



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Kelly Christina Ferreira Castro

**LIMONÓIDES DE FOLHAS DE MOGNO: DESENVOLVIMENTO DE UM
MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA VISANDO
CONTROLAR O ATAQUE DE *HYPsipyla grandella* ZELLER**

Belém, 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*Kelly Christina Ferreira Castro**

**LIMONÓIDES DE FOLHAS DE MOGNO: DESENVOLVIMENTO DE UM
MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA VISANDO
CONTROLAR O ATAQUE DE *HYPsipyla grandella* ZELLER**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Química.
Orientadores: Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda e Dr. Milton Nascimento da Silva.

* Bolsista



Belém, 2010

Ficha Catalográfica

C346 Castro, Kelly Christina Ferreira

Limonóides de folhas de mogno: desenvolvimento de um método de quantificação e avaliação biológica visando controlar o ataque de *Hypsipyla grandella* Zeller / Kelly Christina Ferreira Castro. – Belém: UFPA, 2010.

vi 34 f. : il.; 31 cm.

Orientadores: Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda e Dr. Milton Nascimento da Silva

Tese (doutorado) – UFPA – Programa de Pós-Graduação em Química, 2010.

Referências Bibliográficas: f.

1. *Swietenia macrophylla* King. 2. Limonóides. 3.HPLC. 4. Validação e Quantificação. 5. *Hypsipyla grandella* Zeller. 6. Deterrência Alimentar. – Tese. I. Castro, Kelly Christina Ferreira. II. Universidade Federal do Pará.

CDD – 577.82

*Kelly Christina Ferreira Castro**

**LIMONÓIDES DE FOLHAS DE MOGNO: DESENVOLVIMENTO DE UM
MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA VISANDO
CONTROLAR O ATAQUE DE *HYPsipyla grandella* ZELLER**

Data de aprovação: ----/----/2010.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mara Silvia Pinheiro Arruda
Orientadora
PPGQ-ICEN-UFPA

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva
Orientador
PPGQ-ICEN-UFPA

Prof. Dr. Alberto Cardoso Arruda
Membro
PPGQ-ICEN-UFPA

Prof. Dr. Orlando Shigueo Ohashi
Membro
ICA-UFRA

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
Membro
FEAL-ITEC-UFPA

Profa. Dra. Giselle M. Shelding Pinheiro Guilhon
Membro
PPGQ-ICEN-UFPA

Belém, 2010

Às pessoas mais importantes em minha vida: Ao *Senhor Jesus* – minha fonte inspiradora, o ar que respiro, meu amigo, meu companheiro de todas as horas, meu mestre, meu ajudador, o meu tudo nesta vida. A ti pertence e tudo a ti entrego!

Aos meus amados pais *Walmir Cantuária Castro* e *Ana Ruth Ferreira Castro*, porto seguro diante das dificuldades, por fazerem de mim o que sou hoje e me ajudarem a chegar até onde cheguei. Sem o amor de vocês não conseguiria chegar tão longe.

Aos meus queridos irmãos *Keylla*, *Rafael* e *Karina Ferreira Castro* pelo grande companheirismo, afeto e cuidado em todas as horas.

Todos vocês foram fundamentais para que este momento chegasse da melhor forma.

Amo vocês

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o Autor e Senhor da minha vida, fonte de força e sabedoria. Sem Ele nada teria sido possível. *“Porque dEle e por Ele, e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém”*. (Rm 11:36).

A minha orientadora, Profa. Dra. **Mara Silvia Pinheiro Arruda**, por ser exemplo de pesquisadora, pela confiança em mim depositada, dedicação, grandes ensinamentos, maneira como conduziu a orientação e principalmente amizade, características estas que me trouxeram refrigério para seguir em frente.

Ao Prof. Dr. **Milton Nascimento da Silva** pela excelente orientação, confiança por acreditar em meu potencial, pelos incentivos, ensinamentos, paciência, por ser exemplo de pesquisador, por tirar recursos de onde não existem recursos e principalmente, pelo grande testemunho de que *“o mundo é dos corajosos”*. Serei eternamente grata a você chefeinho!

A Profa. Dra. **Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva** pela grande contribuição, ensinamentos e motivação para prosseguirmos em frente ao desafio mogno.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química: **Alberto Cardoso Arruda, Adolfo Henrique Müller, Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon, Lourivaldo da Silva Santos e Cláudio Nahum Alves**, pelos ensinamentos prestados nas disciplinas e durante todo o doutoramento.

Ao Prof. Dr. **Orlando Shigueo Ohashi** pela colaboração na criação das lagartas de *Hypsipyla grandella* e aos valiosos ensinamentos sobre as mesmas.

A grande família Labcroiana representada pelos grandes amigos que fiz nestes cinco anos e meio de convivência no Labcrol: **Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva, Paulo Roberto da Costa Sá, Raimundo Negrão Neto, Geilson Alcântara da Silva, Roseane Barros Brasil, Cecília Mariana de Almeida, Manolo Cleiton Costa de Freitas, Débora Pinheiro Arruda, William Arthur dos Santos, Leandro Santos de Carvalho, Allan Jones Aires, Ewerton Afonso Silva da Silva, Ana Carolina Maués dos Santos, Sandra Cristina Ramos Monteiro, Angelo Kemil Silva dos Santos, Thalyta Negrão, Danila Tereza Valeriano Alves, Fernanda de Cássia Silva de Lima, Aline Collares Valente Pinheiro**, pelo convívio fraterno e momentos de puro aprendizado.

As grandes amigas e irmãs que levarei pro resto da vida em meu coração: **Lívia Trindade Lôbo, Danielle Rodrigues Monteiro da Costa, Marilene Nunes Oliveira e Sônia das Graças Santa Rosa Pamplona** pelos momentos de alegrias (ah se a Abelhuda falasse...),

reflexão e principalmente pelos grandes exemplos, ensinamentos de vida e carinho enorme que vocês têm por mim.

A minha “filha” **Nathália Siso Ferreira** pela grande ajuda na parte experimental e momentos em que a gente pensa que tudo vai mal, você esteve me encorajando a ir além das forças.

A **Joyce Kelly do Rosário Silva** pela amizade desde os anos de graduação e grande ajuda na compreensão e aplicação dos dados estatísticos.

Ao Prof. Dr. **Moacir Rossi Forim** pelos poucos, porém preciosos dias, que disponibilizou de seu tempo na compreensão do “mundo da validação”.

Aos **membros** da banca examinadora por terem aceitado o convite e pela contribuição no trabalho escrito.

A Profa. Dra. **Quézia Bezerra Cass** pela disponibilidade no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE–UFSCar e pela valiosa contribuição que sempre se dispôs a dar.

Ao amigo e técnico **Marçal de Souza Luna** na realização dos espectros de RMN.

A minha **avó, tias e tios, primos e primas** por estarem sempre de perto de mim, pelo carinho e por também partilharem deste sonho.

A **Banda Avivamento** pelos momentos de descontração e grande amizade durante esses sete anos em que estamos na luta para fazermos o melhor para Deus.

A todos os **amigos e irmãos** em Cristo pelas orações, amizades e torcida que fizeram por mim.

A **CAPES** pelo fomento durante toda a realização do trabalho.

A **todos** aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“A Química é talvez a Ciência que mais necessita de amigos. Para fazê-los, tê-los e mantê-los basta a humildade de perceber que você nunca vai conseguir saber tudo de Química e que eles sempre poderão lhe ensinar alguma coisa.”

Flávio Leite

“Não quero ser um conformista previsível, preso a algo que requer menos de mim do que eu sou chamado a dar. Não quero uma vida de fantasias, que eu possa usufruir sem sair do sofá. Quero sonhos que me façam mover em face de desvantagens impossíveis. Quero ter esperança quando a vida tornar-se intolerável e quero quebrar o que a torna intolerável.”

George Barna

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 12 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 14 |
| LISTA DE TABELAS | 18 |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | 19 |
| <i>Capítulo I</i> | 20 |
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| <i>Capítulo II</i> | 24 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL:..... | 25 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: | 25 |
| <i>Capítulo III</i> | 26 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 27 |
| 3.1 QUÍMICA DA FAMÍLIA MELIACEAE E SUA ATIVIDADE CONTRA INSETOS..... | 27 |
| 3.2 INTERAÇÃO PLANTA-INSETO..... | 32 |
| 3.2.1 Respostas da planta ao ataque do inseto..... | 33 |
| 3.2.2 Resistências de plantas | 35 |
| 3.2.3 Semioquímicos..... | 36 |
| 3.3 MOGNO | 38 |
| 3.4 PRINCIPAIS PRAGAS DA FAMÍLIA MELIACEAE..... | 40 |
| 3.5 A BIOLOGIA, COMPORTAMENTO E ATAQUE DE <i>Hypsipyla grandella</i> | 41 |
| <i>Capítulo IV</i> | 44 |
| 4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE SEPARAÇÃO DOS LIMONÓIDES 1 A 4 PARA A QUANTIFICAÇÃO DESTES NAS FOLHAS DE MOGNO | 45 |
| 4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL | 46 |
| 4.1.1 Materiais e equipamentos utilizados na otimização do método de separação dos limonóides por HPLC..... | 46 |
| 4.1.2 Coleta e identificação das folhas de mogno | 47 |
| 4.1.3 Preparo do extrato hexânico | 47 |
| 4.1.4 Determinação do grau de umidade | 48 |
| 4.1.5 Pré-tratamento das amostras..... | 48 |

| | | |
|-------------------------|---|----|
| 4. 1.6 | Otimização das condições para extração | 49 |
| 4. 1.7 | Preparo das amostras | 52 |
| 4. 1.7.1 | Extração das amostras em banho ultrassônico | 52 |
| 4. 1.8 | Validação de um método cromatográfico | 54 |
| 4. 1.9 | Métodos analíticos | 55 |
| 4. 1.9.1 | Preparo da solução padrão..... | 55 |
| 4. 1.9.2 | Soluções padrão estoque | 55 |
| 4. 1.9.3 | Soluções padrão de análise..... | 55 |
| 4. 1.9.4 | Obtenção das curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão..... | 56 |
| 4. 1.9.5 | Seletividade, Recuperação, Precisão e Exatidão | 56 |
| 4. 1.9.5.1 | <i>Seletividade</i> | 56 |
| 4. 1.9.5.2 | <i>Recuperação (eficiência da extração)</i> | 56 |
| 4. 1.9.5.3 | <i>Repetibilidade (precisão intra-dia)</i> | 57 |
| 4. 1.9.5.4 | <i>Reprodutibilidade (precisão inter-dias)</i> | 57 |
| 4. 1.9.6 | Limites de quantificação e detecção..... | 57 |
| 4.2 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 59 |
| 4.2.1 | Desenvolvimento do método para quantificação dos limonóides em folhas de mogno | 59 |
| 4.2.2 | Processo de validação do método | 68 |
| 4. 2.2.1 | Parâmetros Analíticos para validação do método | 68 |
| 4. 2.2.2 | Seletividade | 69 |
| 4. 2.2.3 | Linearidade e faixa linear | 70 |
| 4. 2.2.4 | Precisão | 75 |
| 4. 2.2.5 | Exatidão..... | 76 |
| 4. 2.2.6 | Limites de quantificação e de detecção..... | 77 |
| 4. 2.2.7 | Recuperação | 78 |
| <i>Capítulo V</i> | | 79 |
| 5 | INTRODUÇÃO | 80 |
| 5.1 | OBTENÇÃO DA FRAÇÃO LIMONOÍDICA | 80 |
| 5.2 | PRÉ-TRATAMENTO PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO LIMONOÍDICA UTILIZADA NO BIOENSAIO | 81 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 5.3 | PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FRL E DOS LIMONÓIDES ISOLADOS A SEREM UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS | 82 |
| 5.4 | BIOENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DETERRENTE ALIMENTAR..... | 82 |
| 5.4.1 | Criação das lagartas de <i>Hypsipyla grandella</i> em laboratório..... | 83 |
| 5.4.2 | Método utilizado para a avaliação da atividade deterrente alimentar | 83 |
| 5.4.2.1 | 1º Experimento..... | 85 |
| 5.4.2.2 | 2º Experimento..... | 85 |
| 5.4.2.3 | 3º Experimento..... | 86 |
| 5.4.2.4 | 4º Experimento..... | 86 |
| 5.5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 86 |
| 5.6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 87 |
| 5.6.1 | 1º Experimento: Avaliação do efeito da fração rica em limonóides de mogno (FRL), em uma única concentração, no ganho de peso das lagartas | 87 |
| 5.6.2 | 2º Experimento: Avaliação do efeito da fração rica em limonóides de mogno (FRL), em várias concentrações, na mortalidade das lagartas | 89 |
| 5.6.3 | 3º Experimento: Avaliação do efeito da fração rica em limonóides de mogno (FRL), em várias concentrações, no ganho de peso das lagartas | 90 |
| 5.6.4 | 4º Experimento: Avaliação do efeito dos limonóides 1 a 4 a diferentes concentrações no ganho de peso das lagartas | 94 |
| | <i>Capítulo VI</i> | 97 |
| 6 | CONCLUSÕES | 98 |
| | REFERÊNCIAS | 100 |
| | <i>Anexos</i> | 108 |

RESUMO

O mogno (*Swietenia macrophylla* King), umas das espécies mais importantes no mercado mundial de madeira vem diminuindo seu contingente nos últimos anos devido à exploração intensiva e ao desmatamento desordenado da floresta amazônica. Uma alternativa de se manter esta espécie foi a intensificação do plantio em áreas de reflorestamento, porém sem sucesso, devido ao ataque das lagartas *Hypsipyla grandella* (broca do mogno) aos brotos jovens da planta. Estudos realizados desde 2001 por pesquisadores da Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia e Universidade Federal de São Carlos, levaram, entre outros resultados, ao isolamento e identificação de substâncias pertencentes à classe dos limonóides e à comprovação de que as lagartas não aceitavam as folhas maduras como alimento, conduzindo à hipótese que estas substâncias podem estar associadas à inibição alimentar das mesmas. O presente trabalho buscou comprovar o efeito deterrente alimentar dos limonóides isolados das folhas maduras de mogno, sobre as lagartas de *Hypsipyla grandella*. Quatro experimentos foram realizados. Foram testadas soluções com concentrações de 1.000 a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de uma fração rica nos limonóides, utilizando como dieta, folhas de cedro. Os resultados obtidos mostram que, em todas as concentrações testadas, houve inibição da alimentação das lagartas, quando comparado ao controle. Paralelamente, foi desenvolvido e validado um método via HPLC-DAD, para a quantificação de quatro limonóides majoritários. A matriz de interesse (folhas secas e trituradas) foi submetida à extração por ultrassom em acetonitrila. O extrato resultante foi submetido à extração em fase sólida (SPE). Para a análise e quantificação dos limonóides foi usada uma coluna Supelcosil C₁₈ com pré-coluna. A fase móvel, composta por H₂O:MeOH:THF (30,2:67,8:1,4), em modo isocrático. Para a validação do método foram considerados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão, de acordo com as normas estabelecidas pela resolução n° 899/03 (ANVISA). A confiabilidade dos parâmetros avaliados pode ser observada pelo coeficiente de variação (CV%). A partir dos tempos de retenção obtidos, calculou-se o K para cada banda eluída, obtendo-se os valores de 9,71; 10,72; 11,60 e 12,80, para cada limonóide, com boa seletividade ($\alpha=1,30$) e resolução (Rs) de 2,09; 2,2, 2,5 e 2,13, respectivamente. Dois métodos de calibração foram usados, sendo um com a padronização externa utilizando-se as concentrações dos limonóides de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o outro, por adição de padrão, com as concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em quintuplicata, para avaliar a exatidão e a recuperação. A precisão foi avaliada utilizando-se soluções de 75, 250 e 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O método proposto mostrou-se

eficiente e confiável, apresentando linearidade nas faixas de 50 - 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, exatidão, seletividade e precisão, permitindo o seu uso na avaliação destes limonóides, nos vários estágios de maturação das folhas esses resultados representam um avanço importante na pesquisa dedicada a encontrar soluções para o ataque da broca do mogno.

PALAVRAS-CHAVES: *Swietenia macrophylla* King, *Hypsipyla grandella* Zeller, HPLC, limonóides, atividade deterrente alimentar.

ABSTRACT

Mahogany (*Swietenia macrophylla* King), one of the most important species in global timber market, is decreasing significantly its in recent years due to intensive exploration and illegal deforestation of the Amazon rainforest. An alternative to maintain this species is was the plantation in reforestation areas, but a limited success has been pointed out due to the attack of larval *Hypsipyla grandella* (mahogany borer). Since 2001 researchers from Universidade Federal do Pará, Universidade Federal de São Carlos and Universidade Federal Rural da Amazônia, have successfully studies, the isolation and identification of substances belonging to limonoids class and verified that the larvaes do not accept mature leaves as food, pointing to the hypothesis suggests these substances may be associated with antifeedant activity. The present study showed the antifeedant effect these limonoids isolated from mature leaves of mahogany, on larvae of *Hypsipyla grandella*. Four experiments were conducted. Solutions 1.000 to 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of a fraction rich in limonoids were tested using cedar leaves as natural diet. The results showed that the solutions at tested all concentrations showed inhibition of the feeding of the larvaes compared to control. Parallely, a method by HPLC-PDA was developed and validated for the quantitation of four major limonoids. The matrix (dried leaves and powdered) was subjected to ultrasonic extraction in acetonitrile. The extract was subjected to solid phase extraction (SPE). A Supelcosil C₁₈ column, with pre-column was used for analysis of limonoids. The mobile phase, consisting of H₂O: MeOH: THF (30,2:67,8:1,4) in isocratic mode. To validate the method the parameters of selectivity, linearity, precision and accuracy were considered in accordance to resolution no. 899/03 (ANVISA). The reliability of these parameters can be observed by the coefficient of variation (CV%). From the retention times, the values K for each band eluted were calculated yielding of 9.71, 10.72, 11.60 and 12.80, with good selectivity ($\alpha = 1.30$) and resolutions (Rs) of 2.09, 2.2, 2.5 and 2.13, respectively. Two calibration methods were used, the external standard using concentrations of limonoids of 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, in triplicate and other by standard addition with the concentrations 100, 200, 300, 400 and 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, in quintuplicate, to evaluate the accuracy. Precision was evaluated using solutions of 75, 250 and 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The proposed method was efficient and reliable, with linearity in the range of 50-600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, accuracy, selectivity and accuracy allowing its use to evaluate these limonoids in various stages of maturation of the leaves. These results represent an important advance in research to finding solutions to the mahogany borer attack.

KEYWORDS: *Swietenia macrophylla* King, *Hypsipyla grandella* Zeller, HPLC, limonoids, antifeedant activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura dos limonóides isolados das folhas de <i>Swietenia macrophylla</i> (DA SILVA <i>et al.</i> , 2008). | 23 |
| Figura 2 - Rota biogenética dos limonóides de Meliaceae (CHAMPAGNE <i>et al.</i> , 1992). | 29 |
| Figura 3a - Alguns limonóides de Meliaceae com atividade inseticida (VIEGAS JUNIOR, 2003). | 30 |
| Figura 3b - Alguns limonóides de Meliaceae com atividade inseticida (VIEGAS JUNIOR, 2003) | 30 |
| Figura 4 - Interações entre plantas e insetos (MELLO e SILVA-FILHO, 2002). | 33 |
| Figura 5 - Esqueleto estrutural de glucosinolatos (KLIEBENSTEIN <i>et al.</i> , 2001). | 35 |
| Figura 6 - Nomenclatura adotada para semioquímicos e critérios biológicos de classificação destes compostos (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009). | 37 |
| Figura 7 - Representação esquemática dos critérios biológicos de classificação dos aleloquímicos (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009). | 38 |
| Figura 8 - Mogno com aproximadamente 1 ano. | 40 |
| Figura 9 - Inseto adulto de <i>H. grandella</i> | 41 |
| Figura 10 – <i>H. grandella</i> em vários instares de seu ciclo. | 42 |
| Figura 11 - Ataque de <i>H. grandella</i> em uma plantação jovem de mogno. A – as lagartas se alimentam das brotações novas; B – após a alimentação das brotações novas as lagartas direcionam-se ao broto apical; C e D – penetram no broto apical; E – causando deformação e morte dos brotos novos (DA SILVA, 2005). | 43 |
| Figura 12 - Etapas envolvidas no processo de desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico. | 45 |
| Figura 13 - Sistema de SPE. Principais etapas empregadas em SPE visando ao isolamento de um composto ou classe de compostos. Fonte: www.waters.com/waters/nav.html | 49 |
| Figura 14 - Esquema geral da otimização do processo de extração das folhas de mogno. | 50 |
| Figura 15 - Esquema da extração das amostras de folhas do mogno após otimização do método de extração. | 51 |
| Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas correspondendo ao pré-tratamento utilizado, por banho ultrassônico, para o extrato das folhas de mogno. | 53 |
| Figura 17 - Estrutura dos limonóides isolados das folhas de <i>Swietenia macrophylla</i> | 58 |

| | |
|--|----|
| Figura 18 - Cromatograma 1 - Gradiente de ampla extensão do extrato hexânico das folhas de mogno com fase móvel composta por solvente A: H ₂ O e solvente B: ACN variando de 5 a 100% de B em 60 minutos, vazão de 2,0 mL min ⁻¹ , fase estacionária C ₁₈ (Gemini) e λ: 220 nm. | 60 |
| Figura 19 - Cromatograma 2 - Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H ₂ O:ACN 40:60, vazão de 1mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 62 |
| Figura 20 - Nomógrafo da seletividade em fase reversa proposto por Snyder (1997). | 62 |
| Figura 21 - Cromatograma 3 - Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H ₂ O:MeOH 30:70, vazão de 1mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 63 |
| Figura 22 - Cromatograma 4 - Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5μ e fase móvel H ₂ O:THF 55:45, vazão de 1mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 63 |
| Figura 23 - A: Triângulo da seletividade a partir do nomógrafo. B: Triangulação cromatográfica para a escolha da melhor fase móvel para separação dos limonóides 1 a 4. ... | 64 |
| Figura 24 - Cromatograma 5- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H ₂ O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 1mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 65 |
| Figura 25 - Cromatograma 6- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna NX C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H ₂ O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 1mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 66 |
| Figura 26 - Cromatograma 7- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Supelcosil C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H ₂ O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 1mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 66 |
| Figura 27 - Cromatograma 8- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Supelcosil C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 3 μ e fase móvel | |

| | |
|---|----|
| H ₂ O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 0,9 mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4. | 67 |
| Figura 28 - Cromatograma 9 - Eluição isocrática da mistura dos quatro padrões de limonóides das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Supelcosil C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 3 μ e fase móvel H ₂ O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 0,9 mL min ⁻¹ . Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides 1 a 4..... | 68 |
| Figura 29 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 1. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 μg mL ⁻¹ | 71 |
| Figura 30 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 2. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 μg mL ⁻¹ | 71 |
| Figura 31 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 3. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 μg mL ⁻¹ | 72 |
| Figura 32 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 4. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 μg mL ⁻¹ | 72 |
| Figura 33 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 1. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 μg mL ⁻¹ | 73 |
| Figura 34 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 2. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 μg mL ⁻¹ | 73 |
| Figura 35 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 3. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 μg mL ⁻¹ | 74 |
| Figura 36 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 4. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 μg mL ⁻¹ | 74 |
| Figura 37 - Fluxograma 3 - Obtenção e fracionamento do extrato hexânico das folhas de mogno para o bioensaio. | 81 |
| Figura 38 - Método ajustado do bioensaio com <i>H. grandella</i> . A e B – Redução da área foliar do cedro e tamanho da dieta utilizada; C – Mecanismo de inserção da droga na dieta; D - Contato da dieta com a lagarta em tubos de vidro cilíndricos. Fonte: Castro, K. C. F; 2008 .. | 84 |
| Figura 39 - Contagem das lagartas mortas (mostrada pela marcação em vermelho) e pesagem ao final do bioensaio. Fonte: Castro, K. C. F; 2008. | 84 |
| Figura 40 - Folhas de cedro (<i>Cedrela odorata</i>), depois de 24 horas de contato com as lagartas. A – lagartas submetidas à dieta tratada com droga; B – lagartas submetidas à dieta sem droga. | 88 |

| | |
|--|----|
| Figura 41 - Lagartas do primeiro bioensaio. Lagartas marcadas com círculo amarelo são as tratadas com a droga e com círculo vermelho são as do grupo controle (branco). | 88 |
| Figura 42 - Gráfico 1 - Ganho de peso médio das lagartas ao longo dos dias do primeiro bioensaio..... | 89 |
| Figura 43 - 3º Experimento. Lagartas que sobreviverem ao tratamento com a droga (10 dias), nas diferentes concentrações (1.000 a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e lagartas do controle..... | 93 |
| Figura 44 - Gráfico 2 - Efeito da droga nas diferentes concentrações, sobre o peso das lagartas após 10 dias de tratamento. Comparação das médias do peso pelo teste de Scheffé. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância = α 5%..... | 94 |
| Figura 45 - 4º Experimento: Visualização da diferença de tamanho entre as lagartas do controle e do tratamento e uniformidade de tamanho em um mesmo grupo. | 96 |
| Figura 46 - Gráfico 3 - Efeito das soluções da droga (1+2+3+4) em várias concentrações, sobre o peso das lagartas. Comparação das médias do peso pelo teste de Scheffé. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância α = 5%. | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 - Classe de substâncias químicas envolvidas na interação de resistências de insetos planta-hospedeiro. Fonte: MELLO e SILVA-FILHO (2002). | 34 |
| TABELA 2 - Estimativa do % do solvente B (ACN) para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda T_z e do gradiente inicial (Snyder e Dolan, 1996). | 61 |
| TABELA 3 - Valores dos CVs (%) para as soluções-controles. | 75 |
| TABELA 4 - Valores dos CVs (%) para as soluções-controles. | 76 |
| TABELA 5 - Valores das exatidões (%) para as soluções-controles. | 77 |
| TABELA 6 - Valores das recuperações (%) para as soluções-controles. | 78 |
| TABELA 7 - Resultados do 2º bioensaio com <i>H. grandella</i> . Percentual de mortalidade das lagartas tratadas com soluções da fração limonoídica em diferentes concentrações. | 90 |
| TABELA 8 - Análise de variância sobre o efeito das soluções da droga, nas diferentes concentrações, sobre o ganho de peso das lagartas <i>H. grandella</i> | 92 |
| TABELA 9 - Análise de variância sobre o efeito da concentração no ganho de peso das lagartas de <i>H. grandella</i> | 95 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α – fator de separação
ACN – acetonitrila
AcOEt – acetato de etila
CCVU – cromatografia em coluna via úmida
CV – coeficiente de variação
DAD – detector de arranjo de diodo
F – teste F
FRL – Fração rica dos limonóides
FV – fonte de variação
GL – graus de liberdade
HA – Hexano/Acetato de etila
Hex – hexano
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
K – fator de retenção
MeOH – Metanol
QM – quadrado médio
Pág. – página
PDA – Photo Diode Array
Rs – resolução
RSD – Relative Standard Deviation
SPE – solid phase extraction
SQ – soma dos quadrados
THF – Tetraidrofurano
 T_g – Tempo de retenção do gradiente
 T_{ra} – Tempo de retenção do primeiro pico
 T_r – Tempo de retenção
 T_{rz} – Tempo de retenção do último pico
UFPA – Universidade Federal do Pará
UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos



Capítulo I

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A ação humana na Amazônia brasileira vem apresentando resultados não compatíveis com a sustentabilidade da sua biodiversidade, principalmente na área da exploração madeireira, onde espécies como o mogno (*Swietenia macrophylla* King) sofre ameaça de extinção em consequência da grande exploração madeireira seletiva, das queimadas e do ataque intensivo da broca do mogno, *Hypsipylla grandella* Zeller (broca das meliáceas), sendo esses os principais fatores limitantes para o cultivo e o aproveitamento do mogno (RODAN *et al.*, 1992).

Nos anos de 2000 a 2002, o estado do Pará foi considerado um importante exportador de madeiras nobres, tendo contribuído com 21%, 19% e 18%, respectivamente, da exportação nacional, obtendo valores de US\$ 309.030.000,00, 286.264.000,00 e 312.574.000,00. Dados recentes mostraram que nos anos de 2007 e 2008, estes valores quase que triplicaram, chegando a US\$ 792.820.353,00 e 631.232.801,00, respectivamente. Nos anos de 1991 a 1997, o Pará exportou um volume de toras que variou de 42.070 a 104.160 m³, sendo os três principais países importadores: E.U.A., França e Espanha, além de Holanda, China, Portugal, República Dominicana, Japão, Reino Unido, Guadalupe, Tailândia e Porto Rico (AIMEX, 2009).

