em CFR, visto que é muito mais efetiva a variação na força do solvente.

3.3.2.1. Triângulo da seletividade de solventes

A mudança no tipo de solvente orgânico é a melhor forma para diminuir ou aumentar o espaçamento entre as bandas cromatográficas. O triângulo de seletividade de solventes, **figura 22**, mostra um guia de escolha de diferentes solventes para obtenção de uma melhor seletividade. As moléculas da amostra sofrem interações intermoleculares do tipo dipolo e ligações de hidrogênio com a fase móvel. A seletividade das bandas cromatográficas pode ser especulada com relação ao momento dipolar, acidez ou basicidade da fase móvel usada (Snyder, 1997).

Para criar uma grande mudança na seletividade pela troca do solvente B, o velho e novo solventes devem cair em partes diferentes do triângulo de seletividade de solventes, **figura 22**. Por exemplo, o éter etílico está perto do vértice básico do triângulo, e o diclorometano (DCM) localizado próximo ao vértice dipolar, por este motivo estes dois solventes podem diferir bastante em seletividade. Se o éter etílico for usado em uma primeira análise (fase normal) e o espaçamento entre suas bandas ainda não for satisfatório, a mudança para DCM na próxima análise poderá resultar em uma larga mudança na seletividade.

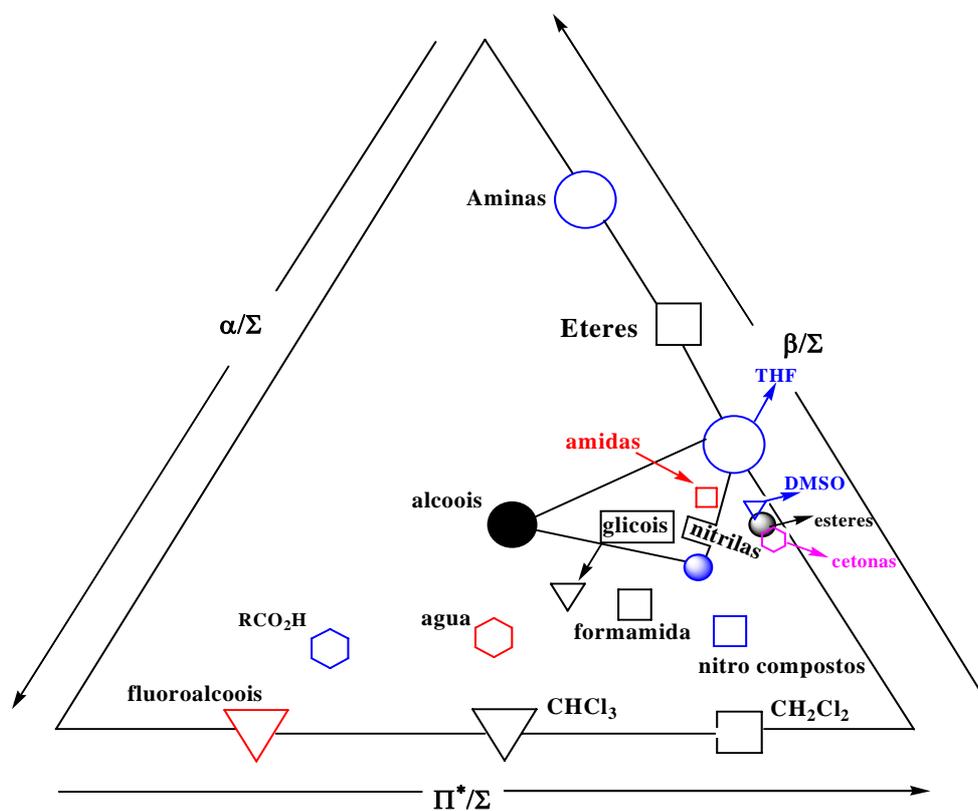


Figura 22: Triângulo da seletividade – modo reverso

Três solventes miscíveis com a água diferem significativamente em suas propriedades de seletividade e são também aceitáveis em termos de absorção no

comprimento de onda na região do ultravioleta e viscosidade: ACN, MeOH, THF. Por esta razão estes solventes são recomendados na investigação de seletividade em CFR. Baseado no triângulo da seletividade de solventes **figura 22**, Kirkland desenvolveu o triângulo de otimização de solventes, **figura 23**, onde em cada ápice fica localizado um dos três solventes (Snyder e Kirkland, 1979).

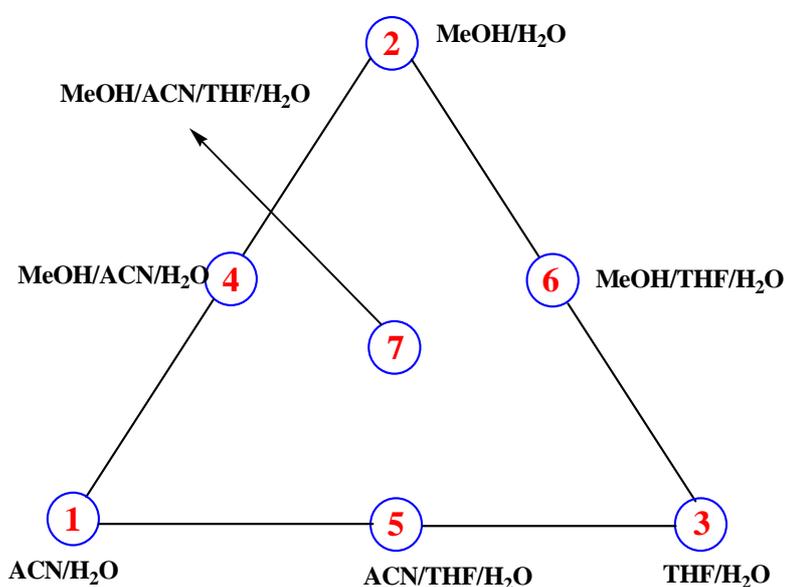


Figura 23: Esquema para otimização da separação no modo reverso

A seletividade intermediária (se necessário, para uma amostra em particular) pode ser obtida pela mistura de quantidades apropriadas de cada um destes três solventes. Uma mudança brusca de seletividade é alcançada variando de um vértice a outro do triângulo, convertendo suas forças através do nomógrafo para modo reverso, **figura 19**.

Um exemplo de como a combinação entre solventes interfere na seletividade em CFR é demonstrado na **figura 24**, onde a mudança de 50% de MeOH para 25% de THF resultou na inversão de ordem de eluição para quatro compostos explosivos: p-nitrofenol; p-dinitrobenzeno; nitrobenzeno; metilbenzoato.

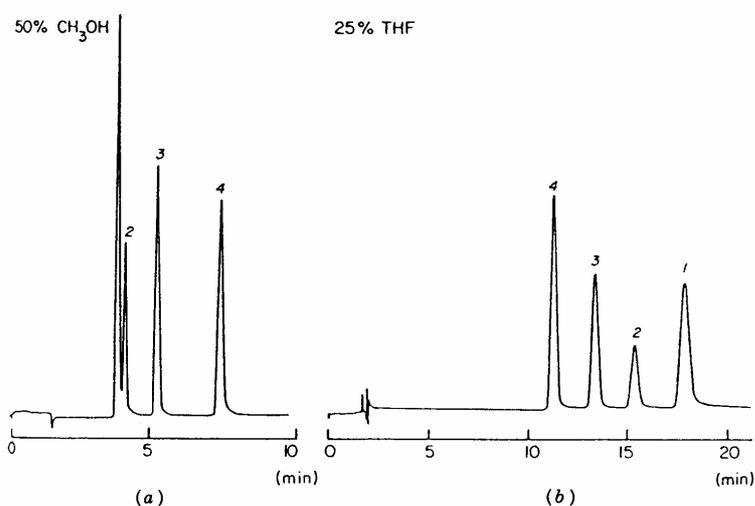


Figura 24: Seletividade do tipo de solvente em CFR. (a) 50% MeOH/H₂O; (b) 25% THF/H₂O. Bandas: 1, p-nitrofenol; 2, p-dinitrobenzeno; 3, nitrobenzeno; 4, metilbenzoato.

3.3.3. Cromatografia de compostos iônicos

Separações cromatográficas de compostos iônicos tendem a ser mais complicadas do que moléculas neutras, mas, por outro lado, o espaçamento das bandas é usualmente conseguido com maior facilidade. A separação de compostos ionizáveis pode ser conseguida por supressão da ionização ou, então, por completa ionização e separação por pareamento de íons ou por troca iônica. Estas duas outras opções também se aplicam a íons.

Em cromatografia de fase reversa, a retenção diminui para compostos mais hidrofílicos.

3.3.4. Cromatografia de troca iônica

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária é normalmente uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno, na qual são ligados grupos iônicos, como por exemplo o grupo $-\text{SO}_3^-$ no caso trocador de cátions, e o grupo $-\text{NH}_3^+$ no caso trocador de ânions.

NR_3^+ , trocador de ânions. Os grupos iônicos possuem um contra-íon (com carga oposta) que pode ser deslocado pelos íons da fase móvel de carga similar a ele.

Exemplos característicos dos compostos separados por cromatografia de troca iônica são ácidos carboxílicos, açúcares, analgésicos, vitaminas, ânions inorgânicos e cátions metálicos ou complexos. Contudo, esta técnica pode ser também aplicada na separação de peptídeos, aminoácidos e ácidos nucleicos que podem se ionizar em soluções com pH devidamente tamponado.

3.3.5. Cromatografia de exclusão

A cromatografia por exclusão efetua a separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. Ela é usada especialmente para separação preliminar de amostras complexas visando isolar ou purificar polímeros. Na análise de polímeros ela é empregada para observar a presença de dímeros, trímeros, etc. ou para estimar o peso molecular de polímeros sintéticos ou naturais.

A separação por exclusão requer que o tamanho do poro da fase estacionária seja adequadamente selecionado de acordo com o tamanho das moléculas que se pretende separar. As moléculas pequenas devem penetrar nos poros, enquanto as moléculas grandes devem ser excluídas de todos os poros da fase estacionária. As de tamanho intermediário serão parcialmente excluídas. Qualquer interação extra com a fase estacionária levará a um aumento do volume de retenção por isto a redução de interações com a fase estacionária deve ser conseguida quando se usa cromatografia de exclusão para determinação do peso molecular.

A escolha do solvente em cromatografia de exclusão requer apenas que o soluto seja solúvel na fase móvel e que esta tenha baixa viscosidade, além de compatibilidade com o soluto e a fase estacionária. Em CLAE, as fases estacionárias que podem ser usadas em cromatografia de exclusão são sílica gel, sílica derivada ou polímeros rígidos (Cass, Degani, 2001).

3.3.6. Cromatografia quiral

O mecanismo de separação de enantiômeros por cromatografia quiral esta fundamentado na diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre a fase estacionária quiral e os enantiômeros a serem separados. As diferenças em estabilidade destes complexos transitórios levam a diferentes tempos de retenção dos enantiômeros na coluna. O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro. A diferença de energia livre de formação dos adsorbatos diastereoisoméricos formados deve ter um valor satisfatório para que ocorra a separação.

Colunas quirais têm sido utilizadas eficientemente tanto em cromatografia gasosa quanto em cromatografia líquida de alta eficiência. O sucesso obtido com este método tem sido grande e várias colunas comerciais têm sido usadas para resolução de um grande número de produtos farmacêuticos e intermediários sintéticos em geral. A CLAE tem se destacado quando comparada à CG devido a maior diversidade de fase quirais que tem sido desenvolvida para aplicação em cromatografia líquida (Cass, Degani, 2001).

3.4. ELUIÇÃO POR GRADIENTE

A eluição por gradiente é feita aumentando-se a força da fase móvel durante a separação cromatográfica. Faz-se necessária quando se trabalha com misturas complexas com solutos que possuem uma grande variedade de valores de k . Gradientes binários são os mais usados e podem ser formados em uma variedade de modos (côncavo, convexo e linear), mas usualmente o gradiente linear é o mais empregado.

A eluição isocrática é normalmente preferida a gradiente devido a uma série de desvantagens atribuídas ao uso de gradiente tais como:

1. O equipamento para o uso de gradiente é mais complexo;
2. Não pode ser usado com alguns detectores, como por índice de refração;

3. O desenvolvimento e a otimização são mais complexos, pois tem um número maior de variáveis a serem examinadas;
4. O tempo de análise é prejudicado pelo tempo que deve ser concedido para reequilíbrio da coluna e normalmente se têm problemas com a linha de base;
5. Não é possível aplicá-lo a todos os tipos de fases estacionárias e a combinação fase móvel/estacionária deve ser cuidadosamente selecionada;
6. A transferência de método é complicada, pois a diferença entre os equipamentos pode afetar muito a separação conseguida.

O desenvolvimento de um método de análise em cromatografia de fase reversa normalmente inicia-se com uma eluição em gradiente. Através desta separação é possível determinar quando a eluição por gradiente ou isocrática será a técnica apropriada para uma dada amostra. Também é possível estimar a força do solvente para separação isocrática ou extensão do gradiente, se a opção for separação por gradiente.

Capítulo

4

EXPERIMENTAL

4.1. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Para obtenção dos extratos foram utilizados solventes grau P.A. da marca Vetec. Os extratos vegetais foram concentrados em aparelho evaporador rotatório da marca BUCHI.

Foram utilizados solventes ultrapuros grau HPLC nas análises cromatográficas de alta eficiência da marca J.T. Baker (Philipsburg, PA, EUA).

A água desionizada utilizada no sistema de CLAE foi obtida através do sistema de filtração Milli-Q (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).

As amostras injetadas no cromatógrafo líquido foram previamente filtradas em filtro seringa da marca Millipore[®], com membrana de nylon de 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro.

Os solventes utilizados nas análises em CLAE foram filtrados a vácuo através de uma membrana de nylon Millipore[®] de 0,45 µm e em seguida desgaseificados em ultra-som COLE-PALMER 8852.

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em pastilhas de KBr em um espectrofotômetro BOMEN-MICHELSON FT-IR, MODELO Power Male 1-ultrasync, na região de 400 a 4000 cm⁻¹, no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (SP).

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ¹H e ¹³C foram realizadas em espectrômetro BRUKER de 400 MHz, no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Foram utilizados solventes deuterados Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) para ressonância de hidrogênio, carbono treze e como referência interna o próprio solvente e TMS.

4.2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

4.2.1. Sistemas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SISTEMA1: Cromatógrafo líquido SHIMADZU série prominence composto por duas bombas LC-20AT, auto-injetor SIL 20A, forno CTO-20A, desgaseificador DGU-20A, válvula seletora de solvente FCV-20A, detector por arranjos de fotodiodos SPD-M10AVP, ligados a uma interface CBM-20A. A análise dos dados foi registrada através do software LABSolution.

