



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LARVICIDA DAS FLORES DE  
*Tagetes patula* L.**

LETÍCIA MARIA KRZYZANIAK

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos naturais e sintéticos biologicamente ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para a obtenção em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-Orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Gisely Cristiny Lopes

MARINGÁ, 2015

**LETICIA MARIA KRZYZANIAK**

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LARVICIDA DAS FLORES DE  
*Tagetes patula* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello

Co-orientadora: Profa. Dra. Gisely Cristiny Lopes

MARINGÁ, 2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA OU ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

K94e Krzyzaniak, Leticia Maria, 1989-  
Estudo químico e atividade larvicida das flores de *Tagetes patula* L. / Leticia Maria Krzyzaniak. -- Maringá, 2015.  
112 f. : figs. color., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.  
Coorientadores: Prof. Dr. Cláudio Roberto Novello e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisely Cristiny Lopes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. *Tagetes patula*. 2. *Tagetes patula* - Métodos cromatográficos. 3. Eletroforese capilar. 4. Flavonoides. 5. Ressonância Magnética Nuclear. 6. Dengue. 7. *Aedes aegypti* - Atividade larvicida. 8. Poliamida - Cromatografia em coluna. 9. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Novello, Cláudio Roberto, coorient. III. Lopes, Gisely Cristiny, coorient. IV. Universidade Estadual de Maringá. V. Título.

CDD 21.ed. 615.321

GVS-002668

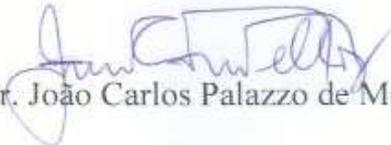
**LETÍCIA MARIA KRZYZANIAK**

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE LARVICIDA DAS FLORES DE  
*Tagetes patula* L.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de junho de 2015

**BANCA EXAMINADORA**

  
Dr. João Carlos Palazzo de Mello

  
Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior

  
Dra. Claudenice Francisca Providelo Sartor

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, Bloco K80, salas 13 e 14, Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), Central de Produtos Naturais (CPN/Comcap), Bloco B08. Parte do trabalho foi realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA, Manaus, AM.

Parte deste trabalho “Estudo de químico das flores de *Tagetes patula*” foi apresentado no V Seminário Anual do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, realizado em novembro de 2014,

Dedico esta dissertação a Deus, aos meus pais, irmãos e ao meu amor Maycon pelo incentivo, paciência e amor.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por estar presente em todos os momentos de minha vida e por ter me dado forças para encarar os desafios com dignidade.

Aos meus pais, Vitor e Helena Maria, e irmãos, Eduardo e Fabrício pelo incentivo e apoio, não somente com relação ao mestrado, mas em todos os aspectos da vida!

Ao meu amor Maycon Rodrigues Gozer por toda paciência, companheirismo, compreensão e amizade. Agradeço por estar presente em todos os momentos! Te amo...

Ao Professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela oportunidade, orientação e conhecimento transmitidos. Estes requisitos foram importantes à elaboração deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal.

À Dra. Gisely Lopes e Professor Dr. Cláudio Roberto Novello pela amizade, coorientação e transmissão das suas experiências e conhecimento.

Ao Dr. João Antônio Cyrino Zequi por ter contribuído e realizado o ensaio da atividade larvicida.

À Família Gozer e Damha, pela amizade, incentivo e pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do laboratório: Ana Carolina Guidi, André Oliveira, Andressa Blainski, Bruna Aguiar, Emilene Dias, Fernanda Bueno, Leila Marques, Lorena Pessini, Luana Magri Tunin, Maisa Leite, Mariane Ritter, Tânia Antonelli, Vanessa Munhoz, por toda ajuda, conhecimento compartilhado e convivência.

À Naiara Cássia Gancedo, Mariana Nascimento, Thiago Henrique Brito de Souza e Raquel Isolani pela ajuda neste trabalho.

À Ana Luiza Sereia pela amizade, conhecimentos compartilhados e contribuição na eletroforese capilar.

À Dra. Renata Longhini pela amizade, por toda contribuição neste trabalho e ajuda na cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao Dr. Marcelo Tempesta pelas amizade e contribuição na interpretação dos dados da atividade larvicida.

Ao Gean Pier Panizzon por ter contribuído a realização dos espectros de massas.

Ao Professor Dr. José Roberto P. Souza por ter realizado a cultura da planta na UEL. Ao Professor Dr. Jimi Nakajima, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Uberlândia por ter realizado a identificação da planta.

Ao Admir Arantes pela amizade, crescimento pessoal e auxílio técnico.

À Professora Dra. Claudenice Francisca Providelo Sartor pela amizade, conhecimentos transmitidos e por todo incentivo pela pesquisa na graduação que despertou meu interesse por esta área.

Aos meus amigos: Angélica Karina Bernardelli; Claudiane Tona, Camila Iwanaga Camila Tiburcio, Laiany Garcia, Fernanda Coellho, Lilian dos Anjos Oliveira Ferreira, Ricardo Barbosa, Cris Tavares Walter da Silva, Elicis Walter, Rudiley da Silva, Aline Bazán, Renata Algauer Nassar, Feliciano Galdino por toda amizade e estarem presente em todos os momentos.

À dona Zaira por toda amizade, paciência, cuidado e ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de vivenciar e concluir essa importante etapa da vida.

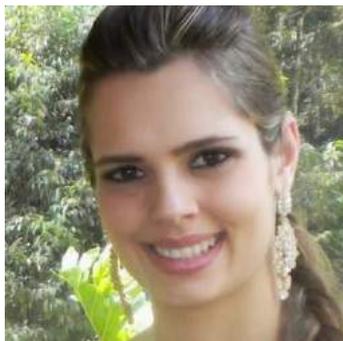
A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

**A todos vocês, o meu muito obrigada!**

*“Podemos mudar nossas vidas.*

*Podemos fazer, ter e ser exatamente aquilo que desejamos.”*

*Anthony Robbins*



**Leticia Maria Krzyzaniak** nasceu em Campo Mourão, PR, no dia 23/04/1989, filha de Vitor Krzyzaniak e Helena Maria Krzyzaniak. Estudou no Colégio Vicentino Santa Cruz até a 8ª série, concluindo o Ensino Médio no Colégio Integrado, ambos em Campo Mourão. Em 2009 ingressou no curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, onde participou de projetos relacionados às plantas medicinais (farmacologia, microbiologia e solos), sob a orientação da Profa. Dra. Claudenice Francisca Providelo Sartor e co-orientação de Daniele Fernanda Felipe, Valéria do Amaral e Sandra Magda Sanches Patroni. Em 2013 iniciou o mestrado acadêmico no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Maringá, realizando suas atividades no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito.

## RESUMO

KRZYZANIAK, LM. 2015. Estudo químico e atividade larvídica das flores de *Tagetes patula* L. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 112 p.

*Tagetes patula* L. é comumente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão. Na medicina popular suas flores e folhas têm sido utilizadas como antisséptica, diurética, depurativa e repelente de insetos. O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e a identificação estrutural de substâncias presente na fração semipurificada *n*-butanol, obtida a partir do extrato das flores de *T. patula*. Concomitantemente, avaliou-se a atividade larvídica das frações de polaridade crescente frente ao vetor *Aedes aegypti*. A partir do extrato bruto acetônico das flores de *T. patula* desengorduradas, obteve-se cinco frações semi-purificadas: hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FAE), *n*-butanol (FB) e água (FAQ). A fração FB foi fracionada por meio da cromatografia de fase reversa de poliamida (CC), obtendo-se 34 subfrações, das quais foram submetidas à cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV), das quais foram isoladas e identificadas por ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e CLAE/IES/MS os flavonoides: patuletina e patuletina-7-O-β-glicosídeo (patulitrina). O perfil do extrato bruto, FB e FAE foram determinado por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nestas amostras foram identificados os picos referentes às substâncias patuletina e patulitrina mediante a adição dos padrões e do espectro de UV/DAD. A substância majoritária na FAE é a patuletina e na FB é a patulitrina. Neste trabalho também foi desenvolvido um perfil da FB, por meio da eletroforese capilar (EC), adicionando-se padrões de patuletina e patulitrina para a identificação dos picos no eletroferograma, sendo a patulitrina a substância majoritária. A análise por EC apresentou algumas vantagens frente à CLAE, como: tempo de análise, quantidade de solventes utilizado e não utilizar solventes orgânicos. Nos resultados da atividade larvídica a FAE foi a que apresentou maior potencial para continuar os estudos frente *A. aegypti*.

Palavras Chave: *Tagetes patula*, métodos cromatográficos, eletroforese capilar, flavonoides, Ressonância Magnética Nuclear, dengue, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

KRZYZANIAK, LM 2015. Chemical study and larvicidal activity of *Tagetes patula* L. flowers. Master degree, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 112 p.

*Tagetes patula* L. (Asteraceae) is traditionally known as “cravo-francês”, “cravo-de-defunto” or “botões-de-solteirão”. Ethnomedicine the flowers and leaves have been used as an antiseptic, diuretic, depurative, and insect repellent. The aim of this study was the isolation and structural identification of compounds present in semipurified fraction of *n*-butanol (BF), obtained from the extract of *T. patula* flowers. Also, it was evaluated the larvicidal activity of acetone extract degreased (CE) and growing forward polarity fractions to the vector *Aedes aegypti*. From the CE of flowers of *T. patula*, were obtained five semi-purified fractions: hexane (HF), dichloromethane (DF), ethyl-acetate (EAF), *n*-butanol (BF), and water (AQF). The BF fraction was fractionated by reverse phase chromatography polyamide, yielding 34 subfractions. These subfractions were subjected to high-speed counter-current chromatography of which were isolated and identified by nuclear magnetic resonance (NMR) 1D (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) the flavonoids: patuletin and patuletin-7-O-β-glucoside (patulitrin). The profile of the CE, BF and EAF were analyzed by high-performance liquid chromatography. The peaks were identified as patuletin and patulitrin adding patterns and the UV spectrum/DAD. The majority compound in the EAF is patuletin and in the BF is patulitrin. This work has also been developed a profile BF by means of capillary electrophoresis, adding patterns patuletin and patulitrin, and it was demonstrated patulitrin as being the majority compound. The capillary electrophoresis analysis showed some advantages to high-performance liquid chromatography, as analysis time, amount of solvents used, and not use organic solvents. The results of larvicidal activity EAF showed the greatest potential to continue forward studies *A. aegypti*.

Keywords: *Tagetes patula*, chromatographic methods, capillary electrophoresis, flavonoids, Nuclear Magnetic Resonance, dengue, *Aedes aegypti*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flores de <i>T. patula</i> cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Londrina.....	25
Figura 2 – Flavonoides isolados e identificados em flores de <i>T. patula</i> .....	27
Figura 3 - Representação esquemática do planejamento simplex-centroide para o sistema ternário..	29
Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonoides..	33
Figura 5 – Sistema CCCAV A. Coletor B. Equipamento CCCAV e C. Bomba utilizada para purificar as amostra. ....	37
Figura 6 - Representação esquemática do sistema EC .....	38
Figura 7- Distribuição dos sorotipos da dengue na América. ....	39
Figura 8- <i>Aedes aegypti</i> : (a) em vôo (por cortesia da História Natural Museu, Londres) e (b) em repouso (© L. Robertson).....	41
Figura 9 - Fluxograma de todo o trabalho realizado, partindo das flores de <i>T. patula</i> até a identificação da substância isolada.....	49
Figura 10 - Fluxograma da partição líquido-líquido do EB das flores de <i>T. patula</i> .....	57
Figura 11 - CCD da partição líquido-líquido do EB desenvolvida com a FM a) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v) e FM b) clorofórmio: metanol (9:1, v/v). Visualização UV: 254nm. ....	57
Figura 12 - CCD da partição líquido-líquido do EB desenvolvida com a FM a) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v) e FM b) clorofórmio: metanol (9:1, v/v) seguido de revelação com vanilina clorídrica 1%. ....	58
Figura 13 - Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Visualização UV: 254 nm.....	62
Figura 14 - Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d): acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Visualização UV: 366 nm.....	63
Figura 15 - Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Revelador: vapores de iodo.....	64
Figura 16- Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Revelador: vanilina clorídrica 5%.....	65
Figura 17- Fracionamento da fração FB-16 por cromatografia em CCCAV.....	66
Figura 18 - Fracionamento da fração FB-23 por cromatografia em CCCAV.....	66
Figura 19 - Fracionamento da fração FB-26 por cromatografia em CCCAV.....	67
Figura 20 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância Tp-1 (300 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	69
Figura 21 - Espectro de COSY da substância Tp-1 (300 MHz; CD <sub>3</sub> OD). ....	70
Figura 22- Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da substância Tp-1 (75,45 MHz; CD <sub>3</sub> OD).....	72
Figura 23 - Espectro de HMBC da substância Tp1 (75,5 MHz; CD <sub>3</sub> OD). ....	72
Figura 24 - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância Tp-2 (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ). ....	74

Figura 25 - Espectro de COSY da substância Tp-2 (300 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	75
Figura 26- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância Tp-2 (75,45 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	77
Figura 27 - Espectro de HMBC da substância Tp-2 (75,5 MHz; DMSO- $d_6$ ).....	77
Figura 28 - Perfis cromatográficos por CLAE do EB de flores de <i>T. patula</i> (a) EB produzido neste trabalho; (b) EB produzido por Munhoz (2012). Picos: 1) patulitrina (Tp2) e (2) patuletina (Tp1) foram isolados neste trabalho.....	79
Figura 29 - Perfil cromatográfico por CLAE da fração acetato de etila (FAE) (a) e da fração <i>n</i> -butanol (FB) (b) do EB de flores de <i>T. patula</i> . Picos: 1) patulitrina (Tp2) e (2) patuletina (Tp1) isoladas neste trabalho.....	80
Figura 30 - Espectro UV/DAD correspondentes aos picos 1 e 2 presentes nos extrato e da FAE e FB.....	81
Figura 31- Perfil eletroforético da FB de <i>T. patula</i> . Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol/L; pH 8,80; 10 mmol/L metil- $\beta$ -ciclodextrina (metil- $\beta$ -CD); voltagem de 30 kV a 25 °C; injeção por 3 s a 0,5 psi; detecção em 214 nm; FB: 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Picos: 1) patulitrina e 2) patuletina.....	82

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Gradiente de fase móvel utilizada para cromatografia em coluna de fase reversa da fração <i>n</i> -butanol.....	51
Tabela 2 – Sistemas eluentes utilizados para as subfrações da fração <i>n</i> -butanol.....	52
Tabela 3 - Rendimento das subfrações da FB obtidas após eluição em CC contendo poliamida. ....	60
Tabela 4 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e correlações observadas no COSY de Tp-1 comparados com dados reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina (300 MHz; CD <sub>3</sub> OD). ....	69
Tabela 5- Dados de RMN de <sup>13</sup> C e HMBC, de Tp-1, comparados com dados de <sup>13</sup> C (100 MHz; CD <sub>3</sub> OD) reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina (75,45 MHz; CD <sub>3</sub> OD). ....	71
Tabela 6 - Dados de CLAE-IES-MS/MS da substância Tp-1 comparada com a literatura.....	73
Tabela 7 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H e correlações observadas no COSY de Tp-2 comparados com dados reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina 7-O-β-glicose (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	74
Tabela 8 - Dados de RMN de <sup>13</sup> C e HMBC, de Tp-2, comparados com dados de <sup>13</sup> C (100 MHz; CD <sub>3</sub> OD) reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina 7-O-β-glicose (75,5 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	76
Tabela 9 - Dados de CLAE-IES-MS/MS e da substância Tp-2 comparada com a literatura...	78
Tabela 10 - Flavonoides presentes no extrato bruto acetônico (EB), na FAE e FB correspondentes aos picos assinalados nos cromatogramas das figuras 27 e 28. ....	80

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – As diferentes classes de flavonoides, exemplos e estruturas químicas.....	34
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

$\delta$	Deslocamento químico, em ppm
CC	Cromatografia em coluna
CCCAV	Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade
CD	Ciclodextrina
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE/IES/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a ionização por “electrospray” com detecção por espectrometria de massa
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DAD	Detector de arranjo de diodos
DL <sub>50</sub>	Dose letal capaz de matar 50%
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado
DV	Droga vegetal
EB	Extrato bruto
EC	Eletroforese capilar
AcOEt	Acetato de etila
FAE	Fração de acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
FB	Fração <i>n</i> -butanol
FD	Fração diclorometano
FH	Fração hexano
FM	fase móvel
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HIV	Imunodeficiência viral humana
<i>J</i>	Constante de acoplamento, em Hertz
OMS	Organização Mundial da Saúde

PDA	Arranjo de diodos
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TFA	Ácido trifluoroacético
Tp	<i>Tagetes patula</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 ASPECTOS GERAIS .....	23
2.1.1 Família Asteraceae .....	23
2.1.2 Gênero <i>Tagetes</i> .....	23
2.1.3 <i>Tagetes patula</i> L. ....	25
2.1.3.1 Composição química .....	26
2.1.3.2 Atividade fisiológica e farmacológica da <i>T. patula</i> .....	29
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS.....	31
2.2.1 Substâncias fenólicas .....	31
2.2.1.1 Flavonoides .....	32
2.3 CROMATOGRAFIA EM CONTRA-CORRENTE DE ALTA VELOCIDADE (CCCAV) .....	36
2.4 ELETROFORESE CAPILAR (EC) .....	37
2.5 ATIVIDADE LARVICIDA .....	38
2.5.1 Dengue .....	38
2.5.2 Consideração sobre o mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	40
2.5.3 Controle.....	42
2.5.4 Plantas inseticidas no controle do <i>Aedes aegypti</i> .....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL .....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
4.1 MATERIA PRIMA VEGETAL .....	46
4.2 SOLVENTES E REAGENTES .....	46
4.3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS .....	47
4.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO .....	47
4.4.1 Partição do extrato bruto.....	48
4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA DE <i>Tagetes patula</i> .....	50
4.5.1 Métodos cromatográficos.....	50
4.5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	50
4.5.1.2 Cromatografia em coluna de fase reversa da fração FB .....	50
4.5.1.3 Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV).....	51

4.5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	52
4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	53
4.6.1 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	53
4.6.2 Análise por CLAE-IES-MS/MS .....	53
4.7 ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE).....	53
4.7.1 Preparo da solução da amostra .....	54
4.7.2 Preparo das soluções de padrões .....	54
4.7.3 Preparo da solução enxágue .....	54
4.7.4 Preparo da solução eletrolítica (tampão) .....	54
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA .....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	57
5.1 EXTRAÇÃO E PARTIÇÃO .....	57
5.2 FRACIONAMENTO DA FB.....	59
5.3 FRACIONAMENTO MEDIANTE COMATOLOGRAFIA EM CONTRA-CORRENTE DE ALTA VELOCIDADE (CCCAV) .....	66
5.4 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS .....	68
5.4.1 Substância Tp-1 .....	68
5.4.2 Substância Tp-2 .....	73
5.5 CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) .....	78
5.6 ELETROFORESE CAPILAR (EC) .....	82
5.7 ATIVIDADE LARVICIDA.....	83
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO 1 .....	99



## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais pelo homem para os mais diversos propósitos é realizada desde as primeiras civilizações (Calixto, 2005; David and David, 2010; Faizi et al., 2011b; Montanari and Bolzani, 2001). Neste contexto, sempre prevaleceu uma estreita relação entre o homem e as plantas, onde por meio de tentativa e erro o homem primitivo adquiriu conhecimentos que foram utilizados para determinar quais plantas eram valiosas como alimentos, medicamentos, e quais deveriam ser evitadas por serem venenosas ou perigosas (David and David, 2010).

No período pós Revolução Industrial, houve preferência mundial por medicamentos sintéticos aliado ao aumento da capacidade produtiva, com a obtenção de formulações mais puras e com menos efeito colateral, visto que havia dificuldade em controlar a qualidade dos extratos vegetais (Toledo, 2002).

Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, nas últimas décadas, pela crescente população que busca uma maior diversidade de plantas no cuidado da saúde, o comércio de plantas tem sido estimulado (Maioli-Azevedo and Fonseca-Kruel, 2007). Estima-se que cerca de um quarto de todos os medicamentos modernos sejam diretamente ou indiretamente derivados de plantas medicinais (Brasil, 2012).

A organização mundial da saúde (OMS) aponta que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de plantas medicinais como forma de tratamento nos cuidados primários de saúde (Calixto, 2000, 2005; Silveira et al., 2008).

Entretanto, ainda faltam estudos sobre plantas medicinais. Dentre as 300 mil, apenas em uma pequena porcentagem foi realizada a investigação fitoquímica e está, ainda é menor nas frações que foram submetidas à triagem biológica ou farmacológica (Hostettman and Marston, 2007).

A maior parte da biodiversidade do mundo encontra-se na América Latina. O Brasil possui aproximadamente 20 a 22% das plantas e microrganismos existentes no mundo. No entanto, estima-se que apenas 25.000 espécies de plantas tem sido objeto de investigação científica (Calixto, 2005). Sendo o Brasil detentor de uma flora bastante diversificada, a realização de estudos que validem as plantas como matérias-primas para produção de fármacos ou como o próprio medicamento é muito importante, constituindo uma alternativa de menor custo para melhoria da qualidade de vida de toda comunidade (Martins et al., 2006).

Dentre as plantas que requerem mais estudos encontra-se a *Tagetes patula* L., comumente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão (Vasudevan et al., 1997). Na medicina popular suas flores têm sido empregadas como antisséptica, diurética, depurativa do sangue e repelente de insetos. Suas folhas têm sido

utilizadas em problemas renais e dores musculares e suas raízes e sementes são usadas como purgativas (Chadha, 1976). Alguns estudos da composição química de *T. patula* apontam até o presente, que as flores e folhas são ricas em terpenos (Dharmagadda et al., 2005; Garg et al., 1999; Restello et al., 2009; Rondón et al., 2006), alcaloides (Faizi et al., 2011a), tiofenos (Bano et al., 2002; Rajasekaran et al., 2004) e flavonoides (Karawya et al., 1996; Piccaglia et al., 1998; Rao and Seshadri, 1941; Tarpo, 1969). Esta planta apresentou as seguintes atividades em alguns estudos: anti-hipertensiva (Saleem et al., 2004), anti-inflamatória (Kasahara et al., 2002), hepatoprotetora (Vasilenko et al., 1990), inseticida (Wells et al., 1993), nematicida (Buena et al., 2008; Chadha, 1976; Kyo et al., 1990), larvicida (Dharmagadda et al., 2005; Rajasekaran et al., 2004), antibacteriana (Rondón et al., 2006), antiviral (Anani et al., 2000) e antifúngica (Faizi et al., 2008; Mares et al., 2004; Romagnoli et al., 2005).

Portanto, diante do exposto, este trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação estrutural de substâncias obtidas a partir de uma fração semi-purificada de extrato das flores de *T. patula*, assim como avaliar a atividade larvicida frente ao agente etiológico da dengue, *Aedes aegypti*, do extrato bruto e frações semi-purificadas.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

---

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS

#### 2.1.1 Família Asteraceae

Asteraceae é uma das famílias mais antigas das plantas superiores (Langer and Hill, 1991). Este grupo representa cerca de 10% da flora mundial, apresentando o maior número de espécies, aproximadamente 23.000, as quais são organizados em 3 subfamílias, 17 tribos e 1.535 gêneros (Bremer, 1994). No Brasil encontra-se aproximadamente 3000 espécies e 300 gêneros (Souza and Lorenzi, 2005).

A família Asteraceae é mais dominante nos tipos de vegetação áridas, semi-áridas e montanhosas, mas está ausente ou pobremente representadas nas florestas tropicais (Hind, 1993).

Essa família apresenta-se raramente em árvores, são encontradas principalmente como ervas perenes e subarbustos (Heywood, 1993). Flores sempre são agrupadas em inflorescência do tipo capítulo, apresentam simetria radial ou zigomorfas até bilabiadas, são hermafroditas ou de sexo separado, podendo estar na mesma inflorescência ou em plantas dióicas. As flores são pentâmeras, com cálice profundamente modificado em papilho (piloso ou espinhoso). Ovário sempre ínfero, bicarpelar, unilocular, com um óvulo ereto. Estilete frequentemente com um anel de pelos abaixo da bifurcação. Fruto seco indeiscente, tipo aquênio. As folhas são muito variadas, inteiras ou fendidas, de disposição oposta ou alternada, podem ser latescentes ou não (Joly, 1998).

Nesta família, as classes de moléculas mais estudadas são os terpenoides e os compostos fenólicos, devido apresentarem um grande potencial farmacológico (Chagas, 2010). Entre os compostos fenólicos, realizou-se o isolamento de flavonoides, considerados importantes marcadores taxonômicos (Emerenciano et al., 2001).

A família Asteraceae apresenta grande importância econômica, são cultivadas como ornamentais, comestíveis, medicinais, inseticidas e apícolas (Beretta et al., 2008). A maioria destas plantas são polinizadas pelos insetos, como abelhas e borboletas, podendo ainda ocorrer a polinização pelo vento e beija-flores (Lane, 1996).

#### 2.1.2 Gênero *Tagetes*

O gênero *Tagetes* apresenta aproximadamente 30 espécies na América do sul e Oriente (Xu et al., 2012). Uma grande variedade das espécies de *Tagetes* é cultivada em todo mundo, sendo as espécies mais comuns a *T. minuta* L., *T. erecta* L., *T. patula* e *T. tenuifolia* Cav (Priyanka et al., 2013; Vasudevan et al., 1997).

As plantas deste gênero são robustas, assim podem ser plantadas em locais ensolarados ou com intensidade média de sol. As espécies de *Tagetes* podem se propagar por sementes, sendo que as flores das plantas aparecem 45 dias após a semeadura. Estas flores apresentam diferentes cores, sendo as mais comuns amarelas e laranja (Priyanka et al., 2013).

As espécies do gênero *Tagetes* são também muito utilizadas para fins ornamentais e nos países orientais as flores também são utilizadas para eventos religiosos e sociais. Além disto, as espécies de *Tagetes* apresentam um forte odor pungente e são utilizadas nas formulações de cosméticos (Priyanka et al., 2013; Vasudevan et al., 1997). Os pigmentos de flores também estão sendo utilizados como corante naturais de alimentos, bebidas e rações, sendo os flavonoides e os carotenoides as principais classes de pigmentos presentes neste gênero (Vasudevan et al., 1997).