Segundo levantamento feito pelo Ministério do Meio Ambiente, 80% da madeira extraída da Amazônia é ilegal. Outro dado é que uma árvore de mogno adulta, extraída ilegalmente de uma reserva indígena, onde atualmente, se estima que esteja a maioria do mogno remanescente, vale R\$ 80,00 para os donos da terra. A mesma árvore é exportada por 3,3 mil dólares para indústrias européias, norte-americanas, asiáticas e renderá madeira suficiente para fabricação de 12 a 15 mesas grandes. Estas, por sua vez, venderão cada peça por cerca de aproximadamente 8,5 mil dólares, sendo o equivalente à venda de 4.275 árvores derrubadas ilegalmente na floresta, segundo os cálculos do Greenpeace, no ano de 2002, considerando o dólar a R\$ 2,66 (MEIO AMBIENTE, 2003). O Ministério do Meio Ambiente, através da Instrução Normativa 07, de 22 de agosto de 2003, estabeleceu que a exploração do mogno só pudesse ser feita através de plano florestal sustentável.

Assim tornou-se necessário a implementação, na Amazônia, de projetos de reflorestamento como forma de amenizar tais prejuízos e assegurar a sustentabilidade do mogno nessa região, porém o que se vê é o fracasso desses projetos devido aos danos causados pelo ataque de um lepdóptero, *H. grandella* (broca do mogno), considerada a

principal praga do mogno e cujo controle ainda não está totalmente definido, tendo em vista ser uma praga de difícil controle (BERTI FILHO, 1973; RODAN *et al.*, 1992; VERÍSSIMO *et al.*, 1992; NEWTON *et al.*, 1993; COSTA, 2000; GALLO *et al.*, 2002 e OHASHI, 2002). Os danos causados por essa praga são drásticos levando à perda da produtividade e interesse comercial do plantio de mogno.

Face estas constatações e ao grande interesse pelo mogno por parte do setor produtivo, estudos realizados em conjunto pela UFSCar, UFPA e UFRA, a partir de 2001 (PROCAD/CAPES), levaram, entre outros resultados, ao isolamento e identificação de seis substâncias pertencentes à classe dos limonóides (Figura 1, p. 23), presentes nas folhas adultas do mogno (DA SILVA *et al.*, 2008), à observação de que as lagartas ao eclodirem tem preferência alimentar pelas folhas jovens e à comprovação de que as lagartas não aceitam as folhas a partir de um certo grau de maturação (intermediária e madura) como alimento.

A obtenção do perfil químico, por HPLC-DAD, das folhas novas, intermediárias e maduras permitiu verificar diferenças na constituição química, e ainda, quais constituintes poderiam estar “induzindo” as lagartas a abandonarem as folhas em desenvolvimento, já que é comprovado que a lagarta se desenvolve e completa seu ciclo de vida alimentando-se das folhas jovens (LUNZ *et al.*, 2009). Tais indícios sugerem que estas substâncias podem estar associadas aos efeitos de deterrência alimentar para as lagartas.

O desenvolvimento e validação de um método de análise, tomando por base a técnica HPLC - High Performance Liquid Chromatography - acoplado a um detector UV, permitiu a quantificação de quatro limonóides, potencialmente associados à deterrência alimentar. Paralelamente foram desenvolvidos bioensaios visando à comprovação da atividade biológica dos limonóides.

Os resultados dos testes destes constituintes químicos sobre o desenvolvimento das lagartas de *H. grandella* poderão, no futuro, contribuir para o controle da praga do mogno, através do desenvolvimento de bioinseticidas e/ou repelentes naturais.

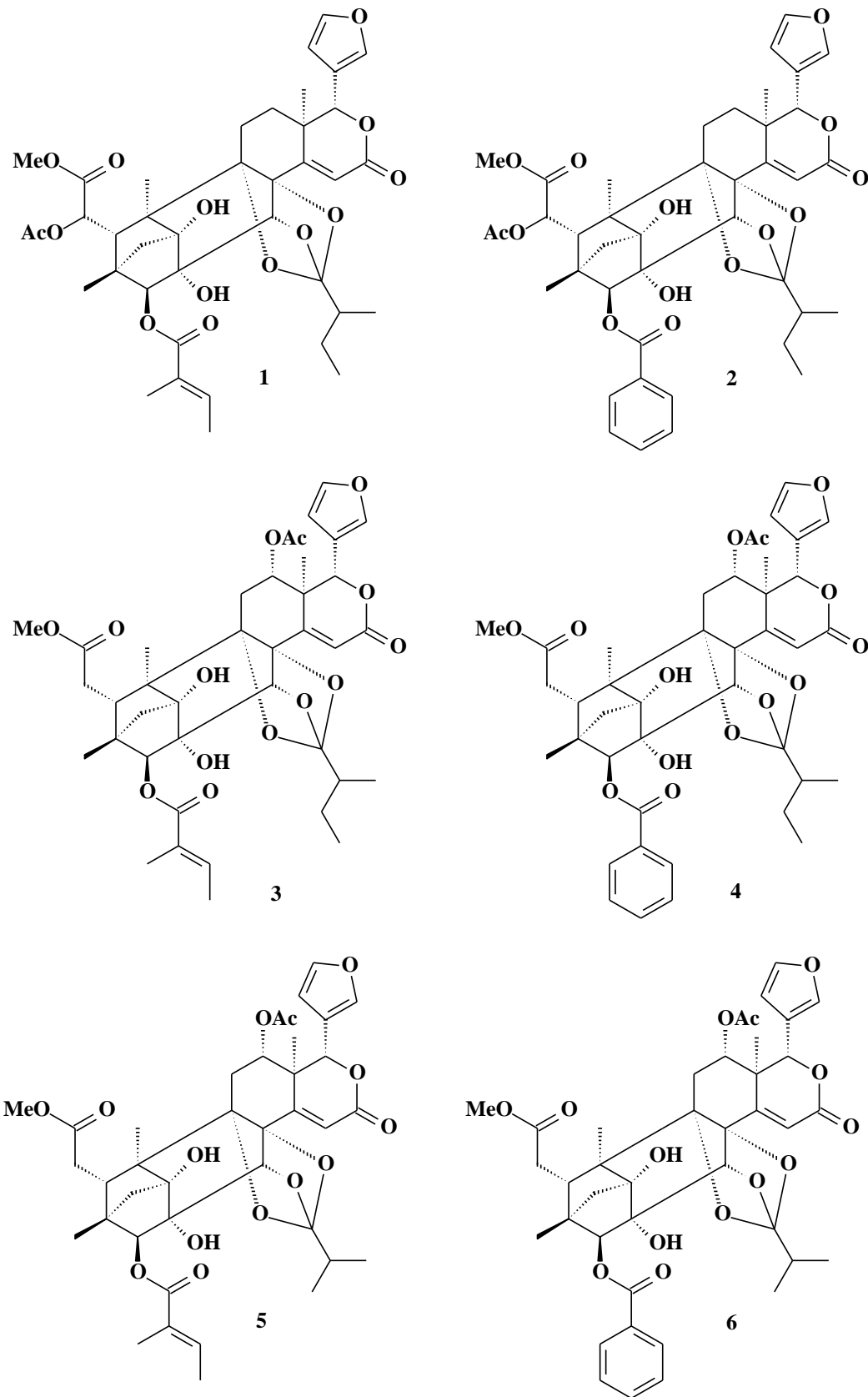


Figura 1 – Estrutura dos limonóides isolados das folhas de *Swietenia macrophylla* (DA SILVA *et al.*, 2008).



Capítulo II

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Quantificar os limonóides majoritários presentes nas folhas maduras de mogno, via HPLC, e avaliar a atividade biológica destes limonóides sobre a praga do mogno (*H. grandella*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar, em quantidade suficiente para realização dos bioensaios frente à *H. grandella*, os limonóides presentes nas folhas maduras de mogno.
- Otimizar a metodologia para a avaliação biológica dos limonóides de mogno frente a *H. grandella*
- Otimizar a metodologia, via HPLC, para obtenção do perfil químico das folhas novas, intermediárias e maduras de mogno, estabelecendo a impressão digital das mesmas.
- Validar e utilizar o método desenvolvido visando o acompanhamento da evolução dos limonóides em função do grau de maturação das folhas.



Capítulo III

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUÍMICA DA FAMÍLIA MELIACEAE E SUA ATIVIDADE CONTRA INSETOS

A família Meliaceae possui 51 gêneros e cerca de 1.400 espécies, quase todas lenhosas, nativas de regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios (BANERJI e MIGAN, 1984 e WATERMAN *et al.*, 1993). Dentre os sete gêneros representados no Brasil, aqueles com maior interesse econômico madeireiro são: *Swietenia* (mogno), *Cedrela* (cedro-branco, cedro-rosa) e *Carapa* (andiroba).

As plantas pertencentes a essa família destacam-se pela sua composição química semelhante, contendo compostos com várias atividades biológicas, dentre as quais, a principal é a de ação contra os insetos (CHAMPAGNE *et al.*, 1992). Os limonóides que ocorrem nas meliáceas, uma das principais fontes desse tipo de substâncias, também são conhecidos como meliacinas. Essa família é capaz de produzir vários tipos estruturais de limonóides (Figura 2, p. 29), a partir de um precursor comum com esqueleto básico de 26 átomos de carbono (Figura 2, grupo 1), sofrendo abertura oxidativa nos anéis B, D e B/D, produzindo, respectivamente, os limonóides dos grupos 2, 4 e 6. Os limonóides do grupo 4 ao sofrerem uma reciclagem produzem os limonóides do grupo 5, conhecidos como mexicanolídeos. A partir do precursor do grupo 1, a abertura oxidativa dos anéis A/B leva aos limonóides dos grupos 8 e 9. A clivagem oxidativa do anel C produz os limonóides com anel C-seco, típicos do grupo azadiractina (Figura 2, grupo 7) (CHAMPAGNE *et al.*, 1992).

Os limonóides encontrados nos gêneros pertencentes à subfamília Swietenioideae geralmente seguem a rota que leva ao grupo do mexicanolídeo (Figura 2, grupo 5), enquanto que nos gêneros da subfamília Melioideae se formam principalmente limonóides ao longo de rotas biogênicas levando aos grupos 6, 7, 8 e 9.

Os limonóides representam o nível máximo na sequência de produção de terpenóides em plantas que normalmente não são atacadas por insetos e são, provavelmente, os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida. Ao falar-se em atividade inseticida, o limonóide azadiractina A (Figura 3a, p. 30, substância 7), isolado de sementes de *Azadirachta indica* (neem) (BUTTERWORTH e MORGAN, 1968) tem destaque por apresentar efeitos tóxicos sobre cerca de 200 espécies de insetos (ROY e SARAF, 2006). Alguns estudos objetivando estabelecer a relação estrutura-atividade permitiram concluir que limonóides com anel C-seco são mais ativos, e uma das ações mais

relevantes relatadas para plantas da família Meliaceae é a supressora de apetite (CHAMPAGNE *et al.*, 1992). Dessa mesma planta outros limonóides foram isolados, como o 7-desacetil-17- β -hidroxiazadiradiona (Figura 3a, substância **8**) que inibiu o crescimento do microlepdóptero *Heliothis virescens* (LEE *et al.*, 1988) e uma nova estrutura de limonóide (Figura 3a, substância **9**), que foi identificada nas sementes de *Khaya ivorensis*, mostrou atividade contra o besouro *Agrotis segetum*, reduzindo em 56% o seu crescimento quando tratado com solução a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do limonóide, em alimentação artificial (HARBONE, 1993; VANUCI *et al.*, 1992). Outros quatro limonóides foram isolados de *Khaya ivorensis* denominados khayanolídeo A e B (Figura 3a, substâncias **10** e **11**), *epi*-angolensato de metila (Figura 3a, substância **12**) e o derivado 6-hidrolixado (Figura 3a, substância **13**). Estes foram testados contra *Spodoptera littoralis*, sendo o composto khayanolídeo o mais potente, na concentração de 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (NAKATANI *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos com a azadiractina intensificaram ainda mais a busca por outros possíveis compostos com atividade inseticida, não só no gênero *Khaya*, mas também em outros gêneros da família Meliaceae. De *Melia azedarach* foi isolada uma substância (Figura 3a, **14**) semelhante estruturalmente à azadiractina, que apresentou atividade inseticida equivalente, além dos compostos **15**, **16**, **17** e **18** (Figura 3b, p. 31) que inibiram a alimentação de *Spodoptera littoralis* (NAKATANI *et al.*, 1998). Esta planta também é fonte das meliacarpinas (Figura 3b, p. 31, substâncias **19**, **20** e **21**) que são inseticidas tão potentes quanto a azadiractina, a qual é utilizada como padrão (BOHNENSTENGEL *et al.*, 1999). *Melia toosendan* forneceu cerca de 40 limonóides de classes estruturais diversas, sendo a grande maioria inédita e com propriedades inseticidas confirmadas; dentre essas substâncias, destaca-se a salanina (**22**) que quando comparada a outros derivados triterpênicos, mostrou-se um forte agente supressor de apetite e regulador de crescimento de inseto, além disto, sua concentração no extrato de *Azadirachta indica* excede em 3 ou 4 vezes a azadiractina, o que sugere que sua atividade seja substancialmente importante na ação inseticida relatada para esta planta (HARBONE, 1999).

As quatro espécies conhecidas do gênero *Swietenia* estão sob estudo, na busca por outros limonóides com potencial atividade inseticida e que possam agir como análogos das azadiractinas. Dos limonóides isolados de *S. macrophylla*, *S. mahogani* e *S. aubrevilleana*, três substâncias inéditas merecem destaque por sua atividade inseticida potencial (Figura 3b, p. 31, substâncias **23**, **24** e **25**) (MOOTOO *et al.*, 1999).

A grande diversidade de atividades biológicas apresentadas pelos limonóides, principalmente atividade inseticida, torna esta família bastante interessante (NAKATANI *et al.*, 2004).

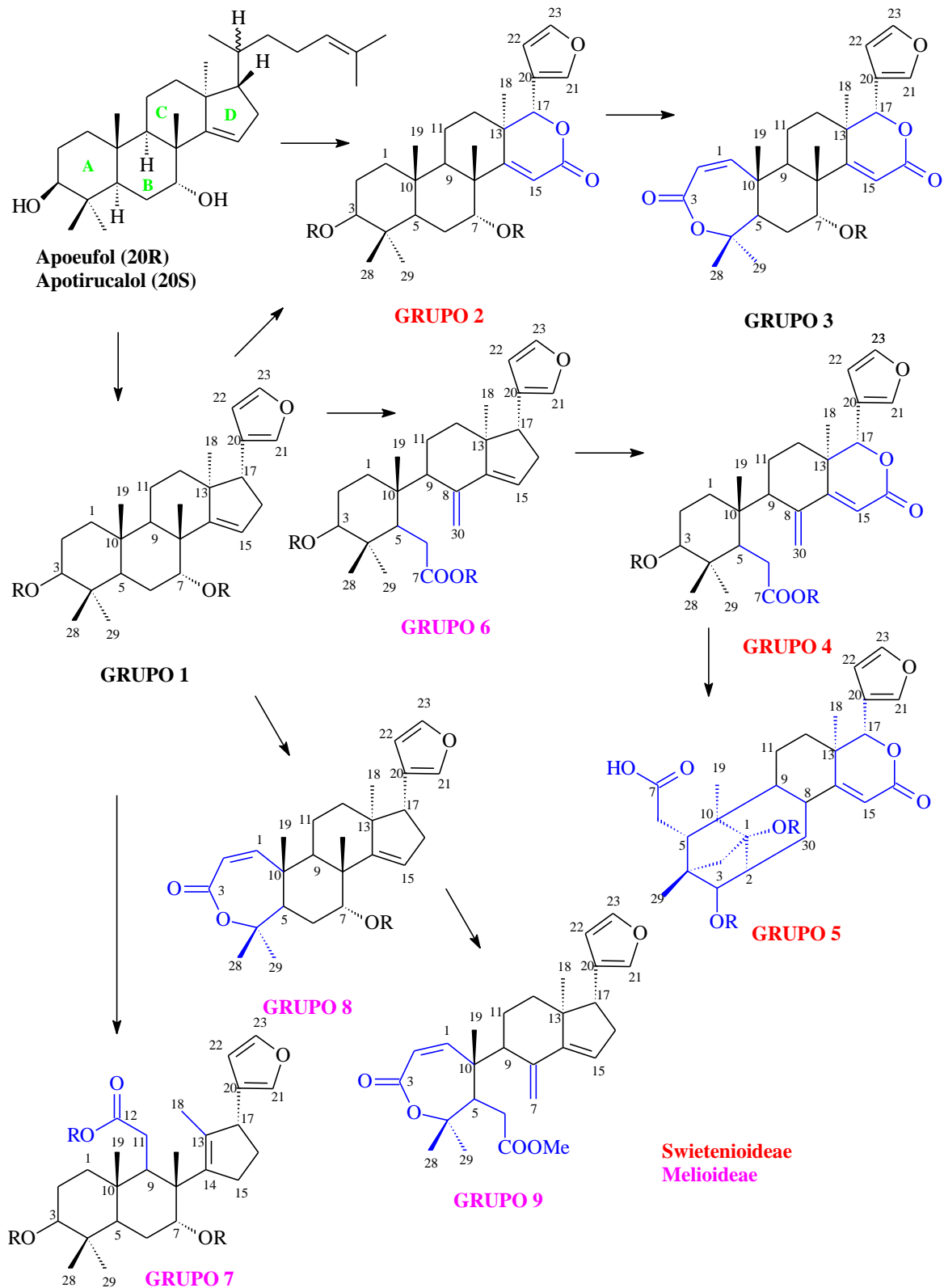


Figura 2 - Rota biogenética dos limonóides de Meliaceae (CHAMPAGNE *et al.*, 1992).

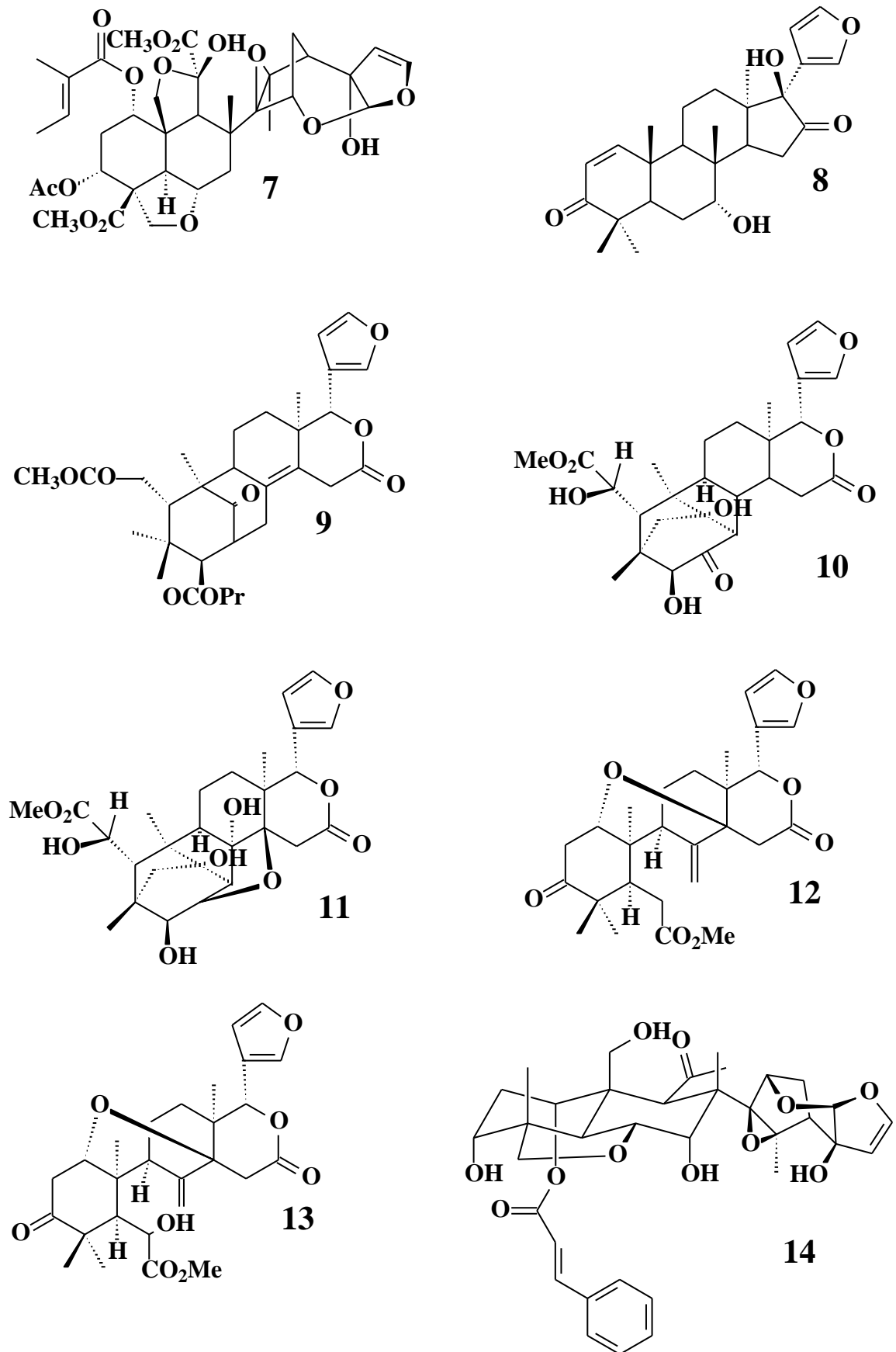


Figura 3a - Alguns limonóides de Meliaceae com atividade inseticida (VIEGAS JUNIOR, 2003).

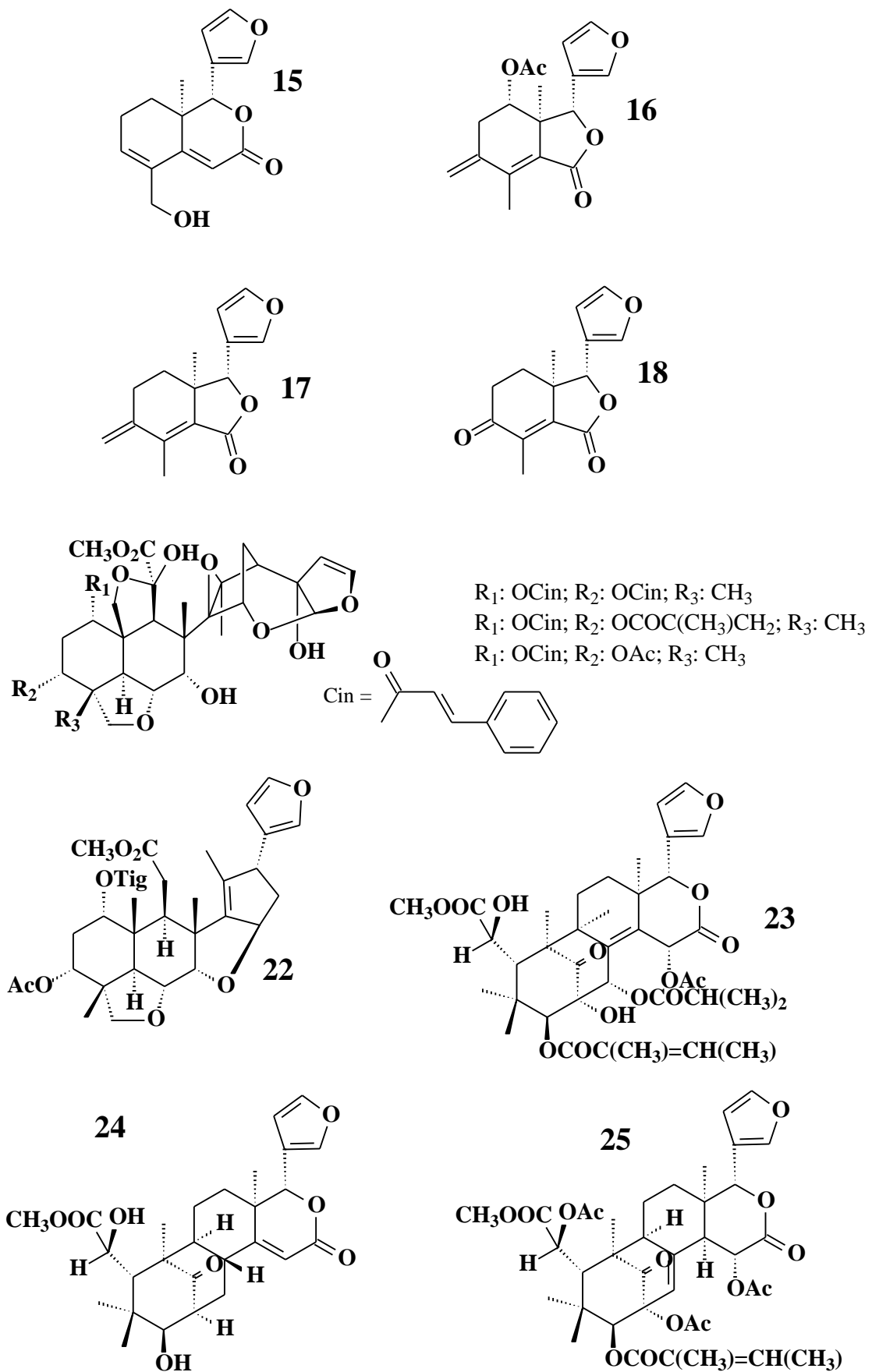


Figura 3a - Alguns limonóides de Meliaceae com atividade inseticida (VIEGAS JUNIOR, 2003).

3.2 INTERAÇÃO PLANTA-INSETO

A evolução das plantas transformou o ambiente terrestre em um recurso altamente importante para a comunidade de herbívoros. Em ecossistemas naturais, plantas e insetos são organismos vivos que interagem continuamente de forma complexa. Os insetos estão intimamente associados às atividades benéficas incluindo a defesa e polinização das plantas, enquanto que as plantas fornecem abrigos, sítios de desova e comida, os três fatores solicitados para a proliferação do inseto (PANDA e KHUSH, 1995). Por outro lado, dependendo da intensidade de ataque de insetos herbívoros, estes podem ser extremamente prejudiciais às plantas levando-as à morte. A interação planta-inseto é um sistema dinâmico (Figura 4, p. 33), sujeito à variação contínua e mudanças (MELLO e SILVA-FILHO, 2002). A fim de reduzir os ataques de insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa, incluindo barreiras físicas e químicas, tais como a indução de proteínas de defesa, compostos voláteis que atraem predadores do inseto herbívoro, metabólitos secundários e densidades de tricomas (BALDWIN, 2001). Paralelamente, os insetos desenvolveram estratégias para ultrapassar as barreiras das plantas, tais como a desintoxicação, mecanismos de anulação, sequestro de veneno e alteração do padrão de expressão gênica. Esta é a base da teoria da co-evolução proposta por Ehrlich e Raven (1964), entretanto, mesmo sendo bem aceita, vale ressaltar que existem experiências de determinados compostos defensivos de plantas, opostos à pressão da seleção dos diferentes inimigos e principais barreiras defensivas, que evoluem em resposta a um conjunto diversificado de herbívoros, fatores bióticos e abióticos. Além disso, ambos os organismos, planta e inseto, estão sob pressões ambientais que tem um importante impacto sobre o sistema de interação (STOWE, 1998).

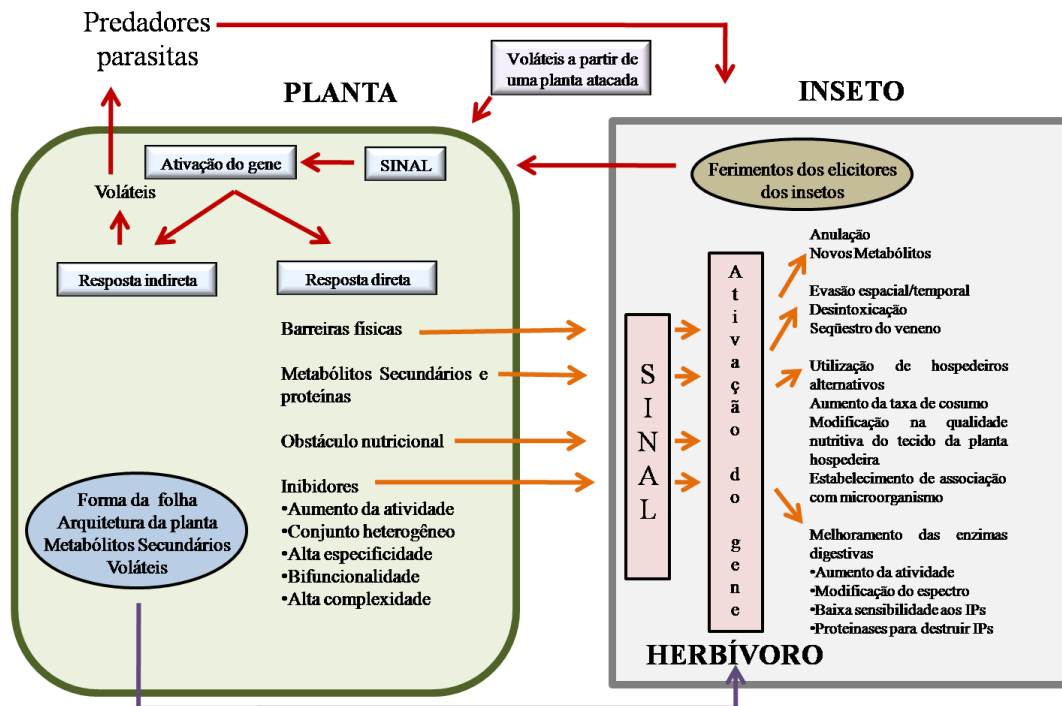


Figura 4 - Interações entre plantas e insetos (MELLO e SILVA-FILHO, 2002)

3. 2.1 Respostas da planta ao ataque do inseto

As plantas produzem substâncias químicas para fins de defesa, de duas maneiras diferentes: 1º- como substância constitutiva para repelir herbívoros por toxicidade direta, ou reduzindo a digestibilidade dos tecidos da planta e, 2º- como indução de substâncias sintetizadas em resposta ao dano tecidual por parte dos herbívoros. Essas estratégias são capazes de impedir a maioria dos herbívoros, embora haja um número reduzido de insetos que são capazes de se adaptar a espécies de plantas específicas. Os metabólitos secundários executam funções úteis às plantas, agindo de maneira induzida e constitutiva. Alguns compostos são considerados reguladores de crescimento, enquanto outros agem como sinais químicos. O ecossistema possui agentes antibioses, mecanismos de transporte e armazenamento de moléculas de carbono e nitrogênio, que estão diretamente envolvidos no metabolismo primário das plantas. Muitos metabólitos secundários das plantas estão envolvidos na defesa do vegetal contra insetos herbívoros agindo como repelentes e inibidores de alimentação e/ou toxinas e algumas dessas substâncias e funções que as mesmas exercem na defesa das plantas estão descritas na Tabela 1 (p. 34) (MELLO e SILVA-FILHO, 2002).