SISTEMA2: Cromatógrafo líquido SHIMADZU composto por uma bomba LC-8A, injetor manual RHEODYNE 7125 com *loop* de 500 µL, detector espectrofotométrico de ultravioleta de comprimento de onda variável modelo SPD-10D ligados a uma interface CBM-10A. A análise dos dados foi registrada através do software CLASS-LC10.

SISTEMA 3: Cromatógrafo líquido SHIMADZU composto por uma bomba LC-10ADvp, desgaseificador DGU-12A, equipamento de gradiente de baixa pressão FCV-10ALvp, injetor manual RHEODYNE, forno CTO-10AVp, detector por arranjos de fotodiodos SPD-M10Avp, ligados a uma interface SCL-10Avp. A análise dos dados foi registrada através do software CLASS-VP 5.0.

4.3. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

Foram utilizadas colunas comerciais analíticas C₁₈ das marcas: Phenomenex[®] (25,0 x 0,46 cm, partícula de 5 µm), THERMO Hypersil[®] (15,0 x 0,46 cm, 5 µm de tamanho de partícula) e Shimadzu ShimPack[®] (15,0 x 0,46 cm com partícula de 3 µm).

A coluna comercial preparativa utilizada no trabalho foi a SHIMADZU ShimPack[®] (25,0 x 2,0 cm).

4.3.1. Procedimento para empacotamento das colunas analíticas e semi-preparativas

Para empacotamento das colunas analíticas e semi-preparativas foram utilizadas sílicas C₁₈ Hypersil[®] com partícula de 5 µm e sílica Hexil-fenil Luna[®] com tamanho de partícula de 10 µm.

Para empacotar as colunas foi utilizada uma empacotadora SHANDON do Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da UFSCar e metanol como solvente.

Colunas de aço inox analítica (15,0 x 0,46 cm) e semi-preparativa (15 x 0,7 cm) foram recheadas com 2,5 g e 9,3 g de sílica respectivamente, sob pressão de 7000 psi, utilizando metanol como solvente.

As sílicas utilizadas neste processo foram previamente suspensas em metanol – 40 mL para coluna analítica e 60 mL para coluna semi-preparativa – em seguida homogeneizadas no ultra-som por três minutos.

As colunas após o empacotamento foram condicionadas em metanol por 4 horas empregando uma vazão de 1,0 mL/min.

4.4. ESPÉCIES VEGETAIS

4.4.1. Coleta

As folhas de *Annona muricata* foram adquiridas no Campus A.C. Simões da Universidade Federal de Alagoas no mês de maio de 2005.

As sementes de *Annona muricata* foram obtidas no mês de março do ano de 2005 na fábrica de sorvetes Fika Frio em Maceió – AL.

As sementes de *Annona squamosa* foram adquiridas no mercado público de Maceió em abril do ano de 2005.

4.4.2. Procedimento Inicial

Todo material vegetal foi seco através da luz solar durante 3 dias e em seguida pulverizado em máquina forrageira no Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas.

4.4.3. Preparo e Fracionamento do Extrato Bruto

O pó das sementes de *Annona muricata* (1,2 Kg) foi colocado em um percolador utilizando como solvente extrator o etanol (6000 mL), ficando em maceração por 3 dias. O macerado foi retirado através de uma torneira, concentrado em aparelho evaporador rotatório e o solvente foi adicionado novamente no percolador. Este processo se repetiu por mais três vezes, obtendo-se assim o extrato bruto seco das sementes de *Annona muricata*.

O pó das sementes de *Annona squamosa* (1 Kg) foi colocado em um percolador utilizando como solvente extrator o etanol (5000 mL), ficando em maceração por 3 dias. O macerado foi retirado através de uma torneira, evaporado em aparelho rotatório e o solvente readicionado ao percolador. Este processo se repetiu por mais três vezes.

O pó das folhas de *Annona muricata* (300 g) foi colocado em um percolador utilizando como solvente extrator o etanol (1000 mL), ficando em maceração por 3 dias. O macerado foi retirado através de uma torneira, evaporado em aparelho rotatório e o solvente readicionado ao percolador. Este processo se repetiu por mais três vezes.

4.4.4. Extração da clorofila do extrato em clorofórmio das folhas de *Annona muricata*

O extrato clorofórmico das folhas de *Annona muricata* (50 mg) foi solubilizado em diclorometano, incorporado na sílica e em seguida evaporado em aparelho evaporador rotatório até atingir o aspecto de um pó fino e seco. Uma coluna de vidro foi recheada com 1,5 g de uma mistura de florissil e sílica (1:1) e no topo da coluna foi colocada a amostra. Eluiu-se por duas vezes com 20 mL de diclorometano, as

frações foram reunidas e o solvente removido para obter uma cera amarelada (5 mg), agora denominado extrato bruto clorofórmico das folhas de *A. muricata* isento de clorofila.

4.5. TESTES BIOLÓGICOS

Os testes larvicidas foram realizados com as larvas do mosquito *Aedes aegypti* no Laboratório de Bioensaios Larvicida do Instituto de Química da Universidade Federal de Alagoas.

Para a realização dos testes os ovos do *Aedes aegypti* foram submersos numa bacia contendo água desclorada a uma temperatura ambiente entre 25° e 27°C para a eclosão dos ovos. As larvas obtidas são alimentadas com ração para gatos até atingir o quarto estágio larval (L4).

4.5.1. Bioensaio larvicida

O bioensaio é realizado em replicata (n = 4) com 25 larvas L4, em copos plásticos contendo 25,0 mL da solução teste. A solução teste foi preparada dissolvendo a amostra em uma solução a 1% de DMSO em água. O controle negativo foi feito com solução 1% de DMSO em água e controle positivo com a rotenona. Após 24 h foi feita a leitura e a retirada das larvas mortas. As larvas foram consideradas mortas quando não responderam a estímulo induzido ou quando não conseguiram chegar à superfície da solução seguindo as normas da OMS (WHO, 1965). Após 48 h foi feito o registro final com o número total de larvas mortas. A variação de temperatura variou de 25° a 27°C e a umidade relativa do ar variou de 85 a 92%.

Capítulo

5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ELUIÇÃO POR GRADIENTE

A presença de acetogeninas na *A. muricata* e *A. squamosa* já foi amplamente documentada por diversos autores (Rupprecht et al, 1990; Cave et al, 1993; Fang et al, 1993; Fugimoto et al, 1994). O grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais do IQB/UFAL vêm trabalhando há mais de dez anos com estas duas espécies usando a cromatografia líquida em coluna e cromatografia de camada delgada (CCD) na tentativa de isolamento e identificação destes compostos (Lima, 2005 e Luna et al, 2006). Quando este trabalho foi iniciado tinha-se em mãos uma fração isolada das folhas de *A. muricata* por *J. S. Luna*, correspondente a uma única mancha em CCD, mas que por ^1H RMN mostrava que se tratava de uma mistura de compostos rica em acetogeninas (Luna et al, 2006). Por isto, foi decidido usar a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência nesta mistura como alternativa para estabelecer os parâmetros de isolamento das acetogeninas nas espécies estudadas.

O uso da eluição gradiente em condições de ampla faixa de força da fase móvel é tido como exploratório e pode ser usado de modo a fornecer um cromatograma *fingerprint* (impressão digital) da amostra em análise (Cass, Degani, 2001). O primeiro passo do trabalho foi a realização de um gradiente exploratório da mistura de acetogeninas obtida por *J. S. Luna* para visualizar sua complexidade e identificar a fase móvel mais eficiente para esta separação.

Inicialmente, foi empregado um gradiente exploratório binário usando a mistura água (A) e acetonitrila (B) como solventes, em uma coluna analítica C₁₈ 25 x

0,46 cm, partícula de 5 μm , Phenomenex[®]. Fez-se variar a concentração do solvente B de 5% a 100% durante sessenta minutos, com vazão de 1,0 mL por minuto. A análise foi acompanhada pelo detector de arranjos de diodos DAD (UV-Vis) utilizando cinco comprimentos de onda: 225, 230, 240, 250 e 280 nm. A melhor detecção foi encontrada em 225 nm. Foi preparada uma solução com concentração de 5 mg/mL desta mistura e injetada uma alíquota de 30 μL desta solução. A **figura 25** mostra o cromatograma desta mistura, onde a maioria dos compostos eluíram entre 45 a 60 minutos.

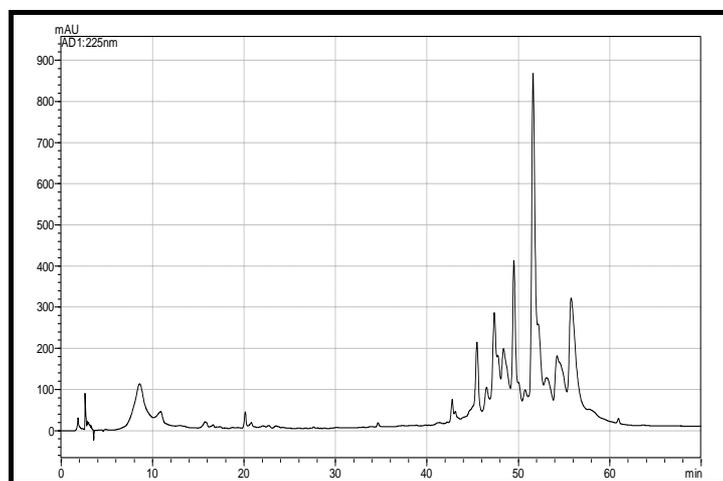


Figura 25: Gradiente exploratório da mistura rica em acetogeninas

Conhecendo a complexidade da mistura e as condições cromatográficas da fração rica em acetogeninas isolada anteriormente por *J. S. Luna*, a próxima etapa do trabalho foi a avaliação dos extratos brutos etanólicos das sementes de *A. muricata* e *A. squamosa* e do extrato em clorofórmio das folhas de *A. muricata* empregando as mesmas condições. A obtenção de um *fingerprint*, cromatograma do extrato bruto do vegetal variando a composição da fase móvel em uma ampla faixa de força durante a análise, foi o próximo passo para caracterizar a diversidade química das espécies estudadas.

O extrato bruto clorofórmico das folhas de *A. muricata* foi filtrado em uma coluna empacotada com uma mistura de sílica e florisil (1:1) para remoção da clorofila. Este filtrado foi concentrado e submetido a um gradiente exploratório. Foi

empregado o mesmo gradiente linear aplicado à mistura rica em acetogeninas (5% a 100% ACN/60 min), coluna analítica C₁₈ 25 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, Phenomenex[®], vazão de 1,0 mL/min e detecção no comprimento de onda de 225 nm. Foram injetadas alíquotas de 30 µL de uma solução de 15 mg/mL do extrato bruto para obter o cromatograma *fingerprint* desta espécie, **figura 26**.

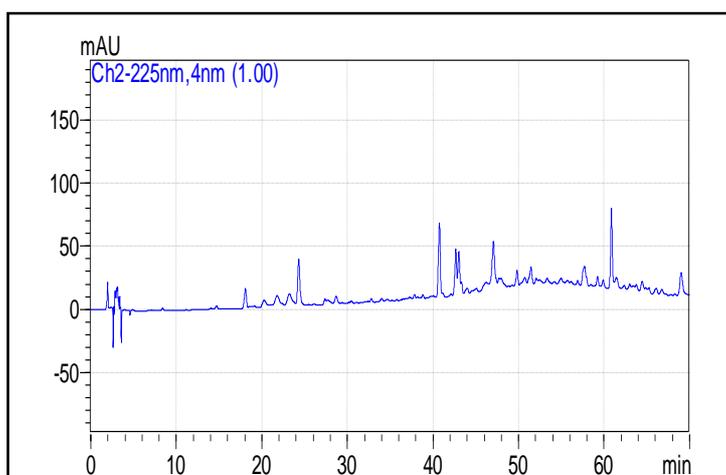


Figura 26: *Fingerprint* da folha de *Annona muricata* (extrato bruto em clorofórmio) isenta de clorofila

Obter extratos clorofórmicos isentos de clorofila foi o grande problema na obtenção de cromatogramas reprodutíveis das folhas da *A. muricata*. As filtrações realizadas na mistura sílica gel e florisil usando diclorometano como solvente, levavam a obtenção de extratos que quando submetidos a CLAE exibiram pequeno número de bandas cromatográficas, isto pode ter acontecido devido a retenção de alguns compostos além da clorofila.

Por causa destas dificuldades encontradas nesta fase do trabalho foi decidido estudar os extratos brutos etanólicos das sementes da *A. muricata* e *A. squamosa*. O método de análise empregado foi o mesmo aplicado anteriormente (5% a 100% ACN/60 min), coluna analítica C₁₈ 25 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, Phenomenex[®], vazão de 1,0 mL/min e detecção no comprimento de onda de 225 nm, com finalidade de estabelecer uma comparação entre as espécies vegetais estudadas. Foram injetadas alíquotas de 30 µL de uma solução de 15 mg/mL do

extrato bruto para obter os cromatogramas *fingerprint* destas espécies, **figura 27 e 28**.

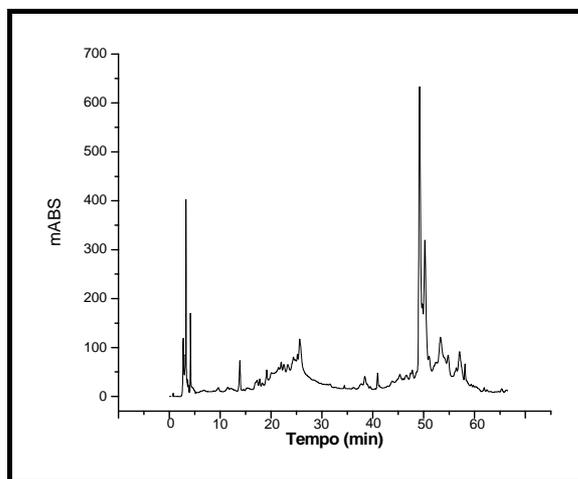


Figura 27: *Fingerprint* da semente de *Annona muricata* (extrato bruto em etanol)

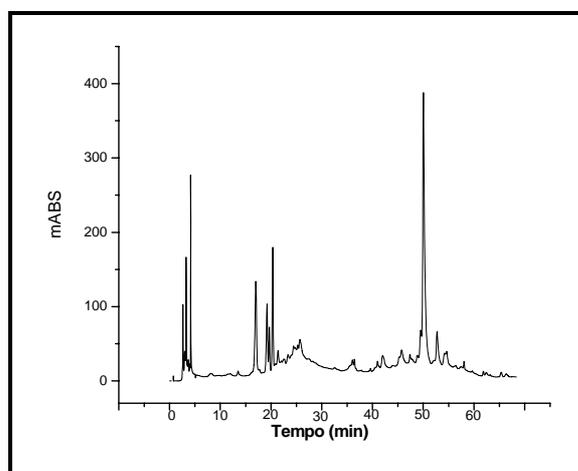


Figura 28: *Fingerprint* da semente de *Annona squamosa* (extrato bruto em etanol)

A diferença marcante encontrada na análise dos dois cromatogramas *fingerprint*, **figuras 27 e 28**, é que o extrato bruto etanólico das sementes de *A. squamosa* exibe a presença de bandas com tempo de retenção entre 15 e 25 minutos que não foram observadas nas sementes e folhas de *A. muricata*. Uma visão mais clara da similaridade e diferenças entre dois extratos brutos pode ser observada

através da sobreposição entre seus cromatogramas *fingerprint*, como mostra a **figura 29**.