No gênero *Tagetes* foram identificados aproximadamente 126 metabólitos secundários como derivados fenólicos, fenilpropanoides, derivados de tiofeno, derivados benzofurano, triterpenoides, esteroides, alcaloides, flavonoides e carotenoides. Sendo que os flavonoides são os principais componentes dentro do gênero *Tagetes*, e pode apresentar um significado nas interpretações quimiosistemática. Neste grupo já foram identificados cerca de 49 flavonoides, na forma livre ou glicosídeo (Xu et al., 2012).

As espécies de *Tagetes* produzem uma substância denominada  $\alpha$ -tertienil, que pode apresentar atividade nematicida, inseticida, antifúngica, antiviral e antibacteriana (Priyanka et al., 2013). Além destas atividades, as plantas deste gênero apresentam atividades: antioxidante (Gutiérrez et al., 2006; Li et al., 2007; Parejo et al., 2005), antinociceptiva, anti-inflamatória (Kasahara et al., 2002; Shinde et al., 2009), hepatoprotetora (Vasilenko et al., 1990), anti-hipertensiva (Saleem et al., 2004) e efeitos anticancerígenos (Block et al., 1992). As plantas deste gênero também são muito eficientes no tratamento de inflamação de pele (Priyanka et al., 2013).

Wells et al. (1993) realizaram um estudo inseticida com as substâncias voláteis das flores, folhas e raízes das plantas *T. erecta*, *T. patula* e *T. minuta* sobre *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*. No estudo verificou-se que as espécies que apresentaram melhor atividade inseticida foram a *T. patula* e *T. erecta*. Em relação às partes das plantas testadas, as flores apresentaram melhor atividade inseticida. Conclui-se que os óleos voláteis são altamente eficazes em relação às larvas e mosquitos adultos.

Deineka et al. (2007) investigaram a acumulação de xantofila de flores de três espécies: *T. erecta*, *T. patula* e *T. tenuifolia*. Utilizou-se a espectrometria para determinar o conteúdo de xantofila nas pétalas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa para determinar a composição de diésteres de luteína e antocianinas em cada

espécie. Conclui-se que mais de 90% de xantofilas em flores são retidas durante a secagem e o conteúdo de diésteres de luteína no material seco pode ser superior a 15 mg/g.

Marotti et al. (2010) investigaram a produção de tiofenos das raízes, brotos e flores das espécies *T. patula*, *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. lucida*, *T. minuta*, *T. patula* e *T. tenuifolia*. As raízes apresentaram maior diversidade e conteúdo de tiofenos (de 64 a 100% da quantidade total de tiofeno), e os principais componentes foram: 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (BBTOAc), 2,2':5',2"-tertienil ( $\alpha$ -Tertienil) e 5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (BBTOH), sendo que a *T. lucida* e *T. tenuifolia* apresentaram as maiores quantidades de tiofenos totais. Em estudo realizado pelo mesmo grupo com as mesmas espécies de *Tagetes* a análise da constituição dos óleos essenciais das flores e folhas foi realizada por meio da cromatografia em fase gasosa (CG) e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Nos resultados os autores observaram que as folhas são ricas em conteúdo de óleos essenciais, enquanto as flores e folhas de cada espécie mostraram composições de óleo qualitativos muito semelhantes. As espécies *T. erecta*, *T. minuta*, *T. patula* e *T. tenuifolia* apresentam o mesmo conjunto de componentes dihidrotagetona, tagetonas, ocimenonas e piperitona, sendo os mais abundantes a piperitona, (*E*)-tagetona, terpinolena e (*E*)-ocimenona (Marotti et al., 2004).

### 2.1.3 *Tagetes patula* L.

*T. patula*, popularmente conhecida como cravo-francês, cravo-de-defunto ou botões-de-solteirão, tem origem no México. Foi introduzida em várias regiões, incluindo o Brasil, onde se aclimatou perfeitamente, tornando-se subespontânea (Vasudevan et al., 1997) (Figura 1).



Figura 1 - Flores de *T. patula* cultivadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Londrina. Fonte: Adaptado de Munhoz (2013).

*T. patula* é uma planta herbácea anual, possui caule baixo, de 20-30 cm de altura, com folhagem com cheiro característico e coloração verde escura. Suas flores são dispostas em capítulos (simples ou dobrados). Estas podem apresentar em três tonalidades: amarelo, alaranjado e marrom-avermelhado (Lorenzi and Souza, 1995).

De acordo com Vasudevan et al. (1997), a *T. patula* é comercializada livremente nas feiras populares e em floriculturas, devido ser muito utilizada como ornamento de jardins e floreiras.

*T. patula* é uma espécie de planta de pleno sol e grande resistência, com a possibilidade de ser cultivada em regiões tropicais durante o período do verão (Lorenzi and Souza, 1995).

Na medicina popular suas folhas têm sido utilizadas em problemas renais e dores musculares e suas raízes e sementes são usadas como purgativas. Suas flores têm sido empregadas como antisséptica, diurética, depurativa do sangue e repelente de insetos (Chadha, 1976).

#### **2.1.3.1 Composição química**

Piccaglia et al. (1998) identificaram mediante CLAE combinada com um detector por arranjo de diodos (DAD) a presença de luteína e teor de ácido graxo de luteína nas pétalas e dos cálices das espécies *T. patula* e *T. erecta*. No perfil da cromatografia apresentou a luteína e oito ésteres de luteína, sendo os mais abundantes o dimiristato, miristato palmitato e dipalmitato-estearato. Garg et al. (1999) identificaram mediante CG/EM as substâncias dipalmitato de luteína, além dos flavonoides patuletina, patulitrina e 2-metil-6-metileno-2,7-octadieno 1-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, um monoterpenoglicosídeo acíclico.

Além da patuletina (1) e patulitrina (2) nas flores desta espécie, foi relatada a presença dos flavonoides: canferol (3) e quercetina (4) (Ivancheva and Zdravkova, 1993), quercetagetina-5-metil-éter (5), luteolina (6), quercetagetatina (7), quercetagetrina (8) (Bhardwaj et al., 1980) e rutina (9) (Faizi et al., 2011a) (Figura 2).

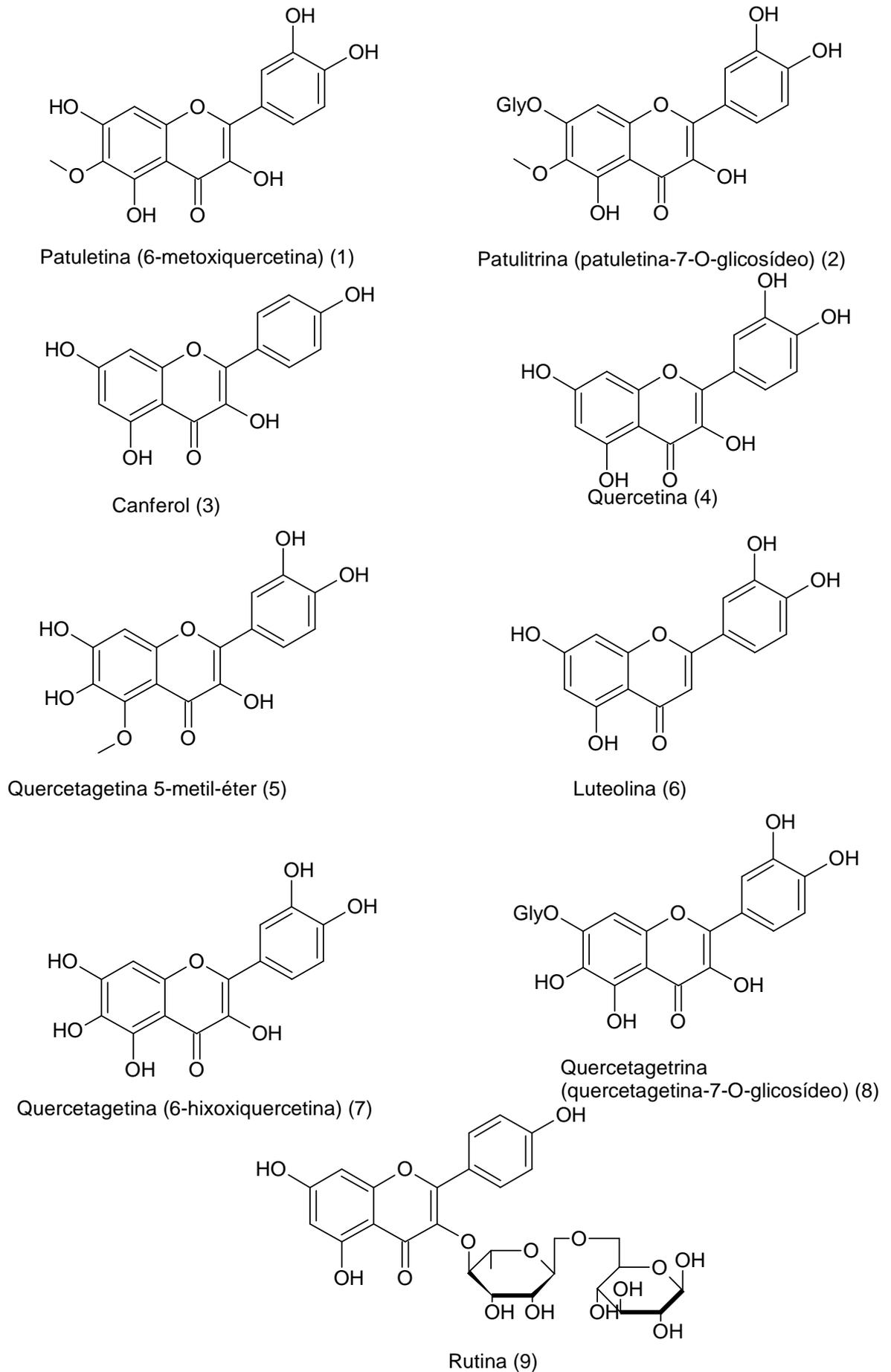


Figura 2 – Flavonoides isolados e identificados em flores de *T. patula*..

Rajasekaran et al. (2004) realizaram um estudo com a raiz de *T. patula* para verificar a produção de tiofeno. A análise de tiofeno foi realizada mediante os métodos de detecção de ionização de chama e CG/EM. Como resultado, indicou a presença de vários tiofenos estruturalmente diferentes, predominantemente o  $\alpha$ -tertienil.

Análise do óleo essencial extraído dos capítulos da *T. patula* foi realizada utilizando CG e CG/EM. Foram identificados trinta compostos, sendo os principais: piperitona (24,74%), piperitenona (22,93%), terpinoleno (7,8%), dihidrotagetona (4,91%), *cis*-tagetona (4,62%), limoneno (4,52%) e allo-ocimeno, (3,66%) (Romagnoli et al., 2005). Outro estudo utilizando as partes aéreas de *T. patula* analisou o óleo essencial mediante CG/EM, e foram identificados trinta componentes, sendo que os principais constituintes foram: piperitona, *trans*- $\beta$ -ocimeno, terpinoleno e  $\beta$ -cariofileno (Rondón et al., 2006). Restello et al. (2009) também realizou a caracterização química do óleo essencial presente nas folhas e caules de *T. patula*. Assim identificou as substâncias: limoneno (37,05%), terpinoleno (32,61%), piperitona (14,40%), eofitadieno (5,91%), sabineno (2,88%), *trans*-ocimeno (2,02%),  $\beta$ -cariofileno (1,98%), farnesol (1,84%) e  $\alpha$ -pineno (1,30%).

Hassanpouraghdam et al. (2011) identificaram quarenta constituintes no óleo da semente de *T. patula* mediante CG/EM. As principais subclasses encontradas foram os hidrocarbonetos sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpenos, sendo os principais constituintes do óleo volátil foram (*E*)-cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno D, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno e limoneno.

O nosso grupo de pesquisa, realizou um estudo para o desenvolvimento de parâmetros farmacognósticos das flores de *T. patula*. No ensaio por hidro-destilação encontraram o rendimento do óleo essencial das flores de 0,15%. Através de testes colorimétricos detectaram a presença de flavonoides, taninos e fenólicos simples. Ainda, foi identificada a quercetina mediante aos métodos de cromatografia de camada delgada (CCD) e CLAE (Munhoz et al., 2012). Outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa realizou a otimização do processo extrativo das flores de *T. patula* com base no conteúdo de flavonoides totais mediante ao planejamento experimental de misturas (Figura 3). Foi utilizado um planejamento simplex-centroide, com  $2q^{-1}$ , para 3 componentes com cinco repetições no ponto central, as soluções extratoras foram: (x1) acetona; (x2) etanol, e (x3) água. Na preparação dos extratos, as flores foram submetidas à extração em turbo-extrator, na proporção de 2,5% (m/v). Este estudo demonstrou com base no conteúdo de flavonoides que o solvente puro acetona é o melhor líquido extrator. Verificou-se também que o extrato acetônico apresentou uma maior capacidade antioxidante, sugerindo assim que a quantidade de flavonoides pode estar diretamente relacionada (Munhoz, 2013).

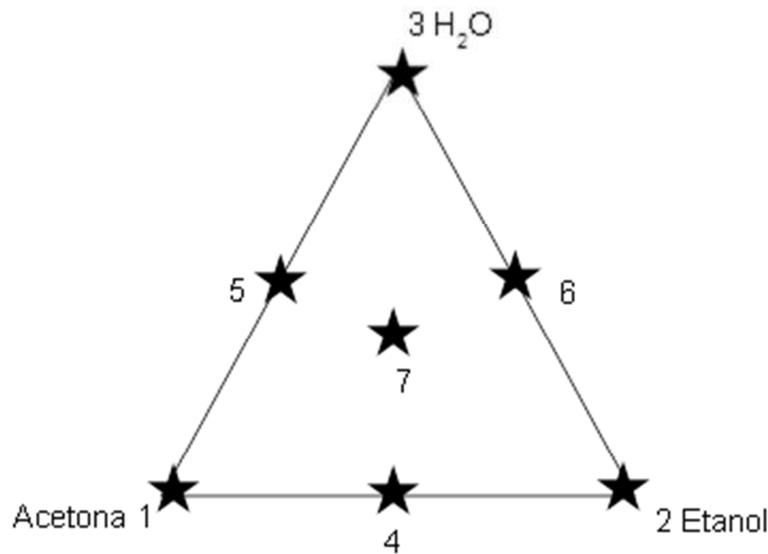


Figura 3 - Representação esquemática do planejamento simplex-centroide para o sistema ternário. Fonte: Munhoz (2013).

Faizi et al. (2011a) também identificaram os ácidos graxos, ésteres metílicos e tiofenos (tertienil) da fração éter de petróleo das flores amarelas de *T. patula*. No extrato metanólico identificaram os fenólicos patuletina, patulitrina, quercetina, rutina, ácido benzóico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido metil 3,4-dihidroxibenzoato, ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) e ácido 4-metoxibenzoico.

### 2.1.3.2 Atividade fisiológica e farmacológica da *T. patula*

Um estudo da ação anti-inflamatória em camundongos e ratos realizado por Kasahara et al., (2002) verificou que o extrato metanólico das flores de *T. patula* inibiu a inflamação aguda e crônica em camundongos. Este extrato suprimiu significativamente o edema de pata induzida por  $\alpha$ -carragenina em camundongos. Além disto, observou a supressão do aumento da permeabilidade vascular por meio de ácido acético na inflamação aguda, indicando que atua principalmente na fase exsudativa da inflamação. Na inflamação crônica não inibiu a proliferação de tecido de granulação.

Saleem et al., (2004) verificaram a atividade anti-hipertensiva e a toxicidade em ratos das substâncias isoladas do extrato metanólico da raiz de *T. patula*. Como resultado, obteve-se que o ácido cítrico e ácido málico causaram 71 e 43% de queda da pressão arterial média nos ratos, nas doses de 15 e 30 mg/kg, respectivamente. Enquanto que o cloridrato de pirimidina produziu aumento de 34% na pressão média dos ratos na dose de 30 mg/kg. Em relação à toxicidade verificou-se que o ácido cítrico foi a substância que

apresentou maior toxicidade, o qual o DL<sub>50</sub> e DL<sub>100</sub> foi respectivamente 545 mg/kg e 1000 mg/kg.

Mares et al. (2004) investigaram a atividade antifúngica do extrato metanólico obtido a partir da planta *T. patula* frente aos microrganismos *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme* e *Pythium ultimum*. A atividade antifúngica foi testada, tanto no escuro como no claro, usando dois sistemas de iluminação diferentes. Os dados demonstraram que a atividade antifúngica é dose dependente do extrato e existe diferença entre o tratamento no claro e no escuro. Os resultados indicam que a presença de uma fonte luminosa aumenta a atividade antifúngica, com pequenas diferenças entre os raios UV-A e de espectro de luz solar. Ainda verificou que o extrato de *T. patula* contribui para alterações da membrana e conduz para o envelhecimento prematuro do micélio do *Pythium ultimum*.

Romagnoli et al. (2005) verificaram que óleo essencial dos capítulos da planta *T. patula* apresenta uma boa atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*, proporcionando a inibição de crescimento completo com 10 e 1,25 µL/mL, respectivamente. Este estudo também mostrou que os dois compostos majoritários, piperitona e piperitenona, apresentam eficácia atividade antifúngica, além disto, observou-se alterações ultraestruturais em micélio através de microscopia eletrônica, evidenciando grandes alterações na morfologia das hifas.

Dharmagadda et al. (2005) realizaram o estudo da atividade larvicida do óleo essencial de *T. patula* frente às larvas: *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. Foram testadas quatro concentrações de óleo essencial e os resultados foram comparados com o de inseticida sintético malationa. O óleo essencial apresentou um bom potencial larvicida, sendo que a melhor atividade foi observada frente a *Ae. aegypti* (CL<sub>50</sub> 13,57 ppm; CL<sub>90</sub> 37,91 ppm), seguido por *A. stephensi* (CL<sub>50</sub> 12,08 ppm; CL<sub>90</sub> 57,62 ppm) e *C. quinquefasciatus* (CL<sub>50</sub> 22,33 ppm; CL<sub>90</sub> 71,89 ppm). Rajasekaran et al. (2004) investigaram a atividade larvicida para os tiofenos das raízes de *T. patula* utilizando as mesmas larvas dos mosquitos citadas anteriormente. Os autores verificaram que o tiofeno apresenta atividade contra *Ae. aegypti*, *A. stephensi* e *C. quinquefasciatus*.

Um estudo realizado por Faizi et al. (2008) verificou a atividade antimicrobiana e antifúngica nos extratos das partes aéreas, raízes e sementes de *T. patula*, sendo que os extratos das flores enriquecidos com flavonoides apresentaram maior potencial antimicrobiano. O flavonoide patuletina apresentou atividade antibacteriana frente a *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Micrococcus luteus* com a concentração inibitória mínima (CIM) 12,5 µg/disco. Outro estudo realizado por Ramya et al. (2012) verificou atividade antimicrobiana do extrato etanólico de flores de *T. patula* frente à *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Escherichia coli*.

Um estudo realizado com óleo essencial das partes aéreas da planta *T. patula* demonstrou forte atividade antibacteriana frente as bactérias Gram positivas e Gram negativas no método difusão em disco. A CIM para as bactérias foram: *S. aureus* (30 µg/mL), *Enterococcus faecalis* (30 µg/mL), *E. coli* (60 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (90 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (130 µg/mL) (Rondón et al., 2006).

Um estudo utilizando as folhas e o caule de *T. patula* investigou o efeito do óleo essencial sobre atratividade e/ou repelência e a atividade inseticida sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky adultos. O *S. zeamais* é uma praga que ataca grãos, contribuindo assim para a diminuição da produtividade da safra. Neste estudo o óleo essencial das folhas e do caule foi eficaz no controle de *S. zeamais* adulto, apresentou um efeito repelente e inseticida na concentração de 10 µL (Restello et al., 2009).

Buena et al. (2008) realizaram a atividade nematocida da *T. patula* frente os parasitas *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica*, *M. incognita* e *M. hapla*, consideradas pragas agrícolas. Destes quatro parasitas apenas o *M. hapla* apresentou resistência frente a *T. patula*.

Faizi et al. (2011a) realizaram um estudo de isolamento bioguiado dos extratos de flores amarelas de *T. patula* sobre o *Heterodera zea*. Na investigação *in vitro* do extrato metanólico e as frações levou ao isolamento de compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos. No estudo, os compostos obtidos comercialmente,  $\alpha$ -tertienil, ácido gálico e ácido linoleico apresentaram mortalidade de 100% em concentrações de 0,125% após 24 h. Avaliação da relação estrutura e atividade nematocida demonstrou que o aumento da atividade dos ácidos fenólicos ocorre com a adição do número de grupos hidroxilas. Nos ácidos graxos, a atividade nematocida depende do comprimento da cadeia e o número e posição das ligações duplas.

## 2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

### 2.2.1 Substâncias fenólicas

Compostos fenólicos são metabólitos secundários que abrangem grandes diversidades de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila (Carvalho et al., 2010; Harborne, 1998). Estas substâncias estão normalmente localizadas nos vacúolos das células, apresentam caráter hidrossolúvel, portanto podem estar ligadas a açúcares e glicosídeos (Harborne, 1998).

Substâncias fenólicas incluem fenóis simples, ácidos fenólicos, lignanas, ligninas, cumarinas, flavonoides e taninos (Shahidi and Naczki, 2004). Estes compostos apresentam múltiplas funções devido a sua diversidade química. Muitos podem atuar na defesa contra

herbívoros e patogênicos, enquanto outros apresentam função como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, no suporte mecânico, na proteção contra a radiação ultravioleta ou na redução do crescimento de plantas competidoras próximas (Lincoln and Zeiger, 2009).

Os fenóis têm a capacidade de se complexarem a proteínas por meio de ligações de hidrogênio. Quando as membranas das células vegetais são destruídas e os constituintes celulares se reúnem, como no caso da produção de extratos brutos, ocorre a inibição da atividade enzimática da planta. No entanto, os compostos fenólicos são muito suscetíveis à oxidação enzimática, pois sofrem ação das enzimas fenolases, presentes em toda porção do vegetal (Harborne, 1998).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais (Es-Safil et al., 2003). Em alimentos, os fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, flavor, odor e estabilidade oxidativa de produtos. Além disso, a capacidade de proteção à saúde e propriedades antinutricionais de outros fenólicos são de grande importância para produtores, processadores e consumidores (Angelo and Jorge, 2007).

Os compostos fenólicos por serem aromáticos apresentam uma intensa absorção na região do UV (Carvalho et al., 2010; Harborne, 1998). Além disso, são facilmente oxidáveis, tanto pela ação de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, da luz e do calor, ou em meio alcalino, ocasionando em escurecimento de soluções ou dos compostos isolados (Carvalho et al., 2010).

De acordo com Haslam (1996), vários estudos com polifenóis foram realizados, verificando assim diversas atividades fisiológicas e farmacológicas como: ação bactericida, ação moluscicida, ação anti-helmíntico, anti-hepatotóxica, inibição da replicação do vírus na imunodeficiência viral humana (HIV), atividade antitumoral, efeitos citotóxicos e inibição de promoção dos tumores, entre outras.

### **2.2.1.1 Flavonoides**

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides. São conhecidos mais de 4200 tipos de flavonoides, sendo mais abundantes em angiospermas (Zuanazzi and Montanha, 2010). Este grupo é muito extenso, devido a sua ampla distribuição no reino vegetal e pelo número de seus constituintes naturais (Costa, 2002).

Os flavonoides podem ser encontrados em diversas formas estruturais, a maioria dos representantes desta classe apresenta como estrutura básica o núcleo fundamental com 15 átomos de carbono em um núcleo básico arranjados na configuração C6-C3-C6, isto é, são

dois anéis aromáticos que pode ou não formar um terceiro anel, ligados a vários substituintes (Figura 4) (Vila, 2006).

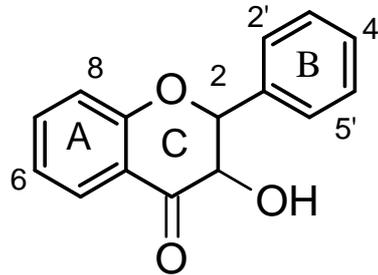
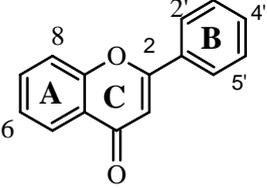
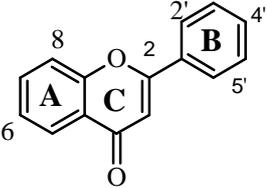
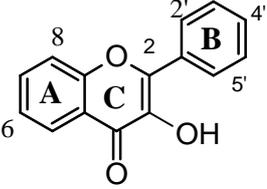
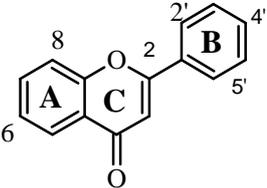
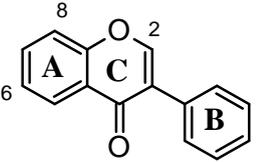
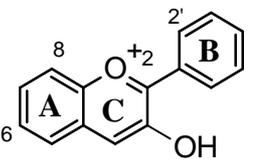


Figura 4 - Núcleo fundamental dos flavonoides. Fonte: Dornas, Oliveira et al., (2007).

Os flavonoides são classificados de acordo com sua estrutura química e subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (Figura 5) (Bravo, 1998).

Quadro 1 – As diferentes classes de flavonoides, exemplos e estruturas químicas. (Adaptado de Heim et al., (2002).

CLASSES	Estrutura geral	Flavonoide	Substituição
Flavanol		(+)-catequina	3,5,3',4'-OH
		(-)-epicatequina	3,5,7,3',4'-OH
		epigallocatequina-galato	3,5,7,3',4',5'-OH, 3-galato
Flavana		Crisina	5,7-OH
		apigenina	5,7,4'-OH
		rutina	5,7,3',4'-OH, 3-rutinese
Flavonol		luteolina	5,7,3',4'-OH
		glicosídeos de luteolina	5,7,3'-OH, 4'-glicose
		Canferol	3,5,7,4'-OH
		quercetina	3,5,3',4'-OH
		miricetina	3,5,7,3',4',5'-OH
Flavanona		Tamarexetina	3,5,7,3',4',-OH, 4'-OMe
		Naringenina	5,7,4'-OH
Isoflavona		Genistina	5,4'-OH, 7-glicose
		Genisteína	5,7,4'-OH
Antocianidina		Apigenidina	5,7,4'-OH
		Cianidina	3,5,4'-OH, 3,5-OMe

Estão presente em todas as partes da planta, desde a raiz até flores e frutos. Eles podem ser encontrados naturalmente na forma conjugada como açúcares, conhecida também como heterosídeos, também pode ser encontrado na forma livre, sem açúcar,

denominada de aglicona ou genina. A ligação do açúcar-genina ou açúcar-aglicona pode ser do tipo C- ou O-heterosídeo (Zuanazzi and Montanha, 2010).