TABELA 1 - Classe de substâncias químicas envolvidas na interação de resistências de insetos planta-hospedeiro. Fonte: MELLO e SILVA-FILHO (2002).

| Classes/ subclasses de substâncias | Função | Referência |
|---|---|--------------------------------------|
| <i>Alcanos, aldeídos, cetonas, ceras</i> | <i>Camada protetora</i> | <i>Panda e Khush (1995)</i> |
| <i>Ligninas, taninos</i> | <i>Barreira mecânica, inibição regular absorptiva, intragabilidade</i> | <i>De Bruxelles e Roberts (2001)</i> |
| <i>Terpenóides (monoterpenos, iridoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos)</i> | <i>Tóxico, antibiótico, deterrente alimentar, deterrente de oviposição</i> | <i>Nishida (2002)</i> |
| <i>Fenólicos</i> | <i>Tóxico, ovicidal, fotosensibilidade inseticida</i> | <i>Ananthkrishnan (1999)</i> |
| <i>Flavonóides (antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas)</i> | <i>Antialimentar, fitoalexinas, inibição da oxidação mitocondrial</i> | <i>Panda e Khush (1995)</i> |
| <i>Quinonas</i> | <i>Tóxico, antialimentar</i> | <i>Panda e Khush (1995)</i> |
| <i>Alcalóides</i> | <i>Tóxico, interferente do sistema nervoso, inibidor de enzima digestiva, antialimentar, inibidor glucosidase</i> | <i>Panda e Khush (1995)</i> |
| <i>Glicosídeos cianogênicos</i> | <i>Tóxico</i> | <i>Panda e Khush (1995)</i> |
| <i>Glucosinolatos</i> | <i>Repelente, tóxico, irritante, antibiótico</i> | <i>Kliebenstein et al., (2001)</i> |

Os glucosinolatos (Figura 5) são um exemplo de metabólitos secundários que estão envolvidos nas interações inseto-plantas. Essa classe de substâncias varia qualitativamente em espécies de *Arabidopsis*, gerando diversas combinações em resposta a mudanças de herbívoros ou outras pressões seletivas (KLIEBENSTEIN *et al.*, 2001). A emissão de compostos voláteis é outro importante mecanismo que afeta o comportamento de insetos que estão em busca de alimento. Os odores transmitidos pelas plantas são uma das principais pistas que os insetos usam para encontrar a planta hospedeira, como exemplos têm o gorgulho das sementes de repolho, que são orientados por uma mistura complexa de compostos voláteis metabolizados nas plantas hospedeiras (BARTLET *et al.*, 1993).

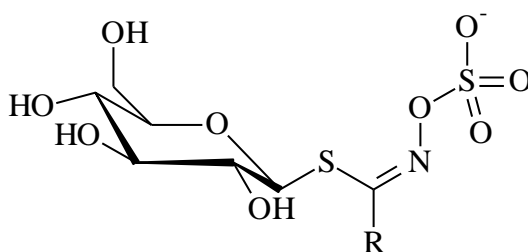


Figura 5 - Esqueleto estrutural de glucosinolatos (KLIEBENSTEIN *et al.*, 2001).

3. 2.2 Resistências de plantas

Existem várias definições para plantas resistentes. Do ponto de vista prático, diz-se que uma variedade ou planta é resistente quando sofre dano menor do que a maioria das outras plantas, sob igualdade de condições, resultando em menor prejuízo econômico, ambiental e biológico. Segundo Painter (1951) existem três tipos de resistências que são:

- Antixenose ou não preferência – Resistência a insetos por parte de plantas ou variedades desprovidas de características adequadas para se tornar hospedeira resultando em resposta negativa à alimentação, oviposição ou abrigo, estando nas mesmas condições;
- Antibiose – Antagonismo fisiológico de um organismo em relação a outro, geralmente usado como referência ao antagonismo devido a compostos presentes em plantas, conferindo resistência a insetos e/ou associação antagonística em que um organismo causa efeito prejudicial no crescimento ou desenvolvimento do outro e/ou forma de resistência de plantas a insetos através da liberação de substâncias químicas tóxicas ao predador;

- Tolerância - capacidade de suportar o ataque do inseto através da regeneração dos tecidos destruídos, emissão de novos ramos, ou perfilhos, ou por outro meio, desde que não ocasione perda na qualidade e quantidade da produção.

Quando o fator genético faz com que uma planta seja menos danificada que outra nas mesmas condições, por um determinado inseto, considera-se aquela como uma planta resistente. O cedro australiano (*Toona ciliata*), o mogno africano (*Khaya ivorenses*) e o neem (*Azadirachta indica*), tanto no plantio solteiro quanto no consorciado com mogno, não foram atacados pela broca do mogno, porque são altamente resistentes à broca do mogno, e ainda, reduziu de 39 a 48% o ataque da broca sobre o mogno brasileiro. O cedro australiano funciona como uma planta armadilha atraindo 80% das posturas da mariposa de *Hypsipylla grandella* e após duas horas das lagartas ingerirem as folhas do cedro morrem pelo efeito de antibiose (OHASHI *et al.*, 2008).

3. 2.3 Semioquímicos

Os insetos exercem suas relações ecológicas com o ambiente e com os outros organismos de várias maneiras, sendo uma das mais importantes a comunicação por meio de compostos químicos. Esses compostos agem no indivíduo receptor da mensagem química como gatilhos fisiológicos de reações comportamentais específicas. Em uma nomenclatura mais generalista, estas substâncias são denominadas de semioquímicos. É através da detecção e emissão desses compostos que os insetos encontram parceiros para o acasalamento, o alimento ou presa, escolhem local de oviposição, se defendem contra predadores e organizam suas comunidades, no caso de insetos sociais (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009).

A origem semântica da palavra semioquímico está relacionada com a palavra grega *semeiôn*, que significa sinal, portanto, são designados de semioquímicos (sinais químicos) os compostos utilizados nas intermediações de relações entre os seres vivos. Os semioquímicos possuem duas classificações; a primeira está relacionada com a espécie do emissor e receptor do sinal químico, e a segunda, de acordo com os resultados decorrentes desta comunicação (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009).

Dethier *et al.* (1960) classificaram os estímulos da planta que atuam no comportamento da alimentação de inseto em dois tipos:

a) Estimulante – quando o inseto é estimulado a se alimentar da planta;

b) Deterrente – quando o inseto é inibido de se alimentar da planta.

Quando os compostos são mediadores de comunicação intraespecífica, ou seja, quando o emissor e receptor do sinal químico são da mesma espécie, este semioquímico é denominado de feromônio. No entanto, quando estes compostos intermedeiam comportamento de indivíduos de espécies diferentes, relação denominada de interespecífica, estas substâncias são classificadas como aleloquímicos (Figura 6) (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009).

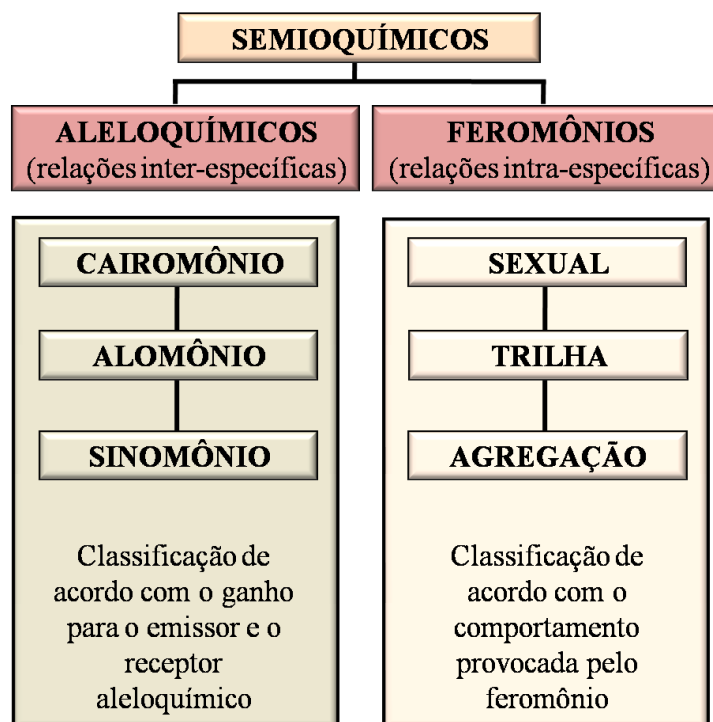


Figura 6 - Nomenclatura adotada para semioquímicos e critério biológicos de classificação destes compostos (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009).

Existem três tipos de aleloquímicos: cairomônio, alomônio e sinomônio. Dois desses aleloquímicos são de interesse particular nas interações inseto-planta (Figura 7, p. 38):

- Alomônios – Compostos que beneficiam ou favorecem o emissor (planta), funcionando como substância de defesa;

- Cairomônios – Compostos que beneficiam ou favorecem o indivíduo receptor (inseto).

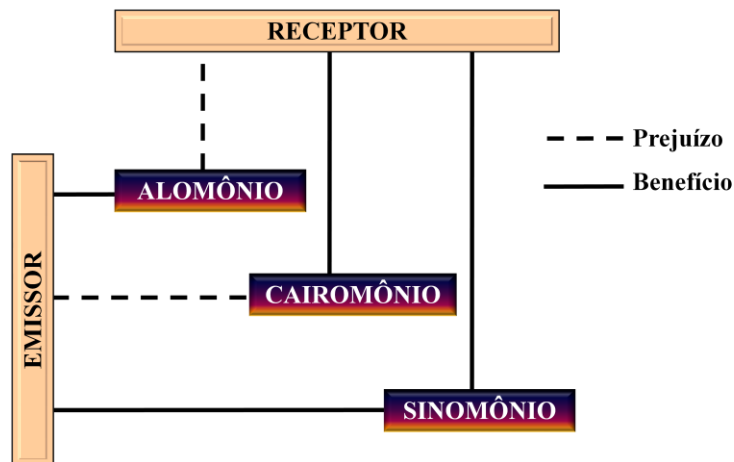


Figura 7 - Representação esquemática dos critérios biológicos de classificação dos aleloquímicos (ZARBIN, RODRIGUES e LIMA, 2009).

3.3 MOGNO

O mogno (*Swietenia macrophylla*), também chamado vulgarmente de aguana, araputanga e mogno brasileiro, em países de língua portuguesa, é comumente conhecido no exterior por caoba (em espanhol), acajou (em francês) e mahogany (em inglês) (PINHEIRO, 2000).

A árvore (Figura 8, p. 40) é considerada de grande porte, podendo atingir até 50 metros de altura e dois metros de diâmetro, decídua, heliófita, característica de floresta de terra firme e de rápido crescimento em seu habitat natural. Sua madeira é indicada para o mobiliário de luxo, painéis, lambris, objetos de adorno, esquadrias, laminados e folhas faqueadas, contraplacados, acabamentos internos como guarnições, venezianas, rodapés, molduras, assoalhos, etc., além de apresentar uma resistência moderada ao apodrecimento e alta resistência ao ataque de cupins quando a madeira está seca (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

Devido às excepcionais qualidades e vantagens comparativas, o mogno foi eleito ao longo dos séculos, como madeira ideal para nobres, sofisticadas e duradouras aplicações, além de ser uma das mais importantes no mercado internacional madeireiro, contribuindo, sozinha, com 10% do total exportado pela região Amazônica. O estado do Pará destaca-se pela contribuição de 2/3 da produção de mogno que é exportado para outros países (LENTINI, 2005).

O gênero *Swietenia* é composto de três espécies: *S. mahogani* Jacq, *S. macrophylla* King e *S. humilis* Zucc, e um híbrido entre *S. macrophylla* e *S. mahogani* denominado *S. aubrevilleana* (PEGNNINGTON, 1981), sendo que *S. macrophylla* tem predominância absoluta nas áreas de ocorrência (SOARES, 2002).

Na Amazônia brasileira, o mogno encontra-se distribuído numa faixa que passa ao longo dos estados do Acre, sudoeste do Amazonas, Rondônia, norte do Mato Grosso, sudeste e sudoeste do Pará (VERÍSSIMO *et al.*, 1995). Sua população é superior ao conjunto de todas as populações de todos os outros países onde ocorre, o que equivale a 74% da população mundial (DA SILVA *et al.*, 2008). Dentre as áreas de ocorrência de mogno, o sudeste e sudoeste do estado Pará são as que apresentam as maiores concentrações, sendo este estado o maior exportador mundial de mogno (VERÍSSIMO *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, devido à exploração intensiva e ao desmatamento desordenado das matas, decorrentes das atividades da agricultura, da pecuária e das madeireiras, as reservas naturais de mogno vêm diminuindo sensivelmente. Desta forma, houve uma intensificação do plantio de mogno em áreas de reflorestamento, no entanto, sem grande sucesso. Isto porque os brotos jovens dessas plantas sofrem ataques drásticos de larvas de um lepdóptero do gênero *Hypsipyla*. Esse ataque chega a provocar a morte dos brotos, estimulando a formação de vários outros brotos, levando à ramificação na copa do vegetal jovem. Como consequência, tem-se a formação de árvores adultas com muitos ramos, de troncos curtos e não homogêneo, perdendo assim o interesse de extração, pelas indústrias madeireiras (DA SILVA, 2005).

Estas informações mostram que há necessidade de se buscar um método eficiente e capaz de controlar o ataque da broca, permitindo-se o estabelecimento de plantio de mogno em áreas devastadas, bem como a diminuição do risco de extinção desta espécie de grande importância no mercado internacional.



Figura 8 - Mogno com aproximadamente 1 ano.
Fonte: Castro, K. F. C. 2007.

3.4 PRINCIPAIS PRAGAS DA FAMÍLIA MELIACEAE

A família Meliaceae apresenta como principais pragas os lepidópteros da família Pyralidae, que são: *Hypsipyla robusta* (Moore), com ocorrência na África, Ásia e Indo-Austrália; *H. grandella* (Zeller), de ocorrência na América do Norte e América do Sul; *H. ferrealis* (Hampson) e *H. ereboneura* (Meyrick) que ocorrem na África (BRADLEY, 1968).

H. grandella e *H. ferrealis* são descritas como as maiores causadoras de danos aos seus hospedeiros (espécies de *Carapa*, *Cedrella* e *Swietenia*). Sendo que, das duas espécies, *H. grandella* é a única que pode ser encontrada em todas as áreas de distribuição dessas espécies de meliáceas hospedeiras (GRIJPMA e GARA, 1970).

3.5 A BIOLOGIA, COMPORTAMENTO E ATAQUE DE *Hypsipyla grandella*

O inseto adulto é uma mariposa que apresenta coloração cinza nas asas anteriores, e branco hialino nas posteriores (Figura 9). A envergadura das asas das fêmeas varia de 28 a 34 mm e do macho 22 a 26 mm (BERTI FILHO *et al.*, 1992).



Figura 9 - Inseto adulto de *H. grandella*.

Fonte: http://www.entnemdept.ufl.edu/creatures/trees/moths/mahogany_borer1a_SP.htm.

A fêmea costuma colocar de um a três ovos por brotação do hospedeiro, sendo ovipositados logo abaixo das brotações novas (COSTA, 2000). A mariposa é atraída pelo odor das brotações novas (GALLO *et al.*, 2002) o que é reconhecido como quimiorrecepção (GRIJPMA e GARA, 1970). O período de postura dura aproximadamente seis dias, podendo dessa maneira, uma fêmea colocar entre duzentos e trezentos ovos (NEWTON *et al.*, 1993).

Após eclodirem, as lagartas são rápidas e procuram imediatamente um local para penetração no hospedeiro. De acordo com Costa (2000), inicialmente, elas se alimentam de exsudados cristalizados de um folíolo bem novo, em seguida penetra neste folíolo, preferencialmente pelo pecíolo. Após um ou dois dias se deslocam, para finalmente perfurar o caule através da gema apical. O período larval varia de 11 a 14 dias, apresentando entre cinco e seis instares, notoriamente diferenciados pela coloração e tamanho. Nos primeiros instares (1° e 2°) as lagartas são de coloração amarela passando a uma coloração marrom nos instares intermediários (3° e 4°) e adquirindo uma tonalidade cinza azulado ou azul nos instares finais (5° e 6°). Com relação ao tamanho pode atingir de 20 a 22 mm no 6° instar (SARMENTO JUNIOR, 2001).

Antes da fase de pupa, a lagarta tece um casulo no interior da galeria, no hospedeiro, sendo que esta fase dura, em média, de oito a dez dias (Figura 10) (BERTI FILHO *et al.*, 1992; NEWTON *et al.*, 1993).



Figura 10 – *H. grandella* em vários instares de seu ciclo.
Fonte: <http://matasciliares.wordpress.com/>

A ação danosa do inseto no mogno inicia-se com o ataque das lagartas às brotações novas (Figura 11, p. 43). Assim, as lagartas perfuram essas brotações terminais e constroem galerias no caule, dificultando o crescimento da planta e provocando severos danos, resultando em planta com muitos galhos e tronco, perdendo, dessa forma, o interesse para a exploração da madeira (BERTI FILHO, 1973; GRIJPMAN e ROBERTS, 1976; YAMAZAKI e VARQUEZ, 1991; OHASHI *et al.*, 1993; AGOSTINHO, 1996).

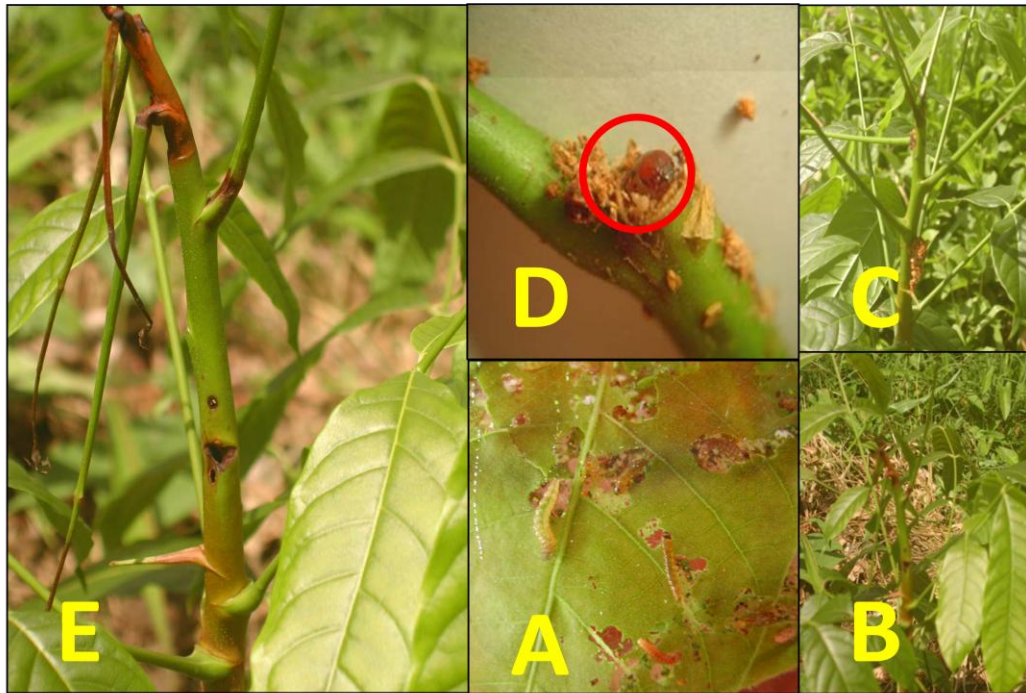


Figura 11 - Ataque de *H. grandella* em uma plantação jovem de mogno. A – as lagartas se alimentam das brotações novas; B – após a alimentação das brotações novas as lagartas direcionam-se ao broto apical; C e D – penetram no broto apical; E – causando deformação e morte dos brotos novos (DA SILVA, 2005).



Capítulo IV

*Desenvolvimento e validação de método para quantificação
dos limonóides de folhas de mogno*

4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE SEPARAÇÃO DOS LIMONÓIDES 1 A 4 PARA A QUANTIFICAÇÃO DESTES NAS FOLHAS DE MOGNO

A validação de um método analítico é um processo que fornece uma evidência documentada de que o método é confiável ao que se aplica. Logo, consiste em uma série de procedimentos que visam assegurar credibilidade às medidas obtidas (CASS e DEGANI, 2001).

A validação de um método é uma etapa muito importante e necessária para que o método desenvolvido possa ser utilizado. A Figura 12 mostra um esquema das etapas envolvidas no processo de desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico. Partindo deste critério de etapas, fez-se a seleção da ferramenta analítica HPLC, cujo emprego é considerado indispensável em vários laboratórios, uma vez que é uma das técnicas de separação que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares.



Figura 12 - Etapas envolvidas no processo de desenvolvimento, validação e utilização de um método analítico.

4.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.1 Materiais e equipamentos utilizados na otimização do método de separação dos limonóides por HPLC

As análises cromatográficas para o desenvolvimento do método de separação dos limonóides de mogno foram realizadas nas seguintes condições:

Foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca SHIMADZU (Tokyo- Japão), modelo PROMINENCE, composto por uma bomba modelo LC-20AT com válvula solenóide com quatro canais, detector de arranjo de diodo modelo SPD-M20A, degaseificador de membrana modelo DGU-20A, auto-injetor de amostras modelo SIL-20A, interface de comunicação modelo CBM-20A acoplado a microcomputador Pentium IV com software de integração LC solution.

A água ultra-pura utilizada na composição das fases móveis, foi obtida em um sistema Millipore DIRECT-Q3 (18,2 M Ω .cm) (Beadford, MA, USA).

A homogeneização das amostras foi realizada em agitador vórtex VERTEX QL-901.

Para extração dos limonóides foi utilizada centrífuga da marca QUIMIS, modelo Q222T116 e ultrassom da marca BRANSON, modelo 2510.

Para pesagem dos padrões foi utilizada uma balança analítica SARTORIUS BP 210 S com precisão de 0,0001 g.

Os solventes, grau HPLC, utilizados nas análises foram adquiridos da TEDIA Brasil. Todos foram utilizados após serem filtrados a vácuo em um sistema de filtração PHENOMENEX, com um funil de 250 mL e frasco coletor de 1 L, utilizando-se membranas de Nylon PHENOMENEX com 47 mm de diâmetro e poros de 0,45 μ m e posteriormente, degaseificados em um ultra-som BRANSON 2510.

As colunas utilizadas no desenvolvimento do método e nas análises das amostras foram: uma C₁₈ Gemini (150 x 0,46 mm, 5 μ m, 110 Å) e uma C₁₈ NX (150 x 0,46 mm, 5 μ m, 110 Å), ambas da PHENOMENEX[®] (Torrance, CA, USA); uma C₁₈ Supelcosil (150 x 0,46 mm, 3 μ m) e uma coluna C₁₈ Supelcosil (150 x 0,46 mm, 5 μ m), ambas da SUPELCO[®] (Taufkirchen, Alemanha). A coluna de segurança ou pré-coluna foi um

HOLDER[®] bicompartilhado contendo, em seu interior, um cartucho de segurança C₁₈ (4x30 mm, 5 µ), adquirido da PHENOMENEX[®] (Torrance, CA, USA).

Para o tratamento das amostras (*clean up*) foram utilizados cartuchos com fase estacionária Strata C₁₈-E (50 mg, 1 mL, 55 µm, 70 Å) e Strata C₁₈-E (100 mg, 1 mL, 55 µm, 70 Å), adquiridos da PHENOMENEX[®] (Torrance, CA, USA).

Para a determinação do T₀ foi utilizado uma solução de NaNO₃ 0,1 M.

Para o preparo de soluções foram utilizadas micropipetas da marca HTL[®], todas calibradas, com precisão de 0,006 para LM100 (100 µL); 0,010 para a LM200 (200 µL) e 0,046 para a LM1000 (1000 µL), respectivamente.

Os padrões dos limonóides **1**, **2**, **3** e **4** (Figura 17, p. 58) foram isolados e caracterizados no Laboratório de Cromatografia Líquida - (LABCROL) da UFPA.

4.1.2 Coleta e identificação das folhas de mogno

A coleta do material botânico foi realizada em uma plantação de mogno de um sítio, localizado no município de Santa Maria – PA, em outubro de 2008, pelo Professor Doutor Milton Nascimento da Silva e aluna de doutorado Kelly Christina Ferreira Castro.

Foram coletados 4,15 Kg de folhas da espécie. As amostras foram cuidadosamente escolhidas e identificadas pelo professor Dr. Orlando Shigueo Ohashi, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

4.1.3 Preparo do extrato hexânico

O material botânico (folhas) foi colocado em sacos de papel e seco em estufa com temperatura de 45 °C, num período de 96 horas e posteriormente triturado em moinho de faca, resultando num total de 1,24 Kg de material seco e moído. Três alíquotas deste material foram separadas para serem submetidos à análise do grau de umidade; 1 kg do material seco e moído foi submetido a três extrações, por maceração, com hexano, seguido de filtração e evaporação do solvente em evaporador rotativo, obtendo-se 49,73 g do extrato hexânico. A partir desse extrato foram isolados os limonóides **1** a **4**, utilizando o método de isolamento por cromatografia em coluna via úmida, otimizado por Da Silva (2008) e assim obtida a fração

rica em limonóides, a qual foi usada para realizar os testes de atividade biológica. Os 240 gramas restantes do material seco e moído foram armazenados para as análises posteriores.

4. 1.4 Determinação do grau de umidade

A determinação do grau de umidade das folhas de mogno coletadas neste trabalho, baseou-se na perda de peso dessas folhas, quando secas em estufa com temperatura média a $105\pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas, de acordo com Brasil (1992). Após isto, as folhas foram levadas para um dessecador por 15 minutos e em seguida pesadas, realizando-se o cálculo do grau de umidade, utilizando-se a seguinte fórmula: $\%U = (P_i - P_f/P_i) \times 100$, onde P_i corresponde ao peso inicial da amostra e P_f corresponde ao peso final da amostra. Os resultados foram obtidos em triplicatas de 1,0 gr cada e expressos em base úmida.

O grau de umidade encontrado foi de 7,46%.

4. 1.5 Pré-tratamento das amostras

Dentre as diversas etapas envolvidas nas análises de amostras complexas, tais como insumos vegetais, o pré-tratamento é um procedimento comum e necessário antes da medida do analito de interesse. Este procedimento tem por objetivo principal eliminar interferentes que possam co-eluir com o analito; além de evitar sobrecarga na coluna e possíveis entupimentos, uma vez que fato como este elevaria a pressão do sistema reduzindo a vida útil das colunas analíticas e de outros filtros no interior do equipamento (SILVA, 2009).

Uma alternativa de pré-tratamento de fácil automação e que apresenta altos níveis de repetibilidade/reprodutibilidade é a SPE, que do ponto de vista prático, em sua forma mais simples, é uma cromatografia líquida, onde se usa uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, que contém fase sólida. A Figura 13 (p. 49) ilustra um exemplo típico de um cartucho de SPE (LANÇAS, 2004).

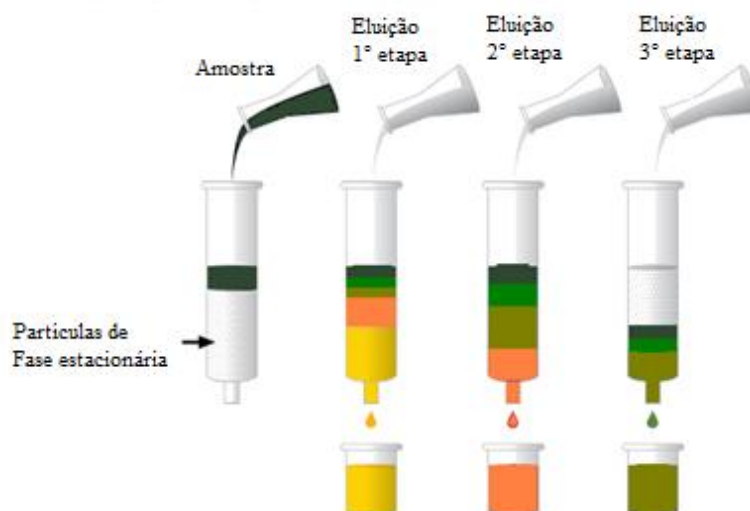


Figura 13 - Sistema de SPE. Principais etapas empregadas em SPE visando ao isolamento de um composto ou classe de compostos. Fonte: www.waters.com/waters/nav.html

Para os analitos de interesse, deste trabalho, e considerando que a matriz é de origem complexa, escolheu-se o método de extração SPE.