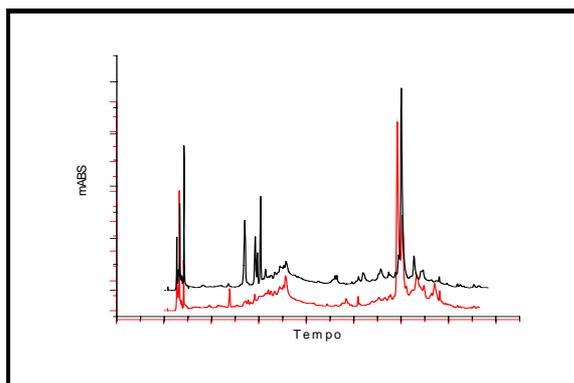


Figura 29: Sobreposição dos cromatogramas *fingerprint* das sementes de *A. muricata* (vermelho) e *A. squamosa* (preto)

Nos extratos submetidos à CLAE por eluição gradiente, foi observado a presença de bandas entre 45 e 60 minutos com absorção no comprimento de onda de 225 nm. Tal similaridade e sabendo que a mistura de acetogeninas obtida por *J. S. Luna* possui tempo de retenção semelhante, sugere que é nesta região que se deve encontrar as acetogeninas nas espécies de anonas estudadas.

Devido ao grande número de bandas encontradas entre 45 e 60 minutos decidiu-se procurar uma mistura ideal de solventes, para ser usado em eluição isocrática, para isolar os diversos componentes para futura identificação. Tendo como premissa que o percentual do solvente B variou 1,5%/min chega-se a conclusão que a composição da fase móvel para explorar esta região em eluições isocráticas está em torno de 60% a 90% ACN em mistura com a água.

5.2. ELUIÇÃO ISOCRÁTICA

A espécie escolhida para início dos estudos foi a *A. muricata* e os testes para escolha da fase móvel tiveram início usando uma mistura ACN/H₂O 60:40 v/v, numa coluna C₁₈ Hypersil 15 x 0,46 cm com vazão de 1,0 mL/min e detecção em 225 nm. Através da análise do cromatograma pode ser notado que não houve uma boa separação, com muitas bandas em coeluição em torno de 2 e 5 minutos, abaixo é mostrado o cromatograma, **figura 30**.

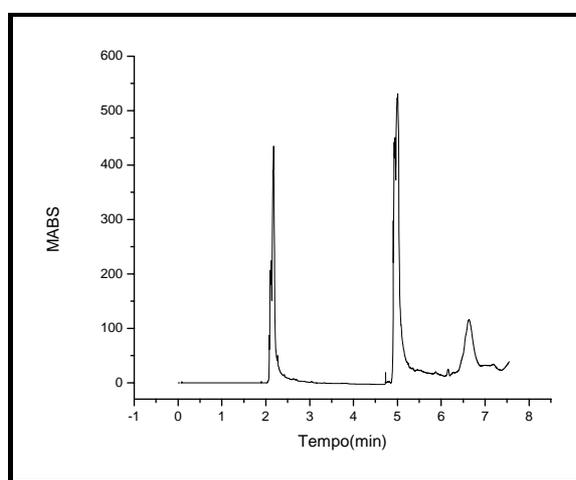


Figura 30: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona muricata*, coluna C₁₈ Hypersil[®] 15 x 0,46 cm, fase móvel ACN/H₂O 60:40, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Na procura por uma melhor separação a força do solvente B (acetonitrila) foi elevada para 80% e para completar a mistura 20% de água. Nesta análise percebeu-se uma melhor resolução das bandas cromatográficas, apesar de ainda apresentar bandas sobrepostas entre 2,5 e 5 e entre 10 e 15 minutos, **figura 31**.

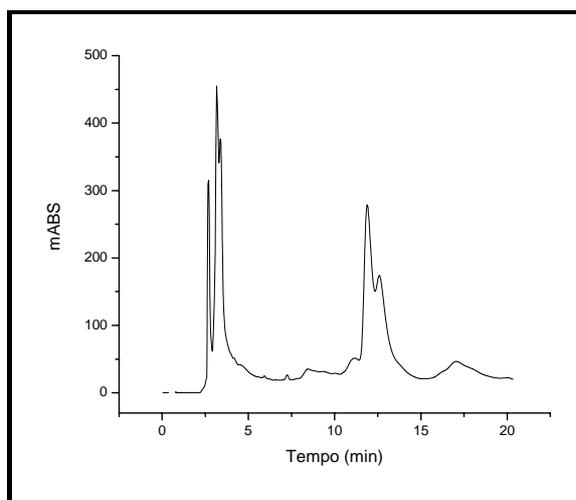


Figura 31: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona muricata*, coluna C₁₈ Hypersil® 15 x 0,46 cm, fase móvel ACN/H₂O 80:20, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Com um aumento da percentagem de acetonitrila para 85% foi observado que as bandas, entre 2,5 e 5 e entre 10 e 15 da análise anterior, que estavam separando voltaram a se juntar em torno 2,5 e 4 e entre 8 e 11 minutos, **figura 32**. Este resultado não era o comportamento esperado para o aumento na concentração de B, as bandas deveriam ter tido uma melhor separação, indicando que outros parâmetros de separação fossem investigados.

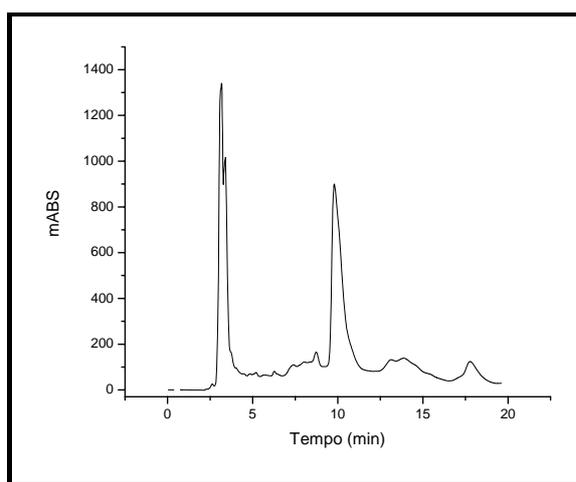


Figura 32: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona muricata*, coluna C₁₈ Hypersil® 15 x 0,46 cm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Foi avaliado inicialmente a eficiência da coluna usada. O extrato bruto etanólico das sementes de *A. muricata* foi recromatografado nas mesmas condições de análise da **figura 32**, trocando a coluna C₁₈ Hypersil[®] 15 x 0,46 cm pela também C₁₈ THERMO Hypersil[®] 15 x 0,46 cm, nova. O cromatograma apresentado na **figura 33**, mostra a surpreendente diferença causada pela troca de coluna e mostra que a composição ACN/H₂O 85:15 v/v se trata de uma fase móvel eficaz na separação de compostos com tempo de retenção entre 7 e 10 minutos. Esta região compreende na eluição por gradiente desta mesma semente ao conjunto de compostos que eluíram entre 45 e 60 minutos **figura 27** e da **figura 25**, o cromatograma da mistura rica em acetogeninas obtida e cedida por *J. S. Luna* para início dos estudos.

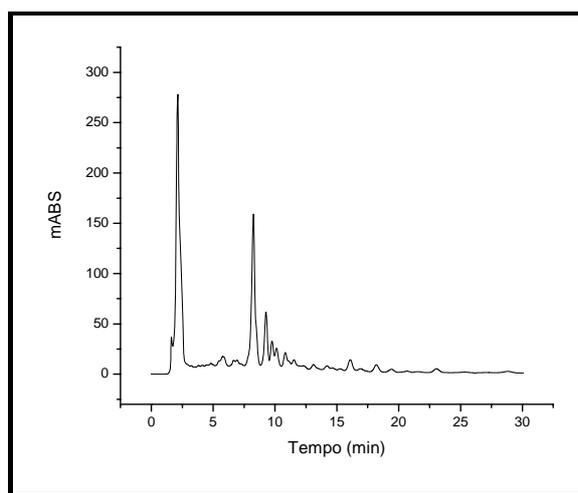


Figura 33: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona muricata*, coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15 x 0,46 cm, partícula de 5 μ m, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Devido a similaridade comprovada entre os extratos brutos das sementes estudadas **figura 29**, o extrato bruto etanólico das sementes de *A. squamosa* foi analisado sob as mesmas condições, **figura 34**. Tanto a composição da fase móvel, ACN/H₂O 85:15, quanto à escolha da coluna THERMO Hypersil[®], foram eficientes para separação de alguns compostos. Nesta espécie foram observadas bandas

cromatográficas com tempo de retenção entre 6 e 10 minutos, semelhante à *A. muricata*. Pode ser observado também uma boa separação para os compostos que eluíram entre 3 e 5 minutos de análise. Não são observadas estas bandas no extrato bruto etanólico das sementes de *A. muricata*.

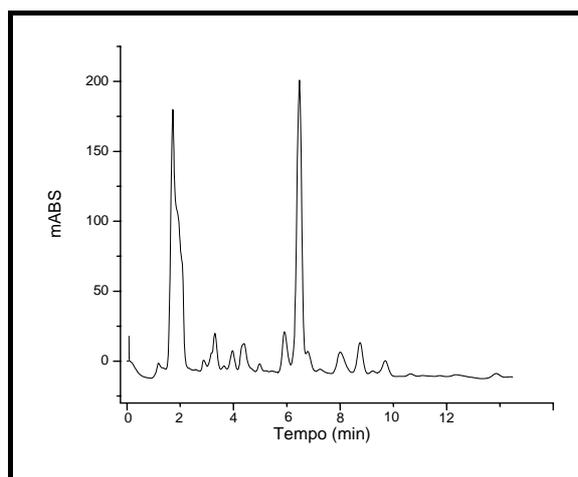


Figura 34: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15 x 0,46 cm, partícula de 5µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Estabelecida as condições iniciais de separação da mistura de substâncias contidas nos extratos brutos etanólicos em análise, iniciou-se a etapa de isolamento dos compostos em quantidades suficientes para suas identificações através de métodos espectrométricos.

5.3. ESCALA MULTI-MILIGRAMA

4.3.1. CLAE Preparativa do extrato bruto etanólico das sementes de *A. muricata*

A transferência do método analítico para o multi-miligrama é feito basicamente ajustando as condições em que a coluna preparativa (maior dimensão) será submetida. Na prática isto significa ajustar a vazão da fase móvel e a carga que será injetada por análise (concentração da amostra). A composição da fase móvel e o comprimento de onda que será feita a detecção permanecem inalterados.

Normalmente as bandas cromatográficas em CLAE preparativa sofrem um alargamento devido à alta carga injetada, podendo algumas vezes apresentar sobreposição de bandas.

O extrato bruto etanólico das sementes de *Annona muricata* foi submetido a isolamento empregando como fase móvel ACN/H₂O 85:15 e vazão de 10,0 mL/min. A detecção foi acompanhada pelo detector de UV em 225 nm, coluna C₁₈ SHIMADZU Shim Pack 25,0 X 2,0 cm. Em cada análise foram injetadas amostras na concentração de 100 mg/500 µL. Os compostos que eluíram em 27 e 33 minutos foram isolados e denominados frações AMS2 e AMS3.

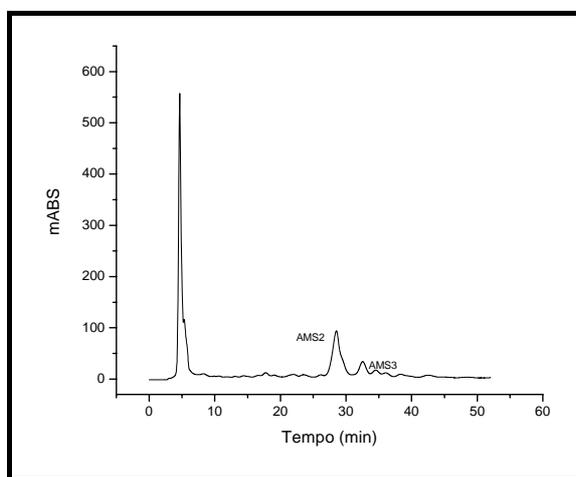


Figura 35: Exemplo da separação preparativa de amostras do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona muricata*, coluna C₁₈ SHIMADZU Shim Pack 25,0 X 2,0 cm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 10,0 mL/min, detecção 225 nm

Com as frações AMS2 e AMS3 em mãos foi necessário verificar o grau de pureza destas. Foram realizados análises em condições analíticas destas frações coletadas na separação preparativa. Felizmente, na CLAE analítica a fração AMS2 se mostrou como uma banda sugerindo se tratar de um único composto agora denominado substância AMS2. Usando como fase móvel ACN/H₂O 85:15, com vazão de 1,0 mL/min e detecção 225 nm, em uma coluna C₁₈ THERMOHypersil® 15,0 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, AMS2 apresentou tempo de retenção de 8,5 minutos, **figura 36**.

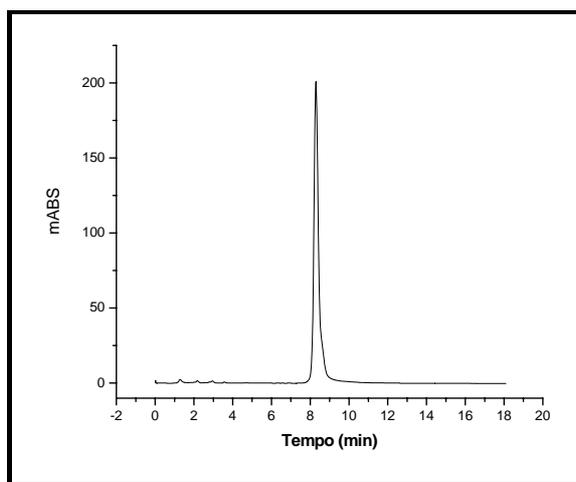


Figura 36: Cromatograma analítico do composto isolado AMS2 das sementes de *Annona muricata*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15,0 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Sob as mesmas condições analíticas usadas para verificar o grau de pureza do AMS2 a fração AMS3 apareceu também como uma banda fina sugerindo também se tratar de um único composto agora denominado substância AMS3, **figura 37**, nessas condições AMS3 apresentou tempo de retenção de 9,5 minutos.