Para a identificação e isolamento de flavonoides são realizadas várias metodologias, principalmente cromatográfica e espectroscópicas, entre os métodos cromatograficos encontra-se a coluna de poliamida. A cromatografia em coluna de poliamida é amplamente utilizada para separação de polifenóis, como os flavonoides (Shu et al., 2013). De acordo com Mabry et al. (1970), a poliamida parece ser o melhor adsorvente para a separação cromatográfica de todos os tipos de flavonoides. Além de compostos fenólicos, a poliamida pode ser utilizada para a separação de terpenoides, esteroides, alcaloides e carboidratos. A poliamida é constituída pela polimerização de grupos amida, assim é uma classe de compostos de elevado peso molecular (Zhao, 2012). Esta fase estacionária apresenta a capacidade de adsorver ânions por meio das interações eletrostática, assim tem uma excelente capacidade de adsorção em relação aos compostos fenólicos (Shu et al., 2013).

O efeito de adsorção da poliamida pode estar relacionado com o número de ligações duplas conjugadas e número de fragmentos aromáticos da molécula. Outro fator que pode estar relacionado são os grupos hidroxilas fenólicas presentes na molécula, quanto maior a quantidade maior é a adsorção (Zhao, 2012).

Em um sentido amplo, os flavonoides são considerados como os pigmentos dos vegetais. As colorações distinguem-se em amarelos, vermelhos, azuis e violetas, ou flavonoides incolores (Cunha et al., 2003). Nas plantas, os flavonoides apresentam várias funções, entre elas: proteção contra os raios ultravioleta e visível, proteção contra microrganismos patogênicos; atraentes para animais com a finalidade de polinização; controle da ação dos hormônios vegetais; antioxidante; alelopática e inibição enzimática (Zuanazzi and Montanha, 2010).

Os flavonoides são antioxidantes naturais que estão presentes na dieta humana. Eles contribuem para as propriedades antioxidantes dos vegetais verdes, frutas, azeite e óleos de soja, vinho tinto, chocolates e chás (Ren et al., 2003; Yao et al., 2004).

Os flavonoides apresentam diversas atividades biológicas para os seres humanos, como: antifúngica (Gafner et al., 1996; Wächter et al., 1999; Zheng et al., 1996), antitrombótica (Alcaraz and Ferrándiz, 1987; Tzeng et al., 1991), anti-inflamatória (Ferrándiz and Alcaraz, 1991; Ferrándiz et al., 1990; Kim et al., 1998), antioxidante, estrogênica (Harborne and Williams, 2000), hipolipidêmica (Santos et al., 1999), antiviral (Kaul et al., 1985), vasodilatadora (Correa-Hernández et al., 2008), antibacteriana (Harborne and Williams, 2000; Taguri et al., 2004; Tereschuk et al., 1997) e citotóxica (Makino and Fujimoto, 1999). Além disto, pode apresentar ação antialérgica, atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, anti-hipertensivo (Bravo, 1998; Di Carlo et al., 1999; Lopes et al., 2000).

A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e interação com as membranas (Barreiros et al., 2006). De acordo com Cao et al. (1997) a atividade antioxidante está diretamente relacionada com o número de hidroxilas, de modo geral, quanto maior a quantidade de OH nos flavonoides apresentam maior atividade como agente doador de hidrogênio e elétrons. Conforme Harborne e Williams (2000) os flavonoides agem como agentes de limpeza de várias espécies oxidantes, isto é, ânion superóxido, o radical hidroxil ou peroxi. Eles também podem atuar como supressores de oxigênio singlete.

Nas indústrias farmacêuticas vem crescendo o interesse pelos flavonoides, devido estes não apresentarem efeitos colaterais. Entretanto, ainda faltam estudos para determinar as concentrações destas espécies em diferentes plantas e ainda conhecer melhor sobre a capacidade antioxidante destas substâncias. Além disto, nas indústrias os flavonoides são utilizados como flavorizantes, corantes e aromatizantes (Lima and Bezerra, 2012).

### 2.3 CROMATOGRAFIA EM CONTRA-CORRENTE DE ALTA VELOCIDADE (CCCAV)

De acordo com Marston e Hostettmann (1994) a CCCAV é ideal para a separação de flavonoides (agliconas e glicosídeos) por não acontecer adsorção irreversível.

A cromatografia em contra-corrente é uma técnica de separação que não utiliza fase estacionária sólida, mas dois líquidos imiscíveis, pertencentes a fase móvel e fase estacionária (Berthod, 1991). O equipamento tem uma coluna que é geralmente constituída por um tubo contínuo enrolado e colocado em um eixo giratório. Essa coluna sofre uma ação de uma força centrífuga ocasionada pelos processos de rotação planetária sobre o eixo do equipamento, entre 700-800 rpm. Esta coluna é equilibrada por um contrapeso. A coluna é inicialmente preenchida com a fase estacionária através da bomba. Após, a fase móvel é bombeada, com fluxo determinado, com o equipamento ligado com rotação de 700-800 rpm, até estabilizar o sistema (Marston and Hostettmann, 1991). Após a injeção no CCCVA a amostra é fracionada e as frações resultantes são coletadas em tubos e monitoradas por CCD. Para melhor compreensão do funcionamento do CCCVA, a Figura 19 descreve o sistema utilizado neste trabalho (coletor, equipamento CCCVA e a bomba).

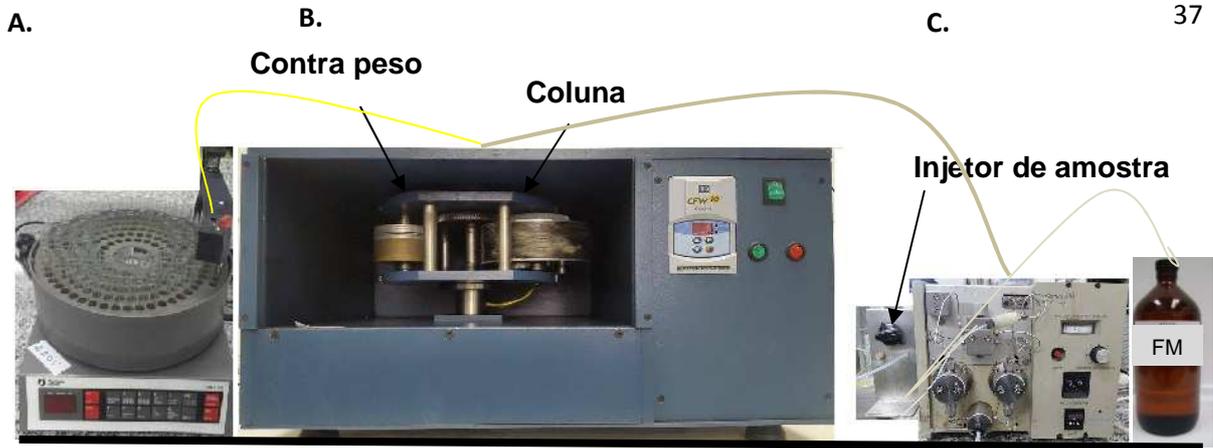


Figura 5 – Sistema CCCAV A. Coletor B. Equipamento CCCAV e C. Bomba utilizada para purificar as amostras. Fonte: Letícia Maria Krzyzaniak, 2015.

A CCCAV é uma forma de cromatografia aceita como uma técnica eficiente preparativa, amplamente utilizada para a purificação e separação de produtos sintéticos e naturais. Dentre as vantagens desta técnica podem ser citadas: uso em escala preparativa, rapidez e economia (Ito, 2005). Além disto, apresenta as vantagens de baixo consumo de solvente e baixo risco da desnaturação da amostra. Outra vantagem da CCCAV maior recuperação da amostra, devido esta técnica não apresentar fase estacionária sólida. Alguns métodos convencionais utilizam, por exemplo, coluna de sílica gel que é adsorvente irreversíveis (Hostettmann et al., 2001).

De acordo com a literatura a CCCAV apresenta algumas vantagens comparadas com o CLAE preparativo como menores quantidades de fase móvel requeridas e não adsorção dos analitos na fase estacionária. Porém, a CLAE apresenta menor tempo de análise e melhor resolução (Março et al., 2008) A CCCVA apresenta algumas desvantagens como a formação de emulsões no interior da coluna quando trabalha com misturas complexas como extratos de plantas (Silva, 2011).

## 2.4 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

Alguns estudos com *T. patula* foram desenvolvidos utilizando métodos cromatográficos e espectroscópicos (Karawya et al., 1996; Munhoz et al., 2012; Rajasekaran et al., 2004). Contudo, até o presente momento, nenhum estudo com *T. patula* utilizou a eletroforese capilar como avaliação quantitativa e qualitativa.

A EC é um método de análise física com base na migração dentro de um capilar carregado de analitos dissolvido numa solução de eletrólito, sob a influência de um campo elétrico de corrente contínua (European Pharmacopeia, 2006).

O sistema de EC consiste em um capilar (geralmente de sílica fundida), frasco de origem e destino que são preenchidos com solução eletrolítica (geralmente uma solução de

tampão aquoso) (Figura 5). Uma fonte de energia de voltagem até 30 kV e corrente elétrica 0 a 300  $\mu$ A são utilizadas para aplicar um campo elétrico. Este sistema apresenta um detector e um computador para o gerenciamento dos dados (Ito, 2011; Tagliaro et al., 1998; Xu, 1996). Quando aplicado um campo elétrico os solutos migram por meio do capilar pela interação do fluxo eletroosmótico do tampão e da mobilidade eletroforética dos solutos. Os solutos migram através de capilar com velocidades diferentes, passam pelo detector com tempos diferentes, aparece assim no eletroferograma com tempos de migração diferentes (Ito, 2011)

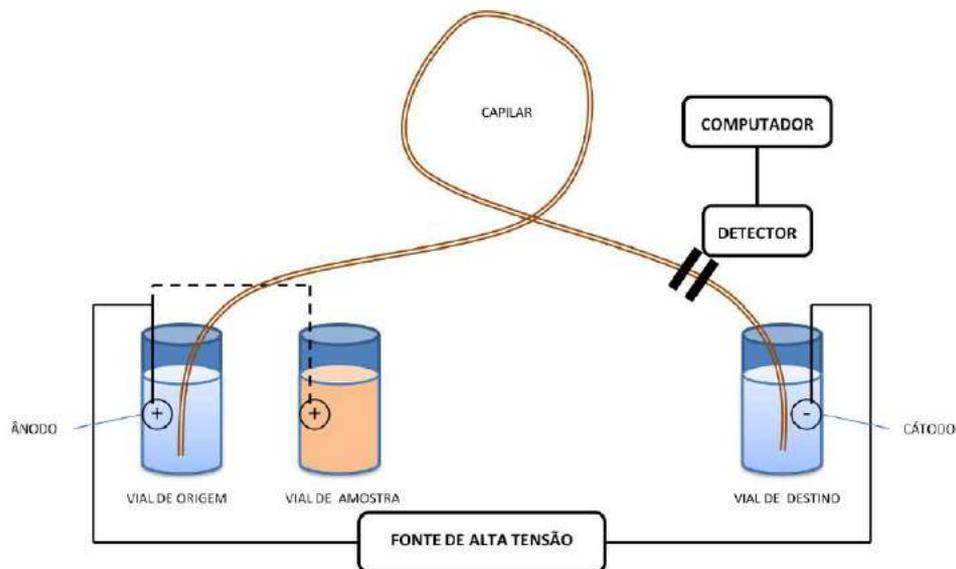


Figura 6 - Representação esquemática do sistema EC. Fonte: Ito, (2011).

A eletroforese capilar (CE) pode ser utilizada na análise fitoquímica, por exemplo, para as classes de flavonoides, alcaloides, terpenos, ácidos fenólicos, cumarinas e quinona (Suntornsuk, 2002).

## 2.5 ATIVIDADE LARVICIDA

### 2.5.1 Dengue

A dengue é uma doença viral transmitida pelo mosquito do gênero *Aedes*. Nos últimos 50 anos, com a expansão geográfica para novos países, a sua incidência aumentou 30 vezes (Galli and Chiaravalloti Neto, 2008; World Health Organization, 2009).

O *Aedes aegypti* foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (Consoli and Oliveira, 1994). O primeiro caso epidemiológico brasileiro ocorreu na temporada 1981/1982 em Boa Vista, capital do Estado de Roraima, cujos sorotipos eram 1 e 4, e desde então sucessivas epidemias tem ocorrido em diversos estados, inclusive com a introdução de novos sorotipos (Brasil, 2009).

Na década de 90, foram registradas três ondas epidêmicas da doença atingindo níveis mais elevados em 1998, com 528.388 casos notificados. Nos anos seguintes ocorreu uma redução da incidência, mas em 2001 registraram-se 428.117 casos e em 2002, 672.371 casos. Em consequência destes fatos ocorreu o aumento de caso de febre hemorrágica da dengue, registrando 682 casos em 2001 e 2.090 em 2002, com taxa de letalidade de 4,2 e 4,6%, respectivamente (Timbó, 2006). Em 2014 foram notificados no Brasil 590.852 casos, estando presentes os quatro sorotipos (DEN 1-4) (Paho/Who, 2015).

Os vírus da dengue (DEN) pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Apresentam quatro sorotipos diferentes (DEN 1-4) (Nogueira et al., 2000). Os quatro sorotipos estão presente simultaneamente em sete países das Américas: Brasil, Equador, Guatemala, México, Nicarágua, Peru e Venezuela (Figura 6) (Martín, 2014).



Figura 7- Distribuição dos sorotipos da dengue na América. Fonte: Martín, (2014).

Os vários sorotipos do vírus da dengue são transmitidos aos seres humanos por meio da picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, principalmente *A. aegypti* (World Health Organization, 2009).

A infecção com um desses vírus pode resultar em febre, dor de cabeça e erupção cutânea. O espectro clínico pode variar, contudo, de assintomático até infecções mais graves com sangramento e síndrome do choque associado à dengue. No entanto, nas áreas em que a pessoa está sujeita a epidemias causadas por diferentes sorotipos, pode ocorrer uma forma mais grave de infecção chamada febre hemorrágica da dengue (FHD). Esta infecção inclui manifestação como hemorragia e choque, que é o resultado de uma perda repentina do volume intravascular ao vazamento vascular (McBride and Bielefeldt-Ohmann, 2000).

Ainda não existe tratamento específico para a dengue, a única maneira de prevenir a doença é aplicar estratégias para controlar o vetor, identificando as áreas e o período de risco (Tran et al., 2004).

Desde 2003, os países da Região das Américas têm implementado a Estratégia de Gestão Integrada da Dengue (Dengue-IMS) para a prevenção e controle da dengue. Esta estratégia (Dengue-IMS) inclui seis áreas de trabalho: epidemiologia, laboratório, assistência ao paciente, comunicação social, o meio ambiente e gestão integrada de vetores (Paho/Who, 2014).

### 2.5.2 Consideração sobre o mosquito *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* (Diptera: *Culicidae*) é um mosquito originário do continente Africano, mais precisamente do Egito, que inclusive compõe o sufixo do nome científico *aegypti*, sendo que existem populações doméstica e selvagens. Em 1881, Carlos J. Finlay reconheceu este mosquito como transmissor da febre amarela. As primeiras evidências de que o mosquito também era o vetor da dengue foram publicadas por Bancroft em 1906, este fato foi posteriormente confirmado por Agramonte (1906) e por Simmons em 1931 (Braga and Valle, 2007).

Nos países tropicais *Ae. aegypti* é um importante vetor de febre amarela, dengue, febre hemorrágica da dengue e outras doenças virais. A espécie *Ae. albopictus*, também pode transmitir dengue (Rozendaal, 1997).

No Brasil, *Ae. aegypti* é atualmente considerado o principal transmissor da dengue e foi o único vetor conhecido de febre amarela urbana (Consoli and Oliveira, 1994). Este mosquito desenvolve-se em recipientes contendo água parada, em buracos nas árvores ou em plantas próximas a habitações urbanas (Brooks et al., 1998), O *Ae. aegypti* (Figura 7) é facilmente reconhecido pelos contrastantes anéis pretos e brancos em sua pernas e com

nítida marcação prateada no tórax em forma de lira (Consoli and Oliveira, 1994; Eiras, 2011).

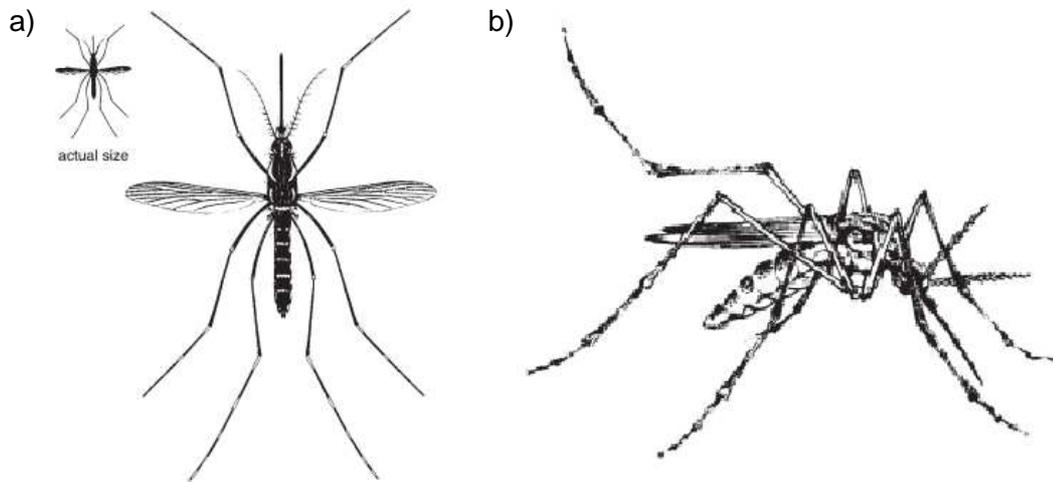


Figura 8- *Aedes aegypti*: (a) em vôo (por cortesia da História Natural Museu, Londres) e (b) em repouso (© L. Robertson). Fonte: Consoli; Oliveira (1994).

O mosquito é predominantemente sinantrópico, apresentam hábitos antropofílicos, e uma grande capacidade de adaptação em criadouros artificiais com água (Medeiros et al., 2011).

Os mosquitos são homometábolos, ou seja, passam pelas fases de ovo, larva (quatro estágios= L1, L2, L3 e L4), pupa e adulto (Eiras, 2011). Os ovos são postos na superfície da água, dão o nascimento às larvas, que vivendo neste ambiente transforma-se em pupas e após transforma-se para forma adulta (alados) (Timbó, 2006).

As fêmeas de *Ae. aegypti* apresentam hábitos hematofagos aos horários diurnos, sendo seus picos de maior atividade situados no amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, porém não impede sua ação a qualquer hora do dia (Consoli and Oliveira, 1994). Os machos não sugam o sangue, mas alimentam-se de sucos vegetais (Rozendaal, 1997).

O *Ae. aegypti* infectado por dengue introduz no hospedeiro o vírus quando se alimenta, usualmente através da saliva contaminada. Após a ingestão de sangue humano infectado por um mosquito suscetível, são necessários oito a dez dias com alta temperatura tabela 1 para que o vírus se multiplique no corpo do inseto e infecte suas glândulas salivares, tornando mosquito capaz de transmitir o vírus pela picada, sendo que o inseto permanece infectado por toda a vida. Desta maneira, o vírus se multiplica e dentro de cinco a sete dias segue-se a viremia. Esse período virêmico usualmente corresponde à fase aguda da doença e termina em cerca de seis dias, onde o paciente é infeccioso para o mosquito (Tesh, 1989).

### 2.5.3 Controle

O controle da dengue depende de medidas de extermínio do mosquito. Desta forma, nas áreas infectadas são realizadas estratégias para a eliminação do foco do mosquito, como controle químico, biológico e manejo ambiental (Timbó, 2006).

O método biológico é uma medida de controle utilizada empregando organismos capazes de parasitar ou preda os mosquitos. Dos vários agentes etiológicos encontram-se os nematoides, microcrustáceos, peixes larvófagos e agentes infecciosos (fungos, bactérias e vírus) (Eiras, 2011).

O manejo ambiental é outra estratégia utilizada que consiste em medidas que produzem mudanças no meio ambiente com objetivo de evitar ou destruir os criadouros potenciais do *Ae. aegypti* (Timbó, 2006).

O controle químico é realizado de acordo com a fase de evolução em que se encontra o vetor. Na fase larval do *Ae. aegypti* utilizam-se substâncias larvicidas, que são aplicadas em locais com depósitos de água. Na fase adulta, os inseticidas são utilizados com o objetivo de reduzir a densidade do vetor (Timbó, 2006).

### 2.5.4 Plantas inseticidas no controle do *Aedes aegypti*

As substâncias inseticidas sintéticas se utilizadas inadequadamente podem contribuir para que ocorra resistência dos mosquitos por estes apresentarem grande plasticidade genética (Eiras, 2011). Neste caso, é necessário o uso de dose cada vez maior de inseticidas sintéticos, podendo assim levar a contaminação progressiva do ecossistema e aumentar os perigos para os homens (Mendonça et al., 2005).

Assim, tem ocorrido um crescente interesse no desenvolvimento de métodos alternativos para o controle de mosquitos, que sejam menos perigosos para os seres humanos e outros organismos (Garcez et al., 2009). Neste sentido, as substâncias extraídas das plantas apresentam uma grande perspectiva para o controle do *Ae. aegypti*.

Estas substâncias botânicas apresentam algumas vantagens em relação ao emprego das substâncias sintéticas, como o desenvolvimento da resistência nos insetos destas substâncias botânicas ser um processo mais lento; os inseticidas naturais são rapidamente degradáveis e são obtidos de recursos renováveis (Roel, 2001). Outra vantagem apresentada das substâncias extraídas das plantas é a baixa toxicidade em mamíferos, com base no  $DL_{50}$  oral e assim não são tóxicos para os seres humanos, mamíferos e as abelhas (Wiesbrook, 2004).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento e a identificação estrutural de substâncias presentes em fração semipurificada, obtida a partir do extrato das flores de *T. patula*. Concomitantemente, avaliou-se a atividade larvívora de extrato e frações semipurificadas frente ao vetor *Aedes aegypti*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir extrato e frações a partir das flores de *T. patula*;
- Isolar substâncias da fração semipurificada mediante emprego de cromatografia em contracorrente de alta velocidade (CCCAV) e cromatografia em coluna (CC) de poliamida;
- Identificar estruturalmente as substâncias isoladas por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) e análise por e2 Análise por LC-IES-MS/MS (Cromatografia líquida acoplada a ionização por “electrospray” com detecção por espectrometria de massa);
- Avaliar o perfil cromatográfico do extrato bruto e da FB e FAE a partir da cromatografia de alta eficiência (CLAE) e identificar as substâncias majoritárias;
- Verificar o perfil cromatográfico da FB a partir de eletroforese capilar (EC) e identificar as substâncias majoritárias;
- Avaliar a atividade larvívora das frações: FH, FD, FAE, FB e FAQ contra o vetor *Aedes aegypti*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIA PRIMA VEGETAL

Sementes de *T. patula* foram obtidas comercialmente da Syngenta Flowers Brazil e cultivadas organicamente no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. As flores de *T. patula* foram coletadas em novembro de 2011. Uma exsicata está depositada sob o número 21.907 no Herbário da Universidade Estadual de Maringá, identificada por Dr. Jimi Nakajima, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Uberlândia.

As flores colhidas foram secas em estufa de circulação forçada de ar, aquecida à 38 °C durante 48 h. Em seguida, a cominuição da droga vegetal seca foi feita em moinho de martelos (Tigre ASN-5).

### 4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Merck<sup>®</sup>, Sigma<sup>®</sup>, Synth, exceto quando especificado.

- Acetato de etila;
- Acetona;
- Acetonitrila;
- Ácido bórico;
- Ácido clorídrico;
- Ácido fórmico;
- Ácido trifluoroacético (TFA);
- Água Ultrapura (Mili-Q)- (Milipore<sup>®</sup>);
- Álcool de cereais - Cereálcool<sup>®</sup>;
- Diclorometano;
- Dimetilsulfoxido (DMSO-*d*6) (CIL<sup>®</sup>);
- Hidróxido de sódio;
- Metanol (MeOH);
- Metanol deuterado;
- Metanol grau HPLC;
- Metil-β-ciclodextrina;
- *n*-butanol;
- *n*-hexano;
- Nitrogênio líquido – Departamento de Física da UEM;

- Tetraborato de sódio anidro- Acros Organics®.

#### 4.3 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

- Aparelho Varian, Mercury 300BB de 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ ;
- Balança analítica Marte®, modelo AY220;
- Balança infravermelho obtidos a partir de fonte halógena OHAUS®, MB35;
- Banho-maria;
- Bomba a vácuo Pfeiffer Vacuum modelo DV05;
- Câmara de lâmpada UV 254 nm; 366 nm;
- Coletor de frações Pharmacia Biotech FRAC-200;
- Cromatógrafo em contracorrente PC Ito® (mod. 001) equipado com uma coluna de politetrafluoroetileno (PTFE) de 2,5 mm de diâmetro interno, volume de 320 mL de capacidade total, injetor para 20 mL de amostra, 800 rpm, bomba de solvente de duplo pistão com vazão de 1,0 mL (Waters mod. 510).
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Thermo® equipado com PDA (arranjo de diodo), espectrofotometria módulo detector (modelo Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), bombas integrais e desgaseificador (Finnigan Surveyor LC Bomba Plus), amostrador automático (Finnigan Survey or Autosampler Plus) equipado com um alça de injeção com capacidade de 10  $\mu\text{L}$ ; software ChromQuest®;
- Sistema CLAE Waters 1525  $\mu$  acoplado a um Espectrômetro de massas triplo-quadrupolo do modelo Micromass Quattro *micro*™ API com uma fonte de ionização Z-spray por electrospray (ESI) (Waters). Para o processamento e aquisição dos dados foi utilizado o Software MassLynx™ (versão 4.0, Waters).
- Eletroforese capilar Beckman P/ACE™ MDQ equipado com sistema de detector ultravioleta-visível (UV-Vis). Os dados foram processados em software 32 Karat™ versão 7.0;
- Evaporadores rotatórios Buchi® R-200 e Buchi® R- 114;
- Liofilizador Christ® Alpha 1-4
- Moinhos de martelos (Tigre ASN-5)
- Ultra-Turrax®, modelo UTC115KT

#### 4.4 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A preparação do extrato bruto (EB) acetônico foi realizado a partir da metodologia realizada por Munhoz (2013) com algumas alterações.