4. 1.6 Otimização das condições para extração

Foram testados três condições de extração: maceração, banho ultrassônico e centrifugação, bem como os seguintes solventes na extração: hexano, acetato de etila, acetona, acetonitrila e metanol, baseado na solubilidade dos limonóides. Os extratos foram preparados pesando-se 25 mg de folhas secas e trituradas de mogno (em triplicata), em tubos de ensaios de 10 mL, adicionando-se em cada tubo 3,0 mL do solvente a ser testado. A amostra foi levada então aos equipamentos correspondentes a cada tipo de extração. Os volumes obtidos das extrações foram transferidos para frascos de boca larga para total evaporação do solvente. Os extratos obtidos foram submetidos à SPE e analisados por HPLC. O método de extração mais eficiente foi em banho ultrasônico. Essa escolha foi feita a partir dos cromatogramas obtidos nas análises por HPLC. O solvente mais eficiente nas extrações foi a acetonitrila. Essa escolha foi feita comparando-se os cromatogramas obtidos das análises por HPLC, dos extratos nos diferentes solventes utilizados. Uma vez escolhido o método, as extrações foram analisadas em separado (por HPLC), a fim de verificar quantas repetições seriam necessárias para a total extração dos limonóides de mogno (Figura 17, p. 58), sendo definidos duas repetições.

Os procedimentos acima citados são ilustrados no fluxograma e esquema das Figuras 14 e 15 abaixo:

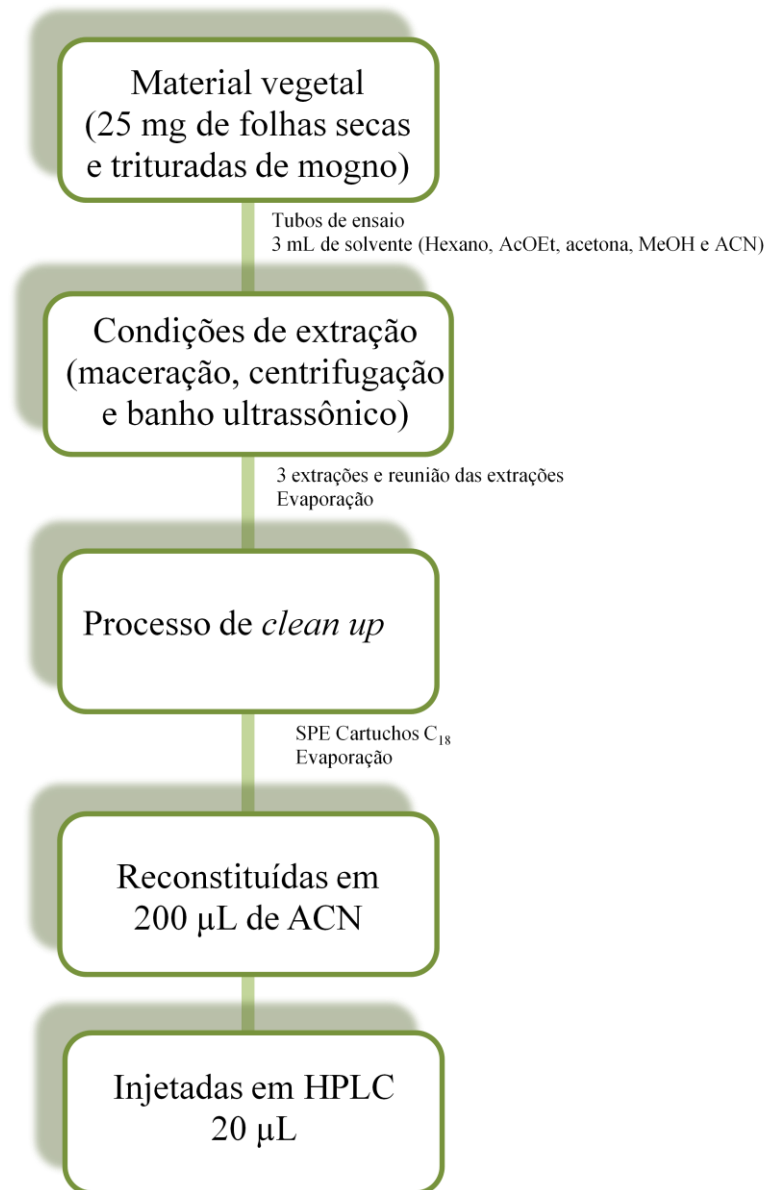


Figura 14 - Esquema geral da otimização do processo de extração das folhas de mogno.

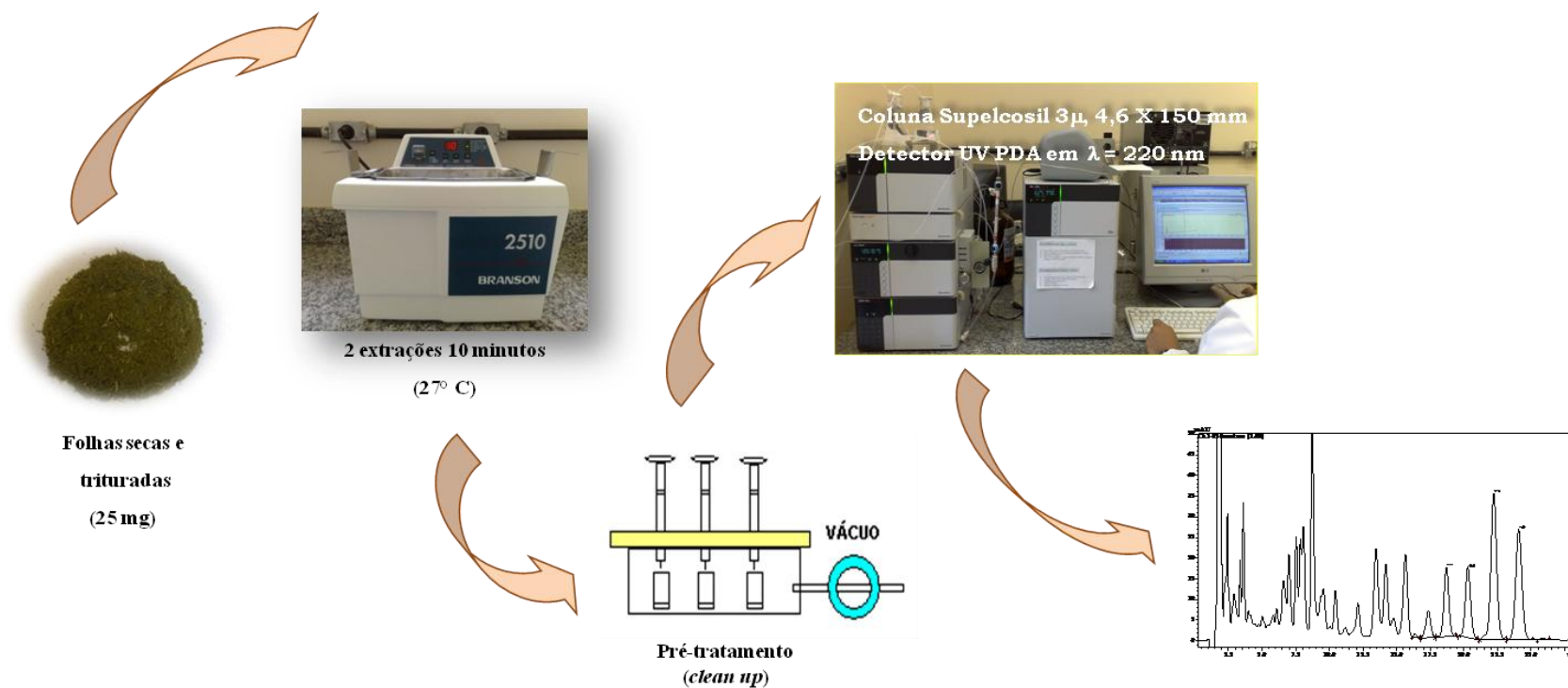


Figura 15 - Esquema da extração das amostras de folhas do mogno após otimização do método de extração.

4. 1.7 Preparo das amostras

4. 1.7.1 Extração das amostras em banho ultrassônico

Os extratos foram preparados pesando-se 25,0 mg de folhas secas e trituradas de mogno (em triplicata), em tubos de ensaio de 10 mL, adicionando-se em cada tubo 3,0 mL de acetonitrila. A amostra foi então levada ao banho ultrassônico por 10 minutos. O procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes. Os dois primeiros volumes foram reunidos totalizando um volume igual a 6,0 mL (V-1), o qual foi transferido para um frasco de boca larga para total evaporação da fase móvel, à temperatura ambiente, obtendo-se um extrato seco. O outro volume (3,0 mL), da mesma maneira, foi transferido para um frasco de boca larga, para evaporação do solvente. (V-2). Os dois extratos resultantes foram submetidos à SPE.

Foi utilizado cartucho Strata C₁₈-E (55 µm, 70 Å) da Phenomenex[®] com 50 mg de fase estacionária e 1 mL de volume. O cartucho foi condicionado com 1 mL de ACN e em seguida 1 mL de água. À alíquota do extrato resultante da extração por banho ultrassônico, foram adicionados 0,5 mL de ACN e levado ao banho ultrassônico por 1 min. Em seguida, foram adicionados mais 0,5 mL de água e novamente levado ao banho ultrassônico, por mais 1 min, sendo, em seguida, feita a inoculação da solução no cartucho. Coletou-se este primeiro volume (1 mL), que foi especificado como o volume de adição da amostra. Foi adicionado mais um volume de 0,5 mL do sistema ACN:H₂O 50:50, que foi coletado, sucessivamente e especificado como volume de lavagem. Em seguida foram adicionados mais três volumes de 1 mL da fase móvel ACN:H₂O 80:20, coletados, reunidos e especificados como o volume de extração do analito. Este pré-tratamento foi feito em triplicata para avaliar a repetibilidade da extração. Cada volume foi então analisado por HPLC, usando-se uma coluna C₁₈ Sulpelco (150 x 4,6 mm, de 3 µ, 110 Å). Como fase móvel foi utilizada uma composição de H₂O:MeOH:THF (30,8:67,8:1,4, v/v), sob vazão de 0,9 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 µL. O equipamento utilizado foi o mesmo descrito no item 4.1.1. A Figura 16 (p. 53) corresponde aos cromatogramas obtidos na análise dos volumes oriundos do pré-tratamento.

Para comparação entre as técnicas de extração, foram realizadas extrações por maceração, partindo-se da mesma massa de material botânico (25 mg), mesmo solvente, com igual volume deste e mesmo número de extrações (todos em triplicatas).

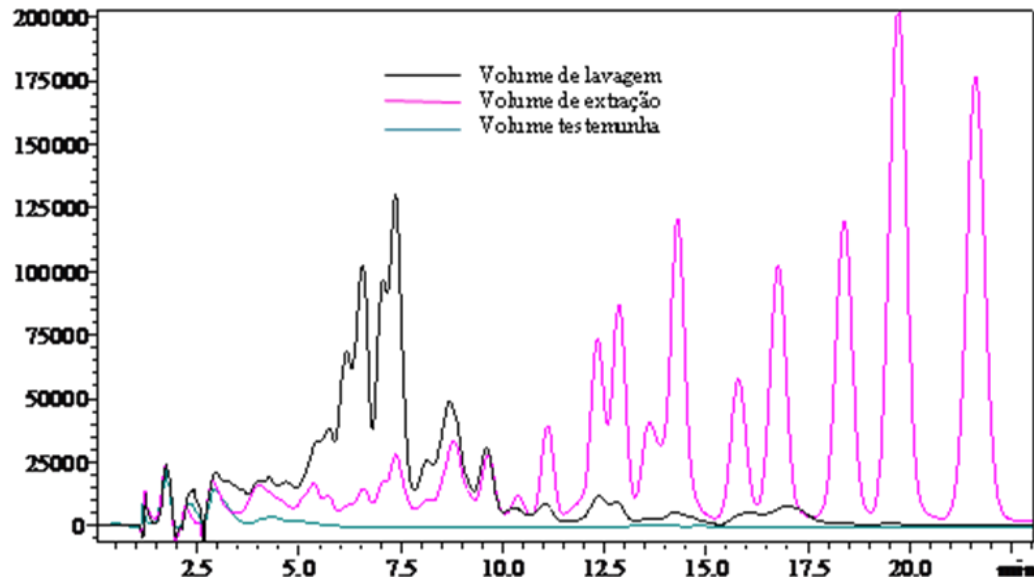


Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas correspondendo ao pré-tratamento utilizado, por banho ultrassônico, para o extrato das folhas de mogno.

4. 1.8 Validação de um método cromatográfico

O desenvolvimento de um novo método analítico ou adaptação ou aplicação de um método conhecido envolve um processo de avaliação que ateste a sua eficiência em usos de rotina, denominado validação (ARAGÃO, VELOSO e ANDRADE, 2009).

A validação dentro de um único laboratório (*in house validation*) é utilizada para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar se um método adotado de outras fontes está bem aplicado, sendo utilizada no desenvolvimento de metodologias e em publicações de artigos para revistas científicas, enquanto que a validação completa (*full validation*) envolve todas as características de desempenho além de um estudo interlaboratorial utilizado para verificar a reprodutibilidade da metodologia em determinada matriz em laboratórios diferentes, sendo que os parâmetros analíticos devem ser baseados na intenção do uso do método. Então, um método para um composto majoritário, requer um critério de aceitação e uma abordagem diferente de um método desenvolvido para análise de traços (SILVA, 2009).


Os estudos de validação devem ser representativos e conduzidos de modo que a variação da faixa de concentração e os tipos de amostras, sejam adequados e que os experimentos sejam limitados para o que realmente é necessário (RIBANI *et al.*, 2004).

Laças (2004) ao revisar sobre validação de métodos cromatográficos comentou não haver uma idéia comum a respeito de quais parâmetros devam ser validados, variando de uma área para outra. Logo, houve um grande esforço no sentido de harmonizar critérios de validação em função do tipo de procedimento a validar. Representantes da comunidade científica, das indústrias e agências reguladoras tais como grupos do sistema ISO (*International Organization for Standardization*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), IAOAC (*International Association of Official Analytical Chemistry*), INMETRO (*Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial*), ANVISA (*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*), FDA (*Food and Drug Administration - EUA*), EU (*European Union*) dentre outros, definiram os parâmetros de validação, que posteriormente foram uniformizados pela ICH (*International Conference on Harmonization*).

As agências reguladoras disponibilizam guias para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos, sendo que tais documentos usualmente sugerem as diretrizes a serem seguidas e são, portanto, abertos a interpretações (CASSINO *et al.*, 2009).

4. 1.9 Métodos analíticos

4. 1.9.1 Preparo da solução padrão

 Limonóides **1** a **4** (Figura 17, p. 58): uma massa de 10 mg de cada limonóide foi precisamente pesada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico SATELIT[®] A HS 542 de 10 mL e precisão de $\pm 0,02$. Os padrões foram solubilizados em acetonitrila e armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução estoque preparada apresentou a concentração nominal de $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

4. 1.9.2 Soluções padrão estoque

A partir da solução padrão foram preparadas soluções filhas ou estoque padrão de calibração e soluções estoque usadas no controle de qualidade. As soluções padrão de calibração preparadas para os quatro padrões tinham as seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300, 400, 500 e $600\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ e as soluções padrão de controle de qualidade tinham as concentrações: 75, 250 e $550\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

4. 1.9.3 Soluções padrão de análise

Das soluções filhas estoques foram retiradas alíquotas de $200\text{ }\mu\text{L}$ que foram evaporadas e logo após, submetidas ao pré-tratamento com cartuchos SPE, para a mimetização do processo de limpeza da amostra e diluídas em $200\text{ }\mu\text{L}$ de acetonitrila fornecendo as soluções padrão de análise.

As amostras foram quantificadas pela construção de uma curva de calibração de adição de padrão para os quatro limonóides.

4. 1.9.4 Obtenção das curvas de calibração por padronização externa e por adição de padrão

A partir das soluções padrão de calibração, apropriadas, foram preparados em triplicatas, os níveis de calibração para os quatro padrões, nas seguintes concentrações: 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para a obtenção da curva de padronização externa e para a obtenção da curva de adição de padrão, foram preparados os níveis de calibração para os quatro padrões, nas seguintes concentrações: 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As curvas de calibração foram obtidas através da regressão linear, considerando a área das bandas cromatográficas relativas às concentrações dos analitos. Foi considerado um mínimo de sete diferentes concentrações. A linearidade foi obtida através do valor do coeficiente de correlação, **r**.

4. 1.9.5 Seletividade, Recuperação, Precisão e Exatidão

4. 1.9.5.1 Seletividade

A seletividade e/ou especificidade de um método bioanalítico é um importante parâmetro a ser avaliado para garantir que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de interferentes, produtos de degradação, etc. Cada sequência de análise continha três amostras para assegurar a seletividade do método (CASSIANO *et al.*, 2009).

4. 1.9.5.2 Recuperação (eficiência da extração)

A recuperação avalia a eficiência do método de tratamento das amostras vegetais. Este parâmetro é calculado comparando-se a resposta da absorção, obtida para o analito adicionado na matriz e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solvente (controle) e, conseqüentemente, não extraídas, as quais representam 100%. A recuperação foi determinada utilizando-se uma testemunha (última extração), uma vez que não existem amostras de folhas de mogno isentas dos quatro limonóides e nem padrões similares aos analitos que proporcionem padronização interna (CASSIANO *et al.*, 2009).

4. 1.9.5.3 Repetibilidade (precisão intra-dia)

Define a precisão do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos, nas mesmas condições de análise, isto é, com o mesmo analista, com o mesmo equipamento, no mesmo laboratório e fazendo uso dos mesmos reagentes (CASSIANO *et al.*, 2009). Este parâmetro foi avaliado utilizando-se amostras preparadas em quintuplicata, a partir das soluções padrão estoques nas seguintes concentrações: 75, 250 e 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os quatro limonóides.

4. 1.9.5.4 Reprodutibilidade (precisão inter-dias)

Define a habilidade do método de fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias (CASSIANO *et al.*, 2009). Este parâmetro foi avaliado utilizando-se amostras preparadas em quintuplicata, a partir das soluções padrão estoques nas seguintes concentrações: 75, 250 e 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os quatro limonóides. As soluções foram preparadas em dias não-consecutivos. A precisão do método foi expressa como o coeficiente de variação (CV%) das replicatas. A exatidão foi determinada através do teste-cego a partir de duas soluções de concentrações desconhecidas ao analista, que foram preparadas em triplicata e injetadas. Para a precisão foram aceitos valores de CV menores ou iguais a 5% e para as amostras valores iguais ou inferiores a 20%, conforme critérios de aceitação do método (CASSIANO *et al.*, 2009).

4. 1.9.6 Limites de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão. O LQ foi estabelecido como a menor concentração, de três amostras, onde a precisão não excedia o valor de 20% de variabilidade e a exatidão não ultrapassava desvios de 20% do valor nominal da concentração, conforme critérios de aceitação do método (CASS e DEGANI, 2001).

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar, confiavelmente, do ruído de fundo. É importante ressaltar que esta concentração é detectada com segurança, porém, em contrapartida, não pode ser quantificada (CASSIANO *et al.*, 2009). O LD foi estabelecido como a menor

concentração em que se observou um sinal três vezes maior que o ruído do detector (RIBANI *et al.*, 2004).

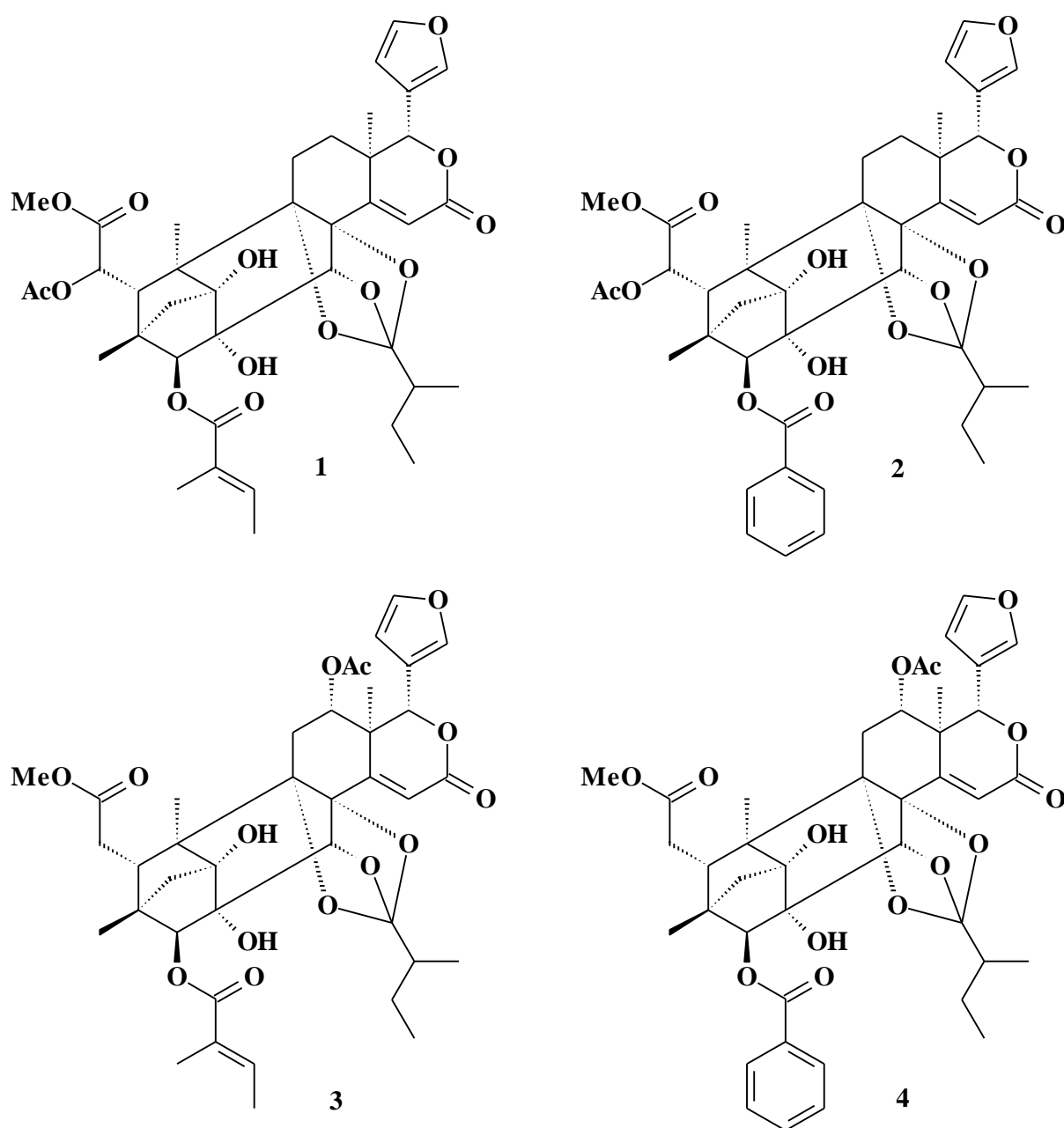


Figura 17 - Estrutura dos limonóides isolados das folhas de *Swietenia macrophylla*.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Desenvolvimento do método para quantificação dos limonóides em folhas de mogno

Iniciou-se a otimização do método cromatográfico em fase reversa, a partir de uma eluição gradiente, na qual se empregam, como constituintes da fase móvel, H₂O (solvente A) e como solvente orgânico ACN (solvente B), em misturas, com proporções que variam com o aumento da concentração do modificador orgânico em função do tempo.

Em cromatografia de fase reversa além de ACN pode-se também utilizar como solvente orgânico, MeOH e THF. O uso de apenas estes três solventes, se dá pelo fato da completa miscibilidade dos mesmos em água.

Os procedimentos adotados, neste trabalho, seguiram a proposta apresentada por Snyder e Dolan (1996), que descrevem um método, via HPLC, como proposta para a eluição inicial da amostra em estudo, podendo-se prever, por este método, qual o modo de separação, se gradiente ou isocrático, será mais apropriado para a separação dos constituintes de uma determinada amostra.

Caso uma eluição isocrática seja possível, os autores também apresentam uma maneira de estimar a melhor composição da fase móvel (força), a qual deverá ser utilizada. Se a escolha for uma eluição gradiente, o método de Snyder e Dolan também permite estimar a melhor extensão do gradiente.

Deste modo, com base na proposta de Snyder e Dolan, iniciou-se o trabalho realizando um gradiente de ampla extensão, eluindo uma amostra preparada a partir do extrato hexânico de folhas de mogno, uma vez que se encontram os limonóides em estudo. Após tratamento por SPE e solubilização em ACN, variou-se a força da fase móvel (% de B) em água, de 5 a 100%, por 60 minutos.

A ACN foi escolhida como solvente orgânico inicial, por apresentar menor viscosidade e por permitir o uso de detector de UV abaixo de 210 nm. A separação cromatográfica no modo de eluição gradiente foi realizada usando uma coluna C₁₈ Gemini da PHENOMENEX[®] (150 x 0,46 mm, 5 μ, Å) acoplada a uma pré-coluna C₁₈ da PHENOMENEX[®] (4 x3 mm, 5 μm, Å). A vazão da fase móvel foi de 2 mL min⁻¹ e a alça de injeção foi de 20 μL. A separação foi acompanhada por um detector de fotodiodo UV-Vis variando em comprimento de onda de 190 a 400 nm, sendo o comprimento de onda fixado em

220 nm (máximo de absorção para estes limonóides). Sob as mesmas condições foi realizada uma eluição gradiente com os padrões dos limonóides em estudo para se conhecer o tempo de retenção dos analitos de interesse e estabelecer a extensão da análise (Figura 18).

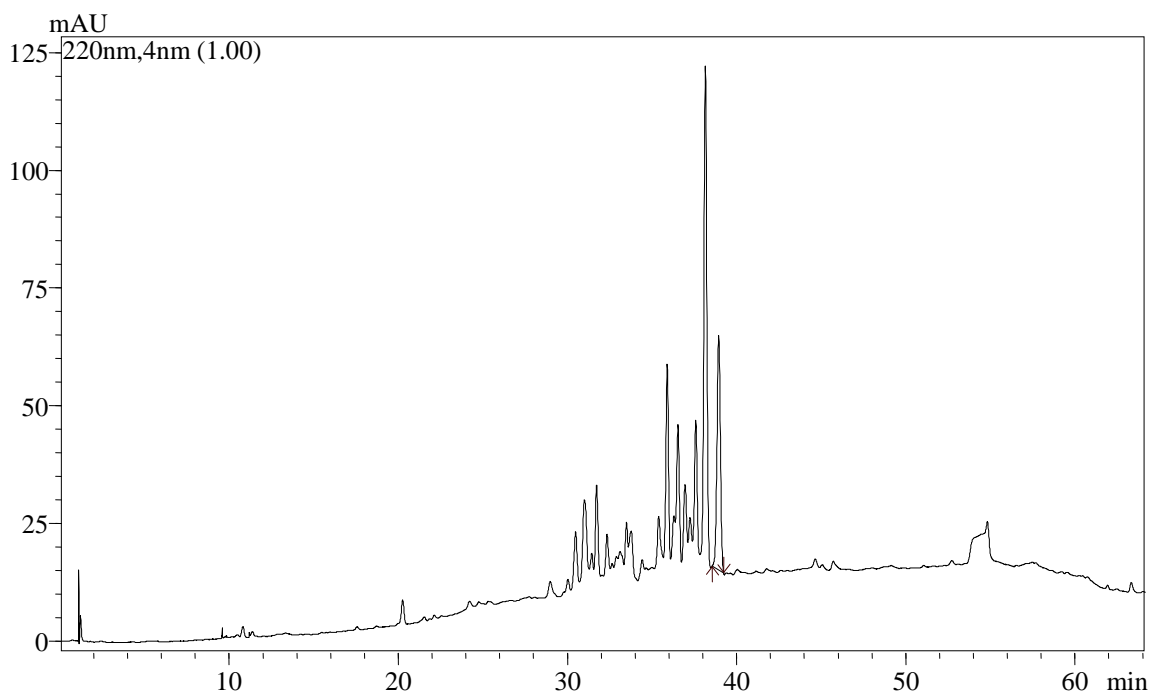


Figura 18 - Cromatograma 1 - Gradiente de ampla extensão do extrato hexânico das folhas de mogno com fase móvel composta por solvente A: H₂O e solvente B: ACN variando de 5 a 100% de B em 60 minutos, vazão de 2,0 mL min⁻¹, fase estacionária C₁₈ (Gemini) e λ: 220 nm.