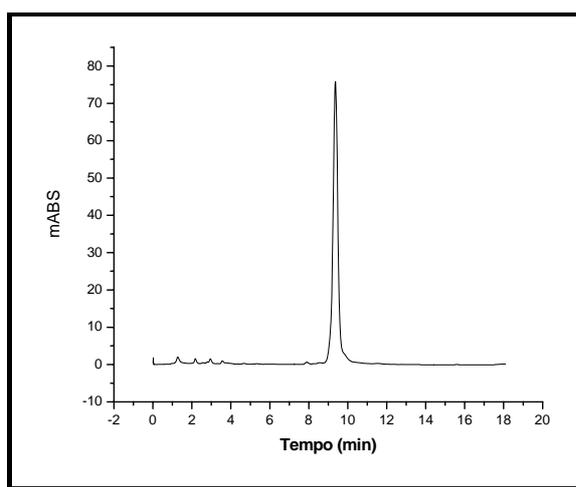


Figura 37: Cromatograma analítico do composto isolado AMS3 das sementes de *Annona muricata*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

5.3.2. CLAE Preparativa do extrato bruto etanólico das sementes de *A. squamosa*

O extrato bruto etanólico das sementes de *Annona squamosa* foi submetido ao isolamento de seus compostos empregando como fase móvel ACN/H₂O 85:15 v/v e vazão de 10,0 mL/min. A detecção foi acompanhada pelo detector de UV em 225 nm, coluna C₁₈ SHIMADZU Shim Pack 25,0 X 2,0 cm. Em cada análise foram injetadas amostras na concentração de 100 mg/500 µL.

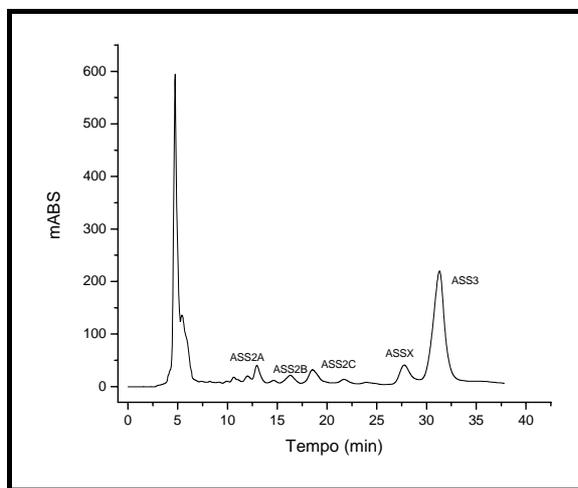


Figura 38: Exemplo da separação preparativa de amostras do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, coluna C₁₈ SHIMADZU Shim Pack 25 X 2,0 cm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 10,0 mL/min, detecção 225 nm

Na CLAE preparativa do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, **figura 38**, mostra a possibilidade de se obter várias frações de fácil isolamento. Cinco frações foram coletadas: ASS2A ($t_R \sim 13$ min), ASS2B ($t_R \sim 16$ min), ASS2C ($t_R \sim 19$ min), ASSX ($t_R \sim 26$ min), ASS3 ($t_R \sim 31$ min).

Os compostos que eluíram entre no CLAE preparativo entre 13 e 18 minutos de análise são os mesmos que eluem no CLAE analítico entre 3 e 5 minutos, presentes apenas nesta espécie. Destes, três apresentaram condições de isolamento.

Foram realizados análises em condições analíticas da fração ASS2A coletadas na separação preparativa. Na CLAE analítica a fração ASS2A se mostrou

como uma banda fina sugerindo se tratar de um único composto agora denominado substância ASS2A. Usando como fase móvel ACN/H₂O 85:15, com vazão de 1,0 mL/min e detecção 225 nm, em uma coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15,0 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, ASS2A apresentou tempo de retenção de 4,5 minutos, **figura 39**.

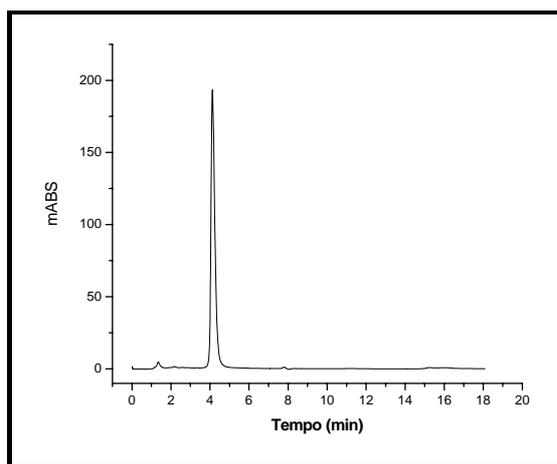


Figura 39: Cromatograma analítico do composto isolado ASS2A das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Na CLAE analítica a fração ASS2B se mostrou como uma banda fina sugerindo se tratar de um único composto agora denominado substância ASS2B. Usando como fase móvel ACN/H₂O 85:15, com vazão de 1,0 mL/min e detecção 225 nm, em uma coluna C₁₈ THERMOHypersil[®] 15,0 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, ASS2B apresentou tempo de retenção de 5,0 minutos, **figura 40**.

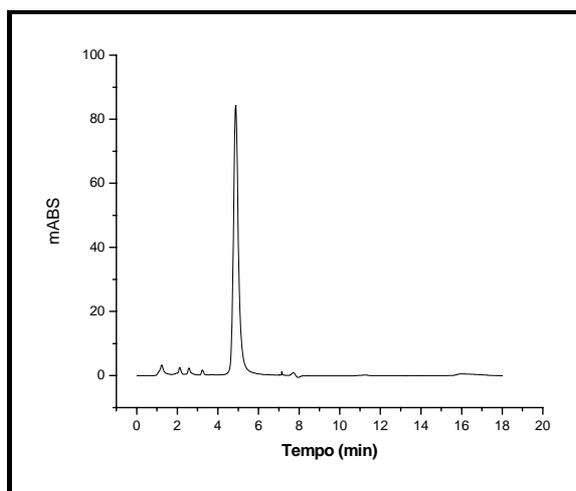


Figura 40: Cromatograma analítico do composto isolado ASS2B das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Sob as mesmas condições analíticas descritas para ASS2A e ASS2B, a fração ASS2C ($t_R \sim 5,5$) também se mostra como uma banda fina, sugerindo se tratar de uma substância pura, agora denominada substância ASS2C, **figura 41**.

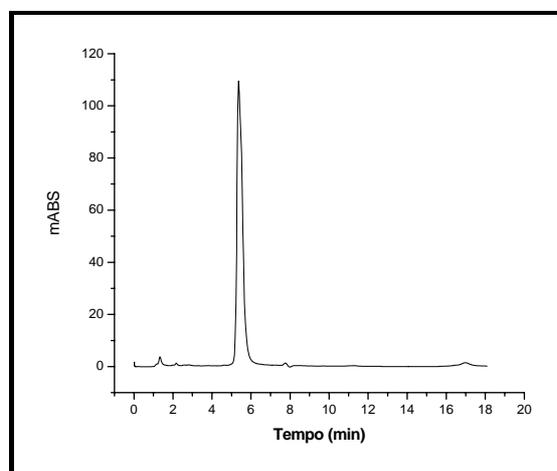


Figura 41: Cromatograma analítico do composto isolado ASS2C das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Infelizmente, o CLAE analítico da fração ASSX mostrou-se tratar da mistura de pelo menos duas substâncias, **figura 42**. Esta mistura foi guardada para futura tentativa de purificação.

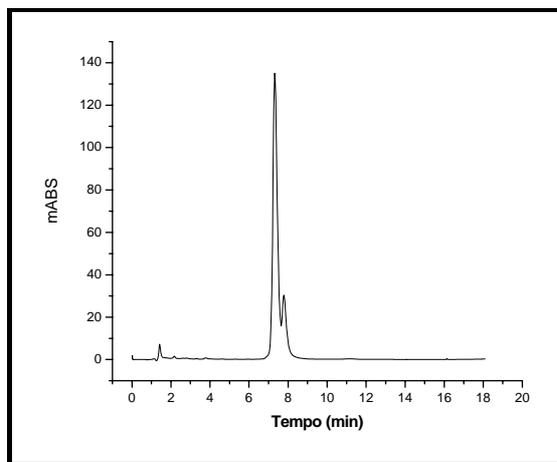


Figura 42: Cromatograma analítico do composto isolado ASSX das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

A fração ASS3, a mais abundante no extrato, quando analisada em CLAE analítico usando as mesmas condições supracitadas também se apresentou como uma banda fina, sugerindo tratar-se de uma única substância, agora denominada substância ASS3.

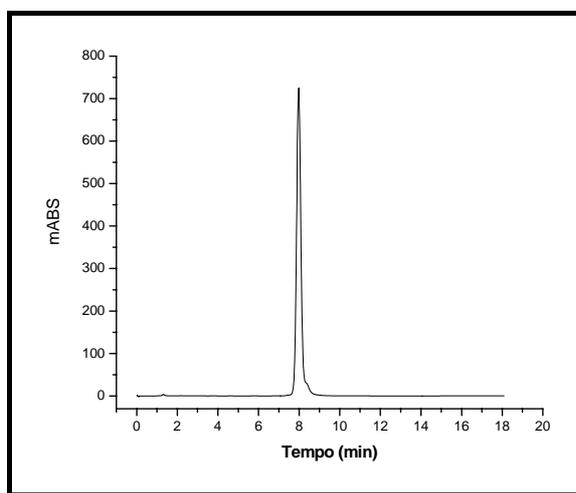


Figura 43: Cromatograma analítico do composto isolado ASS3 das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm, partícula de 5 µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

5.4. TRIÂNGULO DE OTIMIZAÇÃO SISTEMÁTICA NO MODO REVERSO

Como um dos objetivos do trabalho é a formulação de um bioinseticida a partir das sementes de *A. muricata* e de *A. squamosa*, faz-se necessário isolar, caracterizar e quantificar os compostos presentes no extrato vegetal. Para diferenciar os extratos brutos etanólicos destas duas espécies é necessário eleger um ou mais dos compostos da mistura como “marcador” do extrato. Para ser eleito como composto marcador a substância deve ser de fácil separação, caracterização e ser abundante.

A substância denominada ASS3 isolada nas sementes de *A. squamosa* foi o primeiro marcador escolhido. Como pode ser visto no cromatograma do extrato bruto etanólico, **figura 34**, a banda mais intensa que se refere ao composto ASS3 ($t_R \sim 7,0$) pode ter sua resolução melhorada.

Foi decidido que o parâmetro a ser utilizado para se obter uma melhor resolução da banda ASS3 seria a mudança na composição da fase móvel baseado no triângulo de otimização de solventes, **figura 23** (Snyder, 1997). São três as propriedades do solvente que afetam a seletividade em cromatografia líquida no modo reverso: acidez, basicidade e polaridade. Este modelo de otimização para se obter uma composição de fase móvel ideal, em cromatografia de fase reversa, propõe o uso de três solventes para que se consiga a seletividade desejada entre duas bandas. São eles metanol, acetonitrila e tetraidrofurano.

O primeiro passo foi integrar a fase móvel que vinha sendo utilizada, ACN/H₂O 85:15, ao triângulo de otimização no modo reverso, visto que esta combinação resultou em uma boa separação. Isto se fez necessário porque esta mistura ainda não é seletiva para a banda ASS3, composto escolhido para ser o marcador no extrato bruto etanólico da *A. squamosa*, que se deseja quantificar.

Com o auxílio do nomógrafo para fase reversa podemos escolher duas outras combinações binárias de solventes, com força similar, para comporem a fase móvel. No caso de uma mistura ACN/H₂O 85:15 tem força similar as misturas MeOH/H₂O 88:12 e THF/H₂O 63:37, **figura 44**.

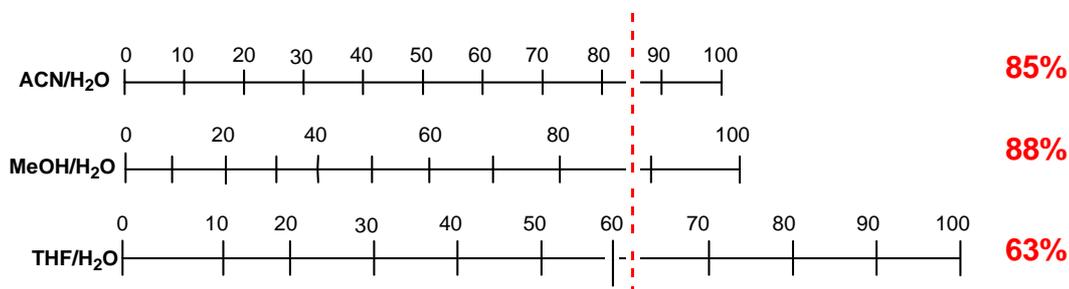


Figura 44: Nomógrafo para modo reverso de eluição, com ajuste de força para os três solventes usados em CFR: ACN (85%), MeOH (88%) e THF (63%)

Estas três misturas de solventes (ACN/H₂O 85:15; MeOH/H₂O 88:12 e THF/H₂O 63:37) formaram os vértices do triângulo de otimização no modo reverso para o extrato bruto etanólico da semente de *A. squamosa*, **figura 45**. Com os três vértices do triângulo de otimização definidos, diversas composições de fase móvel, dentro de sua área, puderam ser exploradas utilizando um, dois ou os três solventes.

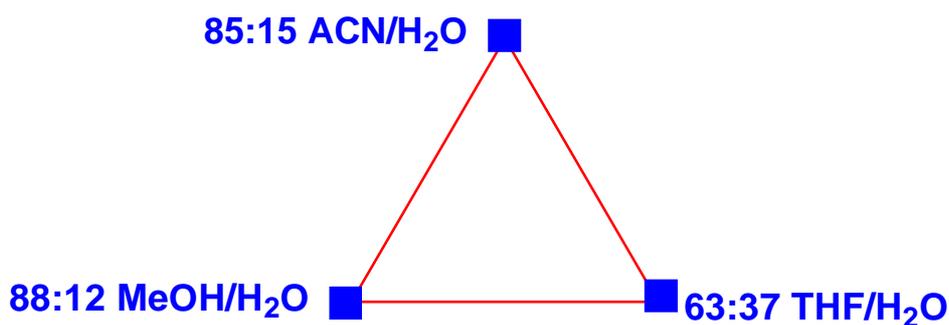


Figura 45: Triângulo de otimização sistemática para o composto ASS3 no extrato bruto etanólico das sementes de *A. squamosa*

Uma mudança brusca de seletividade é conseguida quando se altera a fase móvel de um ápice para o outro ápice do triângulo. Mudanças intermediárias são conseguidas com pequenas variações, isto facilita bastante a escolha dos solventes para compor a fase móvel de maior seletividade para a separação do composto desejado.