As flores cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica, foram desengorduradas com *n*-hexano por maceração dinâmica durante três dias, realizando nove trocas de solvente (aproximadamente 33 h de agitação), com posterior secagem das flores desengorduradas à temperatura ambiente.

Após secagem, as flores desengorduras e secas foram submetidas à extração com líquido extrator acetona na proporção de 4% (m/v), submetida ao Ultra-turrax<sup>®</sup> por 5 min em seguida foi realizada a maceração por 15 h. Após este tempo, foi submetida novamente à turboextração (UTC115KT) por 20 min, com intervalos de 5 min, para que a temperatura não ultrapassasse 40 °C. Realizou-se a filtração sob pressão reduzida empregando-se funil de Büchner contendo papel de filtro, algodão, e tela de nylon, lavando-se o resíduo.

O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura máxima de 40 °C, de modo a eliminar todo o solvente orgânico. Em seguida o mesmo foi congelado e liofilizado (Christ<sup>®</sup>, Alpha 1-4), obtendo-se assim o EB acetônico.

#### 4.4.1 Partição do extrato bruto

A partição do EB de *T. patula* foi realizada de acordo com Cechinel Filho e Yunes (2001). O EB (105 g) foi ressuspenso em 1 L de metanol:água (2:8, v/v) e submetido à partição líquido-líquido em proporção volumétrica 5 vezes com *n*-hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FAE) e *n*-butanol (FB). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizadas.

Os procedimentos realizados com flores e com EB acetônico de *T. patula* encontra-se na Figura 8.

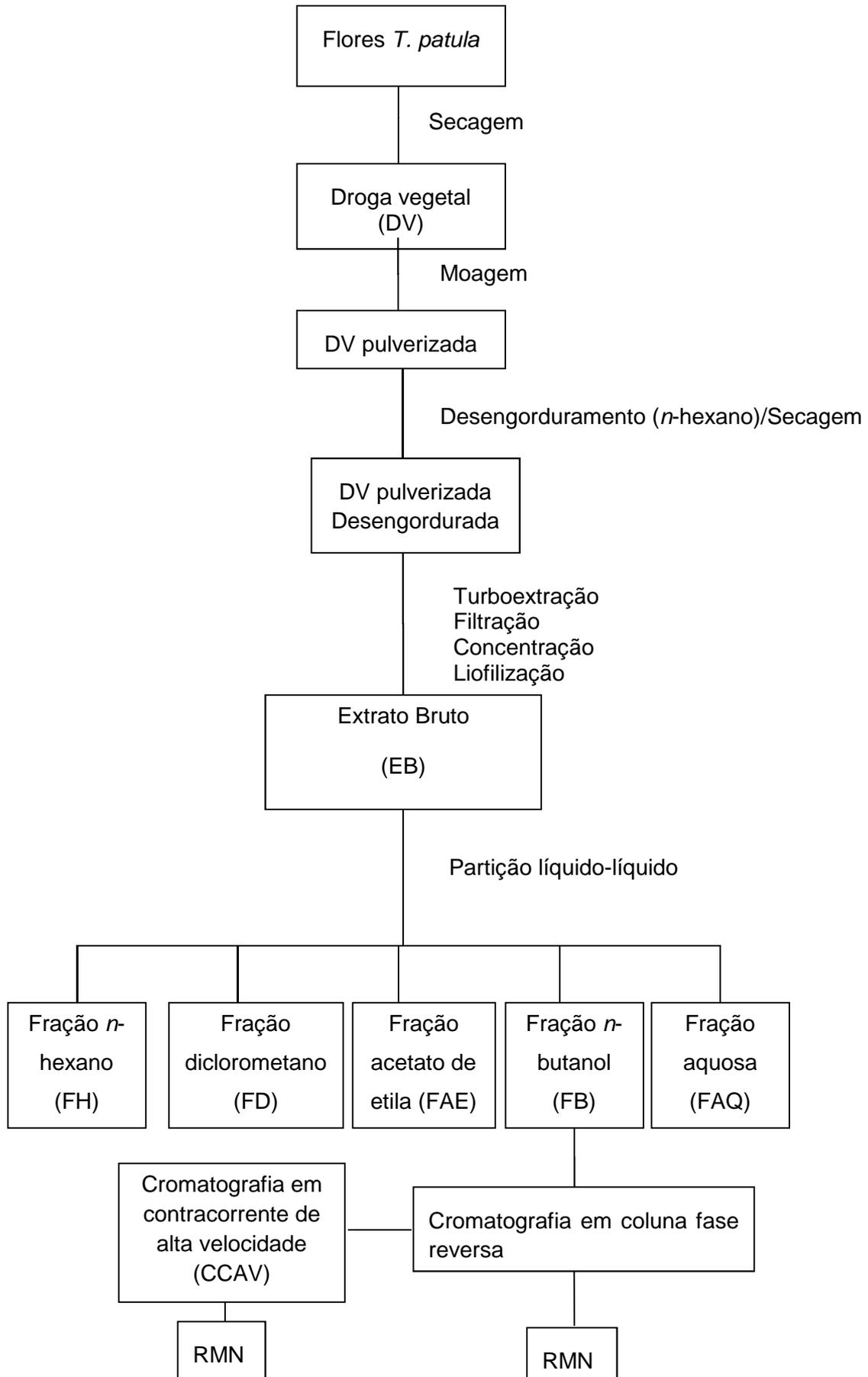


Figura 9 - Fluxograma de todo o trabalho realizado, partindo das flores de *T. patula* até a identificação da substância isolada.

## 4.5 ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA DE *Tagetes patula*

### 4.5.1 Métodos cromatográficos

Para a obtenção de frações semipurificadas e purificadas foram empregados métodos cromatográficos, que possibilitaram o isolamento de substâncias químicas presentes nos extratos brutos oriundos de diferentes misturas de solvente.

#### 4.5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®) de 0,200 mm de espessura. Foram utilizadas as fases móveis (FM) acetato de etila: ácido fórmico e água (90:5:5, v/v), clorofórmio:metanol (9:1, v/v) e clorofórmio:hexano (5:5,v/v). Após o desenvolvimento, as cromatoplasmas foram reveladas sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, com vapores de iodo e/ou vanilina clorídrica 1%.

#### 4.5.1.2 Cromatografia em coluna de fase reversa da fração FB

Foi utilizada cromatografia em coluna (CC) em fase reversa empacotada via úmida segundo os procedimentos descritos por Degani et al., (1998). A FB (20,0 g) foi purificada de acordo com Lage (2011) com pequenas modificações. Foi utilizando como fase estacionária poliamida (CC6 Korngrobe de 0,05-0,16 mm; Macherey Nagel®) e como fase móvel foram utilizados solventes puros ou mistura destes para obter polaridade ideal para cada fração (Tabela 1). A dimensão da coluna utilizada foi 15,0 cm de comprimento e 6,0 cm de diâmetro.

Foram recolhidos 10 mL em cada tubo de ensaio com vazão de 1 mL/min. O monitoramento das frações foi realizado mediante a CCD (seção 4.5.1.1) e agrupadas de acordo com o perfil observado. Cada fração foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida até total eliminação do solvente orgânico, congelada em nitrogênio líquido e liofilizada.

Tabela 1 - Gradiente de fase móvel utilizada para cromatografia em coluna de fase reversa da FB.

Fase móvel	Volume (mL)
Água 100%	6500
MeOH 5%	2000
MeOH 10%	2000
MeOH 15%	2350
MeOH 20%	1230
MeOH 25%	1770
MeOH 30%	1900
MeOH 35%	1950
MeOH 40%	1950
MeOH 45%	2000
MeOH 50%	2000
MeOH 55%	2593
MeOH 60%	1960
MeOH 65%	2000
MeOH 70%	1740
MeOH 80%	2550
MeOH 90%	2250
MeOH 100%	1000
MeOH: AcOEt (9:1)	1290
MeOH: AcOEt (8:2)	2050
MeOH: AcOEt (7:3)	1250
MeOH: AcOEt (6:4)	1000
MeOH: AcOEt (5:5)	1000
MeOH: AcOEt (4:6)	1000
MeOH: AcOEt (3:7)	560
MeOH: AcOEt (2:8)	520
MeOH: AcOEt (1:9)	800
Acetona 100%	1000

#### 4.5.1.3 Cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV)

O teste para determinação do sistema de solventes para CCCAV, foi realizada em tubo de ensaio, com a adição de 5 mg de amostra da partição da FB do EB das flores de *T. patula* em 2 mL de cada fase do sistema de solvente, e em seguida, realizou a agitação manual. Após separação das fases, iguais volumes de ambas as fases foram aplicados em

placa de CCD. As placas foram eluídas e a concentração relativa das substâncias da amostra em cada fase do sistema de solventes bifásico foi visualizada.

Os sistemas eluente (Tabela 2) foram preparado em funil de separação, sendo que a fase aquosa foi utilizada como fase inferior (estacionária) e a fase orgânica como fase superior (móvel). Após, as fases foram desgaseificadas em aparelho de ultrassom por 15 min. As subfrações FB 16, 23 e 26 obtidas na separação por cromatografia em coluna de poliamida (seção 4.5.1.2) foram injetadas em CCCAV e as subfrações resultantes foram coletadas em tubos de ensaios e reunidas por semelhança cromatográfica em CCD (seção 4.5.1.1).

Tabela 2 – Sistemas eluentes utilizados para as subfrações da fração *n*-butanol.

Subfração da fração <i>n</i> -butanol	Sistema eluente
FB-16	hexano: acetato de etila: metanol: água (2:2:2,5:2, v/v) Realizou um gradiente de <i>n</i> -butanol : 0-400ml – 0 ml <i>n</i> -butanol 400-800 ml – 20 ml <i>n</i> -butanol 800-1200 – 30 ml <i>n</i> -butanol 1200-1400 – 40 ml <i>n</i> -butanol
FB-23	hexano: acetato de etila: metanol: água (1:5:1:5, v/v)
FB-26	hexano: acetato de etila: metanol: água (2:2:2,5:2, v/v)

#### 4.5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas baseadas na metodologia desenvolvida por Munhoz et al. (2012). O EB, FAE e FB e as subfrações da FB foram retomados em metanol na concentração 500 µg/mL. Os cromatogramas foram observados a 210, 254 e 370 nm. Para o desenvolvimento dos cromatogramas, foram usados pré-coluna (4 x 3 mm d.i.) e coluna (250 x 4,6 mm d.i.) C-18 Phenomenex<sup>®</sup>, modelo Gemini, porosidade 5 µm.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando água: 0,05 % de TFA (v/v) (fase A) e acetonitrila: 0,05 % de TFA (v/v) (fase B) em sistema gradiente, com vazão de 1,0 mL/min. O programa estabelecido foi: 0 min: 5% fase B; 35 min: 58% fase B. Após, 5 min para reequilíbrio da coluna com 5% da fase B.

Os picos majoritários encontrados nos cromatogramas foram identificados com substâncias isoladas da FB de *T. patula*.

## 4.6 ANÁLISE ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

### 4.6.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise estrutural da substância isolada foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D ( $^1\text{H}\times^1\text{H}$ -COSY e HMBC), relativos ao TMS (7.02T-Varian Mercury Plus 300) operando a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$  e 300 MHz para  $^1\text{H}$ .

### 4.6.2 Análise por CLAE-IES-MS/MS

A voltagem do capilar foi ajustada em 2,5 kV (modo de ionização positivo), cone em 25 V, cone de extração em 2 V. A temperatura da fonte foi de 130 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, fluxo de gás do cone de 50 L/h e o fluxo de gás de dessolvatação de 900 L/h. Argônio foi utilizado como gás de colisão (energia de colisão de 25 eV). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Symmetry C18 coluna (i.d., 3.5  $\mu\text{m}$ ; 75  $\times$  4.6 mm, Waters) mantida à temperatura ambiente. A fase móvel utilizada foi água: 0,1% de ácido fórmico (v/v) (solvente A) e acetonitrila: 0,1% de ácido fórmico (v/v) (solvente B). O sistema gradiente empregado consistiu em : 0 - 2 min 5% de solvente B; 10 min 50% de solvente B, mantido durante 2 min; 13 min 5% de solvente B, mantendo-se nesta última condição durante 2 minutos. O fluxo foi de 0,5 mL/min e o volume de injeção da amostra de 10  $\mu\text{L}$ . A amostra contendo 1000 ng/mL das substâncias isoladas Tp-1 e Tp-2 (p. 69 e 74) foi injetada no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação foi realizada analisando-se as informações dos íons produtos obtidos nos espectros em comparação com dados já publicados.

## 4.7 ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)

Utilizou-se capilar Beckman-Coulter de sílica fundida de 363  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  75  $\mu\text{m}$  O.D. com comprimento de 50/62,5 cm (comprimento efetivo/comprimento total). O capilar foi acondicionado para seu primeiro uso bombeando-se HCl 1,0 mol/L por 15 min, NaOH 1,0 mol/L por 15 min e água ultrapura por 15 min. Para garantir a repetibilidade entre as injeções, o capilar foi lavado com NaOH 1,0 mol/L por 2 min e solução eletrolítica por 2 min. Ao final do dia, o capilar foi lavado com NaOH 1,0 mol/L por 5 min, água ultrapura por 5 min e ar por 2 min. Durante a análise, a temperatura do capilar foi ajustada para 25 °C e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 0,5 psi por 3 s. A solução eletrolítica constituiu-se de tampão tetraborato de sódio 80 mmol/L (pH 8,80) com metil- $\beta$ -ciclodextrina

(metil-  $\beta$ -CD) 10 mmol/L. A voltagem utilizada foi de 30 kV e a detecção foi realizada a 214 nm. A identificação dos analitos foi realizada adicionando-se padrões na amostra.

#### 4.7.1 Preparo da solução da amostra

Foi utilizada para a análise a FB na concentração de 500  $\mu$ g/mL. A amostra foi preparada pesando-se 5 mg de FB, posteriormente solubilizada em aproximadamente 5 mL de solução metanol:água (2:8, v/v), com o auxílio do ultrassom. A solução foi submetida à passagem por um cartucho C18 previamente condicionado (com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura). A solução extraída foi transferida para um balão de 10 mL que teve o seu volume completado com solução de metanol:água (2:8, v/v). A solução foi filtrada utilizando membrana Millipore de 0,45  $\mu$ m, antes de ser injetada no aparelho de eletroforeses capilar.

#### 4.7.2 Preparo das soluções de padrões

As soluções dos padrões patuletina e patuletina 7-O- $\beta$ -glicose (patulitrina) obtidas por meio de isolamento foram preparadas solubilizando-se 1 mg em 1 mL de metanol, por 1 min, em ultrassom.

#### 4.7.3 Preparo da solução enxágue

Foi preparada uma solução de NaOH de 1 mol/L solubilizando-se 4,0 g de NaOH em 100 mL de água ultrapura. Esta solução foi filtrada utilizando membrana Millipore de 0,45  $\mu$ m antes do uso.

#### 4.7.4 Preparo da solução eletrolítica (tampão)

A solução estoque de tetraborato de sódio 80 mmol/L (solução A) foi preparada solubilizando-se 3,051 g de tetraborato de sódio decaidratado em 100,0 mL de água ultrapura. A solução estoque do ácido bórico 80 mmol/L (solução B) foi preparada solubilizando-se 0,495 g do ácido em 100,0 mL de água ultrapura. Ambas as soluções foram submetidas ao ultrassom até solubilização completa. Para obtenção da solução eletrolítica, as soluções A e B foram misturadas até obtenção do pH desejado e filtradas através de membrana de filtro de 0,45  $\mu$ m. A metil- $\beta$ -CD foi adicionada em quantidade adequada na solução eletrolítica pronta. As soluções estoques foram armazenadas em geladeira por no máximo 48 h e as misturas foram preparadas diariamente.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LARVICIDA

Na realização da atividade larvicida foram realizados testes com as frações: hexânica (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FAE), *n*-butanol e aquosa (FAQ) das flores de *T. patula*.

Para a realização dos testes foram utilizadas larvas de *Aedes aegypti* do insetário mantido no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) localizado em Manaus, Amazonas. O insetário teve início com a coleta de ovos a campo, utilizando-se armadilhas (ovitrampas). Todo procedimento de manutenção dos mosquitos e utilização de animais para repasto sanguíneo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal: CEUA/INPA: 04/2013.

A metodologia para os bioensaios foram modificadas de Lacey (1997), WHO (2005) e WHO (1999) Larvas de quarto instar inicial foram utilizadas para os bioensaios. Realizaram-se três réplicas contendo 15 imaturos/pote em volume de 50 mL de água destilada.

Os extratos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração inicial de 30.000 mg/L em volume total de 10 mL. A amostra foi diluída utilizando-se banho ultrassônico por 15 min.

Para verificar taxas de mortalidade em porcentagem, concentrações letais (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) com seus limites foram utilizadas as concentrações: 750, 500, 300 100 e 50 mg/L. Como controle foi realizado solução de DMSO a 300 mg/L e somente água destilada.

Todo o ensaio foi mantido em fotoperíodo (12/12 h) e temperatura 26±2 °C. Leituras de mortalidade foram realizadas a 24, 48, 72, 96 e 120 h .

## **5    *RESULTADOS E DISCUSSÃO***



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO E PARTIÇÃO

Na produção do extrato bruto acetônico empregaram-se 1.900 gramas de flores desengorduradas de *T. patula*, resultando em um rendimento do EB de 5,86%.

Após a finalização do extrato, realizou-se o processo de partição líquido-líquido do mesmo, com ordem crescente da polaridade dos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Foram obtidas cinco frações, apresentando os seguintes rendimentos: FH 19,27%; FD 10,17%; FAE 13,38%; FB 36,59% e FAQ 15,02% (Figura 9). Estas frações foram cromatografadas em CCD e os resultados podem ser observados nas Figuras 10 e 11.

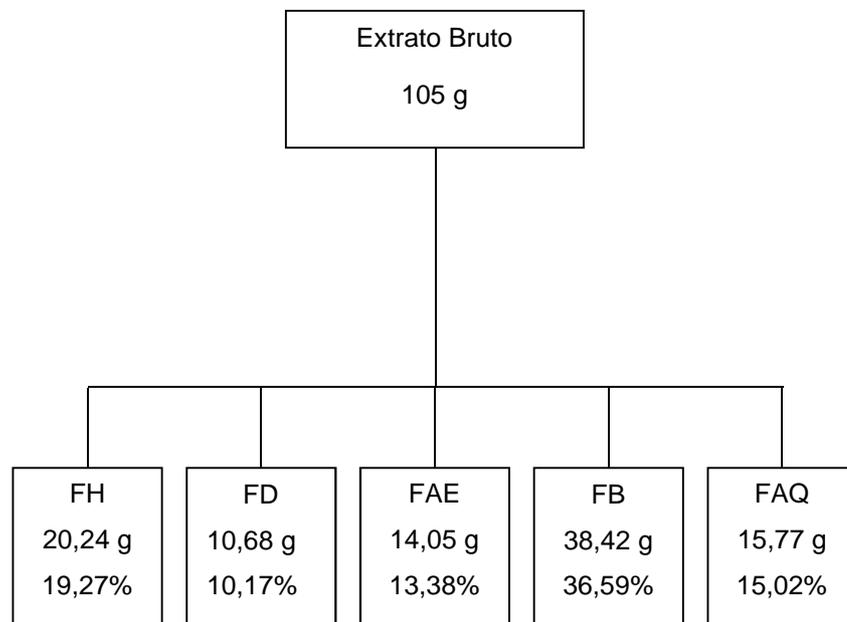


Figura 10 - Fluxograma da partição líquido-líquido do EB das flores de *T. patula*.

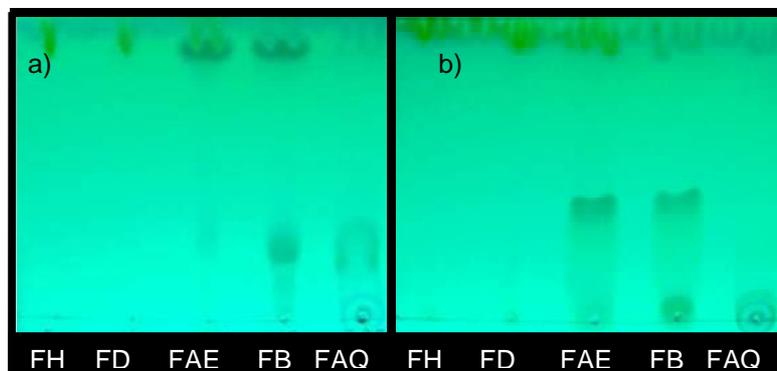


Figura 11 - CCD da partição líquido-líquido do EB desenvolvida com a FM a) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v) e FM b) clorofórmio: metanol (9:1, v/v). Visualização UV: 254nm.

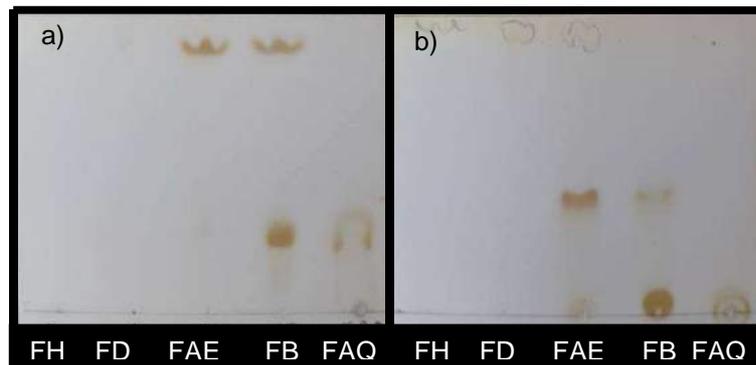


Figura 12 - CCD da partição líquido-líquido do EB desenvolvida com a FM a) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v) e FM b) clorofórmio: metanol (9:1, v/v) seguido de revelação com vanilina clorídrica 1%.

A preparação do EB desengordurado das flores de *T. patula* foi baseado no estudo de otimização da extração realizado por Munhoz (2013), o qual demonstrou ser a acetona o melhor solvente extrator, sendo o responsável pela extração de maior concentração de flavonoides da amostra.

No processo de extração foram realizadas algumas alterações como na proporção das flores e líquido extrator (p/v), tempo de extração e a quantidade de extrato produzida por vez. Na preparação dos extratos, Munhoz (2013), submeteu as flores no turbo-extrator, na proporção de 2,5% (m/v). O tempo de agitação foi de 9 min e na produção do extrato utilizando-se o equipamento turboextrator Skymesen<sup>®</sup>, aparelho pequeno utilizado para produção de extrato em pequena escala. Entretanto, no presente estudo utilizou-se o processo extrativo uma proporção de 4% (p/v) de flores *T. patula*, tempo de agitação de 25 min e foi utilizado Ultra-Turrax<sup>®</sup>, modelo UTC115KT, equipamento utilizado para produção de média escala na produção de extrato.

A turboextração (turbólise) promove a redução das partículas por cisalhamento, o que permite maior rapidez na dissolução das substâncias ativas (Voigt, 1993). Uma consequência da utilização deste procedimento, que merece observação, é a geração de calor no processo de cisalhamento (fragmentação) do material (Mello and Petrovick, 2000). Para minimizar o efeito de temperatura, adotou-se a prática de realizar a extração em 5 etapas de 5 min, com o objetivo de promover o resfriamento do sistema e facilitar a posterior filtração.

## 5.2 FRACIONAMENTO DA FB

O pré-fracionamento de FB resultou em 101 subfrações, as quais foram monitoradas por CCD. Utilizou-se também a CLAE para analisar o perfil cromatográfico das subfrações, através do qual foi possível observar que muitas frações com perfis cromatográficos semelhantes (ANEXO 1), assim foram reunidas, totalizando 34 subfrações (Figuras 12-15). Na Tabela 3 encontra-se o rendimento e eluentes das subfrações.

Para o monitoramento em CCD utilizaram-se três sistemas eluentes diferentes acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); clorofórmio: metanol (90:10, v/v); e clorofórmio: hexano (5:5, v/v). A determinação destes sistemas eluentes foi realizada de acordo com a polaridade das subfrações. A CCD destas junções foi observada mediante UV 254 nm, 366 nm, reveladores vapores de iodo e vanilina clorídrica 1% (Figuras 12-15).

Tabela 3 - Rendimento das subfrações da FB obtidas após eluição em CC contendo poliamida.