O intervalo entre as bandas cromatográficas correspondentes aos analitos de interesse variaram entre 38 e 40 min. Uma vez selecionada a faixa de interesse, iniciou-se os experimentos isocráticos para a otimização dos parâmetros de separação do extrato, buscando um método robusto e seletivo.

Como a relação $(T_{rz} - T_{ra})/T_g$ apresentou valor menor que 0,4, ou seja, $(38,93 - 37,45)/60 = 0,02$; a separação pode ser realizada em modo isocrático. Baseado no tempo de retenção do último pico (38,93 minutos), pode-se estipular o % de B em eluição isocrática (Tabela 2, p. 61). Neste caso para os picos de interesse, a fase móvel correspondente foi de 60% de ACN para uma eluição isocrática. Nesta proposta, buscaram-se os ajustes na seletividade desejada para os analitos mantendo-se o fator de retenção (k) constante. Logo, as alterações na seletividade foram feitas levando-se em consideração as interações do soluto

com o solvente. Porém o que se percebeu foi que o fator de separação (α) entre os picos de interesse não foram satisfatórios, pois os limonóides **1** e **4** co-eluíram (Figura 19, p. 62).

TABELA 2 - Estimativa do % do solvente B (ACN) para eluição isocrática, baseada no tempo de retenção da última banda T_z e do gradiente inicial (Snyder e Dolan, 1996).

| T_z (min) | K = 5 (% de ACN) | K = 10 (% de ACN) | K = 20 (% de ACN) |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 5 | 6 | 0 | - |
| 10 | 19 | 12 | 5 |
| 15 | 29 | 22 | 14 |
| 20 | 37 | 30 | 22 |
| 25 | 45 | 38 | 30 |
| 30 | 53 | 46 | 38 |
| 35 | 61 | 54 | 46 |
| 40 | 69 | 60 | 54 |
| 45 | 77 | 70 | 62 |
| 50 | 85 | 78 | 70 |
| 55 | 93 | 86 | 78 |
| 60 | 100 | 94 | 86 |
| 65 | - | 100 | 94 |

Condições: coluna 15 x 0,46 cm; gradiente 5-100% de ACN em 60 min; vazão 2 mL min⁻¹ (Snyder e Dolan, 1996).

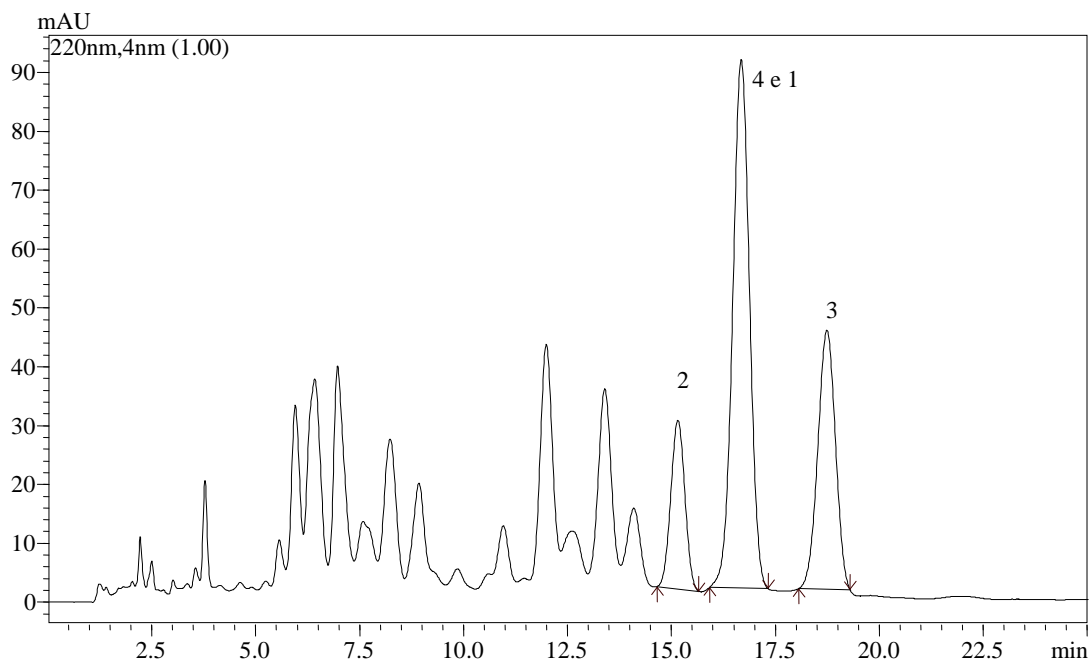


Figura 19 - Cromatograma 2 - Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H₂O:ACN 40:60, vazão de 1mL min⁻¹. Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1** a **4**.

Uma vez que o fator de separação (α) entre os picos de interesse (**1** e **4**) não foi satisfatório, a amostra foi analisada fazendo uso do triângulo da seletividade, no modo reverso, proposto por Snyder (1997).

Para esta otimização, foi utilizado o nomógrafo de fase reversa (Figura 20). Como a fase móvel de 40:60 H₂O:ACN forneceu um bom fator de retenção ($k = 0,03$), apenas a seletividade deveria ser ajustada, mantendo constante a força da fase móvel. Assim foram constituídas as fases em H₂O:MeOH e H₂O:THF obtendo-se três vértices do triângulo da seletividade (Figura 23, Triângulo A, p. 64) que foram: H₂O:ACN (40:60) (Figura 19), H₂O:MeOH (30:70) (Figura 21, p. 63) e H₂O:THF (55:45) (Figura 22, p. 63).

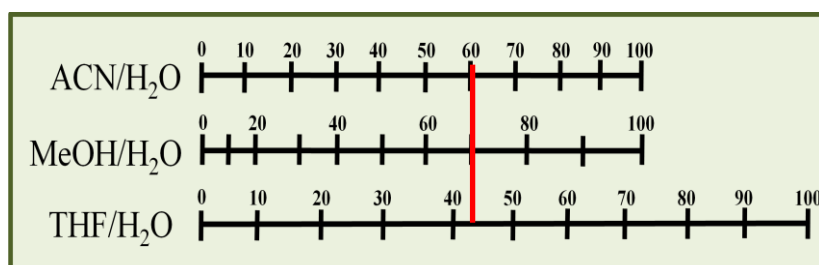


Figura 20 - Nomógrafo da seletividade em fase reversa proposto por Snyder (1997).

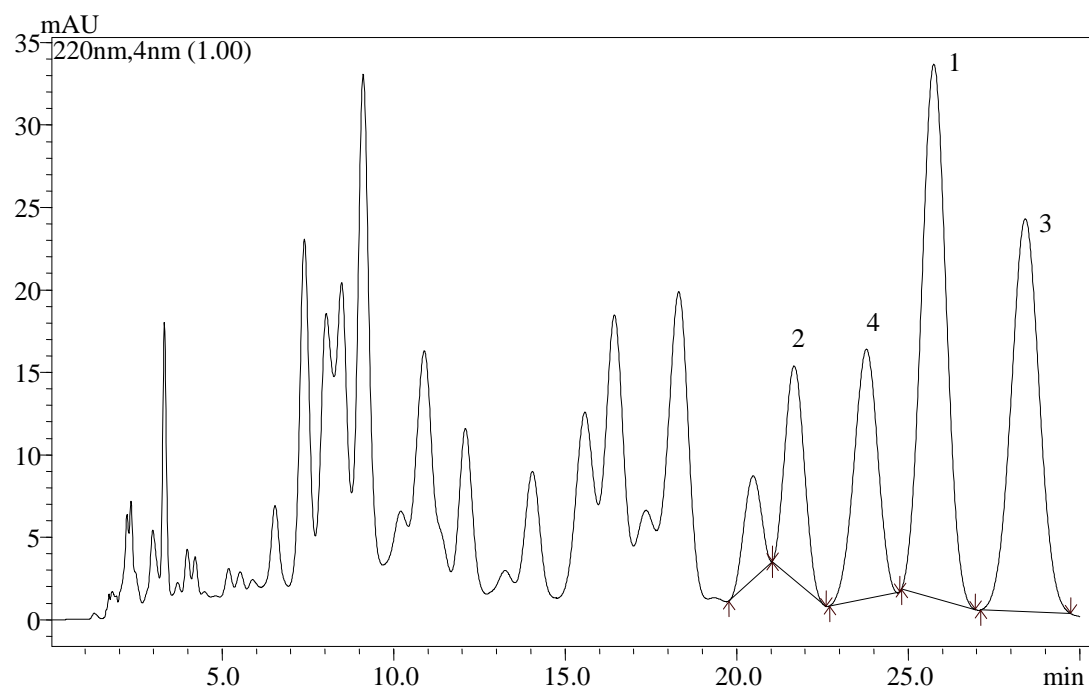


Figura 21 - Cromatograma 3 - Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H₂O:MeOH 30:70, vazão de 1mL min⁻¹. Detecção de $\lambda = 220$ nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1** a **4**.

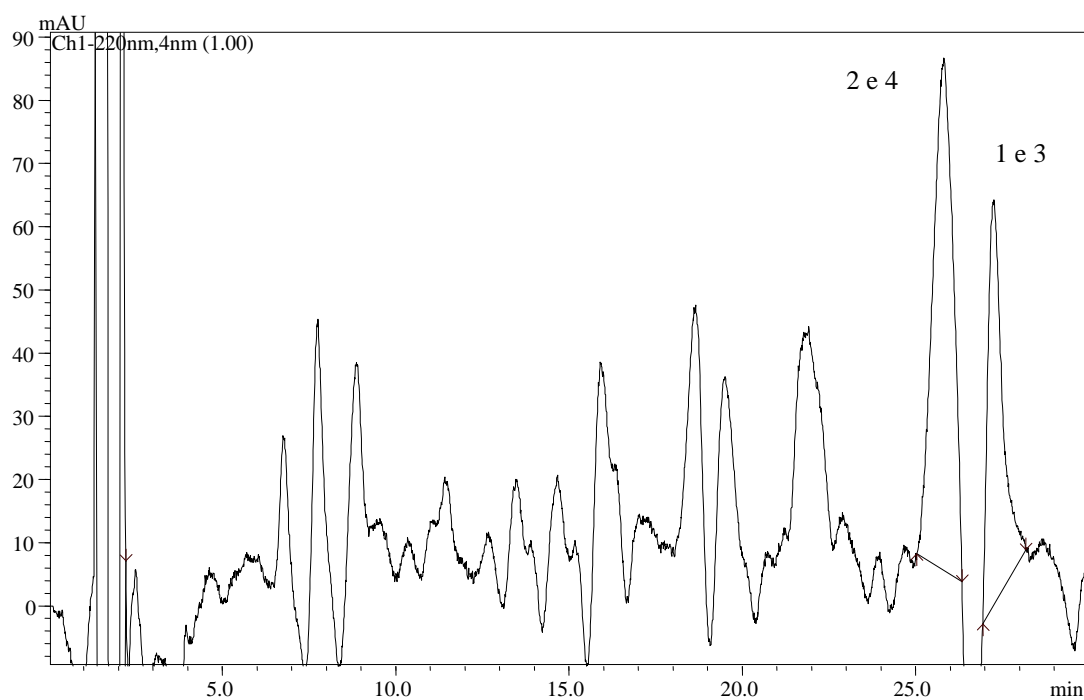


Figura 22 - Cromatograma 4 - Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H₂O:THF 55:45, vazão de 1mL min⁻¹. Detecção de $\lambda = 220$ nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1** a **4**.

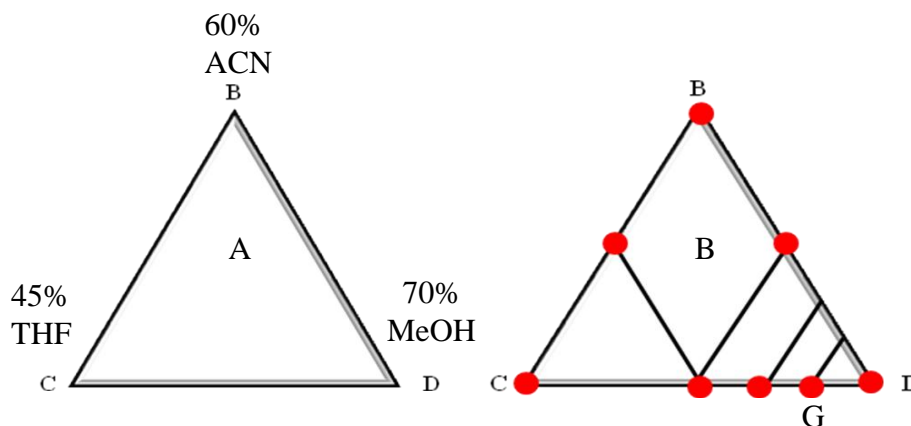


Figura 23 - A: Triângulo da seletividade a partir do nomógrafo. B: Triangulação cromatográfica para a escolha da melhor fase móvel para separação dos limonóides **1** a **4**.

Na figura 21 (p. 63) que corresponde ao cromatograma obtido pela substituição da ACN pelo MeOH, observou-se uma boa separação entre os limonóides **1**, **2**, **3** e **4**. Todavia não foi observada seletividade necessária para a quantificação do limonóide **2** em relação a um interferente da matriz.

Na Figura 22 (p. 63) que corresponde ao cromatograma obtido pela substituição da ACN pelo THF, observou-se uma boa separação entre os limonóides **1** e **4**. Porém, não houve separação entre os limonóides **2** e **4** e nem entre **1** e **3**, indicando que a fase móvel H₂O:THF 55:45 não é seletiva para a separação dos limonóides **2/3** ao contrário do observado no cromatograma da figura 19 com o uso do ACN. Tais observações são válidas para os limonóides **3** e **4**, o que sugere que a mistura de ACN e THF pode ser usada como fase móvel para obtenção de boa seletividade. Porém não foi o desejado, uma vez que o interferente do limonóide **2** não teve resolução e implicaria na seletividade do método. Optou-se por continuar a triangulação pelo outro vértice do triângulo que correspondiam às fases orgânicas MeOH e THF, obtendo-se novas misturas ternárias e novas triangulações sucessivas (Figura 23, Triângulo B) .

Após as análises realizadas, foi encontrado o ponto G (Figura 23, Triângulo B) com a melhor separação para os limonóides em estudo (Figura 17, p. 58). Neste ponto, a fase calculada é uma fase ternária composta por 30,8: 67,8:1,4 H₂O:MeOH:THF (Figura 24, p. 65).

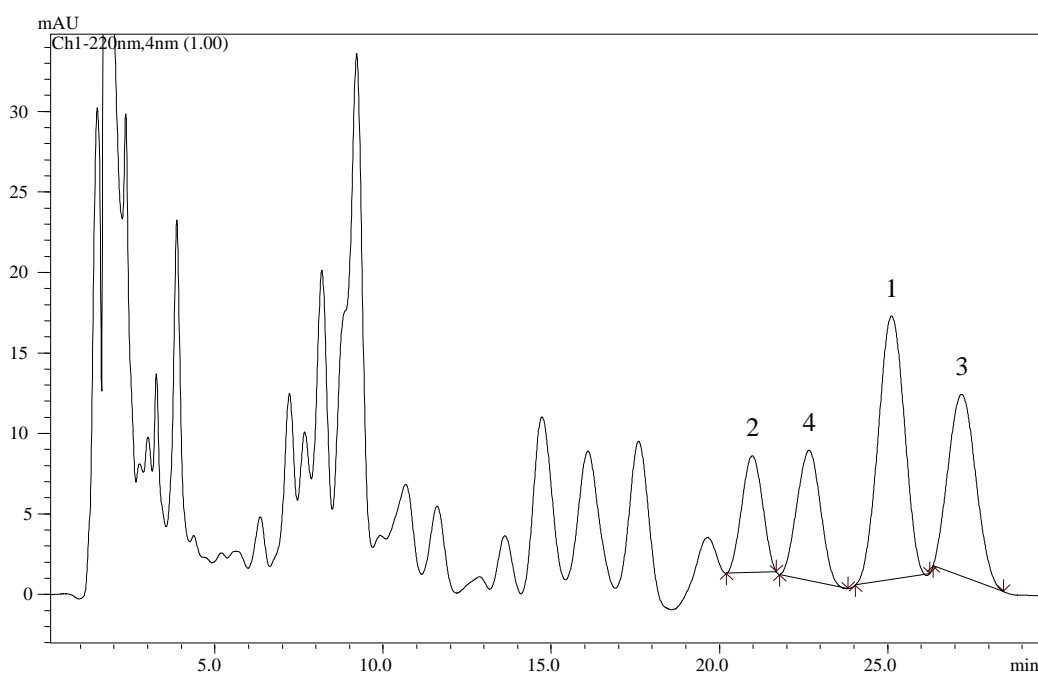


Figura 24 - Cromatograma 5- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Gemini C_{18} 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel $H_2O:MeOH:THF$ 30,8:67,8:1,4; vazão de 1 mL min^{-1} . Detecção de $\lambda = 220$ nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1 a 4**

Uma vez estabelecida o melhor sistema de separação com a melhor seletividade, o próximo passo foi avaliar a melhor fase estacionária para se encontrar todos os parâmetros cromatográficos ideais (T_R , α , R_S). Foram avaliadas 3 colunas C_{18} diferindo apenas no tamanhos da partícula da fase estacionária. Todas as fases estacionárias foram testadas no sistema ternário encontrado (Figuras 25, 26 e 27, p. 66 e 67). A coluna que obteve melhor eficiência para a separação conjunta dos picos de interesse foi uma coluna C_{18} Supelco 150 x 46 mm, 3 μm e para melhorar as condições cromatográficas diminuiu-se a vazão de 1,0 $mL \cdot min^{-1}$ para 0,9 $mL \cdot min^{-1}$ obtendo-se as seguintes condições cromatográficas para os analitos de interesse: resoluções (R_s) de 2,09, 2,2, 2,5, 2,13; fator de separação (α) de 1,3 e fator de retenção (k) de 9,71; 10,72; 11,60 e 12,80 para os picos dos limonóides **1**, **2**, **3** e **4**, respectivamente. Para a avaliação da separação injetou-se, nas melhores condições cromatográficas encontradas, uma solução de 50 $\mu g mL^{-1}$ da mistura dos quatro limonóides em estudo para confirmar a separação dos limonóides (Figura 28, p. 68).

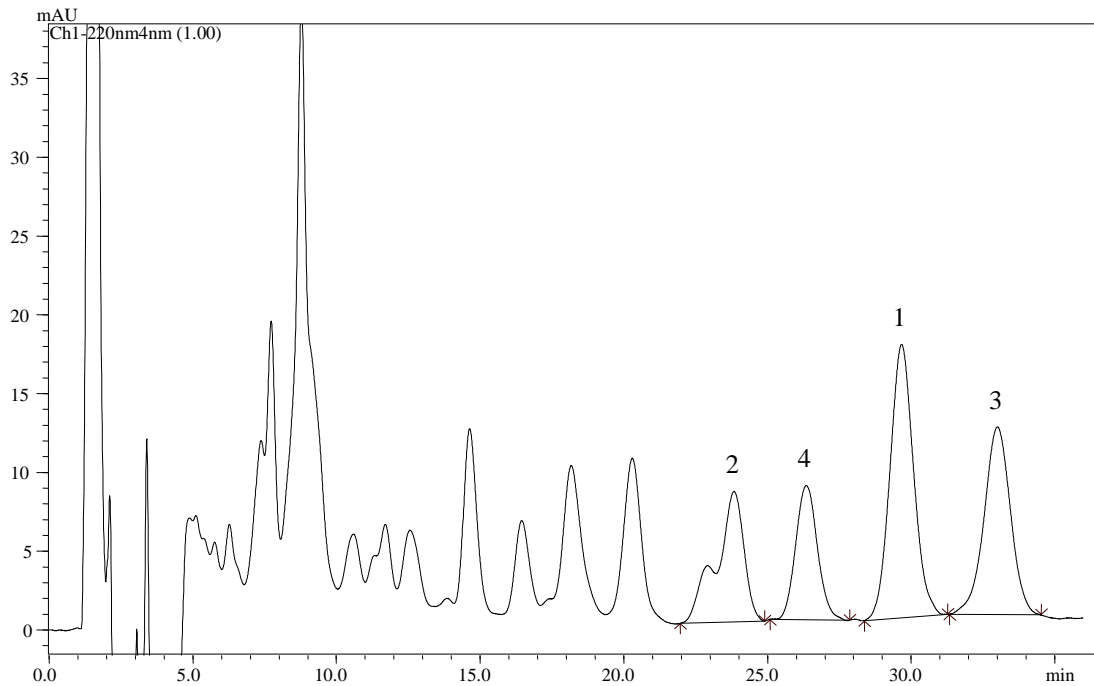


Figura 25 - Cromatograma 6- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna NX C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H₂O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 1mL min⁻¹. Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1 a 4**

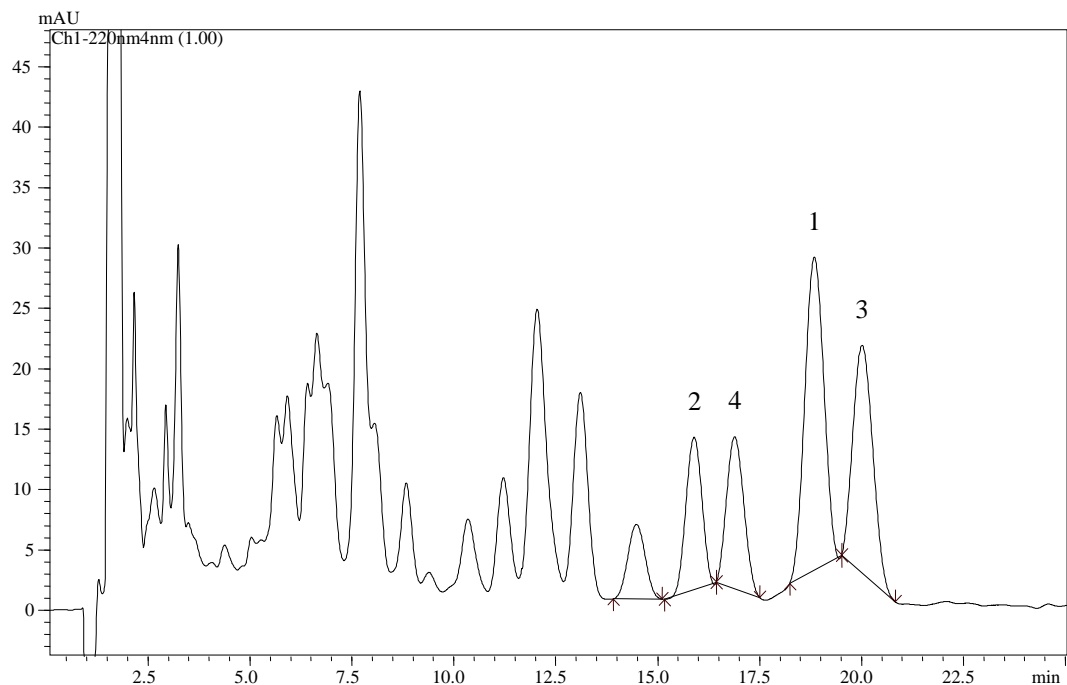


Figura 26 - Cromatograma 7- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Supelcosil C₁₈ 150 x 4,6 mm, 5 μ e fase móvel H₂O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 1mL min⁻¹. Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1 a 4**.

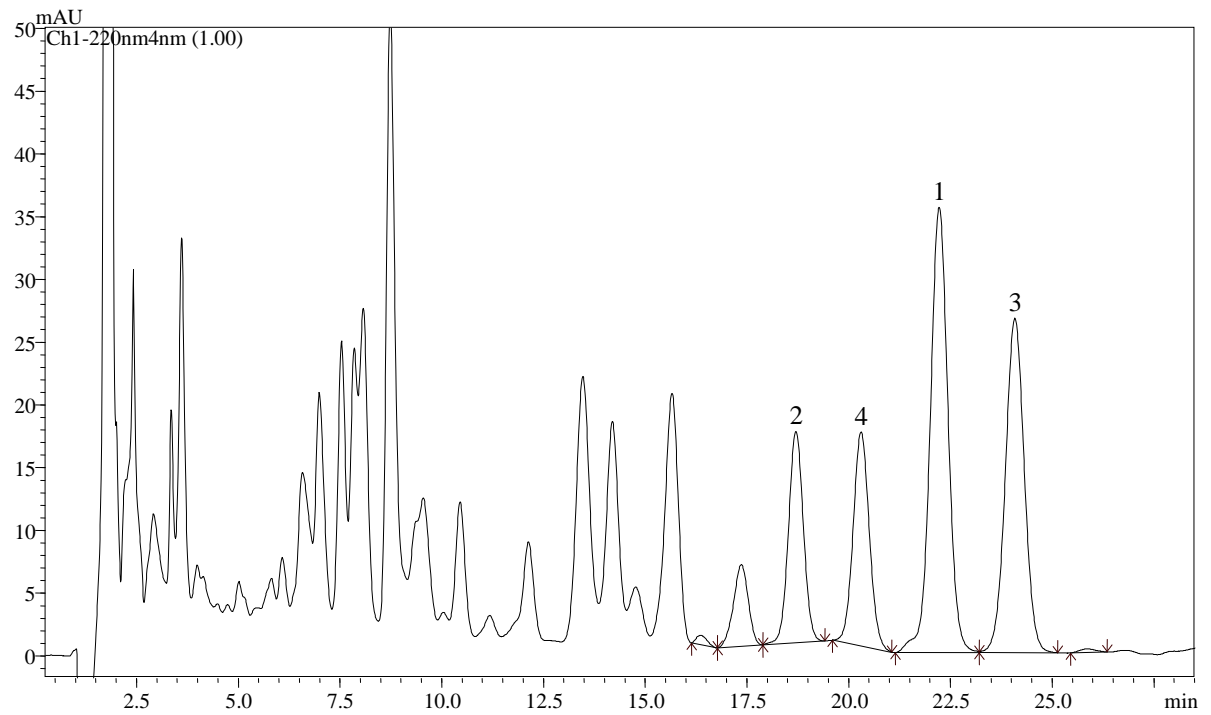


Figura 27 - Cromatograma 8- Eluição isocrática do extrato hexânico das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Supelcosil C₁₈ 150 x 4,6 mm, 3 μ e fase móvel H₂O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 0,9 mL min⁻¹. Detecção de $\lambda = 220$ nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1** a **4**.

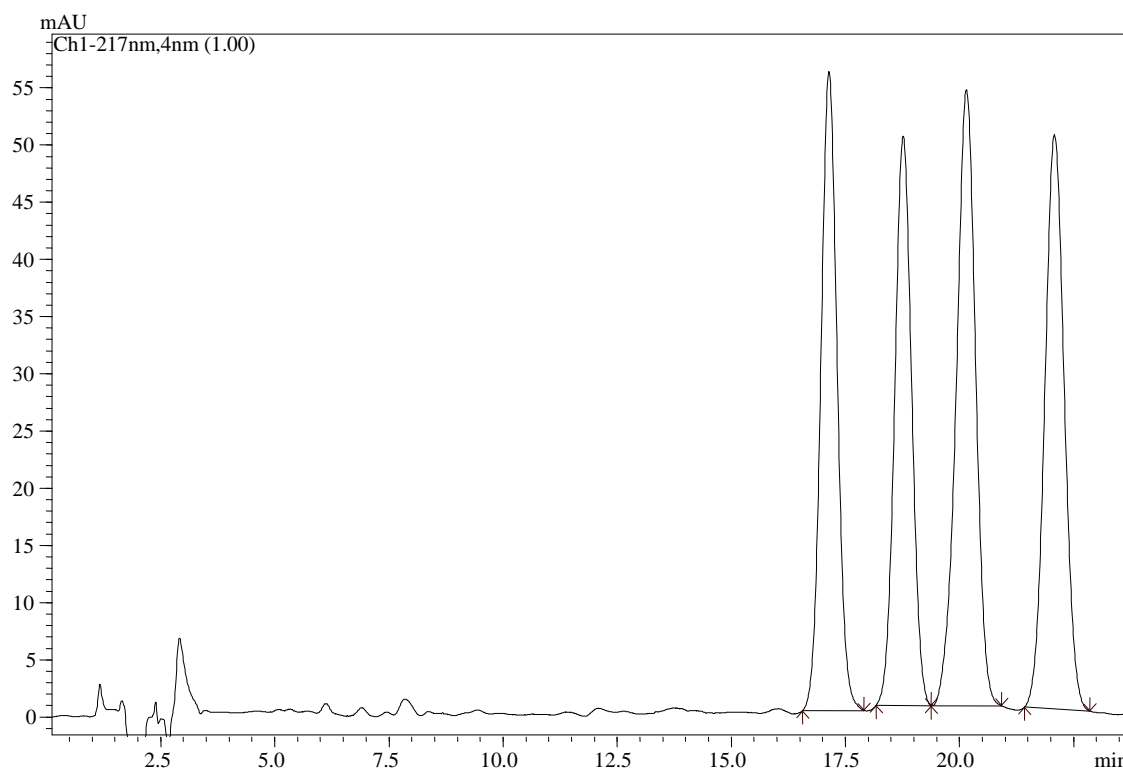


Figura 28 - Cromatograma 9 - Eluição isocrática da mistura dos quatro padrões de limonóides das folhas de mogno, composta por: Fase estacionária: Coluna Supelcosil C₁₈ 150 x 4,6 mm, 3 μ e fase móvel H₂O:MeOH:THF 30,8:67,8:1,4; vazão de 0,9 mL min⁻¹. Detecção de λ =220 nm. Em destaque os picos correspondentes aos limonóides **1** a **4**.