Inicialmente foi tentada uma mudança brusca de seletividade passando de um vértice (ACN/H₂O 85:15) para o outro (MeOH/H₂O 88:12 v/v) do triângulo de otimização. O cromatograma do extrato bruto etanólico das sementes de *Annona squamosa* foi analisado usando como fase móvel MeOH/H₂O 88:12 v/v e vazão de 1,0 mL/min. A detecção foi acompanhada pelo detector de UV em 225 nm, coluna analítica Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm. Em cada análise foram injetadas alíquotas de 20µL de amostras com concentração de 10,0 mg/mL. Nota-se nesta análise; cromatograma **B** da **Figura**, a sobreposição de bandas antes já separadas com a composição ACN/H₂O 85:15; cromatograma **A** da **Figura 46**.

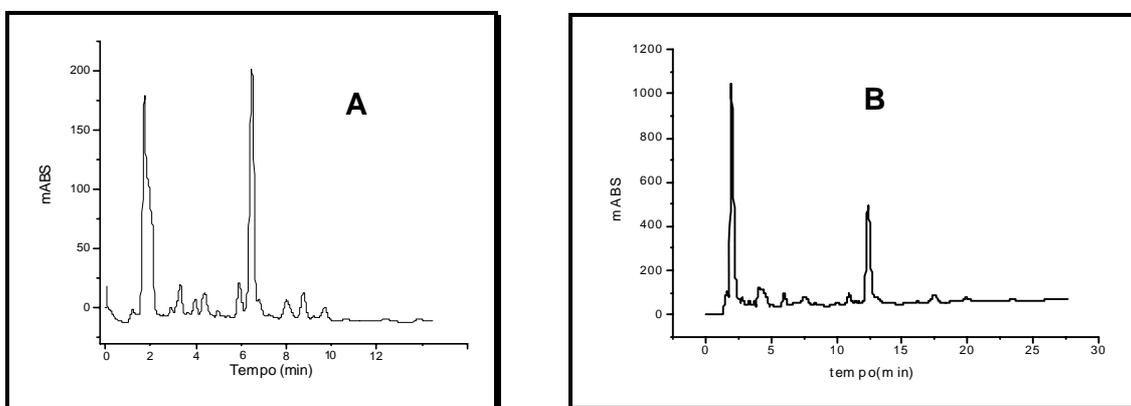


Figura 46: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto etanólico das sementes de *Annona squamosa*, coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm. Fase Móvel: (A) ACN/H₂O 85:15, (B) MeOH/H₂O 88:12

Das 25 misturas de solventes testadas as misturas correspondentes aos pontos 6, 19, 20, 21, 22 e 23, **figura 47**, foram as que apresentaram a melhor seletividade para o isolamento do composto ASS3 do extrato bruto etanólico da semente de *A. squamosa*.

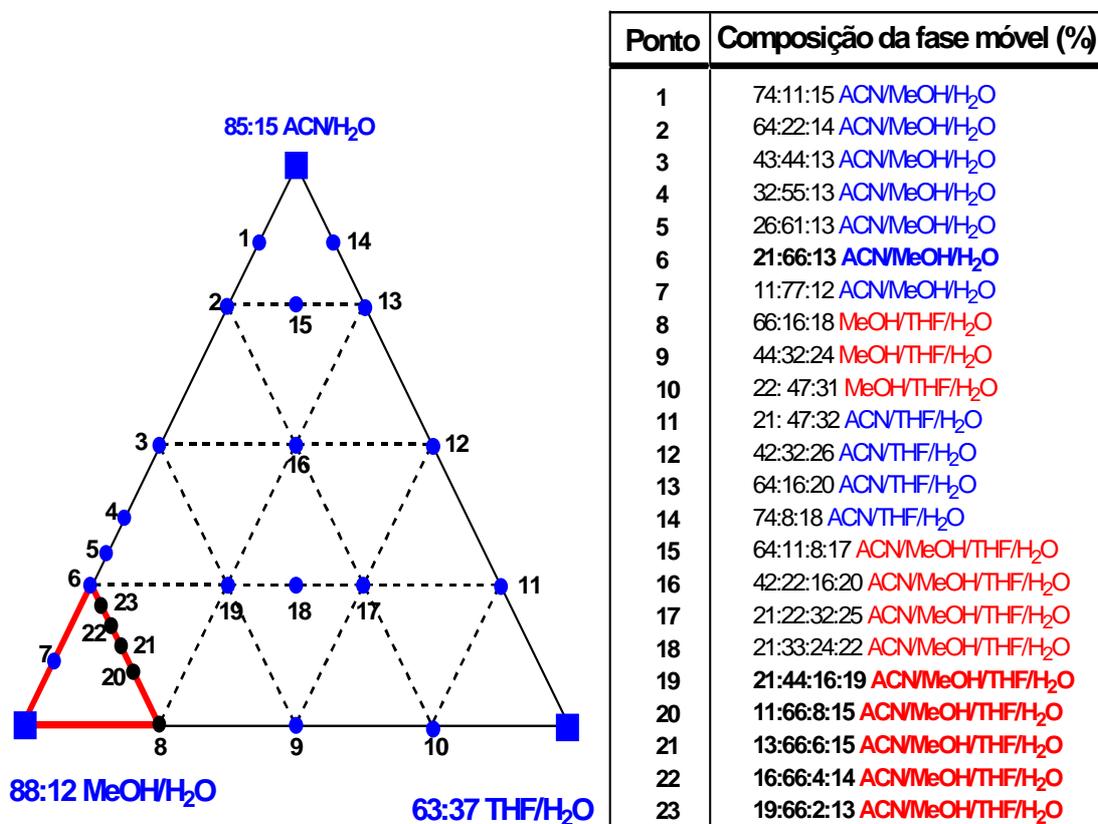


Figura 47: Triângulo de otimização sistemática, no modo reverso de eluição, para separação de acetogéninas.

A seqüência na qual a misturas de solventes foi testadas para escolha da fase móvel para separação do composto escolhido como o “marcador” para o extrato bruto etanólico da *A. squamosa*, seguem a mesma ordem em que são apresentadas na tabela da **figura 47**. Dos pontos que formam o triângulo menor, em vermelho na **figura 47**, aonde um dos vértices é MeOH/H₂O 88:12 e os outros dois vértices são os pontos **6** (ACN/MeOH/H₂O 21:66:13) e **8** (MeOH/THF/H₂O 66:16:18), os pontos **6** ACN/MeOH/H₂O 21:66:13; **22** (ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14) e **23** (ACN/MeOH/THF/H₂O 19:66:2:13) foram os de maior seletividade para o isolamento e quantificação da substância denominada ASS3, composto marcador do extrato etanólico das sementes de *A. squamosa*.

Abaixo são mostrados os cromatogramas obtidos com as três fases móveis consideradas como as de melhor seletividade para quantificar ASS3, os pontos **6** ACN/MeOH/H₂O 21:66:13 **figura 48**; **23** (ACN/MeOH/THF/H₂O 19:66:2:13) **figura 49** e a escolhida como a fase ideal para quantificar a substância denominada ASS3 no extrato bruto da *A. squamosa* **22** (ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14) **figura 50** do triângulo de otimização da mistura de solventes, **figura 47**.

As análises foram executadas empregando uma vazão de 1,0 mL/min, coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, detecção no comprimento de onda de 225 nm. Foram injetadas amostras de 20 µL com concentração de 10 mg/mL.

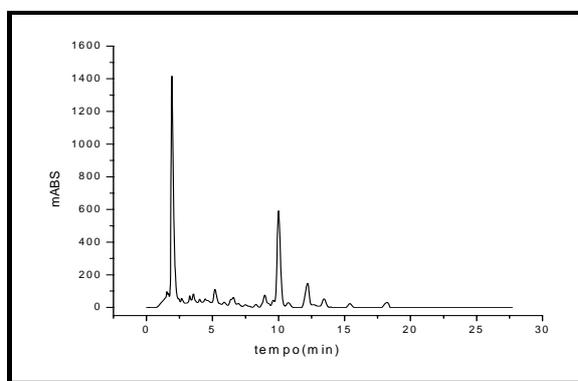


Figura 48: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/H₂O 21:66:13, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

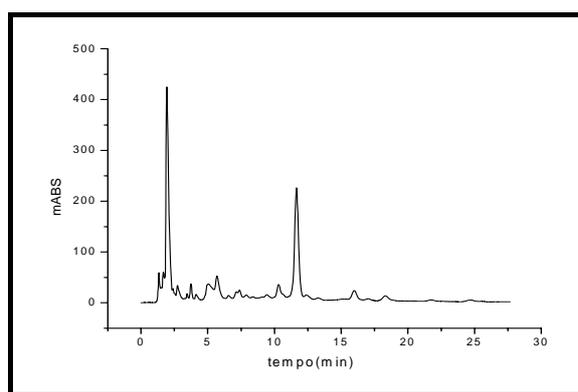


Figura 49: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto Extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/THF/H₂O 19:66:2:13, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

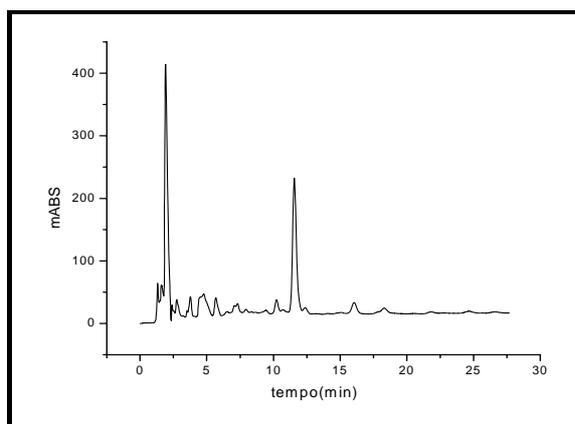


Figura 50: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Abaixo está demonstrado o cromatograma do composto ASS3 ($t_R \sim 8$ min) com a fase móvel inicial ACN/H₂O 85:15 **figura 51**, onde se observa uma banda bem definida, sugerindo que o composto está puro. Como a amostra foi solubilizada em metanol apareceu uma banda intensa em torno de 2 minutos referente a este solvente, juntamente com tempo morto da coluna.

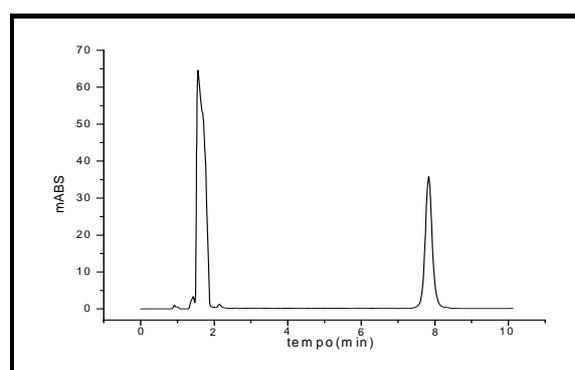


Figura 51: Cromatograma analítico do composto isolado ASS3 das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Quando esta mesma amostra supracitada foi submetida a uma nova análise, agora com a nova composição de fase móvel encontrada no triângulo de otimização de solventes, a banda do composto ASS3 se apresentou impura, como é visto na

figura 52. Nesta figura também pode ser visto duas bandas de menor intensidade por volta de 2 minutos de análise. Isto é justificado pelo fato da fase móvel ter em sua composição 66% de metanol que também o solvente em que a amostra foi solubilizada.

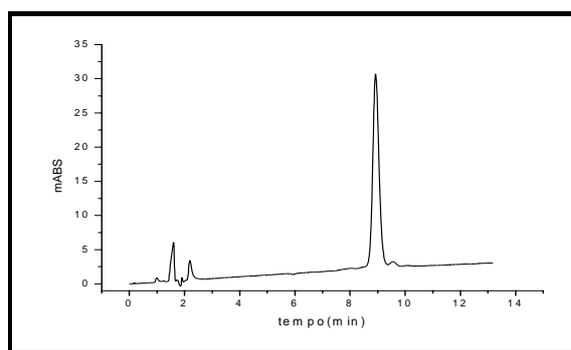


Figura 52: Cromatograma analítico do composto isolado ASS3 das sementes de *Annona squamosa*. Condições de análise: coluna C₁₈ Shimadzu ShimPack 15 x 0,46 cm, partícula de 3µm, fase móvel ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm

Estabelecida a composição do eluente ideal para a quantificação do composto ASS3 nas análises do extrato bruto etanólico da semente de *A. squamosa*, a próxima etapa deste trabalho será a padronização deste extrato bruto via quantificação por padrão externo e por adição de padrão.

5.5. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO ASS3 DA SEMENTE DE *ANNONA SQUAMOSA*

O composto ASS3 possui aspecto de cera e apresenta coloração branca. Ele foi detectado no CLAE por um detector DAD (*diódo array detector*) em 225 nm. A **figura 53** localiza ASS3 no cromatograma do extrato bruto etanólico da semente de *A. squamosa*.

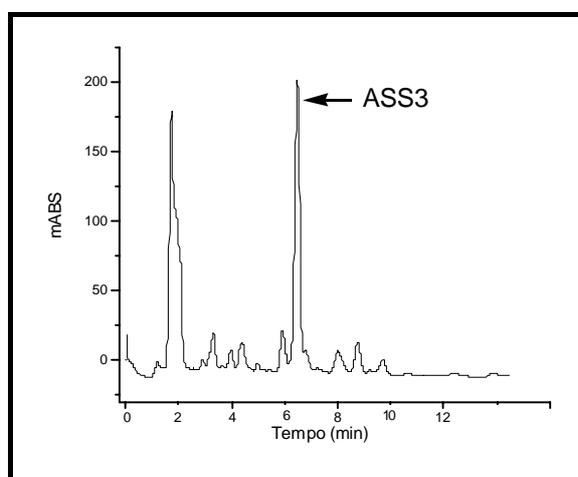


Figura 53: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa*, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm, coluna C18 THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm

A análise do espectro de infravermelho obtido em pastilha de KBr mostrou uma banda de absorção em 3416 cm^{-1} sugerindo a presença de grupo hidroxila na molécula. As absorções em 2923 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} indicam a presença de ligação H-C_{sp}³. O espectro de IV mostra ainda um pico intenso em 1755 cm^{-1} indicando a presença de um grupo carbonílico de uma γ -lactona α,β -insaturada.