<b>Subfração CC</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Subfrações</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
FB-1	Água 100%	1	0,55	2,73
FB-2	Água 100%	2	2,50	12,48
FB-3	Água 100%	3	0,66	3,29
FB-4	Água 100%	4	1,57	7,85
FB-5	Água 100%	5	0,43	2,14
FB-6	Água 100%	6-10	1,84	9,19
FB-7	Água 100%	11-14	0,72	3,62
FB-8	MeOH 5% MeOH 10%	15-18	0,68	3,4
FB-9	MeOH10%	19-20	0,28	1,39
FB-10	MeOH 10% MeOH 15%	21-24	0,58	2,92
FB-11	MeOH 15%	25-26	0,41	2,08
FB-12	MeOH15% MeOH 20%	27-28	0,44	2,19
FB-13	MeOH 20%	29-30	0,44	2,20
FB-14	MeOH20%	31-32	0,45	2,28
FB-15	MeOH 25% MeOH 30%	33-35	0,67	3,35
FB-16	MeOH 30% MeOH 35%	36-40	1,00	5,015
FB-17	MeOH 35% MeOH 40% MeOH 45%	41-47	1,24	6,21
FB-18	MeOH45%	48-49	0,21	1,07
FB-19	MeOH 45% MeOH 50%	50-55	0,68	3,42
FB-20	MeOH 50% MeOH 55%	56-59	0,34	1,71

Continuação da Tabela 3

<b>Subfração</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Subfrações</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
FB-21	MeOH 60%	60-62	0,14	0,71
FB-22	MeOH60%	63-66	0,44	2,22
FB-23	MeOH 60% MeOH 70%	67-70	0,56	2,81
FB-24	MeOH 80% MeOH 90%	71-75	0,81	4,03
FB-25	MeOH 90%	76-78	0,48	2,42
FB-26	MeOH 90% MeOH 100%	79-82	0,52	2,60
FB-27	MeOH:AcOEt (9:1)	83-84	0,03	0,15
FB-28	MeOH:AcOEt (9:1) MeOH:AcOEt (8:2)	85-86	0,07	0,23
FB-29	MeOH:AcOEt (8:2) MeOH:AcOEt (7:3)	87-89	0,10	0,47
FB-30	MeOH:AcOEt (7:3) MeOH:AcOEt (6:4) MeOH:AcOEt (5:5)	90-94	0,04	0,22
FB-31	MeOH:AcOEt (5:5) MeOH:AcOEt (4:6)	95-96	0,03	0,15
FB-32	MeOH:AcOEt (4:6) MeOH:AcOEt (3:7) MeOH:AcOEt (2:8)	97-99	0,04	0,23
FB-33	AcOEt 100%	100	0,02	0,10
FB-34	Acetona	101	0,01	0,01

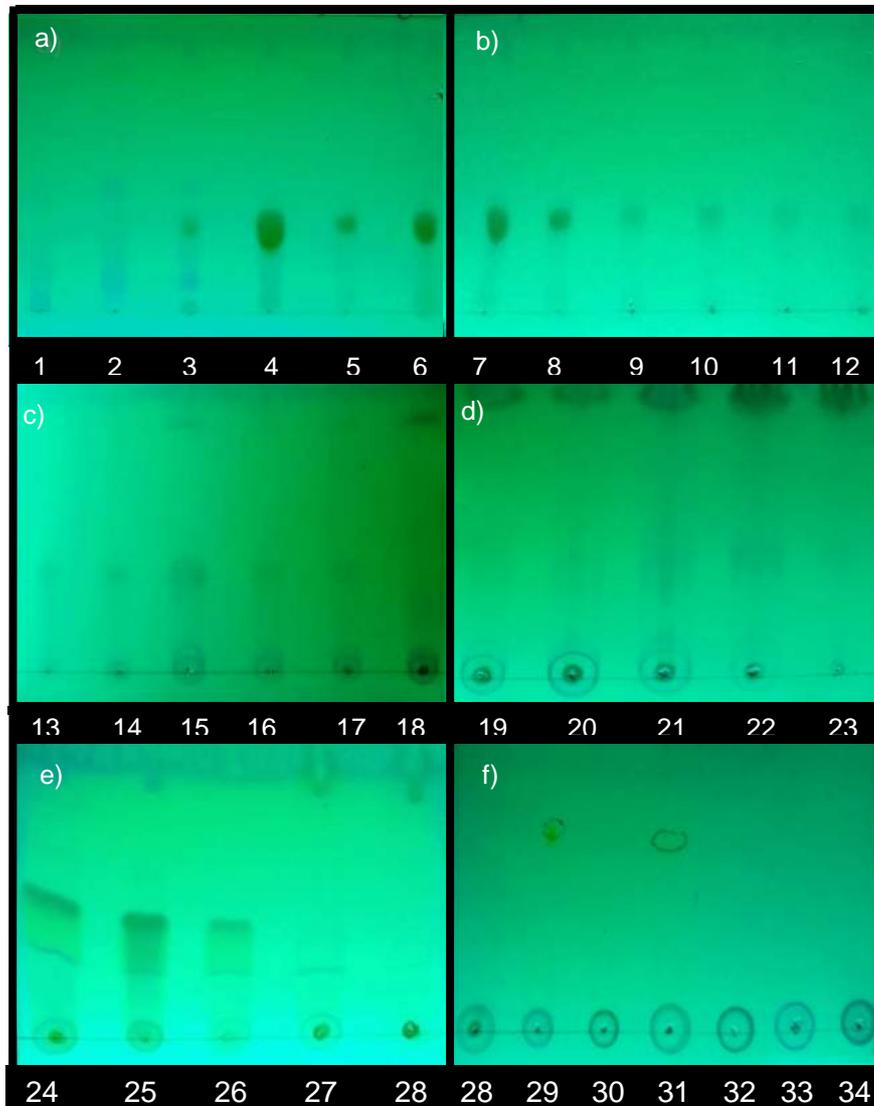


Figura 13 - Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Visualização UV: 254 nm.

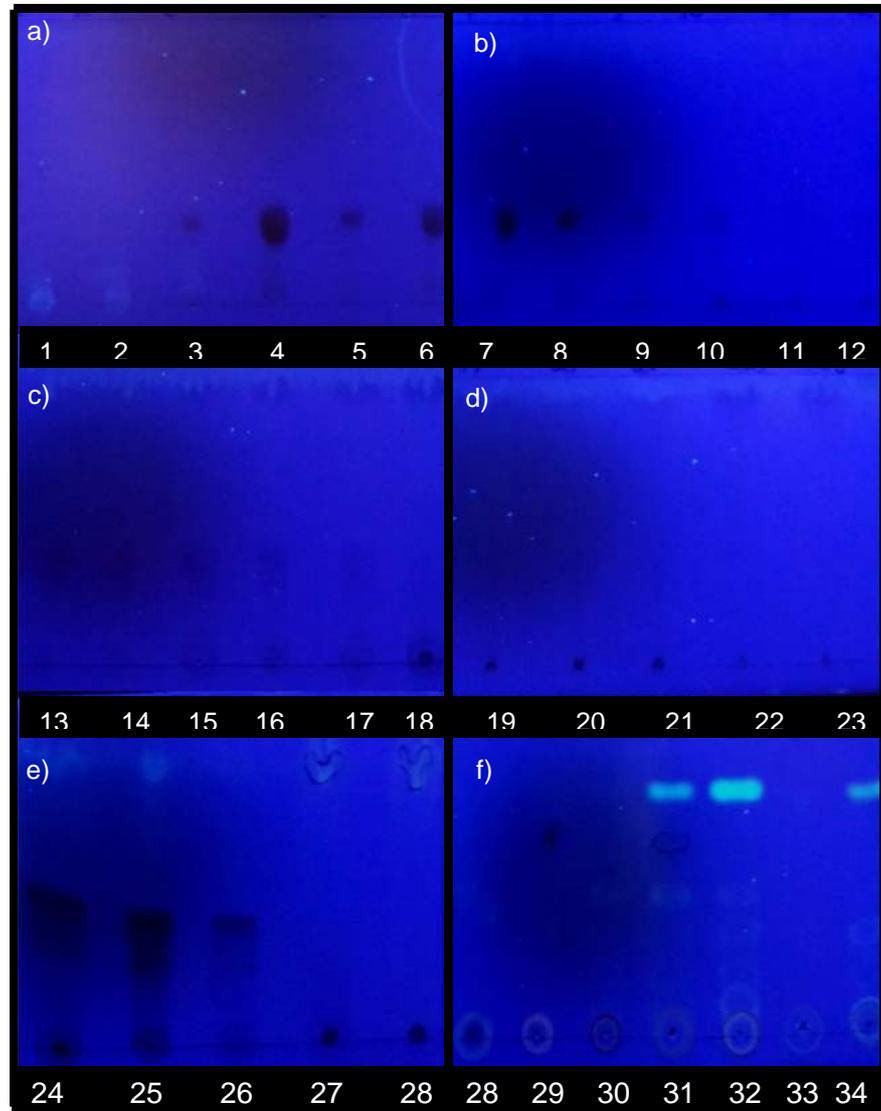


Figura 14 - Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d): acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34:metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Visualização UV: 366 nm.

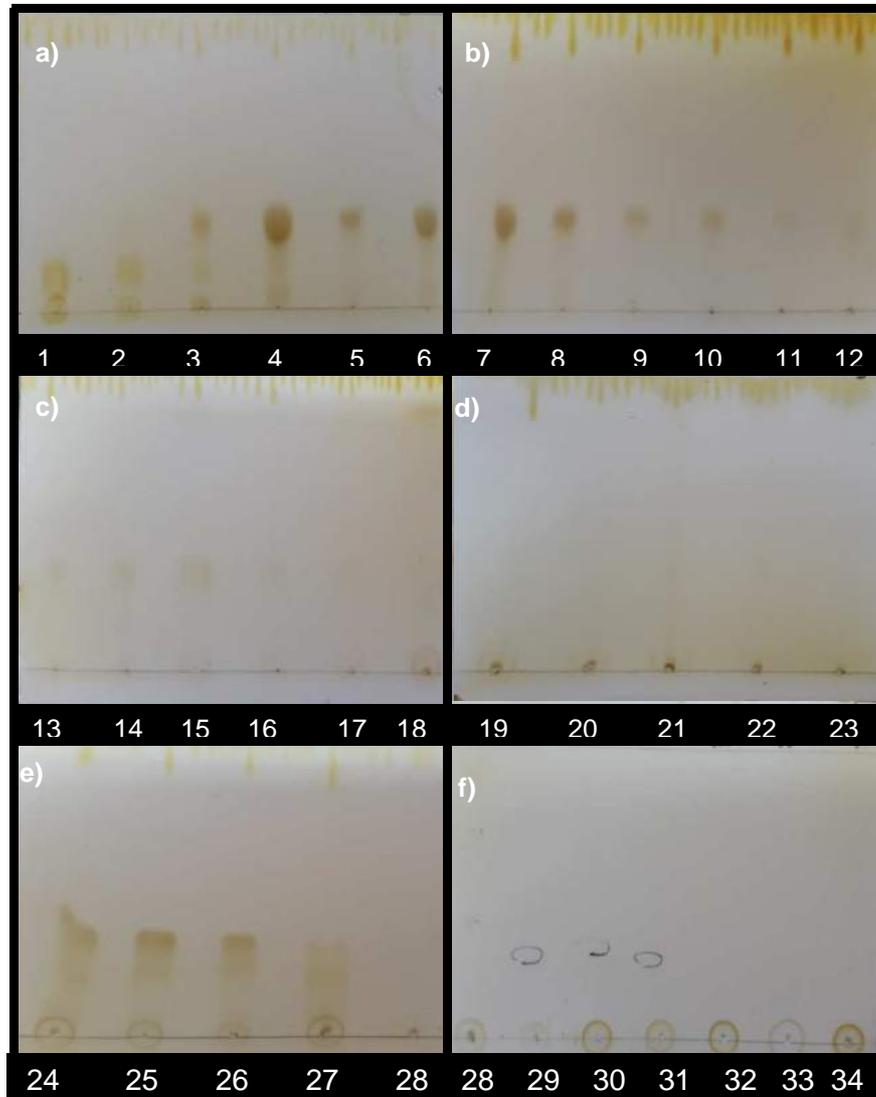


Figura 15 - Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Revelador: vapores de iodo.

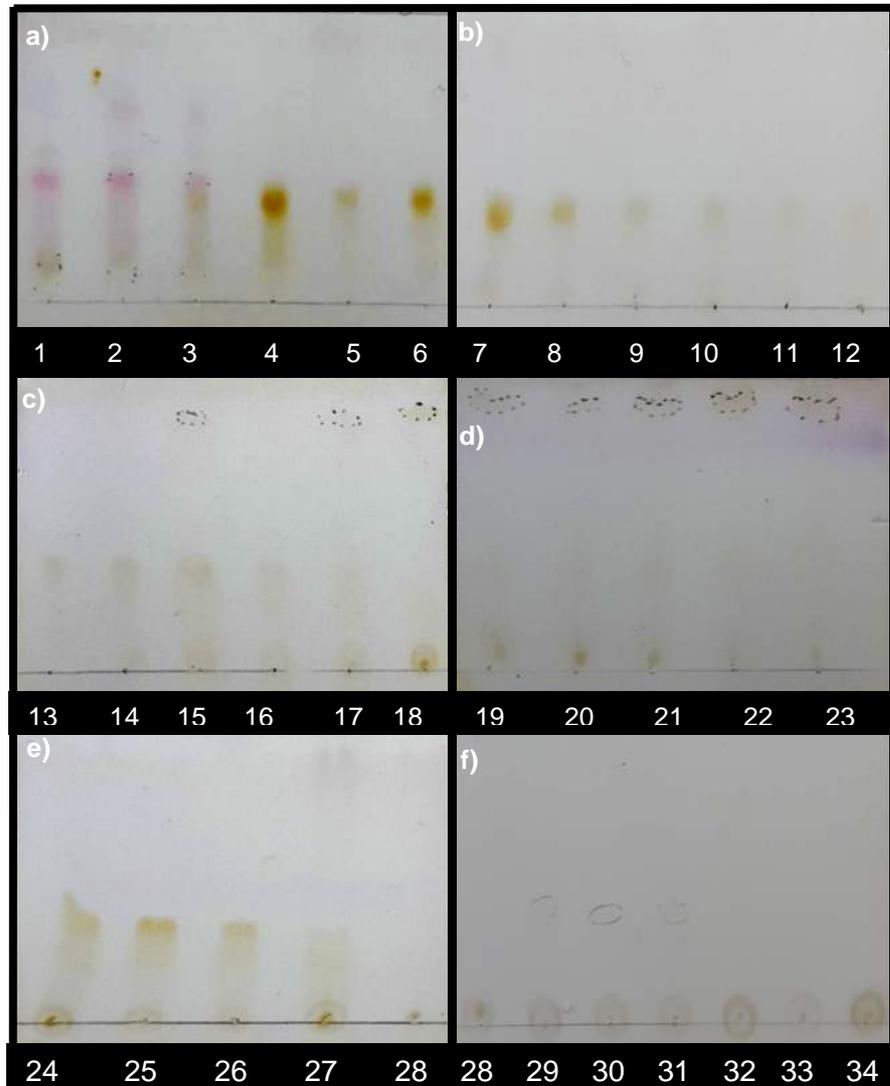


Figura 16- Cromatografia em camada delgada das 34 subfrações obtidas da FB por cromatografia em coluna. Fase móvel- frações 1-23 (a-d) acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5, v/v); frações 24-28 (e): clorofórmio: metanol (90:10, v/v); frações 29-34 (f) clorofórmio: hexano (5:5, v/v). Revelador: vanilina clorídrica 5%.

No processo de cromatografia em coluna (CC) da FB, as subfrações 6 e 11 precipitaram, após filtradas foi obtida a substância Tp 2 (30 mg).

### 5.3 FRACIONAMENTO MEDIANTE COMATOLOGRAFIA EM CONTRA-CORRENTE DE ALTA VELOCIDADE (CCCAV)

Na CCCAV foram fracionadas as subfrações FB-16, FB-23 e F-26, resultando no isolamento das substâncias Tp-2 (FB-16) e Tp-1 (FB-23 e FB-26) (Figuras 16-18).

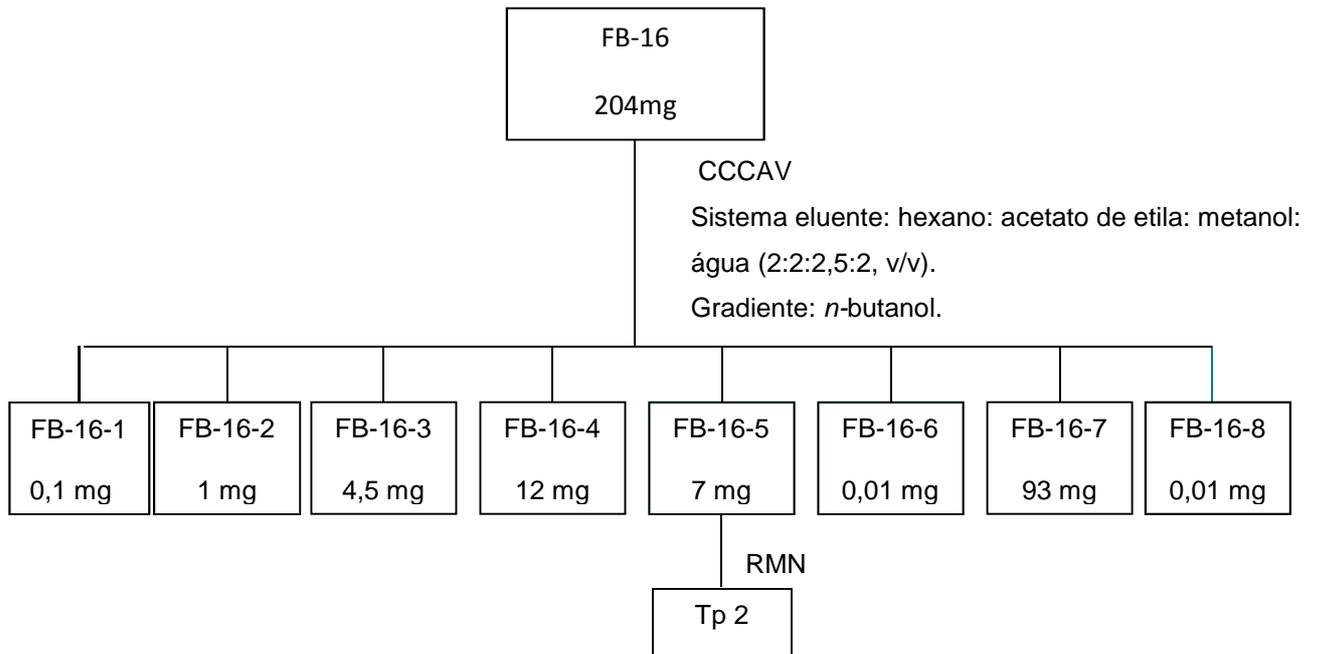


Figura 17- Fracionamento da fração FB-16 por cromatografia em CCCAV.

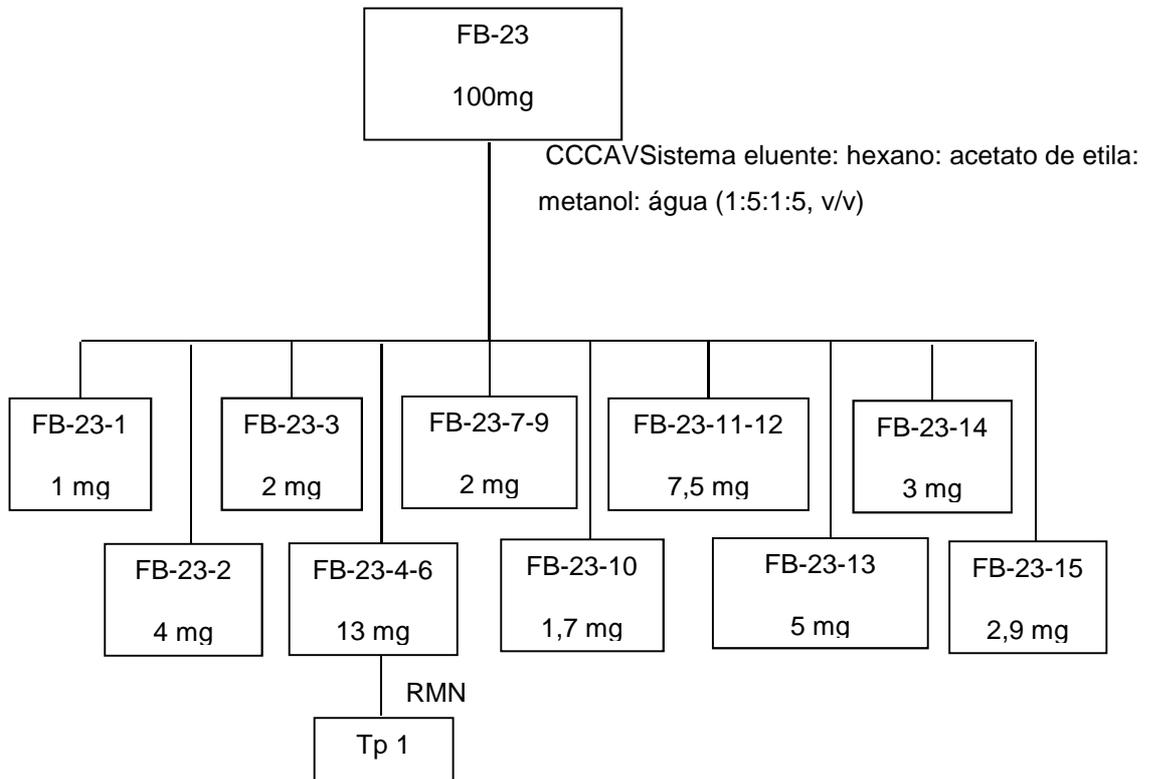


Figura 18 - Fracionamento da fração FB-23 por cromatografia em CCCAV.

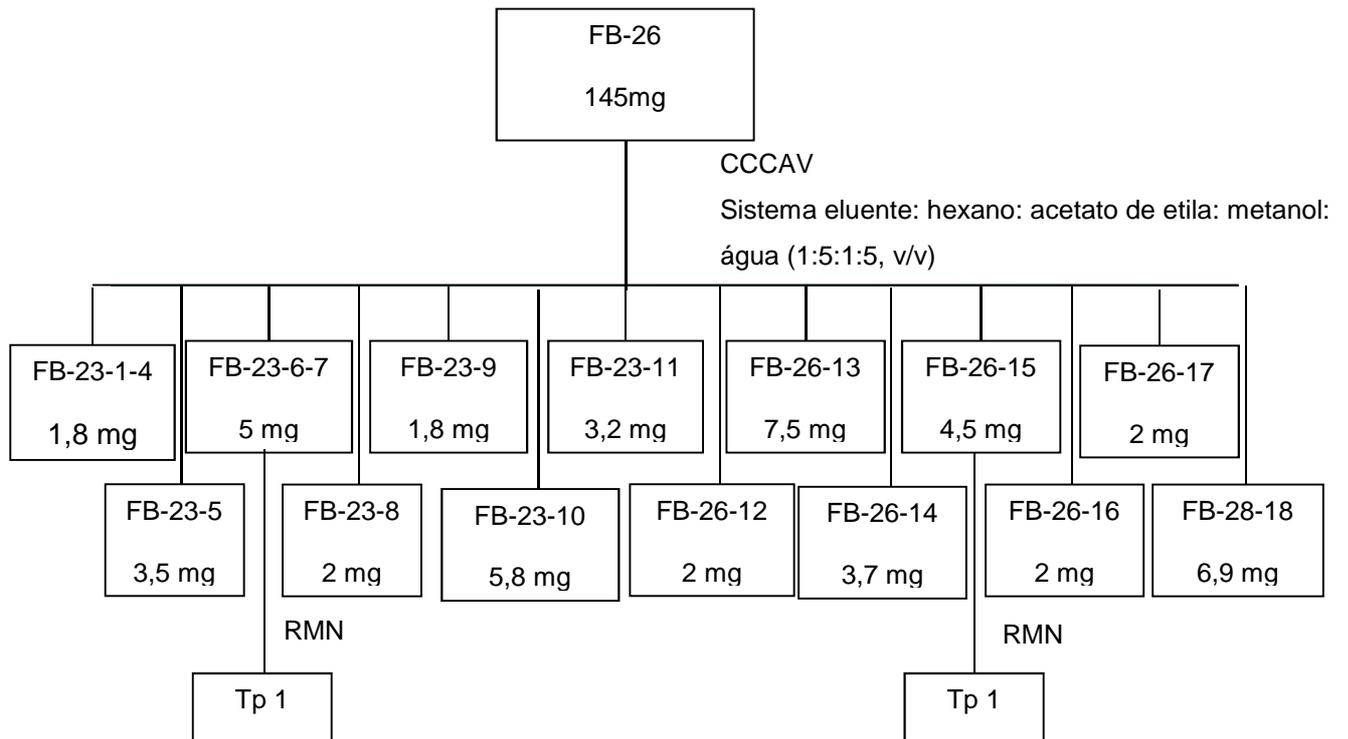


Figura 19 - Fracionamento da fração FB-26 por cromatografia em CCCAV.

O sistema eluente utilizado para cada amostra foi determinado mediante a metodologia já exposta anteriormente (seção 4.5.1.3) e com base na literatura. De acordo com a literatura, a escolha de um solvente ideal contribui para o sucesso da separação dos compostos na cromatografia em contra-corrente (Pauli et al., 2008; Rinaldo et al., 2006; Sticher, 2008). A utilização de sistemas com duas fases imiscíveis resulta em um número extremamente grande de escolha de combinações de solventes possíveis com um amplo leque de polaridade (Sticher, 2008). De acordo com Plaza (2007), o mecanismo de separação do CCCAV é baseado principalmente na diferença de solubilidade dos componentes entre as duas fases (Plaza, 2007).

Para o isolamento das subfrações FB-23 e FB-26 utilizou-se quatro tipos de solventes, *n*-hexano: acetato de etila (AcOEt): metanol (MeOH): água. De acordo com Leitão (2005) os sistemas eluentes com quatro e às vezes cinco solventes são comuns. Estudos mostraram que o sistema eluente água, AcOEt, MeOH e *n*-hexano é o mais utilizado para a separação de produtos naturais, devido este sistema funcionar bem na separação dos compostos naturais. Além disto, tem outros fatores que são levados em consideração, como: o custo e acessibilidade, dos solventes (Pauli et al., 2008).

Utilizou-se para a subfração FB-16, o mesmo sistema eluente das subfrações citadas anteriormente (água, AcOEt, MeOH e *n*-hexano) com a adição do *n*-butanol (BuOH), realizando assim um sistema de gradiente com polaridade crescente, contribuindo para a

separação das substâncias desta amostra. De acordo com Ying et al. (2014), é importante estabelecer um sistema de solvente de gradiente para separar os produtos naturais com vasta gama de polaridade, sendo uma ferramenta mais amplamente disponível para o rastreamento destes compostos bioativos.

## 5.4 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

### 5.4.1 Substância Tp-1

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm;  $J$  em Hz) de Tp-1 (300 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Figura 20, Tabela 4) foi observado um singlete em 6,48 que foi atribuído ao H-8 do anel A. Ainda foram observados sinais em 6,88 ( $d$ , 8,08), 7,63 ( $dd$ , 8,6; 2,0) e 7,72 ( $d$ ; 2,0) referentes aos hidrogênios H-5', H-6' e H-2' do anel B, característico de um anel aromático meta e para substituído. O sinal em 3,88, um singlete, comprovou a presença de um grupo metoxila em C-6.

A Tabela 04 e a Figura 21 apresentam também a análise do espectro bidimensional de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY (Figura 16), mostrando as correlações homonucleares do sinal  $\delta$  7,63 (H6') com 6,88 (H5').