Sendo encontrado as melhores condições de análises como fase móvel e estacionária para os limonóides em estudo, os parâmetros de isolamento, pré-tratamento e análise da matriz foram avaliados quanto a sua repetibilidade e confiabilidade.

4.2.2 Processo de validação do método

4.2.2.1 Parâmetros Analíticos para validação do método

Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos normalmente determinados são: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, faixa linear, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras analíticas de mérito.

No método desenvolvido neste trabalho foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação.

4.2.2.2 Seletividade

A seletividade e/ou especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e compostos da matriz (ARAGÃO, VELOSO e ANDRADE, 2009). Se a seletividade não for assegurada, os outros parâmetros de validação estarão seriamente comprometidos (RIBANI *et al.*, 2004). Lanças (2004) sugere que, devem-se, ainda demonstrar que o pico observado no tempo de retenção do analito de interesse possui apenas o analito procurado e que não há co-eluição do composto com outros interferentes. Uma das formas mais utilizadas de se avaliar a seletividade é através da avaliação com detectores modernos, tais como o detector de arranjo de diodo (DAD), que comparam o espectro de ultravioleta do pico obtido na separação com o espectro de um padrão puro utilizando estes dados como indicação da presença do composto puro (RIBANI *et al.*, 2004). A seletividade em cromatografia é obtida otimizando-se as condições analíticas como fase móvel, temperatura da coluna, fase estacionária, entre outros (LANÇAS, 2004).

Em produtos naturais, devido à ausência de matrizes isentas do analito de interesse, a seletividade do método pode ser avaliada através da análise de diversas amostras da matriz utilizando-se detector de UV-Vis e arranjo de diodos (SILVA, 2009).

Para as folhas de mogno, foram feitas análises em ampla varredura com comprimentos de onda variando de 190 a 800 nm, demonstrando não haver compostos interferentes no tempo de retenção dos analitos, tendo-se optado pela quantificação a 220 nm, além disso, cada análise foi realizada em triplicata para assegurar a seletividade do método.

Também o método de adição de padrão foi aplicado para os estudos de seletividade. Neste caso, foram construídas duas curvas analíticas, uma com as soluções de trabalho mistas adicionadas a matriz e a outra sem a presença da matriz. Comparando-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que não há interferências de outros compostos da matriz na determinação das substâncias de interesse, portanto o método é seletivo.

4. 2.2.3 Linearidade e faixa linear

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta $y = ax + b$, chamada de curva analítica. Os coeficientes a e b da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação r ou o coeficiente de determinação r^2 , que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (ARAGÃO, VELOSO e ANDRADE, 2009).

Em uma técnica instrumental, a relação linear descrita pela equação $y = ax + b$, só é válida em um determinado intervalo de massa ou concentração da espécie medida. Este intervalo de massas ou concentração, no qual se pode construir uma curva analítica linear, é a faixa linear dinâmica.

Para a avaliação da linearidade e quantificação dos limonóides 1 a 4, foram obtidas curvas analíticas de soluções de trabalho mistas, na faixa de concentração 50 - 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com $n=7$ pontos (em triplicata) para a curva de padronização externa (Figuras 29, 30, 31 e 32, p. 71 e 72) e $n =6$ pontos (em quintuplicata) para a curva de adição de padrão (Figuras 33, 34, 35 e 36, p. 73 e 74).

A faixa linear de trabalho e as curvas analíticas desenvolvidas mostraram-se apropriadas para a quantificação dos quatro limonóides nas folhas maduras de mogno. A partir da curva de adição de padrão pode-se determinar a concentração em miligrama por quilograma dos limonóides presentes nas folhas secas e trituradas de mogno que foram: 3,40 mg Kg^{-1} para o limonóide **1**; 2,45 mg Kg^{-1} para o limonóide **2**; 2,86 mg Kg^{-1} para o limonóide **3** e 2,90 mg Kg^{-1} para o limonóide **4**.

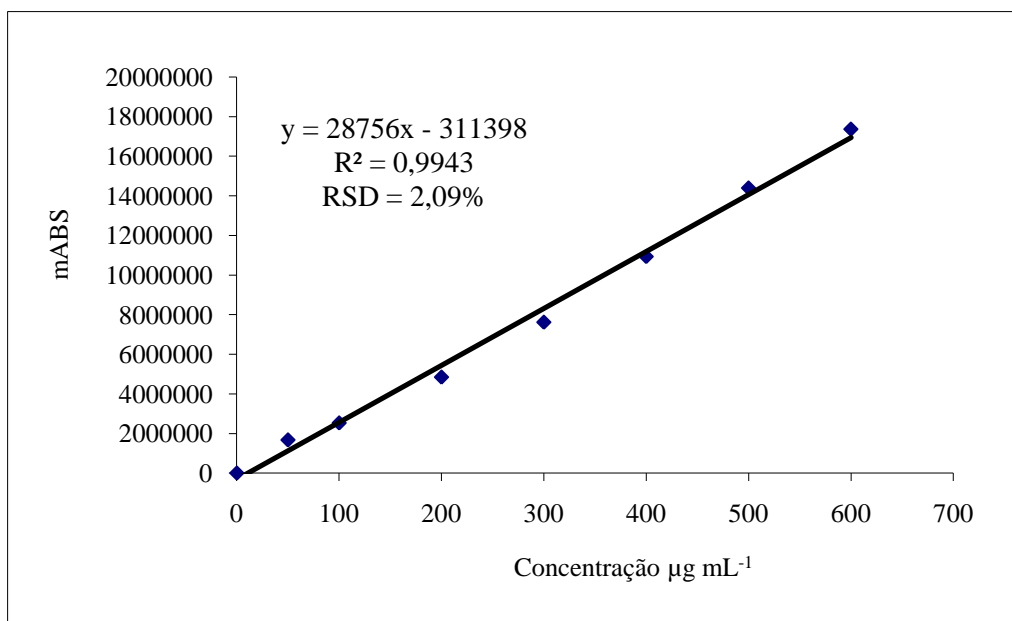


Figura 29 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 1. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

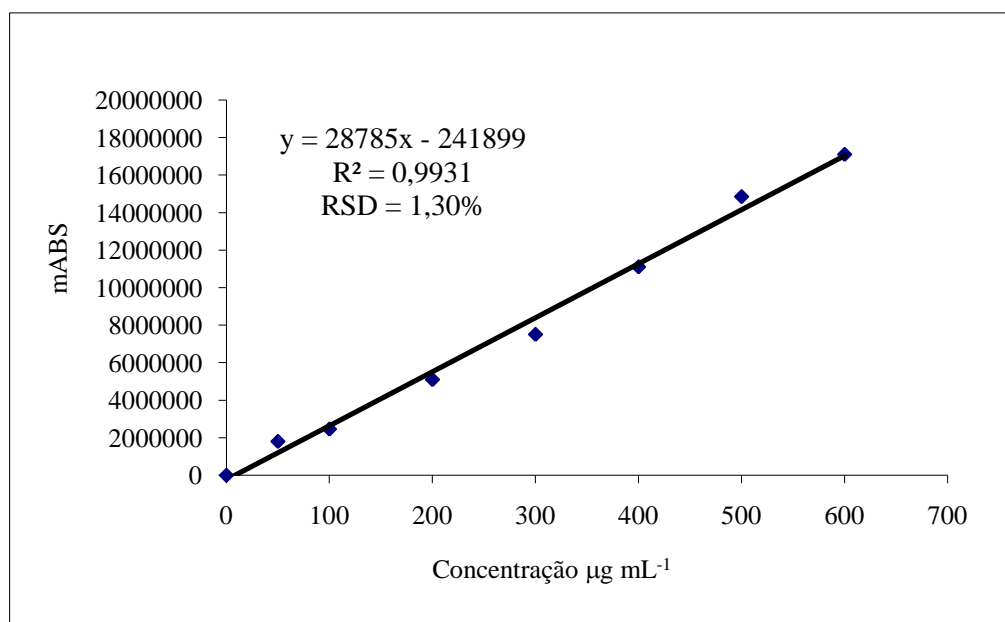


Figura 30 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 2. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

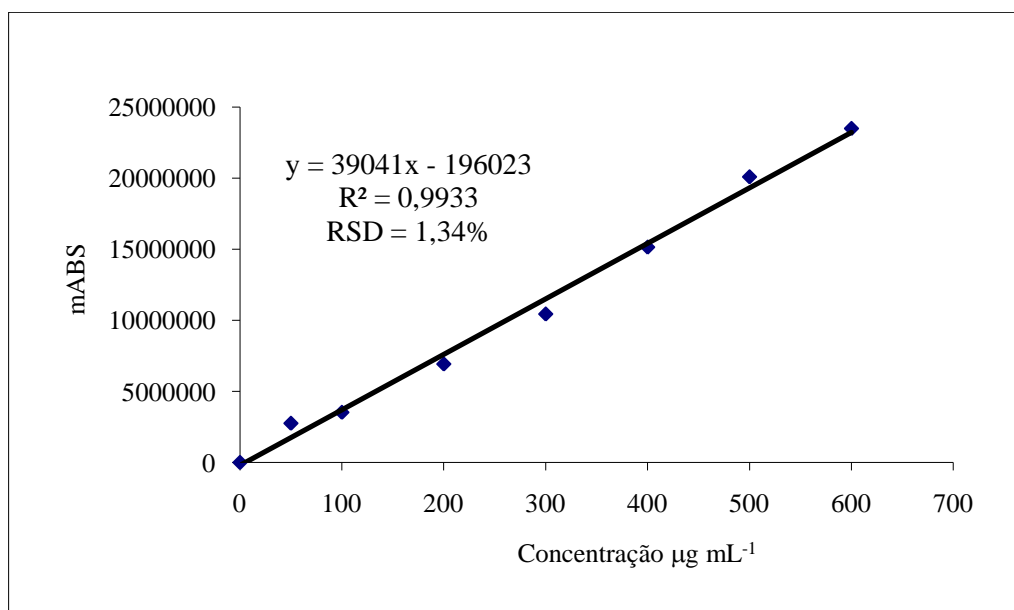


Figura 31 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 3. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

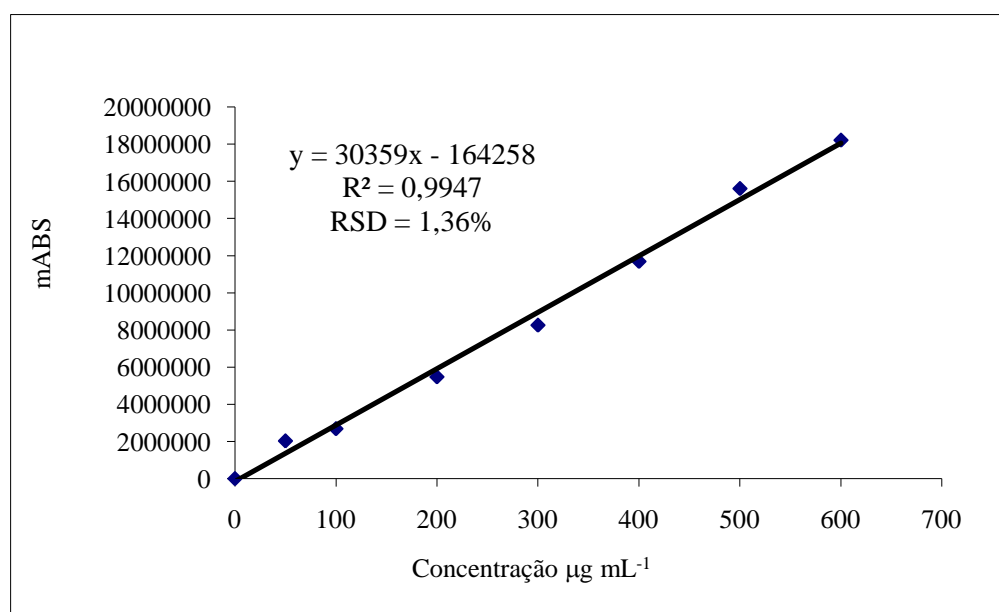


Figura 32 - Curva de calibração de padronização externa para quantificação do limonóide 4. Concentração do níveis de calibração variando de 50 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

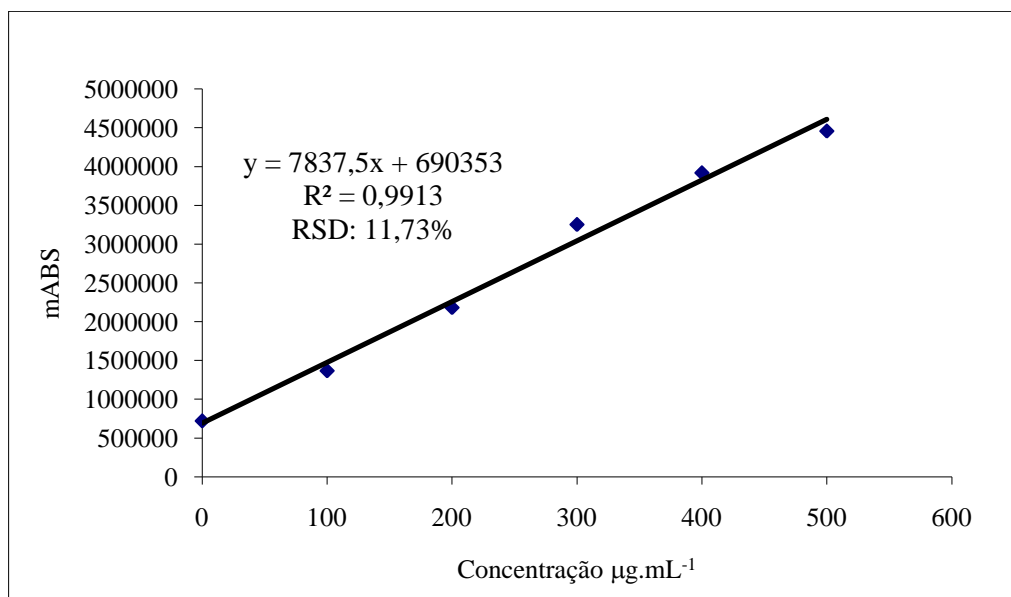


Figura 33 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 1. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

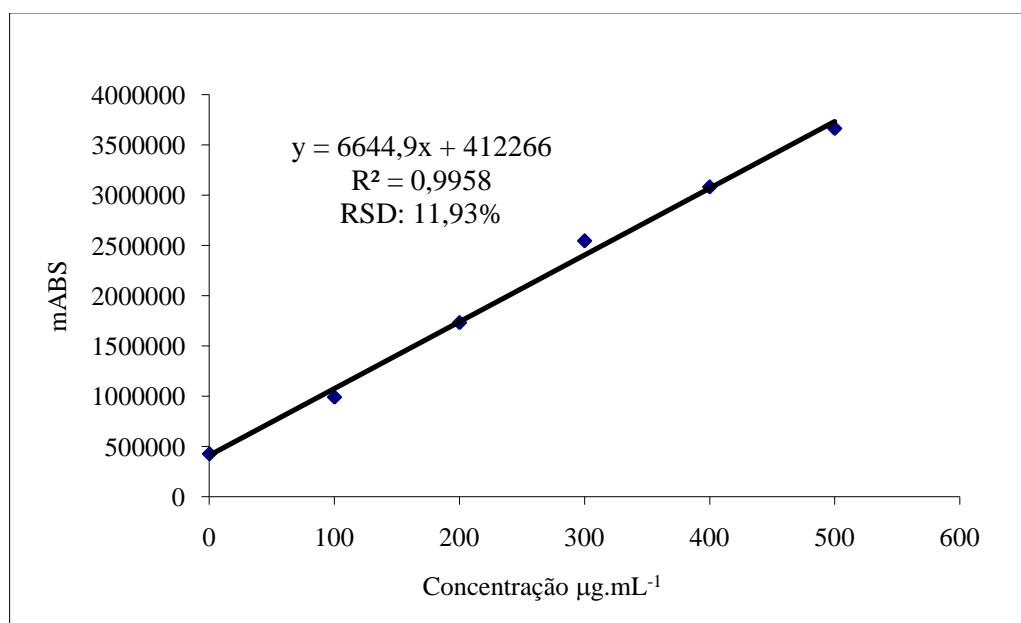


Figura 34 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 2. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

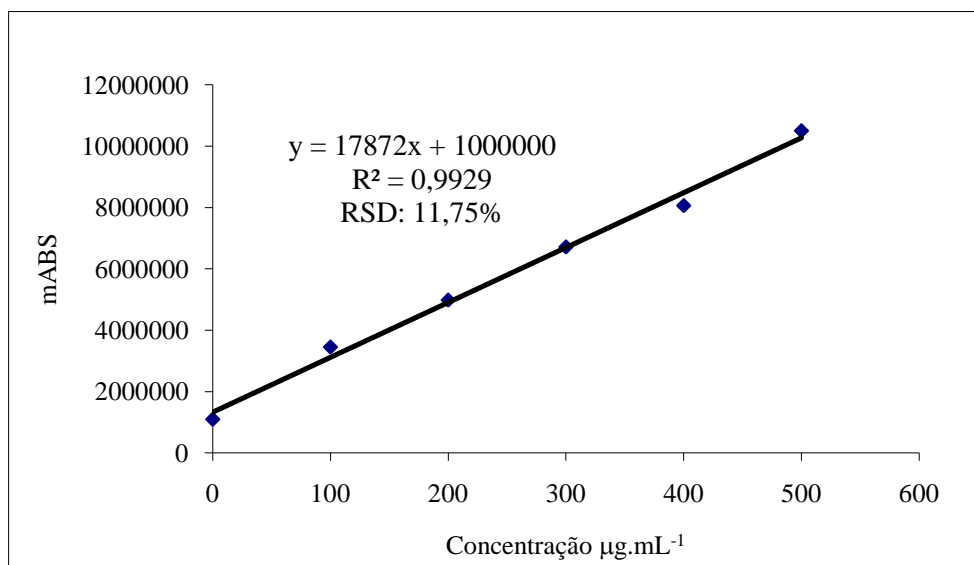


Figura 35 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 3. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 µg mL⁻¹.

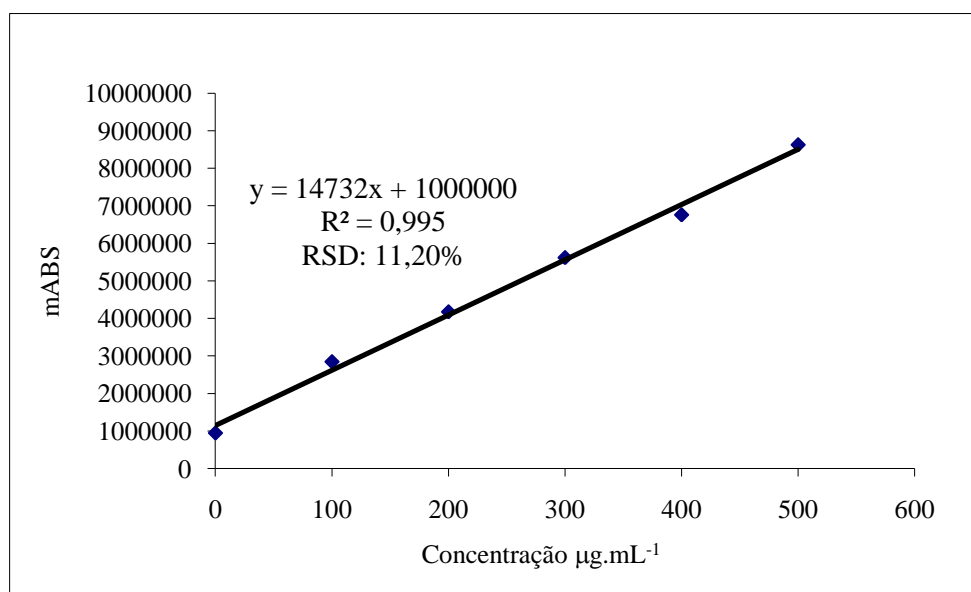


Figura 36 - Curva de calibração de adição de padrão para a quantificação do limonóide 4. Concentrações dos níveis de calibração variação de 100 a 500 µg mL⁻¹.

4. 2.2.4 Precisão

A precisão é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método é confiável ou não para o objetivo da análise.

A precisão pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão (s) ou desvio relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%) , de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes preparações.

A precisão deve ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dias) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial)

a) Precisão intradia: Define a precisão do método em repetir, em um curto intervalo de tempo, os resultados obtidos nas mesmas condições de análises. A precisão intradia foi avaliada através de análises em quintuplicata dos três controles de qualidades em um mesmo dia. Para o controle de qualidade foram escolhidas três concentrações de cada limonóide: uma concentração baixa ($75 \mu\text{g mL}^{-1}$ que corresponde a 120% da primeira concentração da curva analítica [$50 \mu\text{g mL}^{-1}$]); uma concentração média ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$ que corresponde a 40% da concentração mais alta da curva analítica [$600 \mu\text{g mL}^{-1}$]) e uma concentração alta ($550 \mu\text{g mL}^{-1}$ que corresponde a 80% da maior concentração da curva analítica [$600 \mu\text{g mL}^{-1}$]). Os coeficientes de variação encontrados para as soluções-controle variaram entre 2,47% e 3,75% como mostrados na tabela 3 abaixo:

TABELA 3 - Valores dos CVs (%) para as soluções-controles.

| Limonóide | $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ | $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ | $550 \mu\text{g mL}^{-1}$ |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 2,56% | 3,75% | 2,91% |
| 2 | 3,71% | 2,60% | 2,47% |
| 3 | 3,15% | 2,76% | 3,34% |
| 4 | 3,24% | 3,02% | 2,74% |

b) Precisão interdias: Define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório mas em diferentes dias, por diferentes analistas. A precisão interdias foi avaliada através de análises em quintuplicatas dos três controles de qualidade (os mesmos citados no item **a** acima) em três dias não consecutivos. Os CV encontrados variaram entre 2,06 e 3,86% para os limonóides, como mostrado na tabela 4 abaixo:

TABELA 4 - Valores dos CVs (%) para as soluções-controles.

| Limonoíde | 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 3,86% | 3,25% | 2,83% |
| 2 | 3,42% | 2,24% | 2,71% |
| 3 | 3,45% | 1,86% | 2,06% |
| 4 | 3,13% | 3,31% | 2,74% |

4. 2.2.5 Exatidão

A exatidão representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais, aceitos como referências, ou seja, se os resultados exatos estão próximos do valor verdadeiro.

Assim como a precisão, a exatidão, também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método e deve ser investigada após a determinação da seletividade, linearidade e precisão do método analítico.

Os guias do FDA e da ANVISA preconizam que a precisão e a exatidão devem ser investigadas pela análise de, no mínimo, 3 controles de qualidade (CQ) analisados em 5 replicatas de preparo de amostras, com níveis de concentrações baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em relação ao intervalo de concentração da curva de calibração.

A precisão e a exatidão, determinadas para cada uma das concentrações da curva de calibração e dos controles de qualidade, devem estar no intervalo de $\pm 15\%$ da concentração nominal de todas as concentrações.

A exatidão encontrada para as análises dos pontos da curva variaram entre 96,08% e 112,7% para os quatro limonóides conforme mostrado na tabela 5 abaixo:

TABELA 5 - Valores das exatidões (%) para as soluções-controles.

| Limonoíde | 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | 550 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 106,7% | 96,08% | 99,3% |
| 2 | 103,4% | 98,2% | 100,7% |
| 3 | 112,7% | 100,4% | 102,2% |
| 4 | 104,3% | 98,3% | 101,75% |

4. 2.2.6 Limites de quantificação e de detecção

Os termos limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito.

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. É importante ressaltar que esta concentração é detectada com segurança porém, em contrapartida, não pode ser quantificada.

A ANVISA recomenda que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. No entanto, é muito comum com o registro de vários picos cromatográficos nas amostras de branco, o que pode ocasionar interferência no sinal de fundo ou até mesmo, uma estimativa errada do sinal ruído da linha de base e, conseqüentemente, do valor de LD, o que dificulta a comparação de valores obtidos para limites de detecção entre diferentes laboratórios.

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão.

Neste método, o CV encontrado para o primeiro ponto da curva 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram de 14,71%, 14,47%, 14,87 e 14,76% sendo considerado o próprio limite de

quantificação. Foi encontrado um limite de detecção no valor de $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, com relação sinal:ruído de aproximadamente 3:1.

4.2.2.7 Recuperação

A recuperação do método foi calculada comparando-se a resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído, com a resposta obtida para o analito em amostras preparadas em solventes e conseqüentemente, não extraídas, as quais representam 100%.

Foram utilizadas concentrações em três níveis: 75, 250 e $550 \mu\text{g mL}^{-1}$, sem a adição do analito da matriz. Os valores de recuperação encontrados para as análises dos pontos da curva variaram entre 99,23% e 102,72% para os quatro limonóides conforme mostrado na tabela 6 abaixo:

TABELA 6 - Valores das recuperações (%) para as soluções-controles.

| Limonoide | $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ | $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ | $550 \mu\text{g mL}^{-1}$ |
|-----------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 102,17% | 102,23% | 101,27% |
| 2 | 102,11% | 99,23% | 101,02% |
| 3 | 100,41% | 99,75% | 99,92% |
| 4 | 102,72% | 101,13% | 100,9% |



Capítulo V

*Avaliação da Atividade Deterrente Alimentar dos limonóides
de mogno frente à *Hypsipyla grandella**

5 INTRODUÇÃO

Considerando a importância econômica que o mogno representa para o Estado do Pará, faz-se necessário estudos científicos que venham contribuir com informações que representem alternativas para o controle da praga do mogno (*H. grandella*), a qual é fator limitante para o sucesso de plantios dessa espécie, em áreas de reflorestamento. Os danos causados por esta praga impedem o desenvolvimento da árvore, gerando deformação no tronco e conseqüentemente o decréscimo do valor comercial do mogno.

Embora alguns trabalhos tenham obtido relativo sucesso em apresentar técnicas de controle sobre aspectos pontuais, ainda não foi estabelecida uma estratégia de manejo integrado que seja prática, econômica e eficiente para controlar o ataque da *H. grandella* no Brasil. As estratégias mais recomendadas são o uso natural da resistência da planta, manejo silvicultural, uso de semioquímicos e controle biológico, para as quais ainda há necessidade de pesquisas de longo prazo. Ensaio de resistências naturais de procedências de mogno devem ser incentivados devido às extensas áreas com reservas naturais no Brasil (LUNZ, *et al.*, 2009).

Neste capítulo relata-se a avaliação da atividade deterrente alimentar, visando estabelecer uma metodologia de bioensaio para ser utilizada no estudo sobre a relação inseto-planta, principalmente sob aspecto químico frente à espécie *H. grandella*, contribuindo com a solução da broca do mogno em áreas de reflorestamento.

5.1 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO LIMONOÍDICA

O extrato hexânico das folhas de mogno (49,73 g) foi submetido a fracionamento (Figura 37, p. 81) cromatográfico por coluna filtrante, com misturas de eluentes com polaridades crescentes de cada sistema: hexano/AcOEt 90:10 v/v, hexano/AcOEt 70:30 v/v, hexano/AcOEt 50:50 v/v e AcOEt 100%, obtendo-se as respectivas frações HA10 (27,4 g), HA30 (13,0 g), HA50 (7,0 g) e A100 (836 mg). A massa resultante da reunião das frações HA50 e A100 oriundas da coluna filtrante, foi submetida à método de refractionamento e isolamento proposto por Da Silva *et al.*, (2008) para a purificação dos limonóides **1**, **2**, **3** e **4**, permitindo dar continuidade ao trabalho de desenvolvimento de método de quantificação e validação do mesmo.