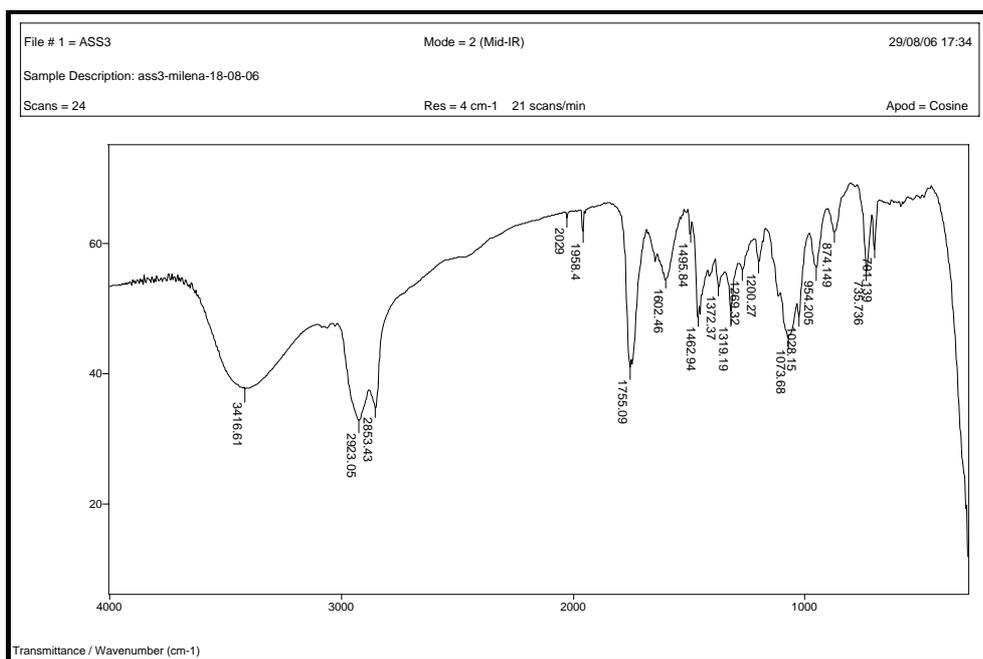


Figura 54: espectro de infravermelho do composto ASS3, obtido em pastilha de KBr

O espectro de massa do composto ASS3, marcador escolhido para o extrato em etanol das sementes de *A. squamosa*, obtido pela técnica de APCI no modo positivo de ionização, indicou a massa molecular de 622 u, através do íon $[M+H]^+$ m/z 623. No espectro de ^{13}C foi constatada a presença de 37 átomos de carbono. Das diversas combinações possíveis entre átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, essa massa molecular 622u sugere a seguinte combinação de átomos $C_{37}H_{66}O_7$

A presença de uma γ -lactona α,β - insaturada, estrutura **figura 55**, pode ser confirmada pelos sinais apresentados do espectro de RMN de 1H e ^{13}C mostrados abaixo.

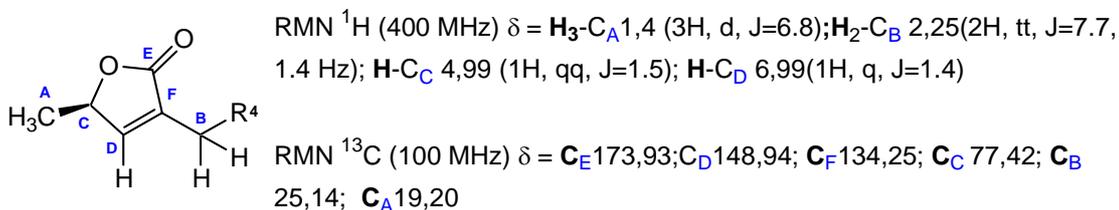


Figura 55: γ -lactona α,β - insaturada mostrando os sinais de 1H e ^{13}C RMN

Abaixo na **figura 56**, é mostrado uma seqüência de cinco quadros sendo o primeiro com o espectro de 1H RMN do composto ASS3 e quatro com ampliações

deste espectro mostrando as regiões assinaladas como sendo os sinais dos hidrogênios da γ -lactona α,β -insaturada, mostrada na **figura 55**.

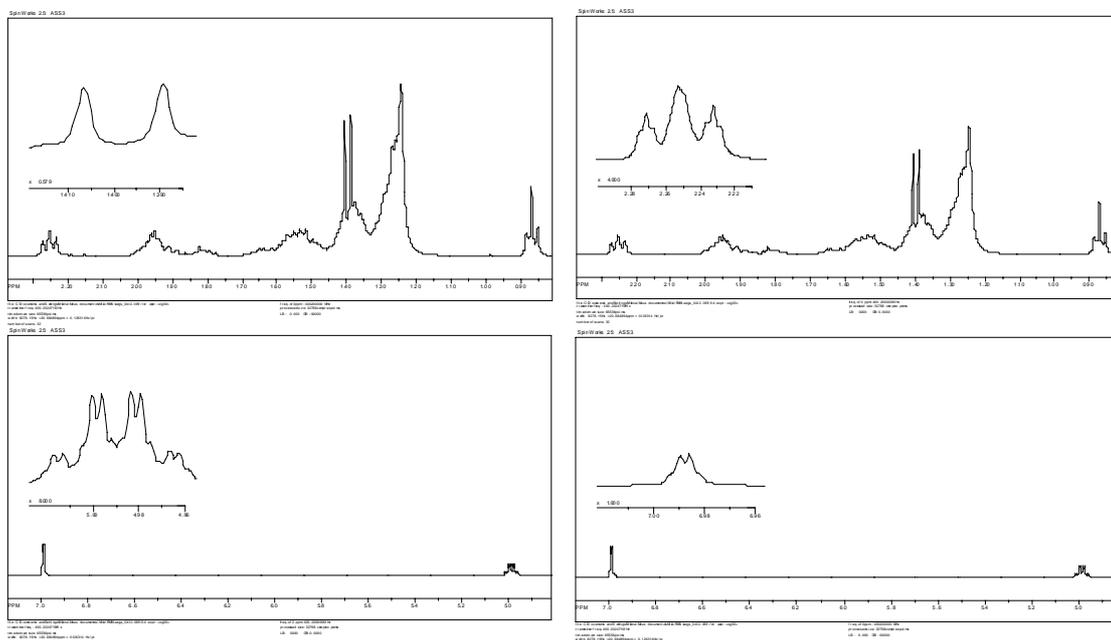
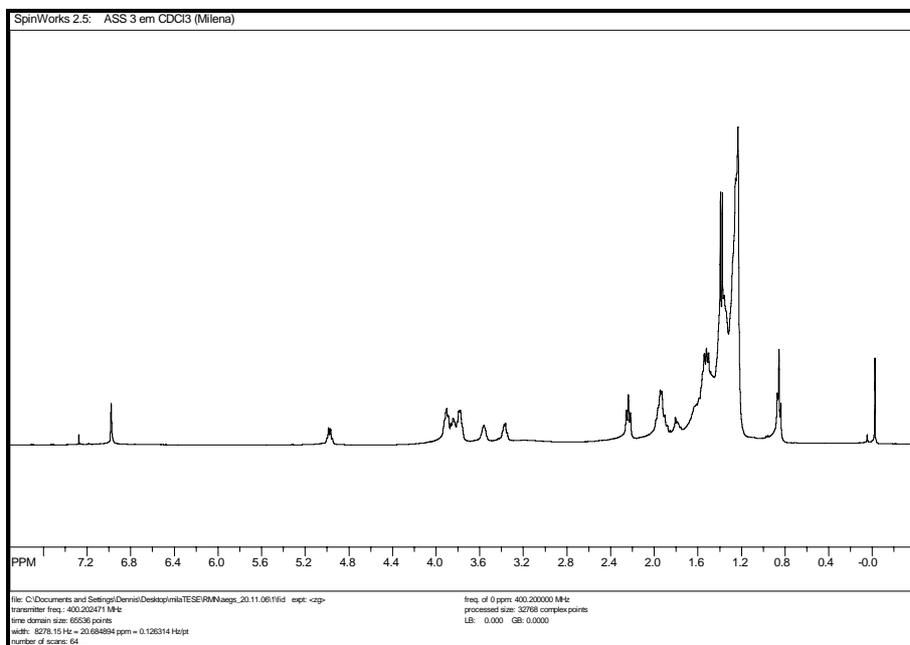


Figura 56: Ampliações do espectro de ^1H RMN do composto ASS3
A figura 57 mostra o espectro de ^{13}C de RMN do composto ASS3.

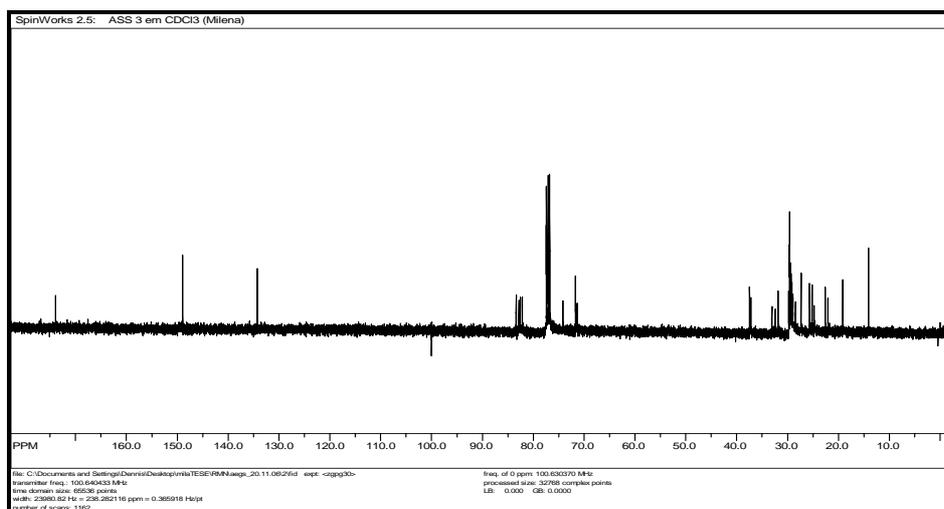
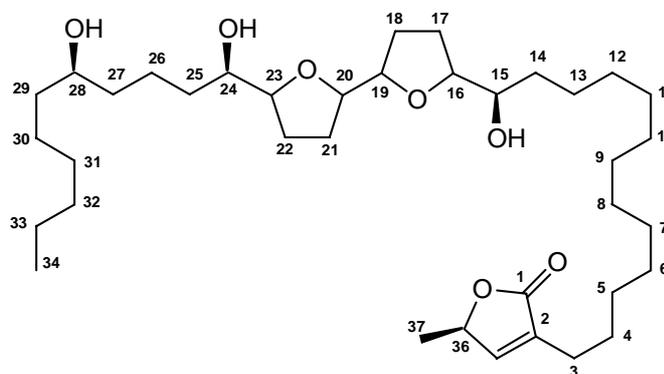


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C do composto ASS3

A comparação dos dados espectrométricos ^1H e ^{13}C RMN obtidos para o composto marcador ASS3, **tabela A**, com os dados estabelecidos para a acetogenina esquamocina A **(39)** **figura 58**, (Rupprecht; Hui; McLaughlin, 1990), também denominada anonina I, indicam que se trata da mesma acetogenina.



(39)

Figura 58: Esquamocina A ou Anonina I

Carbono	ASS3		ESQUAMOCINA A	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [nº de H, multiplicidade, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [nº de H, multiplicidade, J (Hz)]
1	173,93	--	173,93	--
2	134,25	--	134,31	--
3	25,14	2,25 (2H, <i>tt</i> , J=7.7, 1.4 Hz)	25,18	2,21 (2H, <i>tt</i> , J=7.7, 1.4 Hz)
4-14		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
15	74,19	3,35 – 3,42 (1H, <i>m</i>)	74,09	3,33 (1H, <i>dt</i> , J=11, 7.5)
16b	83,38	3,76 – 3,96 (5H, <i>m</i>)	83,36	3,76 (<i>m</i>)
17		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
18		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
19	82,84	3,76 – 3,96 (5H, <i>m</i>)	82,85	
20	82,56		82,55	3,86 (2H, <i>m</i>)
21		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
22		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
23	82,17	3,76 – 3,96 (5H, <i>m</i>)	82,15	3,76 (<i>m</i>)
24	71,37		71,51	3,76 (<i>m</i>)
25-27		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
28	71,68	3,54 – 3,62 (1H, <i>m</i>)	71,60	3,52 (1H, <i>m</i>)
29-33				
34		1,19 – 2,02 (50H, <i>m</i>)		1.20 – 1.90 (50H, <i>m</i>)
	14,09	0,87 (3H, <i>t</i> , J= 7)	14,08	0,83 (3H, <i>t</i> , J= 7)
35	148,94	6,99(1H, <i>q</i> , J=1.4)	148,97	6,96(1H, <i>q</i> , J=1.4)
36	77,42	4,99 (1H, <i>qq</i> , J=1.5)	77,35	4,95 (1H, <i>qq</i> , J= 6.8; 1.4)
37	19,20	1,4 (3H, <i>d</i> , J= 6.8)	19,21	1,36 (3H, <i>d</i> , J= 6.8)

Tabela A: Dados espectroscópicos de RMN da substância ASS3 e do composto Esquamocina A.

5.6. IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO ISOLADO AMS2 DA SEMENTE DE *ANNONA MURICATA*

O composto AMS2 possui aspecto de cera e apresenta coloração branca. Ele foi detectado no CLAE por um detector DAD (*diodo array detector*) em 225 nm. A **figura 59** localiza AMS2 no cromatograma do extrato bruto etanólico da semente de *A. muricata*.