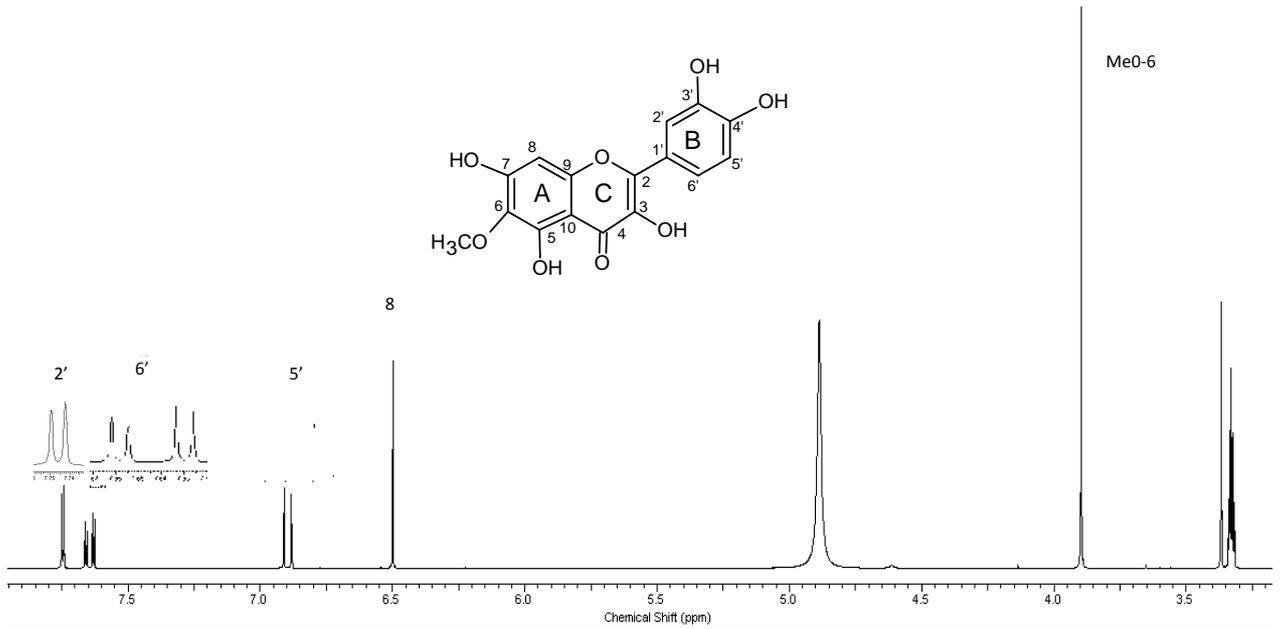


Figura 20 - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância Tp-1 (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

Tabela 4 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H e correlações observadas no COSY de Tp-1 comparados com dados reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

H	$\delta_H$ (m, J em Hz)	Tp-1 COSY	patuletina $\delta_H$ (m, J em Hz) Literatura
8	6,48		6,43 (s)
2'	7,72 (d, 2,0)		7,70 (d, 2,0)
5'	6,88 (d, 8,08)	6'	6,86 (d, 8,08)
6'	7,63 (dd, 8,6; 2,0)	5'	7,59 (dd, 8,6; 2,0)
MeO-6	3,88		3,85 (s)

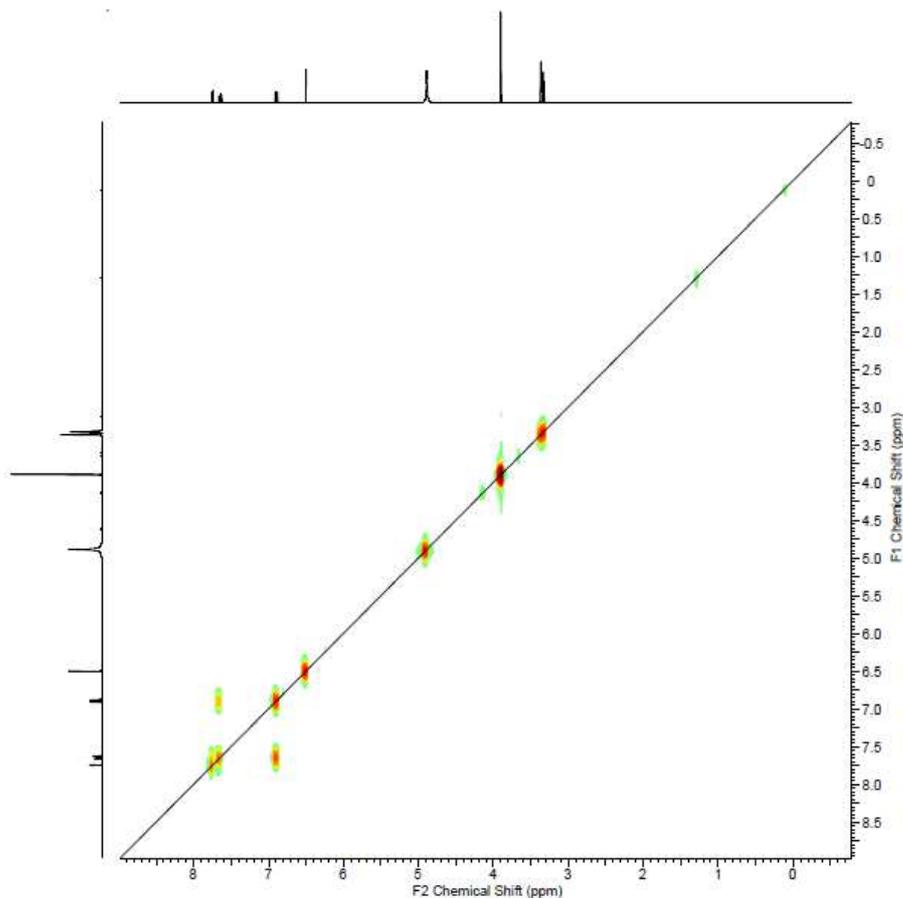


Figura 21 - Espectro de COSY da substância Tp-1 (300 MHz; CD<sub>3</sub>OD).

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C ( $\delta$  em ppm) de Tp-1 (75,45 MHz; CD<sub>3</sub>OD) foi observado o sinal em 176,1 referente a uma carbonila  $\alpha$ - $\beta$  insaturada (C-4). Também foram verificados sinais em  $\delta$  135,6; 151,7; 144,8 e 147,5 referentes aos carbonos hidroxilados C-3, C-5, C-3' e C-4', respectivamente. O sinal em  $\delta$  93,4 foi atribuído ao carbono metínico (C-8) do anel A. Já os sinais em  $\delta$  147,4; 130,8; 157,1; 152,7 e 103,5 foram atribuídos aos carbonos não-hidrogenados C-2, C-6, C-7, C-9 e C-10, respectivamente. O posicionamento do grupo metoxila, em C-6, foi feito com base na comparação dos deslocamentos da substância Tp-1 com os reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina (Tabela 5, Figura 22).

A comprovação do posicionamento da metoxila em C-6 foi feita por experimento de HMBC, com a correlação do sinal em  $\delta$  3,9, referente aos hidrogênio do grupo metoxila e o sinal em  $\delta$  130,8, referente ao C-6 (Tabela 5, Figura 23).

Tabela 5- Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e HMBC, de Tp-1, comparados com dados de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina (75,45 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$	<b>HMBC</b>	<b>patuletina (<math>\delta_{\text{C}}</math>) Literatura</b>
2	146,9		147,22
3	135,6		135,90
4	176,2	6,5	176,48
5	151,6	6,5	151,90
6	130,8	3,9;6,5	131,16
7	157,1	6,5	157,43
8	93,4	6,5; 6,86	93,75
9	152,3		152,55
10	103,5		103,92
1'	120,3	7,59; 7,70	120,76
2'	114,6		115,02
3'	144,8	6,86; 7,70	145,16
4'	147,4	6,86; 7,7	147,77
5'	114,8	7,59	115,23
6'	122,8	6,9	123,13
MeO-6	59,60	3,85	60,10

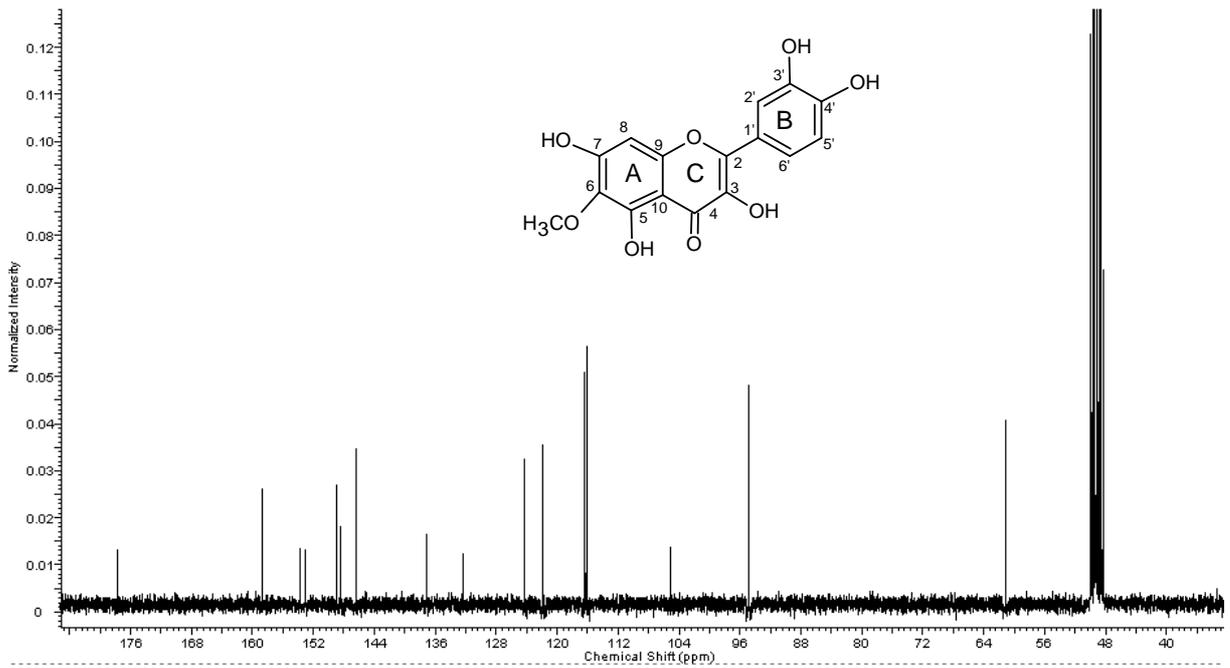


Figura 22- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância Tp-1 (75,45 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

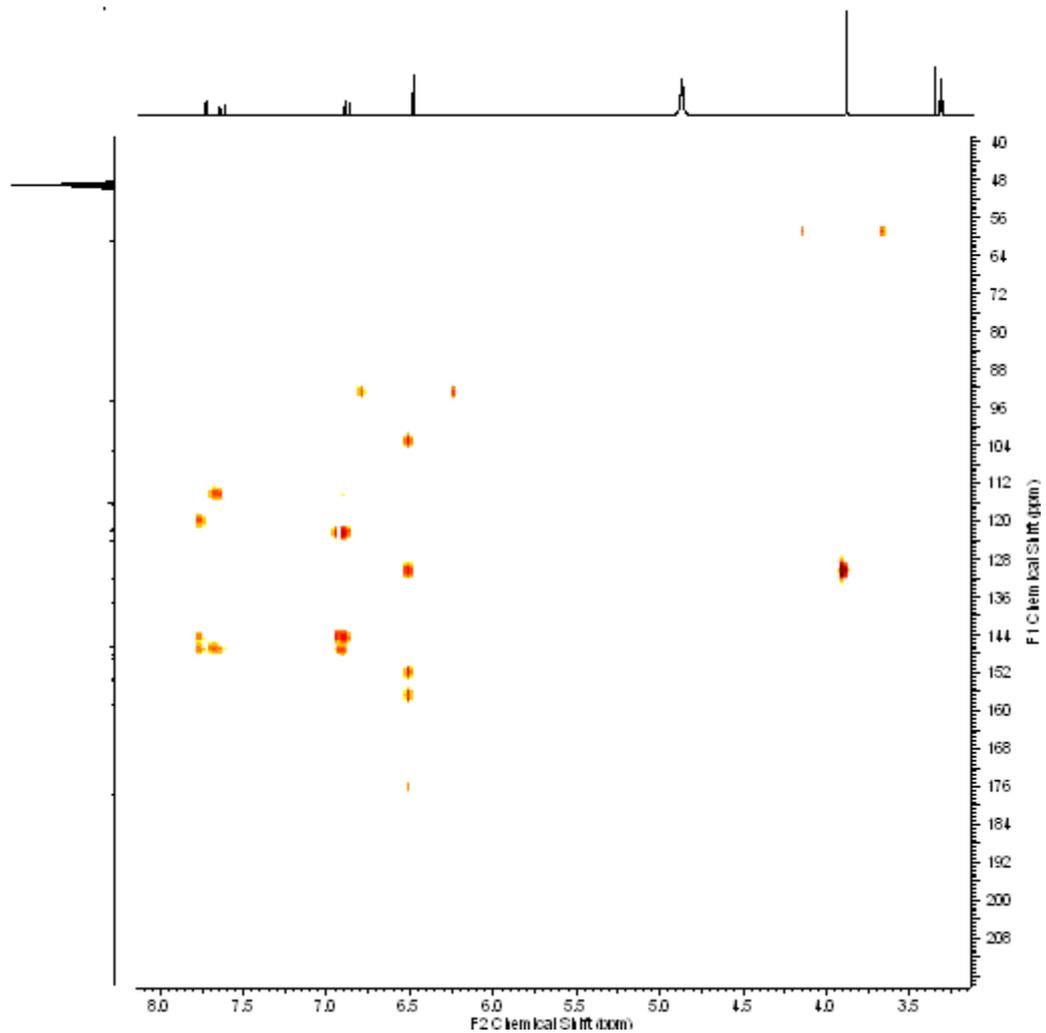


Figura 23 - Espectro de HMBC da substância Tp1 (75,5 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Por meio da análise dos dados obtidos nos espectros de RMN 1D e 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY e HMBC) e comparação com a literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) a estrutura da patuletina foi proposta para o flavonoide Tp-1

Foi realizado também para a substância Tp-1 a análise por CLAE-IES-MS/MS e os dados foram comparados com a literatura (Parejo et al., 2004). Com os dados do espectro massa, através da fragmentação do íon precursor correspondente a da Tp-1 Patuletina ( $m/z$  333), e análise dos íons produtos, comprovou-se que a provável estrutura da substância é a patuletina (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados de CLAE-IES-MS/MS da substância Tp-1 comparada com a literatura.

Nome do composto	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	Literatura
Tp-1 Patuletina	333	288;318	(Parejo et al., 2004)

#### 5.4.2 Substância Tp-2

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  em ppm;  $J$  em Hz) de Tp-2 (300MHz; DMSO- $d_6$ ) (Figura 24; Tabela 7) foi verificado um singlete em 6,93 que foi atribuído ao H-8 do anel A. Ainda verificou a presença de sinais em 6,89 ( $d$ , 8,5), 7,54 ( $dd$ , 8,5 e 2,1) e 7,72 ( $d$ ; 2,2) atribuídos aos hidrogênios H-5', H-6' e H-2' do anel B, caracterizando um anel aromático meta e para dissubstituído. Também foram verificados sinais característicos de uma unidade  $\beta$ -glicosídica, evidenciada pelos sinais em  $\delta$  5,13 ( $d$ ; 7,2), referente ao hidrogênio anomérico e em 3,72, referente ao hidrogênio metilênico H-6". O sinal de um singlete em 3,78 comprovou a presença de um grupo metoxila em C-6.

A Tabela 07 e a Figura 25 apresentaram também a análise do espectro bidimensional de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  COSY (Figura 16), mostrando as correlações homonucleares.

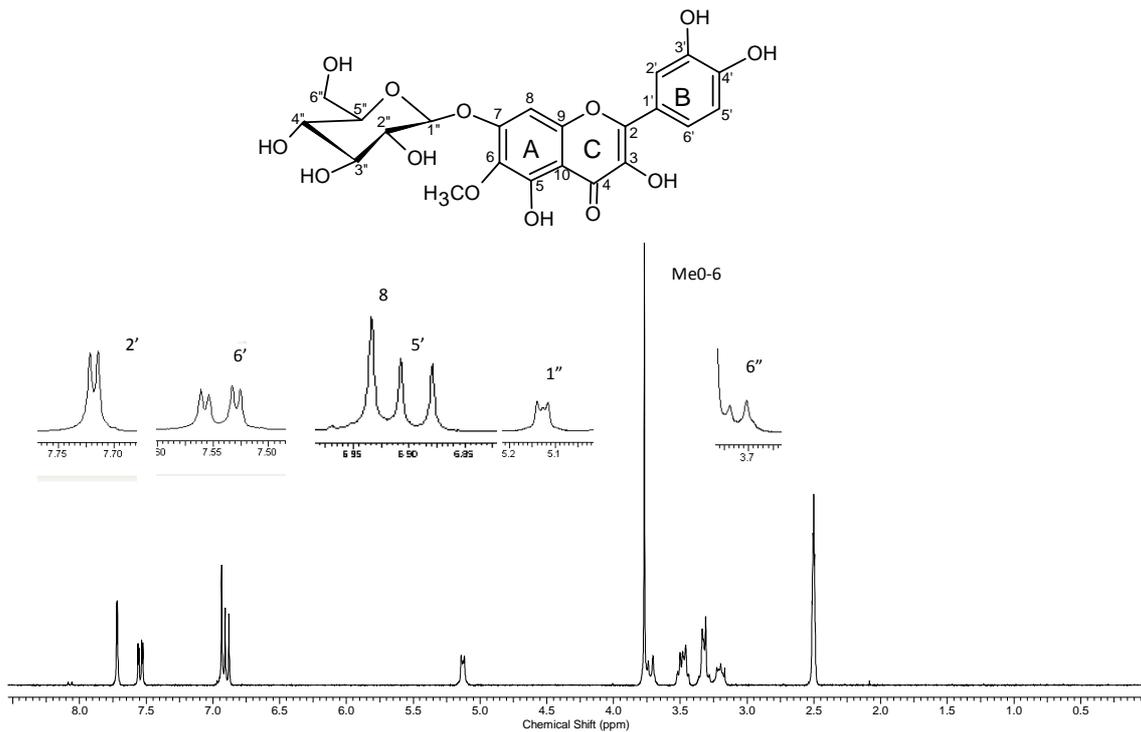


Figura 24 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância Tp-2 (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

Tabela 7 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e correlações observadas no COSY de Tp-2 comparados com dados reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina 7-O- $\beta$ -glicose (300 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ ).

H	$\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz)	Tp 2 COSY	patuletina 7-O- $\beta$ - glicose $\delta_{\text{H}}$ (m, J em Hz)
8	6,93 (s)		6,94 (s)
2'	7,72 (d, 2,2)	H-6'	7,72 (d, 2,1)
5'	6,89 (d, 8,5)	H-6'	6,91 (d, 8,5)
6'	7,54 (dd, 8,5; 2,1)	H-2' – H-5'	7,56 (dd, 8,5; 2,1)
1''	5,13 (d, 7,2)	H-2''	5,12 (d, 7,3)
2''	3,32 (d, 2,2)	H-1''	3,35-3,80 (m)
3''	3,45 (m)		
4''	3,17 (m)		
5''	3,48 (m)	H-6''	
6''	3,72 (m)		
MeO-6	3,78 (s)		3,78 (s)

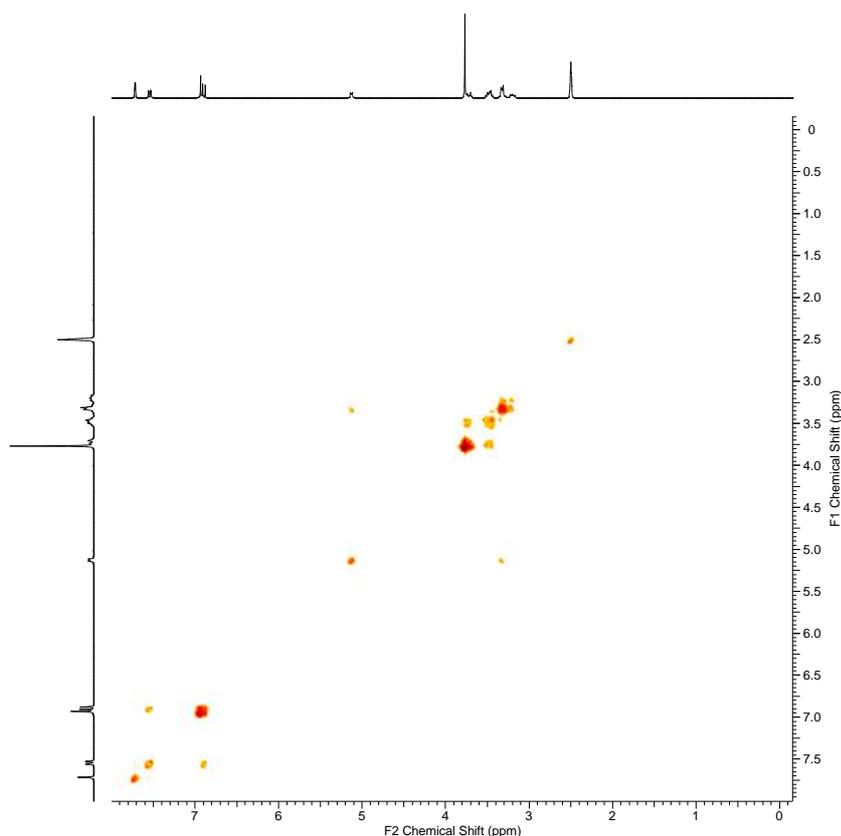


Figura 25 - Espectro de COSY da substância Tp-2 (300 MHz; DMSO- $d_6$ ).

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  em ppm) de Tp-2 (75,45 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) foi observado o sinal em  $\delta$  176,2 referente a uma carbonila  $\alpha$ - $\beta$  insaturada (C-4). Também foram verificados sinais em  $\delta$  135,8; 151,1; 145,0 e 147,7 referentes aos carbonos hidroxilados C-3, C-5, C-3' e C-4', respectivamente. O sinal em  $\delta$  93,8 foi atribuído ao carbono metínico (C-8) do anel A. Já os sinais em  $\delta$  147,9; 131,8; 156,4; 151,4 e 105,0 foram atribuídos aos carbonos não-hidrogenados C-2, C-6, C-7, C-9 e C-10, respectivamente. Ao carbono anomérico da unidade glicosídica foi atribuído o sinal em  $\delta$  110,1. O posicionamento do grupo metoxila, em C-6, e da unidade  $\beta$ -glicosídica, em C-7, foi feito com base na comparação dos deslocamentos da substância Tp-2 com os reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina 7-O- $\beta$ -glicose (Tabela 8, Figura 26).

A comprovação do posicionamento da unidade glicosídica em C-7, bem como o posicionamento da metoxila em C-6 foram feitas por experimento de HMBC (Tabela 8, Figura 27). As correlações do sinal em  $\delta$  5,13, referente ao hidrogênio anomérico H-1", com o sinal em  $\delta$  156,40, referente a unidade glicosídica. Para o grupo metoxila tem-se também a correlação com o C-6, em  $\delta$  131,80.

Tabela 8 - Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e HMBC, de Tp-2, comparados com dados de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) reportados na literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) para a patuletina 7-O- $\beta$ -glicose (75,5 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ ).

<b>C</b>	$\delta_{\text{C}}$	<b>HMBC</b>	<b>patuletina 7-O-<math>\beta</math>-glicose (<math>\delta_{\text{C}}</math>)</b>
2	147,9	7,54; 7,72	148,1
3	135,8		136,6
4	176,2	6,9	177,0
5	151,1	6,9	151,9
6	131,8	3,78	132,6
7	156,4	5,13; 6,93	157,2
8	93,8		94,8
9	151,4		152,2
10	105,0	6,93	105,8
1'	120,0	7,72	122,7
2'	115,5	7,54	116,3
3'	145,0	6,93; 7,72	146,0
4'	147,7	6,89	148,8
5'	115,4		116,5
6'	121,8		121,0
1''	100,1	3,72	101,0
2''	73,2	3,32	74,1
3''	77,2	3,72	77,5
4''	69,5		70,44
5''	76,7		78,0
6''	60,6	3,54	61,5
MeO-6	60,3		61,2

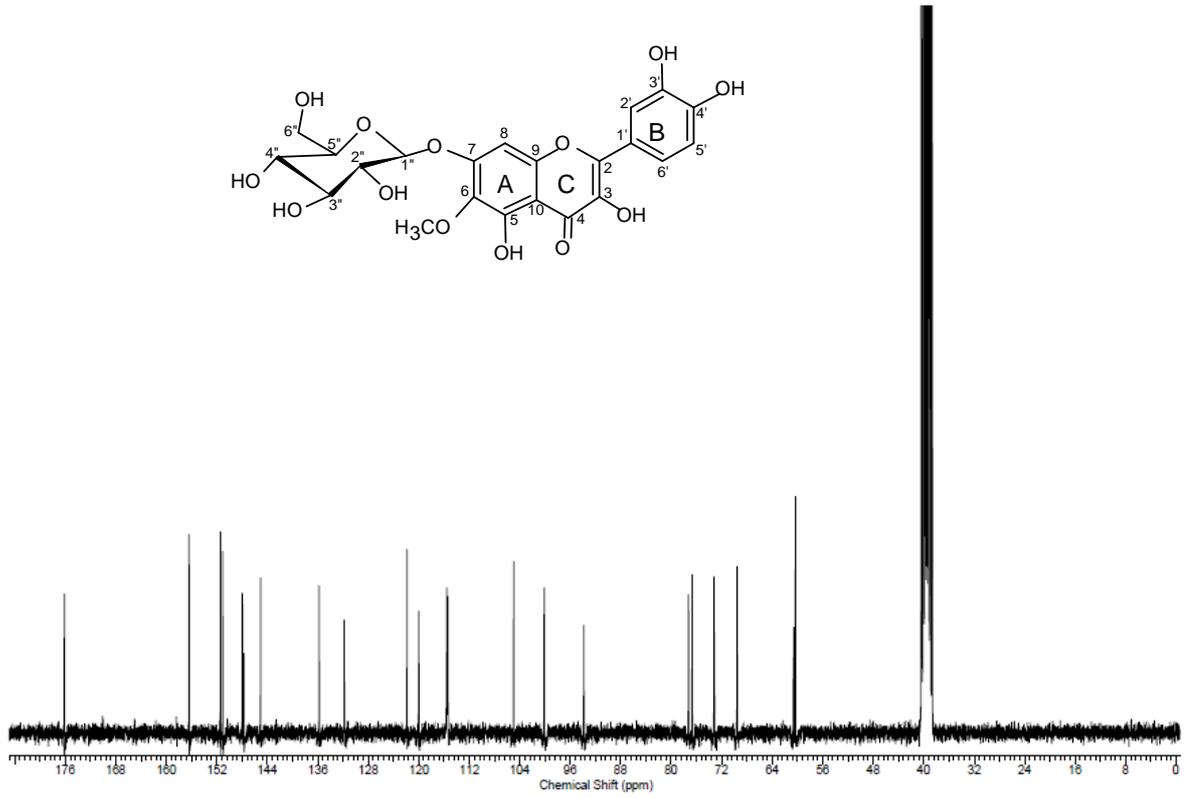


Figura 26- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância Tp-2 (75,45 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).