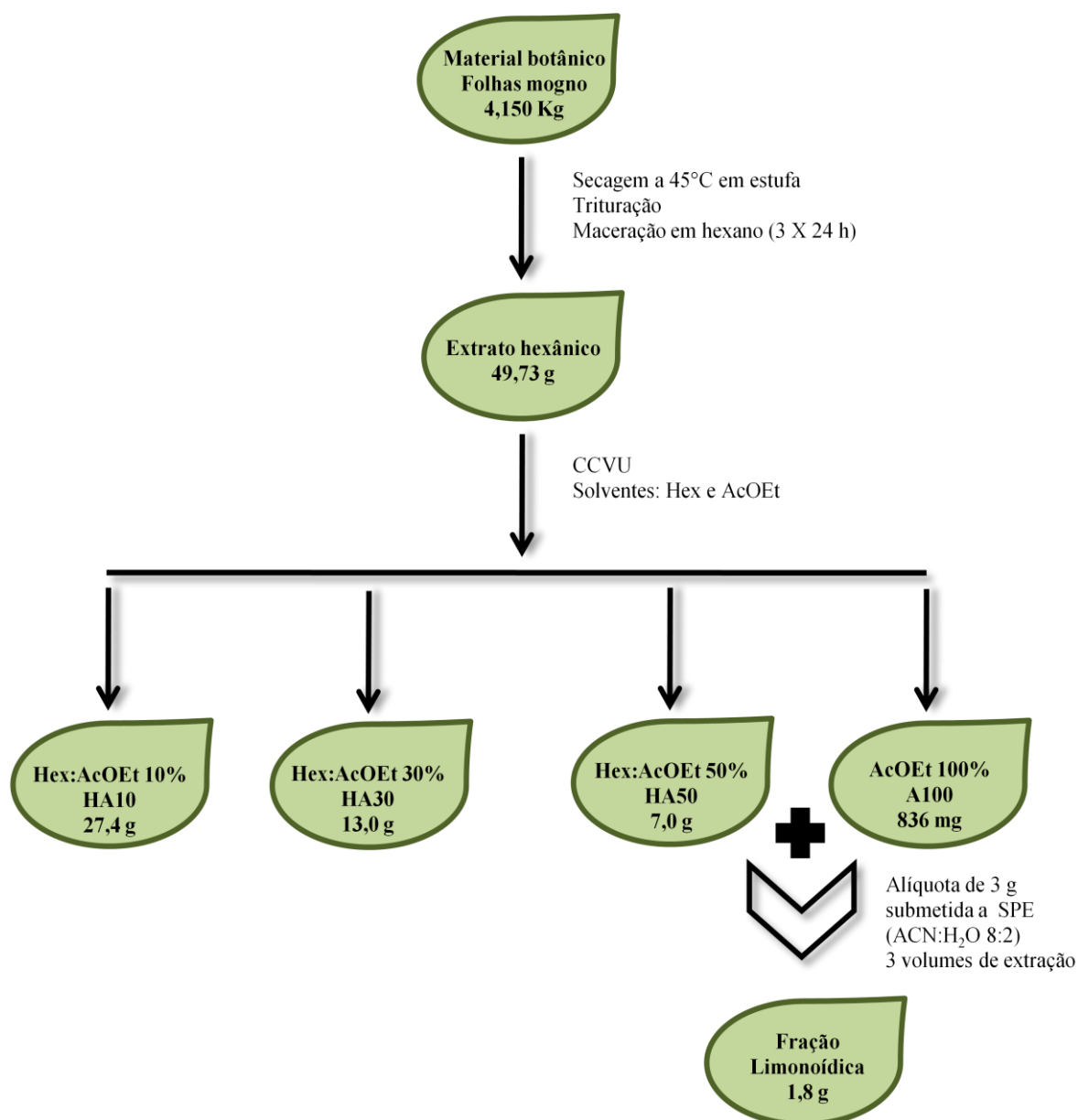


Figura 37 - Fluxograma 3 - Obtenção e fracionamento do extrato hexânico das folhas de mogno para o bioensaio.

5.2 PRÉ-TRATAMENTO PARA A OBTENÇÃO DA FRAÇÃO LIMONOÍDICA UTILIZADA NO BIOENSAIO

Foram utilizados 3 cartuchos Strata-C₁₈ da Phenomenex[®], com 5 g de fase estacionária/20 mL. Cada cartucho foi condicionado com 20 mL de ACN e em seguida 20 mL de água. À alíquota do extrato (1 grama de extrato hexânico para cada cartucho), foram adicionadas 80 mL de ACN e levada ao ultra-som, por cinco minutos. Posterior a esse tempo,

foram adicionados 20 mL de água e levado ao banho ultrassônico, por mais cinco minutos. A solução foi aplicada ao cartucho, recolhendo-se este volume. Foram aplicados mais dois volumes de 100 mL de uma solução ACN:H₂O 8:2, os quais foram somados ao primeiro volume. Esta solução foi levada à capela para a evaporação do solvente e obtenção da fração rica nos limonóides (FRL) de mogno, com massa de 1,87 g (62,3 % de rendimento).

5.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FRL E DOS LIMONÓIDES ISOLADOS A SEREM UTILIZADOS NOS BIOENSAIOS

As soluções da FRL de mogno foram preparadas nas concentrações de 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, utilizando acetona como solvente. A solução contendo a mistura dos padrões dos limonóides **1**, **2**, **3** e **4** foram preparadas nas seguintes concentrações: 250, 500, 750 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os limonóides **1**, **3** e **4** e nas concentrações de 500, 1.000, 1500 e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o limonóide **2**, também utilizando acetona como solvente.

5.4 BIOENSAIO PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DETERRENTE ALIMENTAR

Para o início do bioensaio foi necessário a criação da lagarta em laboratório. Para tal foram coletadas brotações de mogno atacadas com *H. grandella*, no campo experimental da Fazenda da Empresa Tramontina, localizada no município de Aurora do Pará – PA. Os brotos foram encaminhados para o laboratório de Entomologia da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), onde foram dissecados para a retirada das lagartas.

Os experimentos de avaliação da atividade deterrente alimentar foram desenvolvidos e realizados no Laboratório de Produtos Naturais – UFPA, com o objetivo de comprovar a ação dos limonóides **1** a **4** isolados das folhas maduras e ausentes nas folhas jovens.

5. 4.1 Criação das lagartas de *Hypsipyla grandella* em laboratório

A criação de *H. grandella* foi estabelecida a partir de lagartas no quinto instar. As lagartas foram colocadas em tubos de vidro, contendo dieta natural (folhas de *Cedrella odorata*). Os tubos de vidro com as lagartas foram vedados com bucha de algodão. As pupas obtidas foram sexadas com o auxílio de microscópio estereoscópico (lupa). Os machos apresentam, no segmento final, duas protuberâncias e as fêmeas, uma fissura. As pupas (machos e fêmeas) foram separadas em gaiolas de madeira (50 x 32,5 x 32 cm), recobertas externamente por tela de “nylon” e forradas internamente com morim, para a emergência dos adultos. As fêmeas ovipositaram sobre o papel de filtro, cerca de 100 ovos, distribuindo-se aleatoriamente. O morim contendo as posturas foi recortado e colocado nos tubos de incubação de ovos. Depois de 3 a 4 dias as lagartas eclodiram e foram transferidas com o auxílio de um pincel, para tubos de vidro. As lagartas eclodidas foram consideradas como a segunda geração. A partir desta geração de lagartas foram realizados os bioensaios.

5. 4.2 Método utilizado para a avaliação da atividade deterrente alimentar

A partir das lagartas consideradas como a segunda geração, foram realizados quatro experimentos distintos, objetivando-se adequar alguns parâmetros como: escolha do melhor instar para se manipular a lagarta, tamanho da dieta e vidraria adequada para o experimento. À medida que foram sendo realizados os experimentos, foi-se ajustando esses parâmetros até se chegar ao método mais adequado para a realização do bioensaio com *H. grandella*.

Em todos os experimentos foram utilizadas folhas de cedro (*Cedrella odorata*) como dieta natural. Em função da grande quantidade de substâncias dispensada para cada experimento, as folhas foram cortadas com cortador de rolas, obtendo-se discos com 2 cm de diâmetro, a partir do terceiro experimento. Desta forma, cada folha pôde produzir, em média, três discos (Figura 38, p. 84). O volume das soluções aplicadas na dieta foi de 50 µL. Os experimentos foram realizados colocando-se as lagartas em contato com a dieta em tubos cilíndricos de vidro de diâmetro de 3 cm e volume de 30 mL. A duração dos experimentos foi de cinco dias consecutivos, com contagem de mortalidade e troca diária da dieta. Ao final de

cada experimento foi feita a pesagem das lagartas sobreviventes (Figura 39), o que não foi observado para o 2º experimento. A figura 38 mostra o método ajustado para o bioensaio.

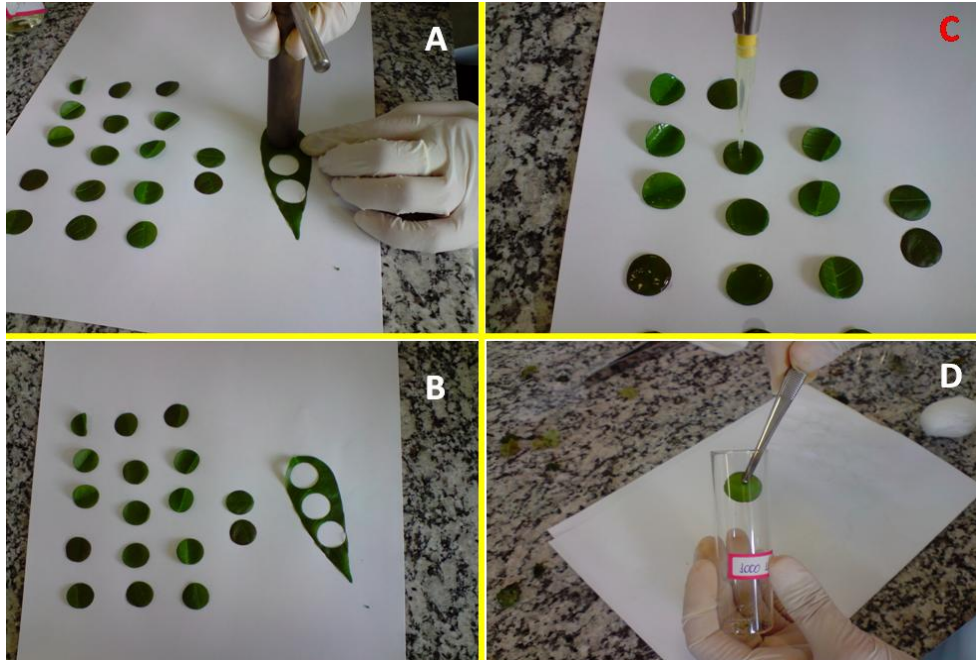


Figura 38 - Método ajustado do bioensaio com *H. grandella*. A e B – Redução da área foliar do cedro e tamanho da dieta utilizada; C – Mecanismo de inserção da droga na dieta; D - Contato da dieta com a lagarta em tubos de vidro cilíndricos. Fonte: Castro, K. C. F; 2008



Figura 39 - Contagem das lagartas mortas (mostrada pela marcação em vermelho) e pesagem ao final do bioensaio. Fonte: Castro, K. C. F; 2008.

5. 4.2.1 1º Experimento

Para este primeiro experimento foram utilizadas 40 lagartas nos 3º e 4º instares a partir da segunda geração. As lagartas foram classificadas como: a) tratadas com a droga, onde 20 lagartas foram submetidas à dieta com as folhas inteiras de cedro, nas quais foram aplicados 200 µL da solução da FRL, solubilizada em acetona, na concentração 2.000 µg mL⁻¹ e b) o controle, correspondendo a 20 lagartas submetidas à dieta natural, nas quais foram aplicados 200 µL do solvente acetona.

Antes de submeter as lagartas ao bioensaio, foi feita a pesagem individual, uma vez que era possível pesá-las em função do instar em que as mesmas se encontravam (3º e 4º instares). O objetivo desta pesagem foi avaliar, caso não houvesse mortalidade, o ganho de peso das mesmas. Ao terceiro dia foi feita uma nova pesagem das lagartas, para o acompanhamento do ganho de massa das mesmas. O tempo total do bioensaio foi de cinco dias consecutivos com contagem das lagartas vivas e troca da dieta diariamente. Ao final desse experimento, comparou-se o peso inicial, intermediário e final das lagartas.

5. 4.2.2 2º Experimento

Neste experimento foram utilizadas 108 lagartas no 1º instar, da segunda geração, sendo o número de indivíduos, para cada tratamento, igual a 18. Partindo dos resultados positivos do primeiro experimento e objetivando avaliar os efeitos das diferentes concentrações da FRL, foram utilizadas cinco soluções com concentrações de 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 e 10.000 µg mL⁻¹.

As lagartas tiveram a mesma classificação que as do primeiro experimento, sendo a) tratadas com a droga e b) o controle. Utilizou-se o mesmo volume de solução da FRL, na dieta natural, como descrito para o primeiro experimento. A diferença entre estes experimentos foi não ter sido feita a pesagem das lagartas no início, meio e final do bioensaio. O tempo total do bioensaio foi de cinco dias consecutivos com contagem das lagartas vivas e troca da dieta, diariamente.

5. 4.2.3 3º Experimento

Em função das lagartas utilizadas no experimento anterior serem muito pequenas e frágeis, neste experimento foram utilizados 126 ovos, com 24 h após a postura da mariposa, os quais foram colocados em tubos de vidro cilíndrico, em triplicatas de sete indivíduos, totalizando 21 ovos, por tratamento. Nos tubos foram colocadas apenas folhas de cedro, na forma de discos com 2 cm de diâmetro, objetivando-se esperar a eclosão das lagartas. Após a eclosão, iniciou-se a aplicação das soluções. Foram usadas soluções da FRL, nas concentrações de 1.000, 2.000, 3.000, 5.000 e 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O volume da solução, em cada tratamento, foi reduzido para 50 μL , em virtude da diminuição do tamanho foliar da dieta. Prolongou-se o tempo total do experimento para 10 dias consecutivos, com contagem das lagartas vivas e troca da dieta, diariamente. Ao final, pesaram-se as lagartas sobreviventes.

5. 4.2.4 4º Experimento

Este experimento foi realizado de forma semelhante ao anterior. Foram utilizados 96 ovos com 24 h após a postura da mariposa e colocados 4 ovos em cada tubo, totalizando um número de 16 ovos, por tratamento. Foi utilizada uma solução contendo os quatro os limonóides isolados anteriormente, nas concentrações de 250, 500, 750 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os limonóides **1**, **3** e **4** (Figura 17, p. 58) e de 500, 1.000 1.500 e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o limonóide **2** (Figura 17, p. 58), correspondendo a uma proporção de 1:2:1:1 respectivamente. O tempo total do bioensaio foi de 5 dias consecutivos, com contagem das lagartas vivas e troca da dieta, diariamente. Ao final do experimento, pesaram-se as lagartas sobreviventes.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos, em todos os experimentos, foram submetidos a análise de variância e no caso de efeito significativo dos tratamentos, as médias foram comparadas pelos teste T de Student ao nível de 10% de probabilidade e teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

5.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.6.1 1º Experimento: Avaliação do efeito da fração rica em limonóides de mogno (FRL), em uma única concentração, no ganho de peso das lagartas

Neste primeiro experimento o principal objetivo foi dar início à otimização do bioensaio com as lagartas de *H. grandella*, uma vez que não se encontram, na literatura, relatos de ensaios biológicos com essa espécie de lagarta. Iniciou-se o ensaio com lagartas nos 3º e 4º instares, pois neste tamanho, é fácil a manipulação da lagarta, inclusive sua pesagem. Optou-se por utilizar apenas uma concentração de $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ da FRL, para avaliação da dieta natural na alimentação e aceitação pela lagarta e ainda se a fração apresentaria algum efeito de inibição alimentar.

Neste experimento não foi observada mortalidade significativa das lagartas. Porém, foi observado que as lagartas do tratamento não se alimentavam o suficiente, quando comparadas às lagartas do controle, conforme demonstram as Figuras 40 e 41 (p. 88), sugerindo uma ação inibidora alimentar provocada pelos limonóides presentes na fração. Ao contrário, para as lagartas do grupo controle, foi observado um maior desenvolvimento, demonstrado pelo aumento de tamanho e massa das mesmas quando comparadas as do grupo sob tratamento.

A análise estatística dos dados, obtidos a partir dos pesos das lagartas, mostrou que a solução da fração FRL, na concentração utilizada, apresentou efeito no ganho de peso das lagartas, resultando em significativo menor ganho de peso, quando comparado ao controle. No gráfico 1 (Figura 42, p. 89) são plotados os pesos médios das lagartas do controle e do tratamento. Neste, pode-se constatar, com 90% de confiança (ou uma chance de erro de 10%) que a solução da fração FRL influenciou no desenvolvimento e peso das lagartas quando comparadas ao controle, sugerindo a ação deterrente alimentar dos limonóides.

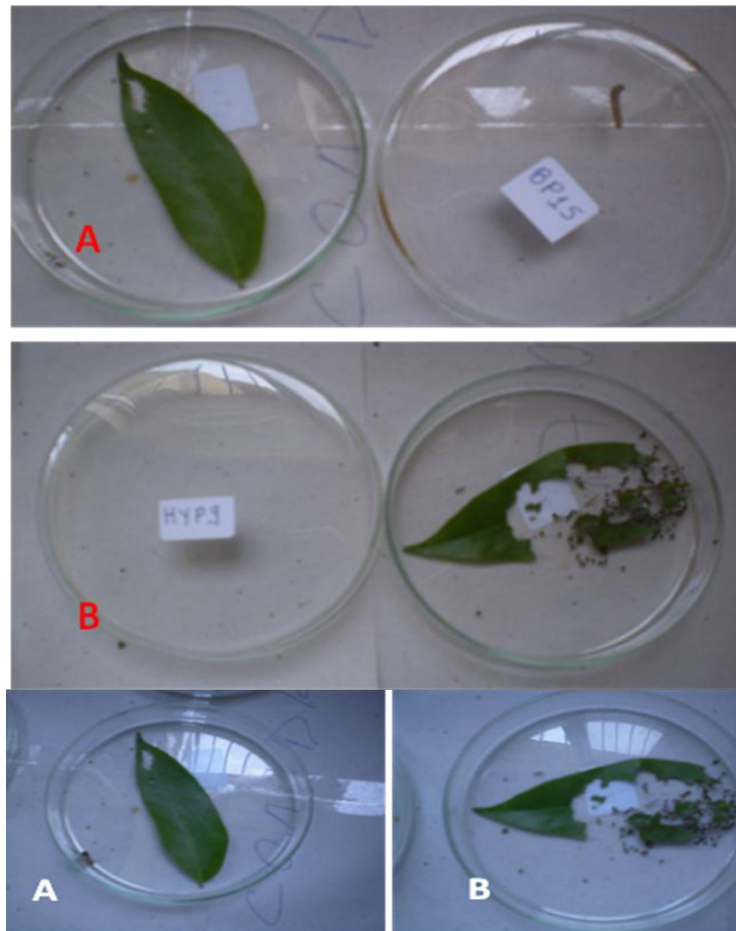


Figura 40 - Folhas de cedro (*Cedrela odorata*), depois de 24 horas de contato com as lagartas. A – lagartas submetidas à dieta tratada com droga; B – lagartas submetidas à dieta sem droga.



Figura 41 - Lagartas do primeiro bioensaio. Lagartas marcadas com círculo amarelo são as tratadas com a droga e com círculo vermelho são as do grupo controle (branco).

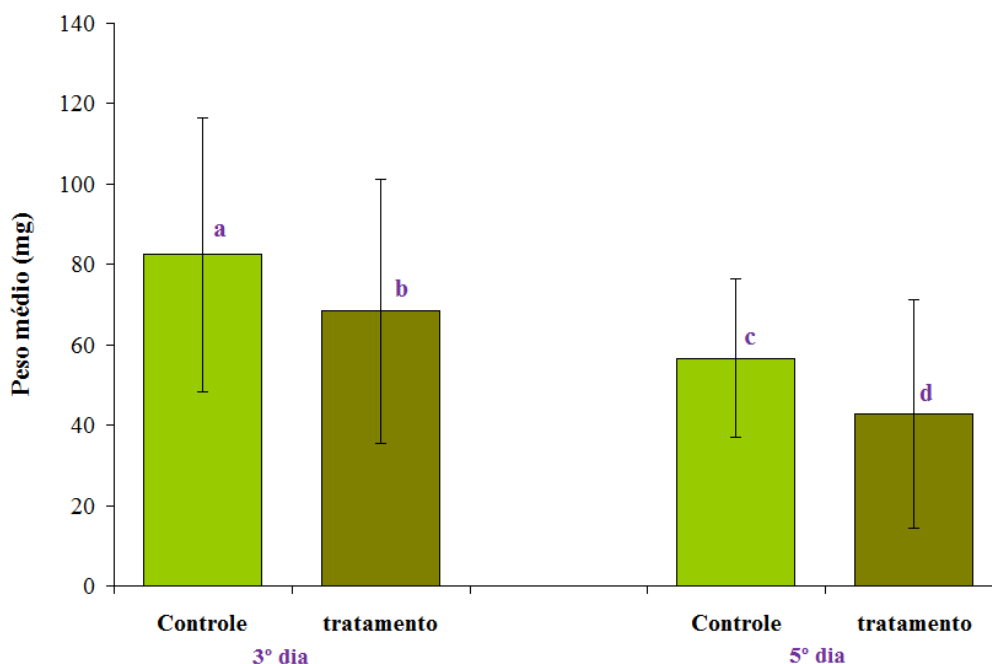


Figura 42 - Gráfico 1 - Ganho de peso médio das lagartas ao longo dos dias do primeiro bioensaio.

5. 6.2 2º Experimento: Avaliação do efeito da fração rica em limonóides de mogno (FRL), em várias concentrações, na mortalidade das lagartas

Para o segundo experimento, onde o objetivo foi verificar se a variação crescente das concentrações da fração FRL afetaria na mortalidade das lagartas, foram utilizadas cinco concentrações variando de 1.000 a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Outro fator a se considerar, neste experimento, foi a fase em que as lagartas se encontravam, uma vez que, são as lagartas jovens que atacam as brotações novas de mogno, logo, optou-se por avaliar o efeito da fração dos limonóides no primeiro instar de vida das mesmas.

Neste experimento foi observada uma mortalidade crescente em função do aumento da concentração de FRL, tendo para a concentração de 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mortalidade de 100% das lagartas. Ainda neste experimento, foi visível a diferença no desenvolvimento dos tamanhos das lagartas, quando comparadas às do controle. Vale ressaltar também que, para o controle não houve mortalidade, concluindo que a utilização da acetona, como solvente, é viável para o bioensaio. Como houve mortalidade de 100% não foi possível pesar

as lagartas que sobreviveram aos tratamentos, inviabilizando a análise estatística por falta de dados suficientes. Na tabela 7 se encontram os percentuais de mortalidade das lagartas para cada tratamento.

TABELA 7 - Resultados do 2º bioensaio com *H. grandella*. Percentual de mortalidade das lagartas tratadas com soluções da fração limonoídica em diferentes concentrações.

| CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | MORTALIDADE (%) |
|--|-----------------|
| Controle | 0 |
| 1000 | 50 |
| 2000 | 50 |
| 3000 | 50 |
| 5000 | 86,7 |
| 10000 | 100 |

n = 18 lagartas por tratamento

5. 6.3 3º Experimento: Avaliação do efeito da fração rica em limonóides de mogno (FRL), em várias concentrações, no ganho de peso das lagartas

Este experimento foi conduzido com vinte e uma lagartas recém eclodidas, evitando assim, o manuseio destas. Este cuidado foi tomado para descartar a hipótese de que houvesse algum tipo de estresse para as lagartas, provocado pela manipulação das mesmas, durante a colocação nos tubos através de pincel, permitindo, assim, maior confiabilidade nos resultados.

Uma observação feita nos experimentos anteriores foi que o diâmetro da folha usada como dieta era bastante grande, exigindo maior quantidade da FRL, já que a troca da dieta deveria ser realizada diariamente. Dessa forma, redimensionou-se o diâmetro das folhas de cedro de três para dois centímetros, o que permitiu um melhor aproveitamento de uma folha visto que na ocasião, havia escassez de folhas jovens de cedro disponibilizadas para o bioensaio. A diminuição do tamanho das folhas também permitiu diminuir o consumo de solução da droga, que passou de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, minimizando gastos

excessivos da fração. Neste experimento foram usadas as mesmas concentrações do ensaio anterior.

Com base nos resultados obtidos no bioensaio anterior, esperava-se observar uma mortalidade de 100% para a maior concentração, ou seja, a de $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, como ocorreu no segundo experimento, pois as lagartas utilizadas também estavam no 1º instar. Porém, não se observou tal mortalidade até o quinto dia do bioensaio.

Todavia, observou-se variação visível no tamanho e peso das lagartas submetidas ao tratamento com a fração FRL, em função do aumento das concentrações, quando comparadas ao grupo controle, conforme mostrado na Figura 43 (p. 93), indicando, desta forma, o efeito de inibição da droga sobre a alimentação das lagartas, assim como ocorreu nos experimentos anteriores.

Desta forma, optou-se por dar continuidade ao bioensaio por mais cinco dias, para verificar se a mortalidade, na maior concentração ($10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), iria chegar a 100%, como observado no segundo experimento. Porém, isto não ocorreu, embora tenham sido observados percentuais de mortalidades de 23,5%, 58,8%, 52,9% e 76,5%, respectivamente, para as lagartas tratadas nas concentrações de 1.000, 2.000, 5.000 e $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ao final do experimento, procedeu-se a pesagem das lagartas sobreviventes do grupo controle e do tratamento. A partir dos dados obtidos fez-se a análise de variância.

A análise de variância apresentada na tabela 8 (p. 92) mostra que as soluções usadas, nas diferentes concentrações, apresentaram um efeito altamente significativo no desenvolvimento das lagartas, em função do pequeno ganho de peso observado em relação ao controle, uma vez que o valor de F teórico (2,55) é menor que o valor de F prático encontrado, rejeitando a hipótese nula (H_0) a 0,5% de significância.

TABELA 8 - Análise de variância sobre o efeito das soluções da droga, nas diferentes concentrações, sobre o ganho de peso das lagartas *H. grandella*.

| FV | SQ | GL | QM | F |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| SOLUÇÕES DA DROGA | 19412,07 | 5 | 3882,41 | 68,22** |
| RESÍDUO | 2902,30 | 51 | 56,91 | |
| TOTAL | 22314,37 | 56 | | |

** altamente significativo ($\alpha = 0,05$)

Uma vez que foi observado, neste bioensaio, efeito significativo da FRL, plotou-se um gráfico comparativo (Figura 44, gráfico 2, p. 94) entre o peso médio das lagartas do grupo controle com o peso médio das lagartas dos grupos submetidos ao tratamento, utilizando-se o teste de Scheffé a 95% de probabilidade de acertos.

A análise do gráfico 2 permitiu constatar que a média de peso das lagartas do controle (51 mg) foi muito maior do que as médias de peso das lagartas tratadas com a fração, nas diferentes concentrações (1.000 a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), as quais apresentaram pesos entre 15,0 e 5,7 mg, indicando que as soluções nas concentrações de 1.000 a 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ influenciaram fortemente na inibição alimentar das lagartas, em relação ao controle.

Quando a análise foi feita considerando as cinco concentrações testadas, houve diferença de peso mais acentuada, entre os grupos tratados com as concentrações de extremos, ou seja, de 1.000 e de 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os quais exibiram pesos médios de 15,0 e 5,7 mg, respectivamente. Entretanto, as médias de peso encontradas para os grupos de lagartas tratadas com soluções da droga, nas concentrações de 1.000, 2.000, 3.000 e 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não exibiram diferenças de peso relevantes, apresentando médias de 15,0; 10,0; 10,0 e 8,6 mg, respectivamente.

Este fato poderia ser justificado considerando-se a quantidade diminuta de lagartas sobreviventes e seu respectivo tamanho.

É fato também que se observa variação de tamanho entre as lagartas de um mesmo grupo de tratamento, indicando que, por se tratarem de seres vivos, as características genéticas de cada membro do grupo, podem influenciar nos resultados observados.

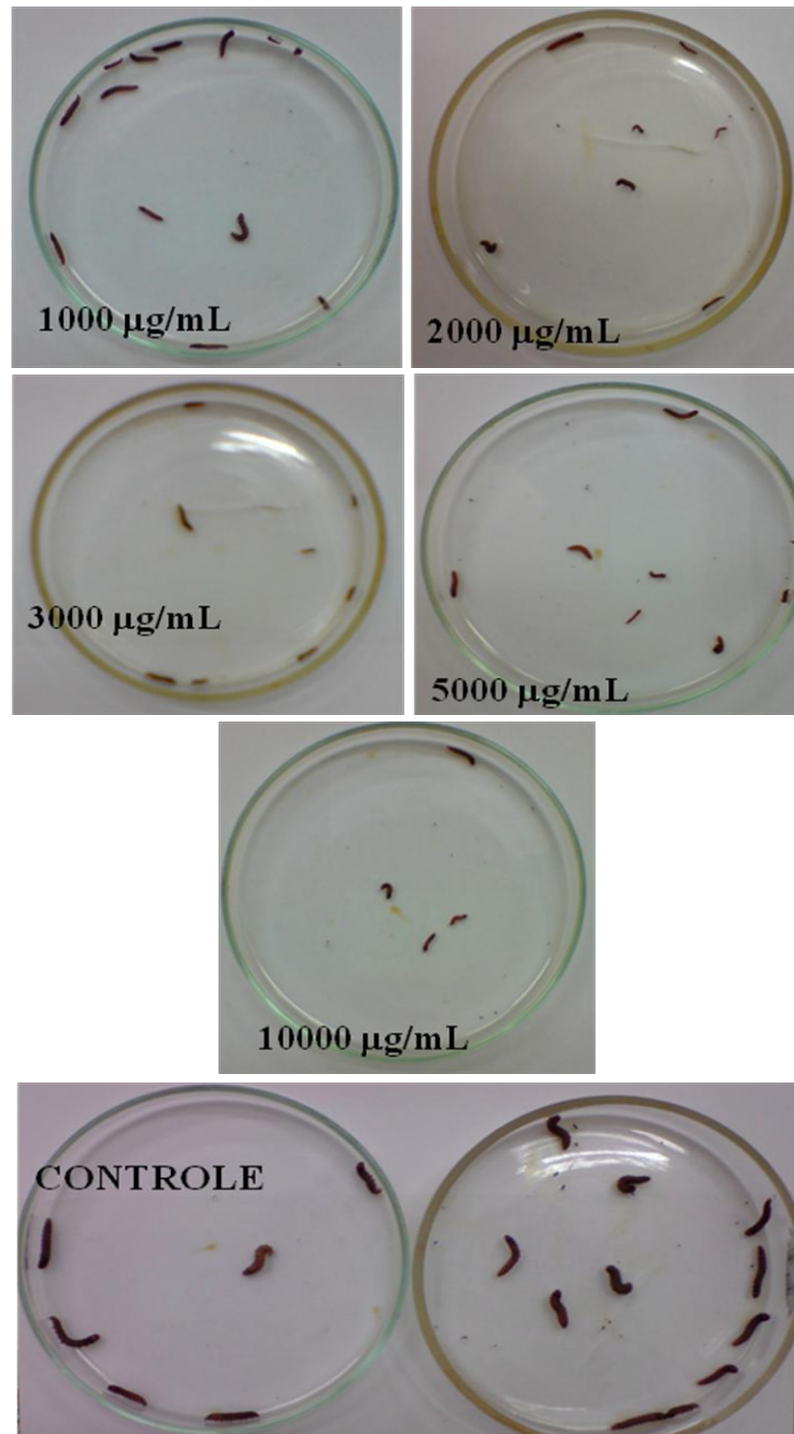


Figura 43 - 3º Experimento. Lagartas que sobreviveram ao tratamento com a droga (10 dias), nas diferentes concentrações (1.000 a $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$), e lagartas do controle.