O espectro de massa do composto AMS2, marcador escolhido para o extrato etanólico das sementes de *A. muricata*, obtido pela técnica de APCI no modo positivo de ionização, indicou a massa molecular de 596u, através do íon $[M+H^+]$ m/z 597. No espectro de ^{13}C foi constatada a presença de 35 átomos de carbono. Das diversas combinações possíveis entre átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, essa massa molecular 596u sugere a seguinte combinação de átomos $C_{35}H_{64}O_7$

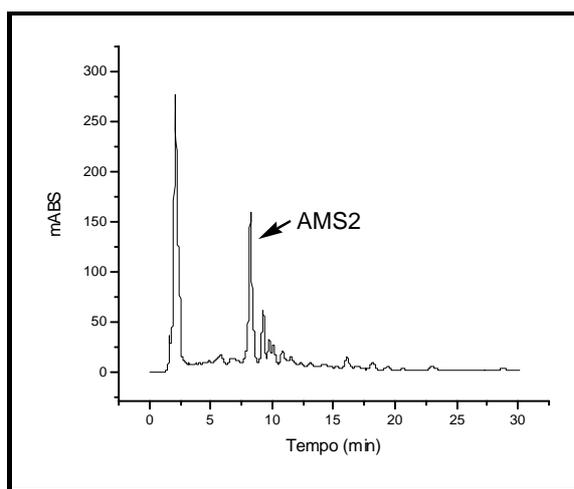


Figura 59: Exemplo da separação analítica de amostra do extrato bruto em etanol das sementes de *Annona muricata*, fase móvel ACN/H₂O 85:15, vazão de 1,0 mL/min, detecção 225 nm, coluna C₁₈ THERMOHypersil® 15 x 0,46 cm

A análise do espectro de infravermelho obtido em pastilha de KBr mostrou uma banda de absorção em 3484 cm^{-1} sugerindo a presença de um grupo hidroxila na molécula. As absorções em 2924 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} indicam a presença de ligação hidrogênio-carbono alifática. O espectro de IV mostra ainda um pico intenso em 1732 cm^{-1} indicando a presença de um grupo carbonílico de uma γ -lactona α,β -insaturada.

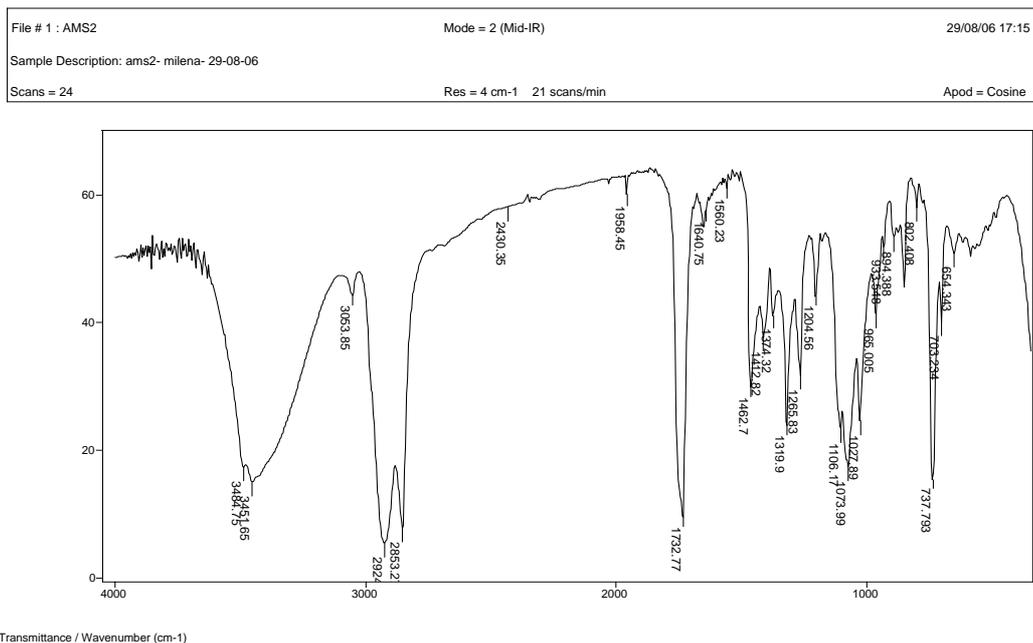
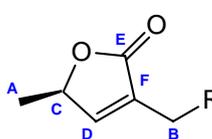


Figura 60: espectro de infravermelho do composto AMS2, obtido em pastilha de KBr

A presença de uma γ -lactona α,β - insaturada **figura 61**, pode ser confirmada pelos sinais apresentados do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C mostrados abaixo.



RMN ^1H (400 MHz) δ = $\text{H}_3\text{-C}_A$ 1,42 (3H,d, J= 6,76 Hz); $\text{H}_2\text{-C}_B$ 2,40 (1H, dddd, J=14,9; 8; 1; 0,5 Hz - Ha); 2,50 (1H, dd, j= 14; 3,7 Hz - Hb); H-C_C 5,06 (1H, dq, J= 6,7; 1,4 Hz); H-C_D 7,20 (1H, d, J= 1,2 Hz)

RMN ^{13}C (100 MHz) δ = C_E 173,74; C_D 151,97; C_F 131,1; C_C 78,01; C_B 22,68; C_A 19,07

Figura 61: γ -lactona α,β - insaturada mostrando os sinais de ^1H e ^{13}C RMN

Abaixo na **figura 62**, é mostrado uma seqüência de seis quadros sendo o primeiro com o espectro de ^1H RMN do composto AMS2 e cinco com ampliações deste espectro mostrando as regiões assinaladas como sendo os sinais dos hidrogênios da γ -lactona α,β - insaturada, mostrada na **figura 61**.

Resultados e Discussão

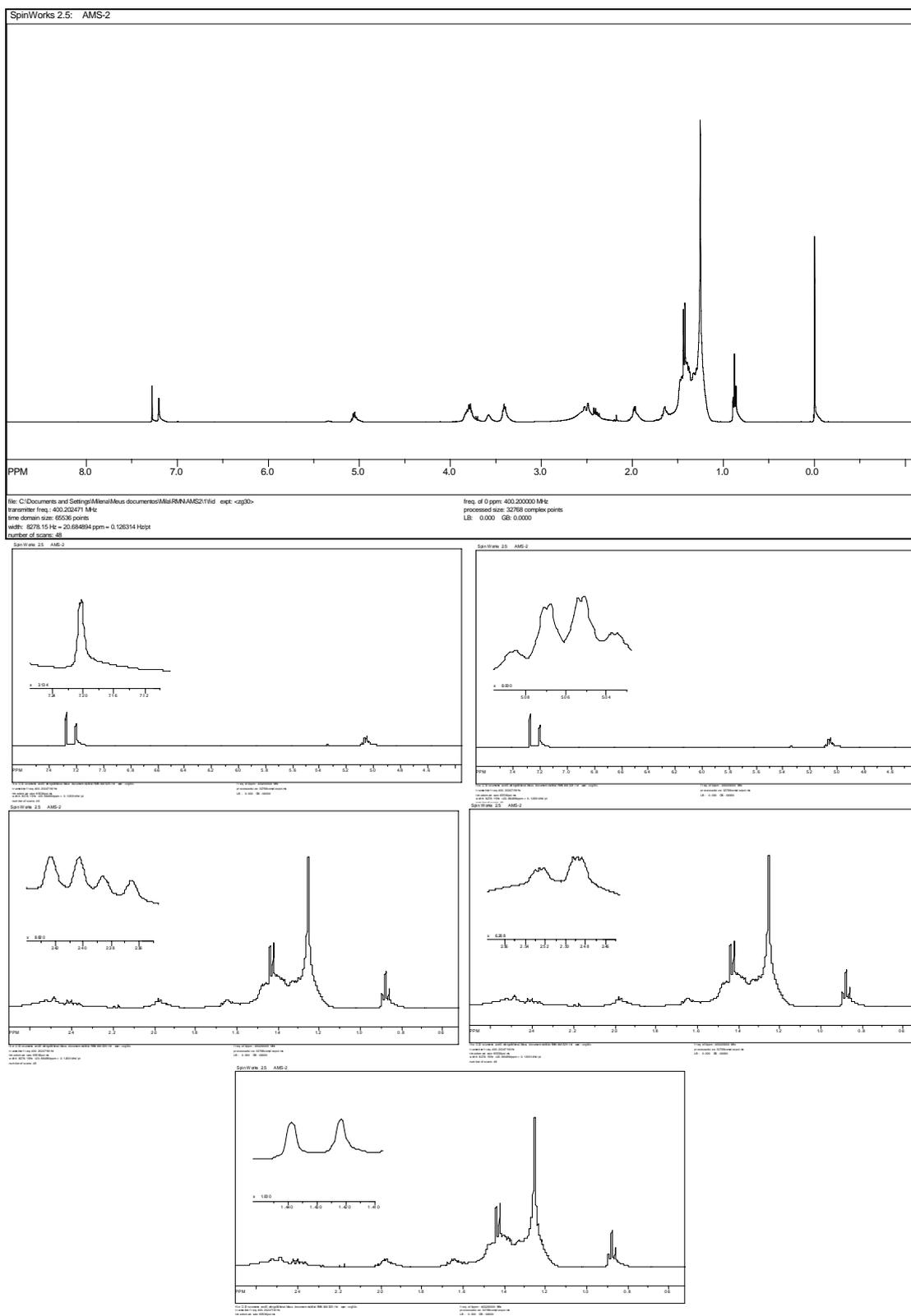


Figura 62: Ampliações do espectro de ^1H RMN do composto AMS2

A **figura 63** mostra o espectro de ^{13}C de RMN do composto AMS2.

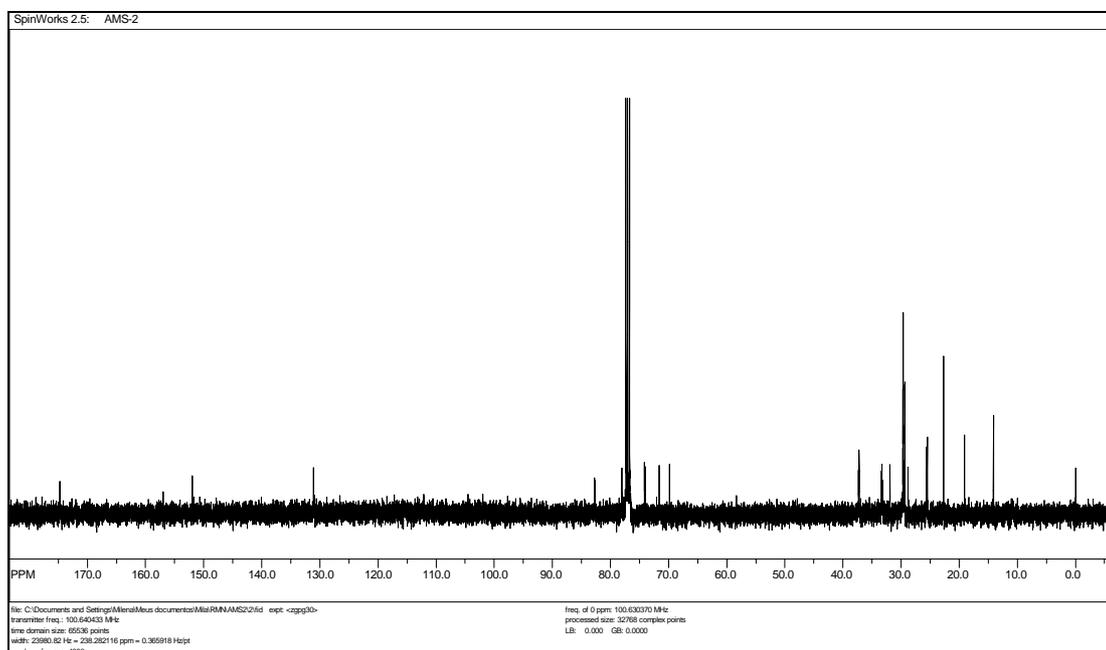


Figura 63: Espectro de RMN de ^{13}C do composto AMS2

A comparação dos dados espectrométricos de ^1H e ^{13}C RMN, obtidos para o composto marcador AMS2, **tabela B**, com os dados estabelecidos para a acetogenina Anonacina (**41**) **figura 64**, (Rupprecht; Hui; McLaughlin, 1990), sugere que se tratam do mesmo composto.

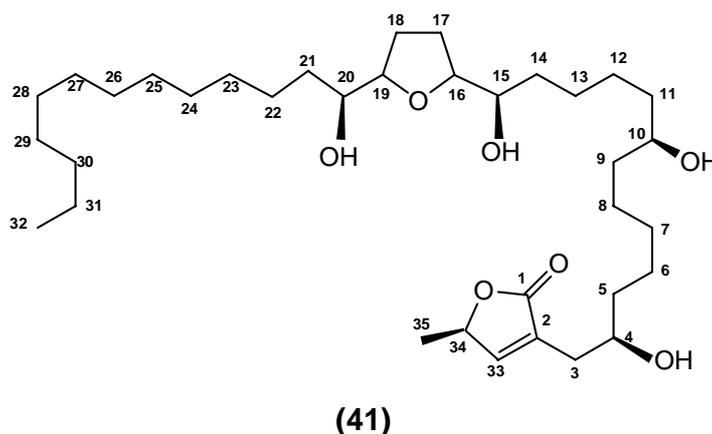


Figura 64: Anonacina

Carbono	AMS2		ANONACINA	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [nº de H, multiplicidade, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [nº de H, multiplicidade, J (Hz)]
1	173,74	--	174,6	--
2	131,1	--	131,1	--
	22,68	2,40 (1H, <i>dddd</i> , J=14,9; 8; 1; 0,5 – Há)	22,38	2.38 (1H, <i>dddd</i> , J=14, 8, 1, 0.5 – H _a)
3		2,50 (1H, <i>dd</i> , j= 14; 3,7 – H _b)		2.51 (1H, <i>dddd</i> , J= 14; 3.4, 0.5, 0.5 – H _b)
4	69,8	3.80 (1H, <i>tt</i> , j=6)	69,8	3.81 (1H, <i>tt</i> , J=8, 4.5)
5-9		1,2-1,7 (m),		1.2-1.7 (m),
10	71,6	3,58 (1H, <i>m</i>)	71,6	3.56 (1H, <i>m</i>)
11-14		1,2-1,7 (m)		1.2-1.7 (m)
15	74,14	3,40 (2H, <i>dt</i> , J= 11, 5.8)	73,9	3.38 (2H, <i>dt</i> , J= 11.6, 5.8)
16	82,6	3,70 (2H, <i>dt</i> , J= 11, 7)	82,6	3.77 (2H, <i>dt</i> , J= 11.6, 6.9)
17-18		1,64 (<i>m</i>)		1.67 e 1.97 (<i>m</i>)
19	82,7	3,70 (2H, <i>dt</i> , J= 11, 7)	82,7	3.77 (2H, <i>dt</i> , J= 11.6, 6.9)
20	74,02	3,40 (2H, <i>dt</i> , J= 11, 5.8)	74,1	3.38 (2H, <i>dt</i> , J= 11.6, 5.8)
21-31		1,2-1,7 (m)		1.2-1.7 (m)
32	14,1	0,87 (3H, <i>t</i> , J=6.9)	14,1	0.85 (3H, <i>t</i> , J=6.9)
33	151,97	7,20 (1H, <i>d</i> , J= 1,2)	151,8	7.16 (1H, <i>d</i> , J= 1.4, 0.5)
34	78,01	5,06 (1H, <i>dq</i> , J= 6,7; 1,4)	77,9	5.04 (1H, <i>dq</i> , J= 6.8; 1.4)
35	19,07	1.42 (2H, <i>d</i> , J= 6,76 Hz)	19,0	1.40 (3H, <i>d</i> , J= 6.8)

Tabela B : Dados espectroscópicos de RMN da substância AMS2 e do composto anonacina.