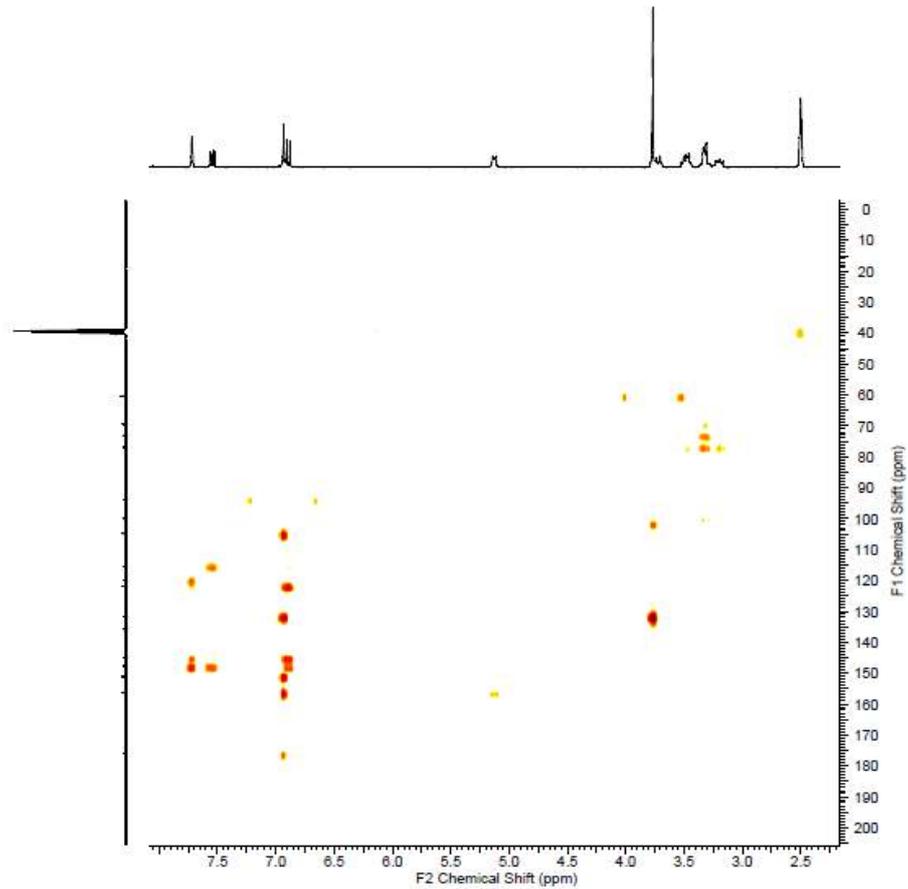


Figura 27 - Espectro de HMBC da substância Tp-2 (75,5 MHz;  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Por meio da análise dos dados obtidos nos espectros de RMN 1D e 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY e HMBC) e comparação com a literatura (Schmeda-Hirschmann et al., 2004) Tp-2 foi identificada como sendo um flavonol denominado patuletina 7-O- $\beta$ -glicose (patulitrina).

Com os dados de CLAE-IES-MS/MS concluiu-se que os íons produtos são os mesmos descritos na literatura (Parejo et al., 2004) para a patulitrina, sendo esta aprovável substância.(Tabela 9).

Tabela 9 - Dados de CLAE-IES-MS/MS e da substância Tp-2 comparada com a literatura.

Nome do compost	[M-H] <sup>-</sup>	MS/MS	Literatura
Tp-2 Patulitrina	495	318,333	(Parejo et al., 2004)

#### 5.4.3 Atividades fisiológicas e farmacológicas das substancias isoladas

Na literatura é relatada diferentes atividades biológicas para os flavonoides isolados neste trabalho, patuletina e patulitrina, como a antioxidante (Schmeda-Hirschmann et al., 2004). Yakusawa; Kasahara (2013) em estudos com ratos verificaram que a patuletina e patulitrina inibem a inflamação aguda induzida por carragenina, histamina e ácido aracnoide (AA).

A patuletina apresenta propriedades antiespasmódicas e hipotensivas (Narayana et al., 2001). Estudo realizado por Faizi et al., (2008) verificou também que o flavonoide patuletina apresentou atividade antibacteriana frente a *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Micrococcus luteus* com concentração inibitória mínima (CIM) 12,5  $\mu\text{g}/\text{disco}$ .

#### 5.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O perfil cromatográfico do EB produzido neste trabalho foi comparado com o perfil de Munhoz (2012) (Figura 28). Nestas amostras, observam-se duas substâncias majoritárias nos tempos de retenção: (1)  $t_r$ ; 16,9 min e (2)  $t_r$ ; 23,7 min,

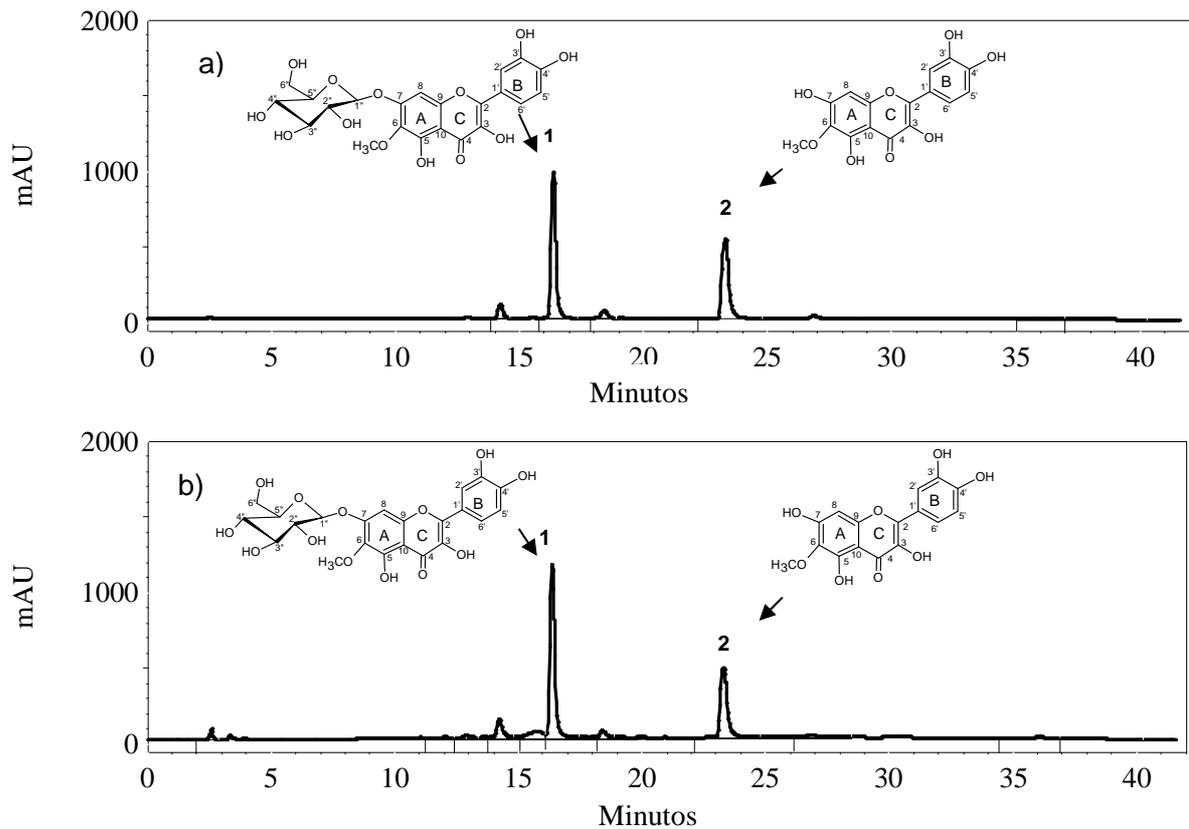


Figura 28 - Perfis cromatográficos por CLAE do EB de flores de *T. patula* (a) EB produzido neste trabalho; (b) EB produzido por Munhoz (2012). Picos: 1) patulitrina (Tp2) e (2) patuletina (Tp1) foram isolados neste trabalho.

Analisou-se também o perfil cromatográfico da FAE e FB (Figura 29). Na FAE o pico majoritário encontra-se com tempo de retenção de 23,7 min, enquanto na FB encontra-se com tempo de retenção de 16,9 min.

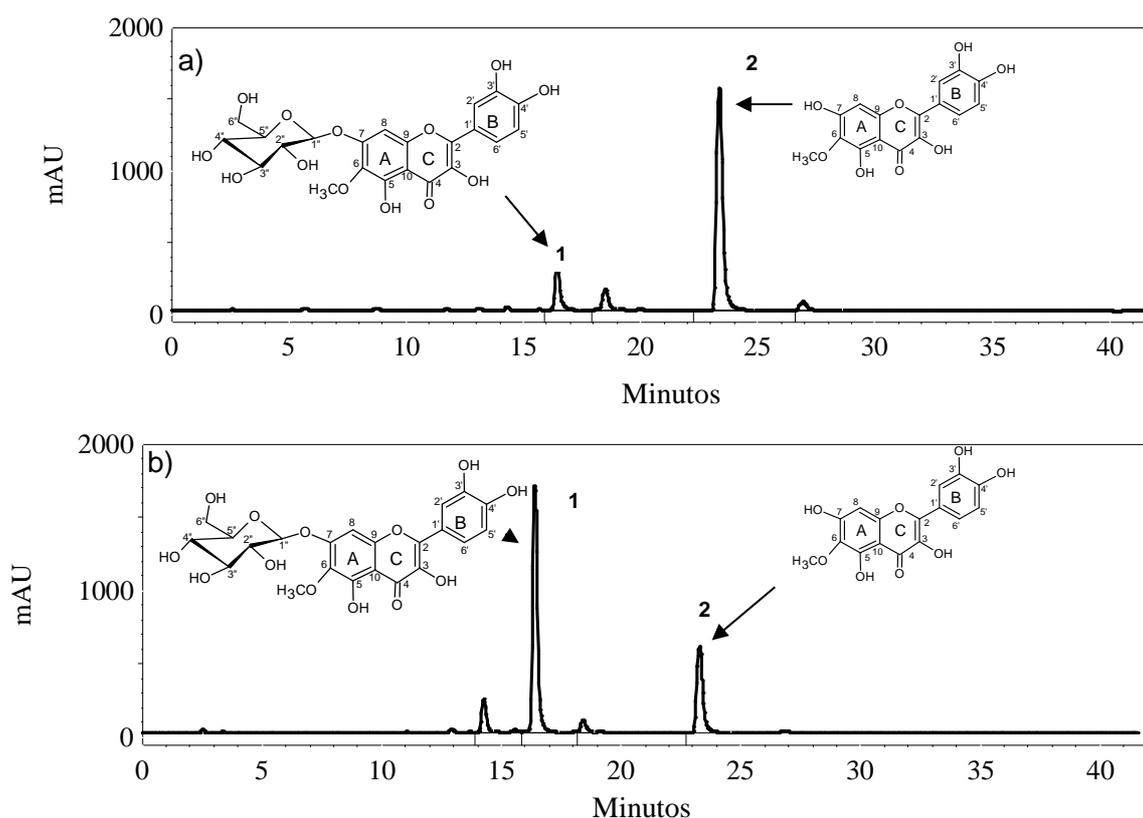


Figura 29 - Perfil cromatográfico por CLAE da fração acetato de etila (FAE) (a) e da fração *n*-butanol (FB) (b) do EB de flores de *T. patula*. Picos: 1) patulitrina (Tp2) e (2) patuletina (Tp1) isoladas neste trabalho.

Os picos 1 e 2 foram observados no espectro de UV/DAD (Tabela 10 e Figura 30) e comparados com a literatura (Mabry et al., 1970) e também estes picos majoritários foram identificados com a adição dos padrões isolados neste trabalho, assim as prováveis substâncias presentes no EB, FAE, FB são: (1) patulitrina (Tp2) e (2) patuletina (Tp1).

Tabela 10 - Flavonoides presentes no extrato bruto acetônico (EB), na FAE e FB correspondentes aos picos assinalados nos cromatogramas das figuras 27 e 28.

Pico	$t_r$ (min)	Dados UV-DAD (nm)		Identificação
		Banda I	Banda II	
1	16,9	257,00	372,00	patuletina 7-O- $\beta$ -glicose (Patulitrina)
2	23,7	258,00	371,00	Patuletina

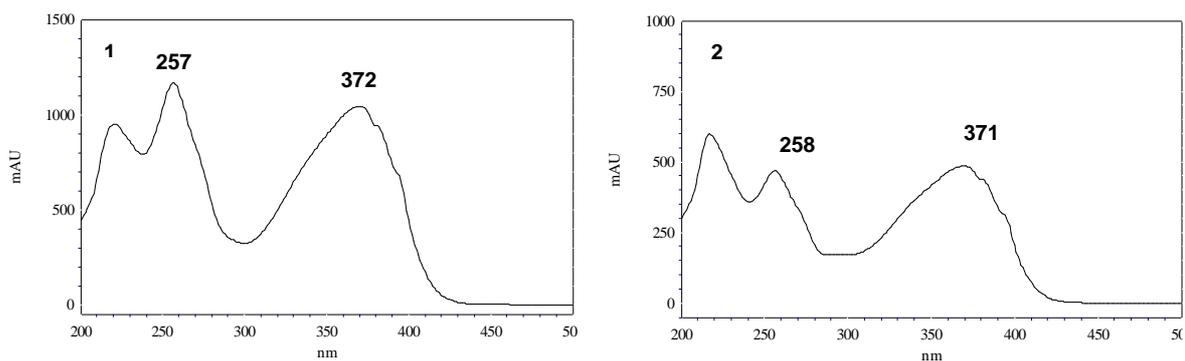


Figura 30 - Espectro UV/DAD correspondentes aos picos 1 e 2 presentes nos extrato e da FAE e FB.

A CLAE é uma técnica muito utilizada para substâncias fenólicas, como ácidos fenólicos, flavonoides, procianidinas e antocianinas (Angelo and Jorge, 2007). Entre estes compostos, encontram-se muitas publicações com análise quantitativa e qualitativa de flavonoides em frutas, bebidas, vinho, própolis e extratos vegetais, mostrando assim a adequação desta técnica para a determinação destes compostos presentes em várias amostras. Nas análises destas amostras podem ser utilizados diferentes tipos de detectores, entre eles encontra-se o arranjo de diodos de UV (UV/DAD), que é considerado o mais adequado para essas amostras e o mais acessível (Stefova et al., 2003).

Neste trabalho foi utilizada a coluna de fase reversa C-18. De acordo com a literatura esse tipo de coluna tem se destacado na separação de diferentes classes de compostos fenólicos (Angelo and Jorge, 2007; Longhini et al., 2013; Tarnawski et al., 2006). O sistema de CLAE em fase reversa (CLAE-FR) consiste de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, sendo que são utilizadas principalmente soluções à base de água (Kazakevich and LoBrutto, 2007). Estas colunas de fases reversas apresentam algumas vantagens como: rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel, facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas (Tonhi et al., 2002).

A fase móvel utilizada na análise das amostras de *T. patula* foi um sistema de gradiente com água:acetonitrila acidificada com ácido trifluoroacético. De acordo com a literatura a maioria das análises que utilizam coluna de fase reversa C-18 para os flavonoides utilizam como fase móvel metanol:água ou acetonitrila:água. Algumas vezes a fase móvel é acidificada com ácido fórmico, acético ou ácido fosfórico permitindo assim melhor separação e resolução dos picos (Stefova et al., 2003).

## 5.6 ELETROFORESE CAPILAR (EC)

Neste trabalho avaliou por EC a FB de *T. patula*. Os picos majoritários foram identificados com a adição dos padrões isolados neste trabalho. O pico 1 foi identificado como patulitrina e o pico 2 como patuletina (Figura 31). Observa-se neste perfil que a substância majoritária é a patulitrina, a mesma apresentada no perfil do CLAE.

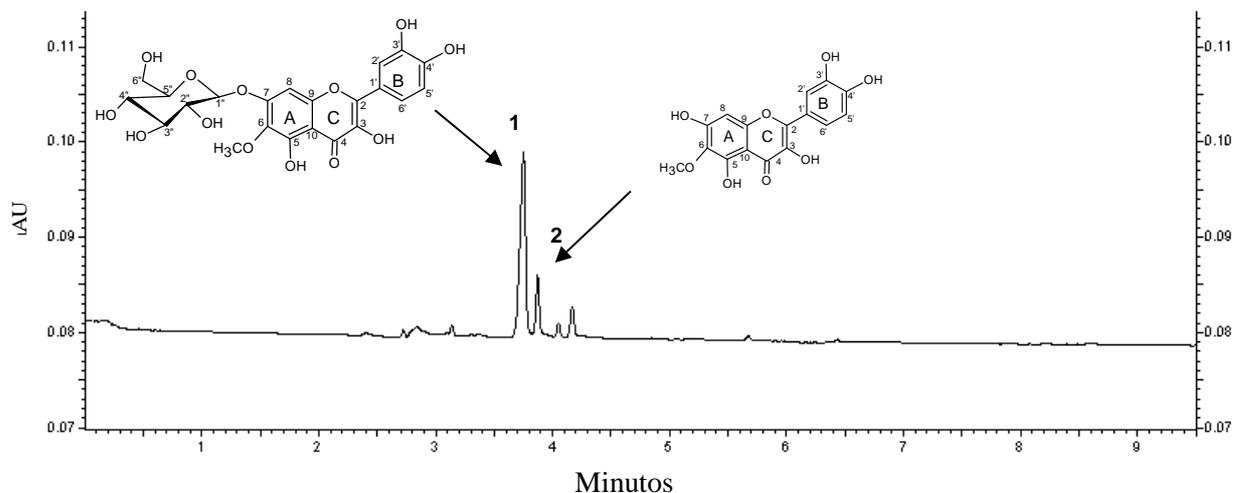


Figura 31- Perfil eletroforético da FB de *T. patula*. Condições eletroforéticas: tampão borato 80 mmol/L; pH 8,80; 10 mmol/L metil- $\beta$ -ciclodextrina (metil- $\beta$ -CD); voltagem de 30 kV a 25 °C; injeção por 3 s a 0,5 psi; detecção em 214 nm; FB: 500  $\mu$ g/mL. Picos: 1) patulitrina e 2) patuletina.

Alguns estudos com *T. patula* foram desenvolvidos utilizando CLAE, CCD, CLAE acoplada a massas (Karawya et al., 1996; Munhoz et al., 2012; Rajasekaran et al., 2004). Contudo, até o presente momento, nenhum estudo com *T. patula* utilizou a eletroforese capilar como avaliação quantitativa e qualitativa. Sendo assim, este estudo desenvolveu a primeira metodologia de EC com esta planta.

Na literatura, a comparação da CLAE e EC é muito comum, apesar de utilizar princípios de separação diferente. A EC apresenta como base de separação física de migração eletroforética e eletroosmose, dependendo principalmente da ionização das espécies, ao passo que as bases de CLAE são propriedades de adsorção e distribuição (Holzgrabe et al., 2006; Suntornsuk, 2002).

A EC é uma técnica que apresenta alta resolução, simplicidade e versatilidade (Altria, 1999). De acordo com a literatura, as principais vantagens do método de EC são: o baixo custo e o tempo reduzido por análise. Outra vantagem da técnica é a questão

ambiental, devido ao fato de utilizar pouca quantidade de solvente, contribuindo assim para menores impactos ambientais e menor custo de tratamento do solvente (Bizzotto et al., 2013; Graef, 2007; Lechtenberg et al., 2004; Liu et al., 2008).

De fato, comparando-se as metodologias desenvolvidas para avaliação da FB de *T. patula*, foi observado que a metodologia desenvolvida por EC apresentou-se cerca de quatro vezes mais rápida que a metodologia por CLAE. Ainda, não foram utilizados solventes orgânicos (acetonitrila) para promover a separação dos analitos no EC, sendo, portanto, menos poluente ao meio ambiente. Além disto, como o volume de solução eletrolítica utilizado para as análises por EC é pequeno (cerca de 10 mL por dia de análise), é possível utilizar aditivos (como as CD) que seriam economicamente inviáveis em separações por CLAE.

Outra comparação que podemos fazer é que o EC se apresenta como um método mais simples, devido ser utilizado o sistema de eluição isocrática, enquanto o CLAE apresentar um sistema gradiente.

Desta forma, a metodologia desenvolvida por EC da FB de *T. patula* será submetida à validação, em posterior estudo.

## 5.7 ATIVIDADE LARVICIDA

Na busca de novos agentes capazes de controlar a disseminação do vetor *A. aegypti*, foram realizados bioensaios para avaliar a atividade larvicida das FH, FD, FAE, FB e FAQ.

As frações FAQ, FH, FB e FD apresentaram atividade larvicida apenas a partir de 750 mg/L e esta atividade foi tempo dependente (Figura 32). Em contra partida a FAE apresentou diminuição da viabilidade larva já a partir de 50 mg/L, atividade esta que se intensificou no decorrer do tempo (Figura 33).

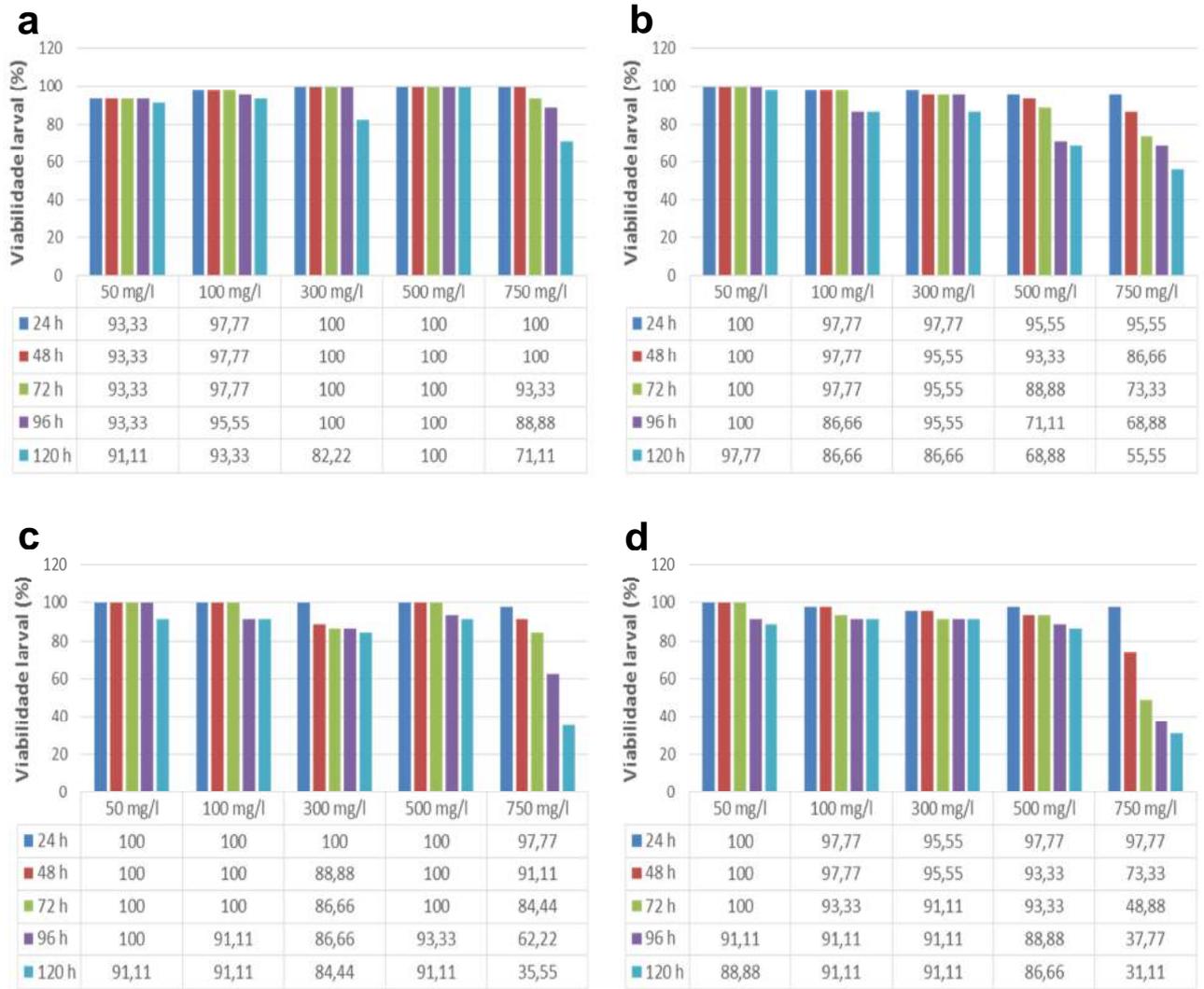


Figura 32- Atividade das frações: a) FAQ, b) FH, c) FB e d) FD contra larvas do mosquito *A. aegypti*.

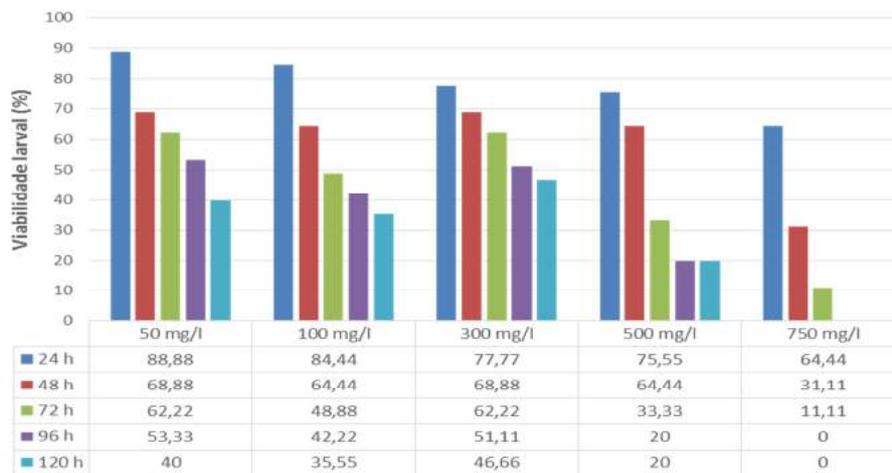


Figura 33- Atividade da FAE contra larvas do mosquito *A. aegypti*.