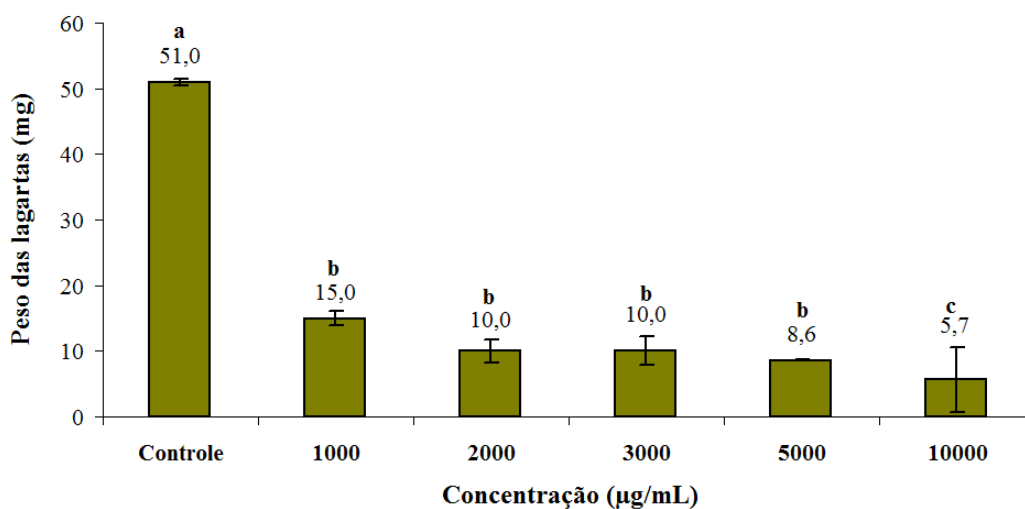


Figura 44 - Gráfico 2 - Efeito da droga nas diferentes concentrações, sobre o peso das lagartas após 10 dias de tratamento. Comparação das médias do peso pelo teste de Scheffé. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância = α 5%.

5.6.4 4º Experimento: Avaliação do efeito dos limonóides 1 a 4 a diferentes concentrações no ganho de peso das lagartas

Como os resultados do terceiro experimento foram bastante satisfatórios e ainda, como os limonóides **1** a **4** representam as substâncias majoritárias da fração limonoídica das folhas de mogno, os quais já haviam sido isolados e purificados e suas estruturas identificadas, optou-se por realizar um experimento utilizando uma mistura dos limonóides **1**, **2**, **3** e **4** na proporção de 1:2:1:1 (proporção definida em função das massas disponíveis dos mesmos), na tentativa de relacionar a atividade deterrente alimentar da fração, às substâncias **1** a **4**. As concentrações utilizadas foram: 250, 500, 750 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os limonóides **1**, **3** e **4**; e 500, 1.000, 1.500 e 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o limonóide **2**, num total de 4 soluções.

Optou-se por continuar o experimento com as lagartas no primeiro instar de vida. Foram utilizadas 16 lagartas por tratamento.

Neste experimento, não houve mortalidade de 100% das lagartas, tão pouco, mortalidade acima de 50%, para qualquer tratamento. Entretanto, foi visível a variação no desenvolvimento do tamanho e peso das lagartas tratadas com as soluções, sendo que essas variações de peso e tamanho foram comparadas com as das lagartas do grupo controle, conforme mostrado na Figura 45 (p. 96). Esses resultados também indicam que os limonóides **1** a **4** exerceram efeitos de inibição alimentar nas lagartas.

A análise de variância, apresentada na tabela 9 mostra que as soluções dos limonóides, nas diversas concentrações, apresentaram efeitos significativos no desenvolvimento das lagartas em função do baixo ganho de peso observado em relação ao controle, uma vez que o valor de F teórico (2,52) é menor que o valor de F prático encontrado, rejeitando a hipótese nula (H_0) a 0,5% de significância.

TABELA 9 - Análise de variância sobre o efeito da concentração no ganho de peso das lagartas de *H. grandella*.

| FV | SQ | GL | QM | F |
|-------------------------|---------------|-----------|--------------|----------------|
| SOLUÇÃO DA DROGA | 140,61 | 5 | 28,12 | 18,39** |
| RESÍDUO | 94,83 | 62 | 1,53 | |
| TOTAL | 235,43 | 67 | | |

** altamente significativo ($\alpha = 0.05$)

Uma vez que foram observados efeitos significativos dos limonóides, plotou-se um gráfico comparativo entre o peso médio das lagartas do grupo controle com o peso médio das lagartas dos grupos submetidos ao tratamento, utilizando-se o teste de Scheffé a 95% de probabilidade de acertos.

A análise do gráfico 5 (Figura 46, p. 96), permitiu constatar que a média de peso das lagartas do grupo controle (8,3 mg) foi maior do que as médias de peso das lagartas tratadas com a solução dos quatro limonóides nas diferentes concentrações (250/500 a 1.000/2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) as quais apresentaram pesos entre 6,6 e 4,5 mg, indicando que as soluções nas concentrações de 250/500 a 1.000/2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ influenciaram na inibição alimentar das lagartas, em relação ao controle.

Quando a análise foi feita considerando as cinco concentrações testadas, não foram observadas diferenças relevantes nos pesos médios das lagartas, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, bem como nas de 750 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mas sim entre esses dois pares.

Este fato poderia ser justificado considerando-se a quantidade diminuta de lagartas sobreviventes e seu respectivo tamanho (Figura 45, p. 96).

É fato também que se observa variação de tamanho entre as lagartas de um mesmo grupo de tratamento, indicando que, por se tratarem de seres vivos, as características genéticas de cada membro do grupo, podem influenciar nos resultados observados.

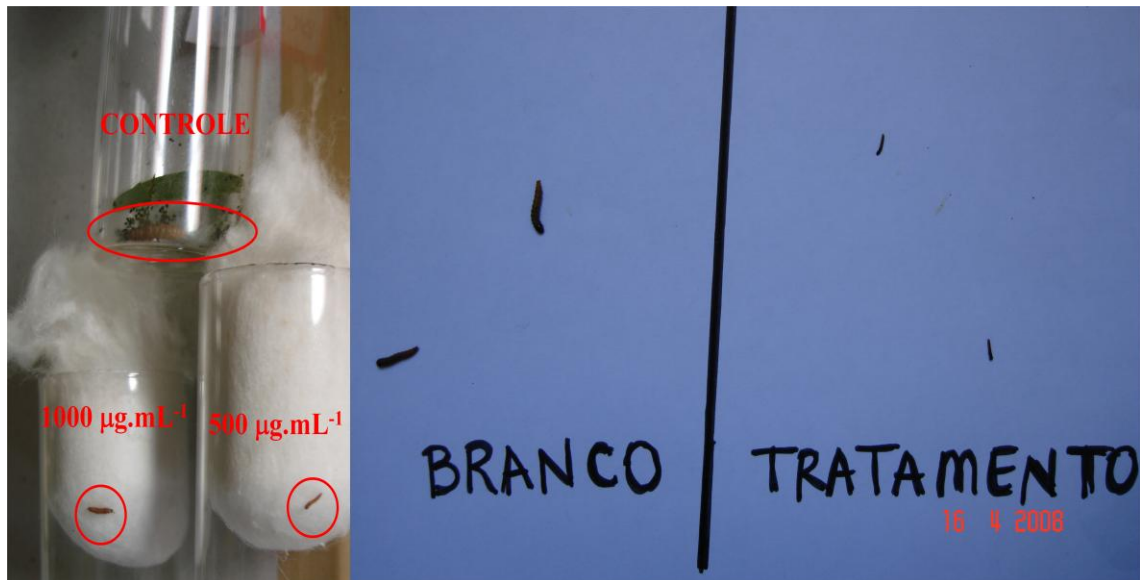


Figura 45 - 4º Experimento: Visualização da diferença de tamanho entre as lagartas do controle e do tratamento e uniformidade de tamanho em um mesmo grupo.

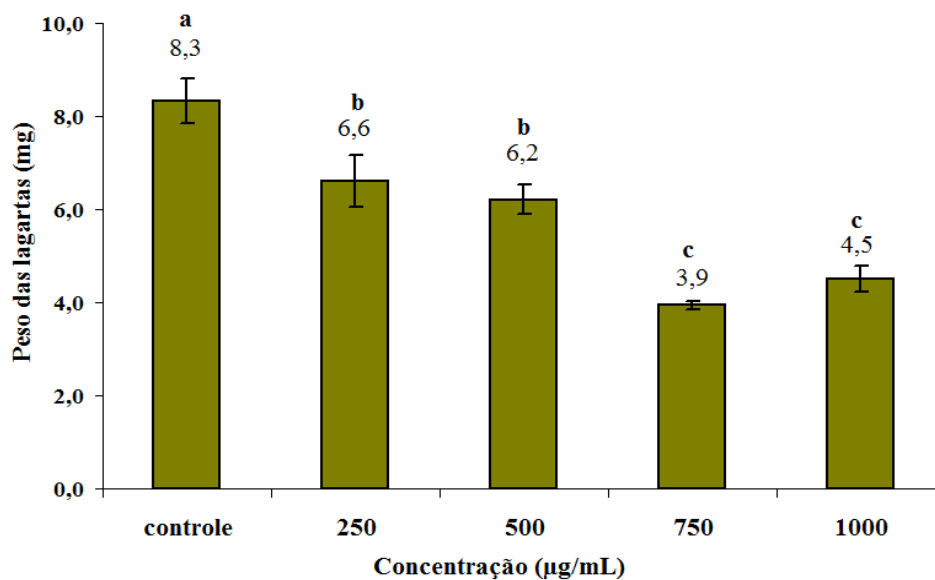


Figura 46 - Gráfico 3 - Efeito das soluções da droga (1+2+3+4) em várias concentrações, sobre o peso das lagartas. Comparação das médias do peso pelo teste de Scheffé. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância $\alpha = 5\%$.



Capítulo VI

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, demonstrando que os objetivos inicialmente propostos foram atingidos, podemos estabelecer as seguintes conclusões:

- Foi desenvolvido e otimizado um bioensaio de avaliação de deterrência alimentar com *H. grandella* – a grande problemática em plantações de mogno nas áreas de reflorestamento – o qual representa um experimento inédito com este inseto, uma vez que não se encontram relatos na literatura de deterrência alimentar com as lagartas de *H. grandella*.

- Ao submeter as lagartas de *H. grandella*, com dieta natural tratada com soluções de fração rica nos limonóides das folhas de mogno, com concentrações variando de 1.000 a 10.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, as lagartas apresentaram baixo ganho de peso em seu desenvolvimento, ao longo do bioensaio, quando comparado ao ganho de peso do controle, o que sugere que estes limonóides possuam atividade de deterrência alimentar frente a broca do mogno. Vale ressaltar que houve mortalidade de 100% quando as lagartas foram tratadas com a solução da fração rica nos limonóides, na concentração de 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

- Ao submeter as lagartas, com dieta natural tratada com soluções contendo os quatro limonóides majoritários (**1+2+3+4**) na proporção de 1:2:1:1 e de interesse deste trabalho, com concentrações variando de 250 a 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, percebeu-se que também os mesmos influenciaram na alimentação das lagartas, ou seja, inibindo o apetite alimentar destas e conseqüentemente provocando baixo ganho de peso durante o período do ensaio, indicando que os limonóides **1-4** possuem atividade de deterrência alimentar sobre as lagartas.

- Foi desenvolvido e validado um método de quantificação eficiente, prático e rápido para os quatro limonóides majoritários (**1-4**), presentes nas folhas maduras de mogno. Através do método pode-se determinar as concentrações encontradas destes metabólitos em miligramas de limonóide por quilograma de folhas secas e trituradas. Essas concentrações foram de 3,4 mg Kg^{-1} para o limonóide **1**; 2,45 mg Kg^{-1} para o limonóide **2**; 2,86 mg Kg^{-1} para o limonóide **3** e 2,90 mg Kg^{-1} para o limonóide **4**.

As perspectivas futuras deste trabalho são:

- Realização do bioensaio com uma solução contendo os limonóides **1, 2, 3 e 4** nas concentrações reais em que se encontram nas folhas maduras. Uma vez que já foi encontrada a concentração real dos limonóides **1, 2, 3 e 4** expressa em mg Kg^{-1} de folhas maduras de mogno, a realização de um próximo experimento com as lagartas será de extrema relevância para a conclusão da atividade deterrente alimentar dos mesmos sobre a lagarta.

- A aplicação do método validado na quantificação e identificação dos limonóides **1-4**, no processo de maturação das folhas de mogno. Este método permitirá avaliar em que fase do desenvolvimento das folhas de mogno, esses limonóides começam a ser produzidos pela planta, uma vez que estes não são observados nas folhas novas de mogno, o grande alvo das lagartas, confirmando, assim, a hipótese de que as lagartas atacam as ramificações novas de mogno devido à ausência dos limonóides **1, 2, 3 e 4**. Sendo este ataque a razão principal que impede o melhor desenvolvimento da árvore em áreas de reflorestamento.

REFERÊNCIAS

AIMEX. **Exportação de madeiras brasileiras**. Disponível em <http://www.aimex.com.br>> acesso em junho de 2009.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. da C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise: Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, 32, p. 2476 – 2481, 2009.

BANERJI, B.; MIGAN, S. K. Wood constituents of Meliaceae: A Review. *Fitoterapia*, 55, 3-36, 1984.

BALDWIN, I. T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, 127, p. 1449 – 1458, 2001.

BARROS, P. C. L.; OLIVEIRA, F. A.; COSTA, P. P. F.; SILVA, J. N. M.; FARIAS, M. M.; TEREZO, E. F. M. **Reservas naturais e artificiais de *Swietenia macrophylla* King na Amazônia Brasileira: Numa perspectiva de conservação**. Belém: Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, Belém – Pará, p. 56, 1996.

BARTLET, E.; BLIGHT, M. M.; HICK, A. J.; WILLIAMS, I. H. The responses of the cabbage seed weevil (*Ceutorhynchus assimilis*) to the odour of oil seed rape (*Brassica napus*) and to some volatile isothiocyanates. **Applied Entomology Experience**, 68, p. 295 - 302, 1993.

BERTI FILHO, E. BATISTA, G. C.; ALVES, S. B. **Curso de entomologia aplicada à agricultura – pragas de espécies florestais arbóreas**. Piracicaba, FEALQ, p. 760, 1992.

BERTI FILHO, E. **Observações sobre a Biologia de *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) (Lepdoptera: Phycitidae)**. ESALQ/USP, Dissertação de Mestrado, p. 108, 1973.

BOHNENSTENGEL, F. I.; WRAY, V.; WITTE, L.; SRIVASTAVA, R. P.; PROKSCH, P. Insecticidal meliacarpins (*C*-seco limonoids) from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, 50, p. 977 – 982, 1999.

BRADLEY, J. D. Description of two genera and species of phycitinae associated with *Hypsipyla robusta* (Moore) on Meliaceae in Nigeria (Lepidoptera, Pyralidae). **Bulletin of Entomological Research**, 57, p. 605 – 613, 1968.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária, p. 365, 1992.

BUTTERWORTH, J. H.; MORGAN, E. D. Isolation of a substance that suppresses feeding in locusts. **Journal of the Chemical Society**, 35, p. 23 – 24, 1968.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de método por HPLC – Fundamentos, estratégias e validação**. EdUFSCar, São Carlos, 2001.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova** 32, p. 1021 – 1030, 2009.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, H. N. Biological activity of limonoids from rutales. **Phytochemistry**, 31, p. 377 – 394, 1992.

CONDE, R. A. R. **Controle Silvicultural e mecânico da broca do mogno *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) (Lepdoptera: pyralidae) em sistema agroflorestal**. Dissertação de Mestrado - UFRA, p. 12, 2006.

COSTA, M. S. S. **Controle de *Hypsipyla grandella* (Zeller) (Broca do Mogno) utilizando a planta resistente *Toona ciliata* Roem (Cedro Australiano) e métodos mecânico e cultural no plantio de *Swietenia macrophylla* King (Mogno)**. Dissertação de mestrado - FCAP, p. 51, 2000.

DA SILVA, M. N. **Estudo Fitoquímico de *Swietenia macrophylla*: Uma contribuição ao controle da broca do mogno.** Tese de Doutorado - UFSCar, p. 11, 2005.

DA SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; CASTRO, K. C. F.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. VIEIRA, P. C. Limonoids of the phragmalin type from *Swietenia macrophylla* and their chemotaxonomic significance. **Journal of Natural Products**, 71, p. 1983 – 1987, 2008.

DETHIER, V. G.; BROWNE, L. B.; SMITH, C. N. The designation of chemical in terms of the responses they elicit from insects. **Journal of Economic Entomology**, 53, p. 134 – 136, 1960.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and plants: A study in coevolution. **Evolution**, 18, p. 586 – 608, 1964.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, CARVALHO R. P.L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, FEALQ - Piracicaba, p. 920, 2002.

GOVINDACHARI, T. R.; NARASIMHAN, N. S.; SURESH, G.; PARTHO, P. D.; GOPALAKRISHNAN, G. Insect antifeedant and growth-regulating activities of salanin and other C-seco limonoids from neem oil in relation to azadirachtin. **Journal of Chemical Ecology**, 22, p. 1453 – 1461, 1996.

GRIJPMAN, P.; GARA, R.I. Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). I. Host Selections behavior. **Turrialba**, 20, p. 233 – 40, 1970.

HARBORNE, J. H. Advances in chemical ecology. **Natural Product Reports**, 10, p. 327 – 348, 1993.

HARBORNE, J. H. Recent advances in chemical ecology. **Natural Product Reports**, 16, p. 509 – 523, 1999.

IBAMA. Instrução Normativa nº 07, de 22 de agosto de 2003. In: BRASIL, Ministério do Meio Ambiente; IBAMA. **Regime interno do IBAMA 2002**. Ed. 164, 2003.

KLIEBENSTEIN, D. J.; KROYMANN, J.; BROWN, P.; FIGUTH, A.; PEDERSEN, D.; GERSHENZON, J.; MITCHELL-OLDS, T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. **Plant Physiology**, 126, p. 811 – 825, 2001.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, vol. 6, Rima Editora. São Carlos, 93 pp., 2004.

LEE, S. M.; OLSEN, J. I.; SCHWEIZER, M. P.; KLOECKER, J. A. 7-Deacetyl-17 β -hydroxyazadiradione, a new limonoid insect growth inhibitor from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, 27, p. 2773 – 2775, 1988.

LENTINI, M.; VERÍSSIMO, A. e PEREIRA, D. **O estado da Amazônia**. Instituto do Homem e Meio Ambiente da Amazônia – IMAZON, nº 02, 2005.

LUNZ, A. M.; THOMAZINI, M. J.; MORAES, M. C. B.; NEVES, E. J. M.; BATISTA, T. F. C.; DEGENHARDT, J.; DE SOUZA, L. A.; OHASHI, O. S. *Hypsipyla grandella* em mogno (*Swietenia macrophylla*): Situação Atual e Perspectivas. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 59, p. 45 – 55, 2009.

MEIO AMBIENTE: **A geografia física e os problemas que afetam o meio ambiente no Brasil e as ações para preservá-lo**. In: ALMANAQUE ABRIL BRASIL. São Paulo: Abril, p. 295 – 332, 2003.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plants-insects interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 14, p. 71 – 81, 2002.

MOOTOO, B. S.; ALI, A.; MOTIAL, R.; PINGAL, R.; RAMIAL, A.; KHAN, A.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Limonoids from *Swietenia macrophylla* and *Swietenia aubrevilleana*. **Journal of Natural Product**, 62, p. 1514 – 1517, 1999.

NAKATANI, M. Limonoids from *Melia toosendan* (Meliaceae) and their antifeedant activity. **Heterocycles** 50, p. 595 – 609, 1999.

NAKATANI, M.; ABDELGALEIL, S. A. M.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; SATO, A.; DOE, M. Khayanolides A and B, new rearranged phragmalin limonoids antifeedants from *Khaya senegalensis*. **Tetrahedron Letters**, 41, p. 6473 – 6477, 2000.

NAKATANI, M.; ABDELGALEIL, S. A. M.; SAAD, M. M. G.; HUANG, R. C.; DOE, M. IWAGAWA, T. Phragmalin limonoids from *Chukrasia tabularis*. **Phytochemistry**, 65, p. 2833 – 2841, 2004.

NAKATANI, M.; HUANG, R. C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. Degraded limonoids from *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, 49, p. 1773 – 1776, 1998.

NEWTON, A. C.; LEAKEY, R. R.; MESEN, J. F. Genetic variation in mahoganies: Its importance, capture and utilization. **Biodiversity and conservation**, 2, p. 126 – 144, 1993.

OHASHI, O. S. Manejo integrado da broca do mogno *Hypsipyla grandella* Zeller (Lep. Pyralidae). **Manejo integrado das principais pragas de cultivos amazônicos**. Belém – Embrapa Amazônia Oriental, p.102, 2002.

OHASHI, O. S.; SILVA, J. N. M.; SILVA, M. F. G. F.; COSTA, M. S. S.; SARMENTO JR, R. G.; SANTOS, E. B.; ALVES, M. Z. N.; PESSOA, A. M. C.; SILVA, T. C. O.; BITTEM COURT, P. R. G.; BARBOSA, T. C.; SANTOS, T. M. **Manejo Integrado da broca do mogno *Hypsipyla grandella* Zeller (Lep. Pyralidae)**. Embrapa/FCAP/FUNTEC/SECTAM/BASA, Belém, p. 33, 2008.

PAINTER, R. M. **Insect resistance in crop plants**, p. 520, 1951.

PANDA, N.; KHUSH, G. S. **Host plant resistance to insects**. CAB international, Wallingford, 1995.

PENNYTON, T. D. A monograph of the neotropic Meliaceae. **The New Botanical Gardens**, New York, 1981.

PINHEIRO, A. L. Resistência do mogno (*Swietenia macrophylla* King) à *Hypsipyla grandella* Zeller. **Folha Florestal**. Informativo Técnico do Departamento de Engenharia Florestal da UFV. Universidade Federal de Viçosa, 97, p. 22 – 24, 2000.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, 27, p. 771 – 780, 2004.

RODAN, B.; NEWTON, A.; VERÍSSIMO, U. M. **A Conservação do mogno: Situações e perspectivas**, p. 18, 1992.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of significant bioactive Triterpenes distributed in plants Kingdom. **Biological Pharmacological Bulletin**, 29, p. 191 – 201, 2006.

SARMENTO JUNIOR, R.G. **Biologia de *Hypsipyla grandella* (Zeller, 1848) e avaliação da resistência de *Swietenia macrophylla* King, *Cedrela odorata* L., *Toona ciliata* Roem e *Toona* sp. à broca das meliáceas em laboratório**. Dissertação de Mestrado - FCAP, p. 61, 2001.

SILVA, C. Y. **Efeito da Sazonalidade sobre a concentração de Rotenóides em Raízes de *Deguelia utilis* (A. C. Sm.) A. M. G. Azevedo (Timbó-branco) avaliado por HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**. Dissertação de Mestrado – UFPA, 2009.

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

SNYDER, L. R.; KIKERLAND, J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2º ed. John Wiley & Sons, p. 282 – 287, 1997.

SOARES, M. S. **Alguns aspectos químicos envolvidos na interação *Hypsipyla grandella* e *Swietenia macrophylla* King (mogno)**. Tese de Doutorado - UFSCar, 2002.

STOWE, K. A. Experimental evolution of resistance in *Brassica rapa*: Correlated response of tolerance I lines selected for glucosinates content. **Evolution**, 52, p. 703 – 712, 1998.

VANUCI, C.; LANGE, C.; DUPONT, B.; DAVOUST, D.; VAUCHOT, B.; CLEMENT, J. L.; BRUNCK, F. An insect antifeedant limonoid from seed *Khaya ivorensis*. **Phytochemistry**, 31, p. 3003 – 3004, 1992.

VASCONCELLOS, F. J. DE; **Madeiras tropicais de uso industrial do Maranhão: Características tecnológicas**. Manaus. INPA/UFMA, p. 62, 2001, 19^a ed.

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R. Mahogany extraction in the stein Amazon: A case study. Preservation to mahogany workshop: review and implication of cites. **Tropical Forest Foundation**, 4, p. 464, 1992.

VERÍSSIMO, A.; BARRETO, P.; TARIFA, R.; UHL, C. Extraction of a high-value natural resource in Amazônia: The case of mahogany. **Forest Ecology and Management**, 72, p. 39 – 60, 1995.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle de insetos. **Química Nova**, 26, p. 390 – 400, 2003.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: Tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, 32, p. 722 – 731, 2009.

WATERMAN, P. G. DOWNUM, K.; ROMEO, J. T.; STAFFORD, H. Phytochemical Diversity in the order Rutales. **Phytochemical Potential of Tropical Plants**. p. 203 – 233, 1993.

YAMAZAKI, S.; VASQUEZ, C. **Studies on *Hypsipyla grandella* Zeller. In: Report on Join Study Project of Performance Trials for Reforestation in de Amazon Area in the Peru Republic.** JICA/ INIAA, mogno, IV, p. 163 – 173, 1991.

Anexos

MEMORIAL

Da Silva, M. N.; Arruda, M. S.P.; **Castro, K. C. F.**; da Silva, M. F. das G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P.C. **Limonoids of the phragmalin type from *Swietenia macrophylla* and their chemotaxonomic significance.** *Journal Natural Products*, 71, 1983 – 1987, 2008.

Castro, K. C. F.; Da Costa, D. R. M.; Arruda, M. S. P.; da Silva, M. F. das G. F.; Da Silva, M. N. **Validação de método analítico por HPLC para quantificação de limonóides em folhas de mogno.** In: *Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas afins, 2010, Campos do Jordão. Programa e Resumos, 2010.*

Da Silva, M. N.; Negrão, T. de M.; dos Santos, A. C. M.; **Castro, K. C. F.**; Arruda, M. S. P.; da Silva, M. F. das G. F. **Avaliação da atividade inseticida dos limonóides isolados de *Swietenia macrophylla* sobre *Hypsipyla grandella*.** In: *33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. Programa e Resumos, 2010.*

Ferreira, N. S.; **Castro, K. C. F.**; Arruda, M. S. P.; da Silva, M. N.; Arruda, A. C.; Guilhon, G. M. S. P.; Santos, L. da S.; da Silva, M. F. das G. F.; Ohashi, O. S. **Avaliação da atividade inseticida e/ou deterrente alimentar de limonóides de *Swietenia macrophylla* sobre *Hypsipyla grandella* parte II.** In: *32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza. Programa e Resumos, 2009.*

Ferreira, N. S.; **Castro, K. C. F.**; Arruda, M. S. P.; da Silva, M. N.; Da Silva, M. F. das G. F.; Ohashi, O. S. **Avaliação da atividade inseticida e/ou deterrente alimentar de limonóides de *Swietenia macrophylla* sobre *Hypsipyla grandella*.** In: *31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Programa e Resumos, 2008.*

Ferreira, N. S.; **Castro, K. C. F.**; Arruda, M. S. P.; da Silva, M. N.; M. F. das G. F.; Fernandes, J. B.; Vieira, P.C.; Forim, M. R.; Cass, Q. B. **Desenvolvimento de um método via CLAE para quantificação de limonóides de *Swietenia macrophylla*** In *31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. Programa e Resumos, 2008.*

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)