5.7. BIOENSAIO LARVICIDA

Os testes frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* demonstrou o poder larvicida das espécies de *Annona* estudadas. O extrato bruto em etanol das sementes de *Annona squamosa* e *Annona muricata* e as folhas de *Annona muricata* promoveram a morte das larvas em 100% na concentração de 50 ppm. Uma curiosidade foi a fraca ação do extrato bruto em etanol das folhas de *Annona squamosa* onde foi constatada a morte de apenas 10% das larvas do *Aedes aegypti* também na concentração de 50 ppm.

Planta	% Atividade
<i>Annona muricata</i> Folha	100%
<i>Annona muricata</i> Semente	100%
<i>Annona squamosa</i> Folha	10%
<i>Annona squamosa</i> Semente	100%

Tabela C: Percentual de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* a 50 ppm

As DL₅₀ para os extratos brutos etanólicos das espécies mostradas na tabela C, com exceção das folhas de *A. squamosa*, foram calculadas, **figura 65**.

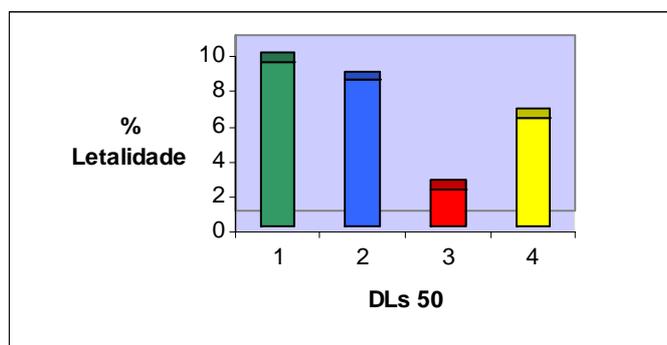


Figura 65: DL₅₀ das espécies (1) *Annona muricata* folha, (2) *Annona muricata* semente, (3) *Annona squamosa* semente, (4) rotenona.

Os resultados dos testes larvicidas com os extratos brutos etanólicos da *A. muricata* e *A. squamosa* estão de acordo com o esperado. Isto ocorre porque segundo Rupprecht e col. as acetogeninas *bis*-THF adjacente, como a ASS3 (esquamocina A) composto marcador da semente da *A. squamosa*, são mais citotóxicas do que a *mono*-THF, como o composto marcador da *A. muricata* AMS2 (anonacina). A baixa atividade larvicida do extrato da folha da *A. squamosa* é indicativo que ela é pobre em acetogeninas ou de ausência de acetogeninas *bis*-THF.

Capítulo

6

CONCLUSÕES

Através das análises em CLAE por gradiente foi possível obter o perfil cromatográfico inicial das espécies *Annona muricata* e *Annona squamosa*. Foi observada uma grande similaridade entre os extratos etanólicos brutos das sementes das *Annonas*, podendo estas espécies possuir compostos de natureza em comum.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência mostrou ser uma técnica eficaz na separação de acetogeninas contidas no extrato bruto etanólico destas espécies, principalmente quando comparada com a Cromatografia Líquida Clássica, onde esta separação dificilmente era conseguida. A CLAE em escala preparativa possibilitou o isolamento de dois compostos das sementes de *A. muricata* e cinco compostos das sementes de *A. squamosa* diretamente do extrato bruto.

Neste trabalho foi apresentada a estrutura química de dois dos sete compostos isolados. **Esquamocina A**, uma acetogenina *bis*-THF isolada das sementes de *A. squamosa*, e **Anonacina**, acetogenina *mono*-THF isolada das sementes de *A. muricata*. Estas duas acetogeninas serão os compostos marcadores no extrato vegetal em que foi obtida, visando posteriormente seu controle de qualidade. As outras cinco substâncias estão em fase de elucidação.

Uma nova composição de fase móvel foi estabelecida através do triângulo de seletividade de solventes, onde diversas combinações de fases móveis foram testadas para o composto Esquamocina A. A melhor seletividade para esta banda foi conseguida com a composição **ACN/MeOH/THF/H₂O 16:66:4:14 v/v**, esta agora mais específica para o composto marcador ASS3.

Os extratos etanólicos brutos das sementes de *A. muricata* e *A. squamosa* foram ativos contra as larvas do *Aedes aegypti*, sendo o extrato da semente de *A. squamosa* mais efetivo.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alali, F. Q.; Liu, X.; McLaughlin, J. L. Annonaceous Acetogenins: recent progress. *J.Nat.Prod.* 1999, 62, 504-540.

Alves, R. E.; Filgueiras, H. A. C.; Mosca, J. L. Anonáceas – Produção e Mercado: Pinha, Graviola, Atemóia e Cherimóia. Vitória da Conquista: DFZ/UESB, 1997, 240-256.

Benenson, A. S. (ed). Controle de Doenças Transmissíveis no Homem 13ª edição. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 1983.

Boyce, A. M.; Metcalf, R. L. The Future for Inseticides, Needs and Prospects, John Wiley e Sons. New York, USA, p.469, 1974.

Braga, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará, 2ª ed, Fortaleza: imprensa oficial, p. 274, 1960.

Cass, Q. B.; Degani, A. L. G. Desenvolvimento de Métodos Por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: (2001) Edufscar.

Cavé, A.; Cortes, D.; Figadère, B.; Hocquemiller, O.; Laurens, A; Leboeuf, M. Recents advances in the acetogenins of Annonaceae. *Recents Advances in Phytochemistry*.v.27, New York, Plenum Press, 1993.

Chopra, R. N.; Nayar, S. L.; Chopra, I. C. (eds). Glossary of Indian Medicinal Plants. C.S.I.R., Nova Deli, p. 20, 1956.

Choudhary, G. P. Anthelmintic activity of *Annona squamosa*, School of Pharmacy, India. *Asian Journal of Chemistry*, 2007, 19(1), 799-800.

Ciola, R. Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC, São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

Corrêa, M. P., Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura – IBDF, 1984.

Cremlyn, R. Pesticides, Preparation and Mode of Action, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1978.

Defagó, M.; Valladares, G.; Banchio, E.; Carpinella, C.; Palácios, S. Insecticide and antifeedant activity of different plants parts of *Melia azedarach* on *Xanthogaleruca luteola*, *Fitoterapia* 2006, 77, 500-505.

Esposti, D.; Ghelli, A; Ratta, M.; Cortes, D.; Estornell, E. Natural substances (acetogenins) from the family *Annonaceae* are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I), *Biochem.J.*, 1994,301, 161-167.

Fang, X. P.; Rieser, M. J.; Gu, Z. M.; Zhao, G. X.; McLaughlin, J. L. Annonaceous Acetogenins: An Update Review. *Phytochemistry Analysis*, 1993, 1(4), 27-48.

Ferreira, J. T. B.; Corrêa, A. G.; Vieira, P. C. Produtos Naturais no Controle de Insetos, 2001, ed.UFSCAR, São Carlos-SP.

Fujimoto, Y; Murasaki, C; Shimada, H.; Nishioka, S.; KKinuma, K; Singh, S.; Singh, M.; Gupt, K; Sahai, M. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*,. 1994, 42 (6), 1175-1184.

Fukami, H; Nakagima, M.; Jacobson, M.; Crosby, D. G. (eds), Naturally Occuring Inseticides, Marcel Dekker Inc, New York, USA,1971.

Fukami, J.; Shishido, T.; Fukunaga, K.; Casida, J. E. Oxidative metebolism of rotenone in mammals, fish and insects and its relation to seletive toxicity. *J. agric. Food Chemistry*, 1969, 17, 1217-1226.

Gefner, J. L. M.; Giuseppina,P. P. L. Desenvolvimento de Frutos de Atemóia (*Annona cherimola* L. x *Annona squamosa* L.) ,Embrapa – Agroindústria Tropical, 2002.

Gu, Z. M.; Zhao, G. X.; Oberlies, N. H.; McLaughlin,L. Annonaceous acetogeninas- Potent mitochondrial inhibitors with diverse application, *Recents advances in phytochemistry* 29, New York, Plenuim Press, 1995.

Gupta, R. K.; Kesari, A. N.; Watal, G.; Murthy, P. S.; Chandra, R.; Tandon, V. Nutritional and hypoglycemic effect of fruit pulp of *Annona squamosa* in normal healthy and alloxan-induced diabetic rabbits, *Ann. Nutr. Metab.*, 2005, 49, 407-413.

Harper, S. H.; Potter, C.; Gillham, E. M. *Ann. Appl. Biol.*,1947, 34, 104.

Jacobson, M. ACS Symp. Ser 296, American Chemical Society, Washington, DC., 1986, 220-232.

Jolad, S. D.; Hoffmann, J. J.; Schram,.K. H.; Cole, J. L. Uvaricin, a new antitumor agente from *Uvária acuminate* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, 1982, 47 (16), 3151-3153.

Kaur, C.; Kapoor, H. C. Antioxidant activity of some fruits in Indian diet. *Acta Horticulturae* , 2006, 696, 563-565.

Kumar, C. D.; Rajendran, K.; Lobo, R.; Shirwaikar, A. An identity based pharmacognostical profile of folium *Annona squamosa*. *Natural Product Sciences*, 2005, 11(4), 213-219.

Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Application of various chemical methods to the determination of the antioxidative activity of fruit pulp., *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 2005, 25(4), 726-732.

Lako, J.; Trenerry, V. C.; Wahlqvist, M.; Wattanapenpaiboon, Naiyana. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chemistry*, 2006, 101(4), 1727-1741.

Larini, L. Toxicologia dos Praguicidas, ed. Manole, São paulo, 1999

Leboeuf, M., Cavé, A., Bhaumik, P.K., et al. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 1982, 21 (12), 2783-2813.

Lenzi, M. F.; Coura, L. C. Prevenção da dengue: a informação em foco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2004, 37(4), 343-350.

Lima, M. R. F., Contribuição para o conhecimento fitoquímico e da atividade biológica de *Annona crassiflora* Mart e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Tese de doutorado, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 2005.

Luna, J. De S.; De Carvalho, J. M.; De Lima, M. R. F.; Bieber, L. W.; Bento, E. De S.; Franck, X.; Sant'ana, A. E. G. Acetogenins in *Annona muricata* L. (annonaceae) leaves are potent molluscicides. *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis*, 2006, 20(3), 253-257.

Maas, P. J. M.; Kamer, H. M. V.; Junikka, L.; Silva, R. M.; Reiner, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*. 2001, 52 (80), 65-98.

Martin, H. The Scientific Principles of Crop Protection, 6th ed, Arnold London, 1973

Martinez, S. S. O Nim - *Azadirachta indica*. Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Instituto Agrônômico do Paraná. Londrina: IAPAR, 2002.

McLaughlin, J. L.; Zeng, L.; Oberlies, N. H.; Alfonso, D.; Johnson, H. A.; Cummings, B. A. Annonaceous acetogenins as new natural pesticides: recent . *American Chemical Society ACS Symposium Series* (1997), 658(Phytochemicals for Pest Control), 117-133.

McLaughlin, J. L.; Zeng, L.; Oberlies, N. H.; Alfonso, D.; Johnson, H. A.; Cummings, B. A. *Phytochemical for Pest Control*; Symp. Ser. 1997, 658; American Chemical Society: Washington D.C.

Mordue, A. J.; Blackwell, A. Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 1993, 39 (11), 903-924.

Morita, H.; Iizuka, T.; Choo, C-Y.; Chan, K-L.; Takeya, K.; Kobayashi, J. Vasorelaxant activity of cyclic peptide , cyclosquamocin B, from *Annona squamosa*, *Biorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16, 4609-4611.

Oga, Seizi. Fundamentos de toxicologia, 2^a ed. – São Paulo: Ed. Atheneu, 2003.

Pontes, A. F.; Barbosa, M. R. V.; Maas, P. J. M.; Flora paraibana: Annonaceae Juss. *Acta Botânica Brasileira*, 2004, 18 (2), p. 281-293.

Quattrocchi, O. A.; Andrizzi, S. A.; Laba, R. F., Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica, ed. Farro S.A., 1992.

Rieser, M. J. , Hui, Y.-H., Rupprecht, J. K., et al. Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers in annonaceous acetogenins by ^1H and ^{19}F NMR analysis of Mosher ester derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* , 1992, 114 (26), 10203-10213.

Rupprecht, J. K.; Hui, Y.-H.; McLaughlin, J. L. Annonaceous Acetogenins: a review, *Journal of Natural Product*, 1990, 53 (2), 237-278.

Silverstein, R. M.; Webster, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ªed., LTC editora Rio de Janeiro, 2000.

Simas, N. K.; Lima, E. C.; Conceição, S. R.; Kuster, R. M.; Oliveira Filho, A. M. Produtos Naturais Para o Combate da Transmissão da Dengue – Atividade larvicida de *Myroxylon Balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, 2004, 27(1), p. 46-49.

Singh, K. K.; Tatke, P. A.; Dhuru, S. Herbal Contraceptive Formulations (India), (2006), Patente:2006087733 A120060824.

Snyder, L. R.; Dolan, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development – Use of a starting gradient run, *Journal of Chromatography A*, 1996, 721, 3–14.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. Practical HPLC Method Development, 2ªed. New York (1997), John Wiley and Sons. 1-349.

Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. Introdução to modern liquid Chromatography, 2ªed. New York, John Wiley & Sons, 1979.

Teske, M.; Trentini, A. M. Compêndio de Fitoterapia, 1ª ed, Curitiba, Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

Vasconcelos, P. F. C. Febre Amarela, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2003, 36(2), p. 275-293.

WHO. Moluscicide screening and evaluation. World Health Organization, 1965, nº33, p. 567-581.

Zeng, L.; Ye, O.; Oberlies, N. H.; Shi, G.; Gu, Z. M.; McLaughlin, J. L. Advances in Annonaceous acetogenins. *Natural Product Reports*, 1996, 13 (4), 275-306.

Zhang, Yonghong, Preparation of *Annona squamosa* lactone antitumor monomer compound and its application for preparing antitumor agent (Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Peop. Rep. China). Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (2006), Patente: 1869031 A 20061129 Patente escrita em Chinês. Aplicação: CN 1008-5781 20060630.