Komalasmisra et al., (2005) demonstraram que a atividade larvicida de plantas cujo  $CL_{50}$  foi menor que 750 mg/L são eficazes contra a larva do mosquito *A. aegypti*. Em nosso estudo, as frações FB e FD demonstraram serem eficazes contra a larva *A. aegypti*, uma vez que a concentração 750 mg/L reduziu mais que 50% a viabilidade larval. A FAE foi a mais promissora, pois em 50 mg/L já foi possível observar redução de mais da metade da população, causando a morte de todas as larvas na concentração 750 mg/L no tempo 96 h. Faizi et al., (2011b) realizou um estudo nematicida com flores de *T. patula*, as quais foram submetidas a um processo de desengorduramento com éter de petróleo, e após foi realizado a produção de extrato metanólico. O extrato metanólico foi dissolvido em água e submetido a partição líquido-líquido, originando assim as frações éter de petróleo (cinco vezes, JYM-P1-JYM-P5), diclorometano (três vezes, JYM-DC1-JYM-DC3), acetato de etila (quatro vezes, JYM-EA1-JYM-EA4), butanol (três vezes, JYM-BU1-JYM-BU3), e aquosas (JYM-aq). Em relação a atividade nematicida contra o *Heterodera zae* as frações acetato de etila, (JYM-EA1, JYM-EA2D, JYM-EA2M) e *n*-butanol (JYM-BU1), causou 100% de mortalidade de larvas. As frações JYM-EA2D e JYM-EA2M, apresentaram maiores concentrações de patuletina do que patulitrina, mostrando assim mais ativo do que JYM-EA1 e JYM-BU1, que têm menores quantidades de patuletina. Os autores também relataram que a patuletina é geralmente mais potente que a patulitrina em outros ensaios biológicos com antimicrobiano e antioxidante.

Comparando o resultado da atividade nematicida contra o *Heterodera zae* obtido por Faizi et al., (2011b) com os resultados da atividade larvicida frente ao vetor *Ae. aegypti* apresentada neste trabalho, observa-se que em ambos os trabalhos as frações que apresentaram melhores atividades foram as que apresentaram maior quantidade da patuletina e menor da patulitrina. Assim sugere-se que a atividade larvicida obtida da FAE pode estar relacionada com a maior concentração de patuletina presente na fração.



## 6 CONCLUSÕES

Através dos procedimentos realizados neste trabalho, verificou-se que os flavonoides patuletina e patulitrina estão presentes majoritariamente entre os metabolitos secundários das flores de *T. patula*.

Os métodos cromatográficos aplicados neste estudo, como coluna de poliamida e CCCAV, foram efetivos nos processo de separação e isolamento de flavonoides do extrato bruto acetônico de *T. patula*.

Nas condições empregadas em CLAE, os flavonoides patuletina e patulitrina foram observados no extrato bruto, FAE e FB, sendo que a FAE favoreceu a presença majoritaria de patuletina enquanto que o FB favoreceu a predominância de patulitrina. A FB também foi submetido à EC, que confirmou os dados obtidos por CLAE.

Será dada continuidade ao desenvolvimento de metodologia e validação de EC para *T. patula* devido às vantagens do método.

Em relação à atividade larvicida, a FAE apresentou resultados promissores com potencial para realização de estudos posteriores frente a *A. aegypti*. Sugere-se que esta atividade pode estar relacionada com a quantidade de patuletina em maior quantidade e patulitrina em menor quantidade presente na amostra.

## ***REFERÊNCIAS***



## REFERÊNCIAS

- Alcaraz, M.J., Ferrándiz, M.L., 1987. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. *Journal Ethnopharmacology* 21, 209-229.
- Altria, K.D., 1999. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* 856, 443-463.
- Anani, K., Hudson, J.B., De Souza, C., Akpagana, K., Tower, G.H.N., Arnason, J.T., Gbeassor, M.I., 2000. Investigation of medicinal plants of Togo for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology* 38, 40-45.
- Angelo, P.M., Jorge, N., 2007. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz* 66, 1-9.
- Bano, H., Ahmed, S.W., Azhar, I., Ali, M.S., Alam, N., 2002. Chemical constituents of *Tagetes patula* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 1-12.
- Barreiros, A.L.B.S., David, J.M., David, J.P., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 29, 113-123.
- Beretta, M.E., Fernandes, A.C., Schneider, A.A., Ritter, M.R., 2008. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 6, 189-216.
- Berthod, A., 1991. Practical approach to high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 550, 677-693.
- Bhardwaj, D.K., Bisht, M.S., Jain, S.C., Mehta, C.J., Sharma, G.C., 1980. Quercetagenin 5-methyl ether from the petals of *Tagetes patula*. *Phytochemistry* 19, 713.
- Bizzotto, C.S., Meinhart, A.D., Ballus, C.A., Ghiselli, G., Godoy, H.T., 2013. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography methods for caffeine determination in decaffeinated coffee. *Food Science and Technology (Campinas)* 33, 186-191.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A., 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention - a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18, 1-29.
- Braga, I.A., Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16, 279-293.
- Brasil, 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Ministério da Saúde, Brasília.
- Brasil, 2012. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Série A. Normas e Manuais Técnicos Cadernos de Atenção. Ministério da Saúde, Brasília.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56, 317-333.
- Bremer, K., 1994. Asteraceae: cladistics and classification. Timber Press, Portland.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., 1998. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores, Jaurtz, melnick & adelberg: microbiologia médica, 20 ed. Internacional, New York, pp. 342-355.
- Buena, A.P., Diez-Rojo, M.A., López-Pérez, J.A., Roberton, L., Escuer, M., Bello, A., 2008. Screening of *Tagetes patula* L. on different populations of Meloidogyne. *Crop protection* 27, 96-100.

- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33, 179-189.
- Calixto, J.B., 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 131-134.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22, 749-760.
- Carvalho, J.C.T., Gosmann, G., Schenkel, E.P., 2010. Compostos fenólicos simples e heterosídicos, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora da UFRG/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, pp. 519-535.
- Cechinel Filho, V., Yunes, R.A., 2001. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos., in: Yunes, R.A., Calixto, J.B. (Eds.), *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Argos, Chapecó.
- Chadha, Y.R., 1976. *Tagetes* Linn (Compositae). *The Wealth of India* 10, 109-112.
- Chagas, D.A., 2010. Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae), *Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto*, p. 32.
- Consoli, R.A.G.B., Oliveira, R.L., 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. *Fiocruz, Rio de Janeiro*.
- Correa-Hernández, S.X., Puebla-Ibáñez, P., Calle, R.C., Martín-Calvo, M.L., Barrio, L.S.R., Pabón, M.F.G., 2008. Vasodilator profile of flavonoid and phenylbutanoid compounds isolated from *Crotons chidean* Schlecht. *Revista Facultad de Medicina* 56, 291-301.
- Costa, A.F., 2002. *Farmacognosia*, 6 ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Cunha, A.P., Silva, A.P., Roque, O.R., 2003. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- David, J.P., David, J.M., 2010. Plantas medicinais, fármacos derivados de plantas, in: Silva, P. (Ed.), *Farmacologia*. 8. ed. . Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1325.
- Degani, A.L.G., Cass, Q.B., Vieira, P.C., 1998. *Cromatografia um breve ensaio*. *Cromatografia* 7, 21-25.
- Deineka, V.I., Sorokopudov, V.N., Deineka, L.A., Tret'yakov, M.Y., 2007. Flowers of marigold (*Tagetes*) species as a source of xanthophylls. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 41, 540-542.
- Dharmagadda, V.S.S., Naik, S.N., Mittal, P.K., Vasudevan, P., 2005. Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology* 96, 1235-1240.
- Di Carlo, G.D., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65, 337-353.
- Dornas, W.C., Oliveira, T.T., Rodrigues-das-Dores, R.G., Santos, A.F., Nagem, T.J., 2007. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada* 28, 241-249.
- Eiras, A.E., 2011. Culicidae, in: Neves, D.P. (Ed.), *Parasitologia humana*, 12 ed. Atheneu, São Paulo, pp. 387-401.

- Emerenciano, V.P., Militão, J.S.L.T., Campos, C.C., Romoff, P., Kaplan, M.A.C., Zambon, M., Brant, A.J.C., 2001. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29, 947-957.
- Es-Safil, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M., 2003. Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 535-553.
- European Pharmacopeia, 2006. Capillary Electrophoresis, 5 ed. Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM).
- Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Iqbal, E.Y., Lubna, Siddiqi, H., Naz, A., 2011a. Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zae* infective stage larvae. *Journal of agricultural and food chemistry* 59, 9080-9093.
- Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Iqbal, E.Y., Ludna; Siddiqi, H., Naz, A., 2011b. Isolation of nematicidal compounds from *Tagetes patula* L. yellow flowers: structure-activity relationship studies against cyst nematode *Heterodera zae* infective stage larvae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 9080-9093.
- Faizi, S., Siddiqi, H., Bano, S., Naz, A., Ludna; Mazhar, K., Nasim, S., Riaz, T., Kamal, S., Ahmad, A., Khan, A.S., 2008. Antibacterial and Antifungal Activities of Different Parts of *Tagetes patula*: Preparation of Patuletin Derivatives. *Pharmaceutical Biology* 46, 309-320.
- Ferrándiz, M.L., Alcaraz, M.J., 1991. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions* 32, 283-288.
- Ferrándiz, M.L., Nair, A.G., Alcaraz, M.J., 1990. Inhibition of sheep platelet arachidonate metabolism by flavonoids from Spanish and Indian medicinal herbs. *Pharmazie* 45, 206-208.
- Gafner, S., Wolfender, J.L., Mavi, S., Hostettmann, K., 1996. Antifungal and antibacterial chalcones from *Myrica serrata*. *Planta Medica* 62, 67-69.
- Galli, B., Chiaravalloti Neto, F., 2008. Modelo de risco tempo-espacial para identificação de áreas de risco para ocorrência de dengue *Revista Saúde Pública* 42, 656-663.
- Garcez, W.S., Garcez, F.R., Silva, L.M.G.E., Hamerski, L., 2009. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West- Central region of Brazil. *Bioresource Technology* 100, 6647-6650.
- Garg, S.N., Charles, R., Kumar, S., 1999. A new acyclic monoterpene glucoside from the capitula of *Tagetes patula*. *Fitoterapia* 70, 472-474.
- Graef, L.E., 2007. Desenvolvimento e validação de um método analítico quantitativo por eletroforese capilar para tuberculostáticos de primeira escolha Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.92.
- Gutiérrez, R.M.P., Luna, H.H., Garrido, S.H., 2006. Antioxidant activity of *Tagetes erecta* essential oil. *Journal of the Chilean Chemical Society* 51, 883-886.
- Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*, 3 ed. Chapman & Hall, London.
- Harborne, J.B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59.
- Hassanpouraghdam, M.B., Shekari, F., Emarat-Pardaz, J., Safi Shalamzari, M., 2011. Sesquiterpene rich volatile seed oil of *Tagetes patula* L. from northwest Iran. *Journal of Central European Agriculture* 12, 304-311.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heywood, V.H., 1993. *Flowering plants of the world*. Oxford University Press, New York.
- Hind, D.J.N., 1993. A checklist of Brazilian Senecioneae (Compositae). *Kew Bulletin*, Kew, Richmond, Surrey 48, 279-295.
- Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y., 2006. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? *Electrophoresis* 27, 2283-2292.
- Hostettman, K., Marston, A., 2007. The search for new drugs from higher plants. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 61, 322-326.
- Hostettmann, K., Marston, A., Hostettmann, M., 2001. *Técnicas de cromatografia preparativa*, Springer.
- Ito, L.A., 2011. Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para isolar, identificar e quantificar cafeína e flavan-3-ol em extrato de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke – Sapindaceae, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), p. 133.
- Ito, Y., 2005. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography *Journal of Chromatography A* 1065, 145-168.
- Ivancheva, S., Zdravkova, M., 1993. Flavonoids in *Tagetes patula*. *Fitoterapia* 64, 555-558.
- Joly, A.B., 1998. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.*, 12 ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo.
- Karawya, M.S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Zaki, A.K., Nazif, N.M., 1996. HPLC and MS analyses of lutein-esters from *Tagetes patula* L. *Qatar University Science Journal* 16, 251-255.
- Kasahara, Y., Yasukawa, K., Kitanaka, S., Khan, M.T., Evans, F.J., 2002. Effect of methanol extract from flower petals of *Tagetes patula* L. on acute and chronic inflammation model. *Phytotherapy Research* 16, 217-222.
- Kaul, T.N., Middleton, E.J., Ogra, P.L., 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal Medical Virology* 15, 71-79.
- Kazakevich, Y., LoBrutto, R., 2007. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley, New York.
- Kim, H.K., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Kim, H.P., 1998. Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent. *Archives of Research Pharmacal* 21, 406-410.
- Komalamisra, N., Trongtokit, Y., Rongsriyam, Y., Apiwathnasorn, C., 2005. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36, 1412-1422.
- Kyo, M., Miyauehi, Y., Fujimoto, T., Mayama, S., 1990. Production of nematocidal compounds by hairy root cultures of *Tagetes patula* L. *Plant Cell Reports* 9, 393-397.
- Lacey, L.A., 1997. Bacteria: Laboratory bioassay of bacteria against aquatic insects with emphasis on larvae of mosquitoes and black flies, in: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in insect pathology*, London, p. 409.
- Lane, M.A., 1996. Pollination biology of Compositae, in: Caligari, P.D.S., Hind, D.J.N. (Eds.), *Compositae: biology & utilization*. Royal Botanical Garden, Kew, pp. 61-81.
- Langer, R.H.M., Hill, G.D., 1991. *Agricultural plants.*, 2 ed ed. Cambridge University Press.

- Lechtenberg, M., Quandt, B., Nahrstedt, A., 2004. Quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma rhizomes* and rapid differentiation of *Curcuma domestica* Val. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis. *Phytochemical analysis* 15, 152-158.
- Leitão, G.G., 2005. Uso da Cromatografia Contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal. *Revista Fitos* 1, 48-52.
- Li, W., Gao, Y., Zhao, J., Wang, Q., 2007. Phenolic, flavonoid, and lutein ester content and antioxidant activity of 11 cultivars of Chinese marigold. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8478-8484.
- Lima, F.O., Bezerra, A.S., 2012. Flavonoides e radicais livres. *Disciplinarum Scientia* 13, 111-124.
- Lincoln, T., Zeiger, E., 2009. *Fisiologia vegetal*, 4 ed. Artmed, São Paulo.
- Liu, E.H., Qi, L.W., Cao, J., Li, P., Li, C.Y., Peng, Y.B., 2008. Advances of modern chromatographic and electrophoretic methods in separation and analysis of flavonoids. *Molecules* 13, 2521-2544.
- Longhini, R., Klein, T., Bruschi, M.L., Silva Jr, W.V., Rodrigues, J., Lopes, N.P., Mello, J.C.P., 2013. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Separation Science* 36, 1247-1254.
- Lopes, R.M., Oliveira, T.T., Nagem, T.J., Pinto, A.S., 2000. Flavonoides: farmacologia de flavonoides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 3, 18-22.
- Lorenzi, H., Souza, H.M., 1995. *Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. São Paulo: Plantarum.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The systematic identification of flavonoids*. Springer, Berlin.
- Maioli-Azevedo, V., Fonseca-Kruel, V.S., 2007. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. *Acta Botânica Brasílica* 21, 263-275.
- Makino, M., Fujimoto, Y., 1999. Flavanones from *Baekkea frutescens*. *Phytochemistry* 50, 273-277.
- Março, P.H., Poppi, R.J., Scarminio, I.S., 2008. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. *Química Nova* 31, 1218-1223.
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., Romagnoli, C., 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research* 159, 295-304.
- Marotti, I., Marotti, M., Piccaglia, R., ; , Nastri, A., Grandi, S., Dinelli, G., 2010. Thiophene occurrence in different *Tagetes* species: agricultural biomasses as sources of biocidal substances. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1210-1217.
- Marotti, M., Piccaglia, R., Biavati, B., Marotti, I., 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal of Essential Oil Research* 16, 440-444.
- Marston, A., Hostettmann, K., 1991. *Modern Separation Methods. Natural Product Reports*, 391-413.
- Marston, A., Hostettmann, K., 1994. Counter-current chromatography as a preparative tool - applications and perspectives *Journal of Chromatography A* 654, 315-341.

- Martín, J.L.S., 2014. Situación epidemiológica del dengue, Bucaramanga, Colombia.
- Martins, N.L.P., Malafaia, O., Ribas-Filho, J.M., Heibel, M., Baldez, R.N., Vasconcelos, P.R.L., Moreira, H., Mazza, M., Nassif, P.A.N., Wallbach, T.Z., 2006. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso Intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata*(babaçu). Estudo controlado em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira 21, 66-75.
- McBride, W.J.H., Bielefeldt-Ohmann, H., 2000. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. Microbes and Infections 2, 1041-1050.
- Medeiros, E.S., Costa, F.M., Rodrigues, I.B., Tadei, W.P., 2011. Larvicidal activity of the aqueous extract of the clove (*Eugenia caryophyllata*) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) under laboratory conditions. Journal of Research in Biology 7, 518-523.
- Mello, J.C.P., Petrovick, P.R., 2000. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. Acta Farmaceutica Bonaerense 19, 211-215.
- Mendonça, F.A.C., Silva, K.F.S., Santos, K.K., Ribeiro Júnior, K.A.L., Sant'ana, A.E.G., 2005. Activities of some Brazilian plants against larvae of the *Aedes aegypti*. Fitoterapia 76, 629-636.
- Montanari, C.A., Bolzani, V.S., 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. Química nova 24, 105-111.
- Munhoz, V.M., 2013. Avaliação farmacognóstica e otimização da extração de flavonoides de flores de *Tagetes patula* através de planejamento de misturas, Dissertação(Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Maringá, p. 58.
- Munhoz, V.M., Longhini, R., Silva, T.A.P., Lonni, A.A.S.G., Souza, J.R.P., Lopes, G.C., Mello, J.C.P., 2012. Estudo Farmacognóstico de Flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae). Revista Fitos 7, 225-230.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., Krishna, D.R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian Journal of Pharmacology 33, 2-16.
- Nogueira, R.M.R., Miagostovich, M.P., Schatzmayr, H.G., 2000. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. Caderno de Saúde Pública 16, 205-211.
- Paho/Who, 2014. Epidemiological Alert. Chikungunya and dengue fever in the Americas.
- Paho/Who, 2015. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas, by country.
- Parejo, I., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C., 2005. Acylated quercetagenin glycosides with antioxidant activity from *Tagetes maxima*. Phytochemistry 66, 2356-2362.
- Parejo, I., Jáuregui, O., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., 2004. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry 18, 2801-2810.
- Pauli, G.F., Pro, S.M., Friesen, J.B., 2008. Countercurrent separation of natural products. Journal of Natural Products 71, 1489-1508.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Grandi, S., 1998. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. Industrial Crops and Products 8, 45-51.
- Plaza, C.V., 2007. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das folhas e frutos de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) Dissertação (Química). Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- Priyanka, D., Shalini, T., Navneet, V.K., 2013. A brief study on marigold (*Tagetes species*): a review. International Research Journal of Pharmacy 4, 43-48.

- Rajasekaran, T., Ravishankar, G.A., Reddy, B., 2004. In vitro growth of *Tagetes patula* L. hairy roots, production of thiophenes and its mosquito larvicidal activity. *Indian Journal of Biotechnology* 3, 92-96.
- Ramya, R., Mahna, S., Bhanumathi, S.P., Bhat, S.K., 2012. Analysis of phytochemical composition and bacteriostatic of *Tagetes* sp. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 114-115.
- Rao, P.S., Seshadri, T.R., 1941. The colouring matter of the flowers of *Tagetes patula*: Isolation of a new flavonol, patuletin and its constitution. *Proceedings Mathematical Sciences* 14, 643-647.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L., 2003. Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews* 23, 519-534.
- Restello, R.M., Menegatt, C., Mossi, A.J., 2009. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 53, 304-307.
- Rinaldo, D., Silva, M.A., Rodrigues, C.M., Calvo, T.R., Sannomiya, M., Santos, L.C., Vilegas, W., 2006. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Savilla elliptica* st. hill. by high-speed counter-current chromatography. *Química Nova* 29, 947-949.
- Roel, A.R., 2001. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local* 1, 43-50.
- Romagnoli, C., Bruni, R., Andreotti, E., Rai, M.K., Vicentini, C.B., Mares, D., 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma* 225, 57-65.
- Rondón, M., Velasco, J., Hernández, J., Pecheneda, M., Rojas, J., Morales, A., Carmona, J., Diaz, T., 2006. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Revista Latino americana de Química* 34, 32-36.
- Rozendaal, J.A., 1997. Vector control, methods for use by individuals and communities. World Health Organization, Geneva.
- Saleem, R., Ahmad, M., Naz, A., Siddiqui, H., Ahmad, S.I., Faizi, S., 2004. Hypotensive and toxicological study of citric acid and other constituents from *Tagetes patula* roots. *Archives of Pharmacal Research* 27, 1037-1042.
- Santos, K.F.R., Oliveira, T.T., Nagem, T.J., Pinto, A.S., Oliveira, M.G., 1999. Hypolipidaemic effects of naringenin, rutin, nicotinic acid and their associations. *Pharmacological Research* 40, 493-496.
- Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Theoduloz, C., Rodríguez, J., López, S., Feresin, G.E., 2004. Free radical scavengers and antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Zeitschrift für Naturforschung* 59, 345-353.
- Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Theoduloz, C., Rodríguez, J., López, S., Feresin, G.E., 2004. Free Radical Scavengers and Antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Zeitschrift für Naturforschung* 59, 345-353.
- Shahidi, F., Naczk, M., 2004. Phenolics in food and nutraceuticals: sources, applications and health effects. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Shinde, N.V., Kanase, K.G., Shilimkar, V.C., Undale, V.R., Bhosale, A.V., 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of solvent extracts of *Tagetes erectus* Linn (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8, 325-329.

- Shu, X., Wang, M., Liu, D., Wang, D., Lin, X., Liu, J., Wang, X., Huang, L., 2013. Preparative separation of polyphenols from artichoke by polyamide column chromatography and high-speed counter-current chromatography. *Química Nova* 36, 836-839.
- Silva, M.N., 2011. Desenvolvimento de comprimidos e isolamento de marcadores a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Copaifera lansdorffii* Desf., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Ribeirão Preto, p. 166.
- Silveira, P.F., Bandeira, M.A.M., Arrais, P.S.D., 2008. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 618-626.
- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2005. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira em APG II, 2 ed. ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Stefova, M., Stafilov, T., Kulevanova, S., 2003. HPLC Analysis of Flavonoids, in: Dekker, M. (Ed.), *Encyclopedia of Chromatography*, New Yourk.
- Sticher, O., 2008. Natural product isolation. *Natural Product Report*, 517-554.
- Suntornsuk, L., 2002. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27, 679-698.
- Tagliaro, F., Manetto, G., Crivellente, F., Smith, F.P., 1998. A brief introduction to capillary electrophoresis. *Forensic Science International* 92, 75-88.
- Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological & pharmaceutical bulletin* 27, 1965-1969.
- Tarnawski, M., Depta, K., Grejciun, D., Szelepin, B., 2006. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract—a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 182-188.
- Tarpo, E., 1969. Isolation of quercetagenin from *Tagetes patula* flowers. *Farmacia* 17, 739-744.
- Tereschuk, M.L., Riera, M.V., Castro, G.R., Abdala, L.R., 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 227-232.
- Tesh, R.B., 1989. Dengue, in: Wyngaarden, S.V. (Ed.), *CECIL Tratamento de Medicina Interna*. 16 ed, 16 ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 1699-1670.
- Timbó, M.J.M., 2006. Dengue, in: Duncan, B., Schmidt, M.I., Giugliani, E.R.J. (Eds.), *Medicina Laboratorial. Conduas de atenção primária baseadas em evidências*, 3 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Toledo, C.E.M., 2002. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae), Dissertação (Ciências Farmacêuticas da UNESP), Araraquara, p. 115.
- Tonhi, E., Collins, K.E., Jardim, C.S.F., Collins, C.H., 2002. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova* 25, 616-623.
- Tran, A., Deparis, X., Dussart, P., Morvan, J., Rabarison, P., Remy, F., Polidori, L., Gardon, J., 2004. Dengue spatial and temporal patterns, French Guiana, 2001. *Emerging Infectious Diseases* 10, 615-621.
- Tzeng, S.H., Ko, W.C., Ko, F.N., Teng, C.M., 1991. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thrombosis Research* 64, 91-100.

- Vasilenko, Y.K., Bogdanov, A.N., Frolova, L.M., Frolov, A.V., 1990. Hepatoprotective properties of preparations from spreading marigold. *Khimico Farmatsevticheskii Zhurnal* 24.
- Vasudevan, P., Kashyap, S., Sharma, S., 1997. *Tagetes*: a multipurpose plant. *Bioresource Technology* 62, 29-35.
- Vila, F.C., 2006. Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) Dissertação (Mestrado em Ciências Química Analítica), São Carlos, p. 68.
- Voigt, R., 1993. *Pharmazeutische Technologie*. 7 ed. Ullstein Mosby, Ausgabe, Berlin.
- Wächter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E., Timmermann, B.N., 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52, 1469-1471.
- Wells, C., Bertsch, W., Perich, M., 1993. Insecticidal volatiles from the marigold plant (Genus *Tagetes*). Effect of species and sample manipulation. *Chromatographia* 35, 209-215.
- Wiesbrook, M.L., 2004. Natural indeed: Are natural insecticides safer and better than conventional insecticides? *Illinois Pesticide Review* 17, 1-8.
- World Health Organization, W., 1999. DRAFT. Determination of the Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *B. sphaericus* products, Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. *Who/Cds/Cpc/ Whopes*, pp. 29–33.
- World Health Organization, W., 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides.
- World Health Organization, W., 2009. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Preventions and Control*, p. 160.
- Xu, L., Chen, J., Qi, H., Shi, Y., 2012. Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines* 4, 103-117.
- Xu, Y., 1996. Tutorial: Capillary Electrophoresis. *The Chemical Educator* 1, 1-14.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberá, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59, 113-122.
- Yasukawa, K., Kasahara, Y., 2013. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model. *International Journal of Inflammation* 2013, 1-5.
- Yinga, H., Jiangb, H., Liua, H., Chena, F., Dua, Q., 2014. Ethyl acetate-*n*-butanol gradient solvent system for high-speed countercurrent chromatography to screen bioactive substances in okra. *Journal of Chromatography A* 1359, 117-123.
- Zhao, W.M., 2012. Extraction and isolation of natural products, in: Xu, R., Ye, Y., Zhao, W. (Eds.), *Introduction to Natural Products Chemistry*. Taylor E francis group.
- Zheng, W.F., Tan, R.X., Yang, L., Liu, Z.L., 1996. Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Medica* 62, 160-162.
- Zuanazzi, J.A.S., Montanha, J.A., 2010. Flavonoides, in: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Editora da UFRG/Editora da UFSC Porto Alegre/Florianópolis, pp. 579-581.

***ANEXOS***



## ANEXO 1

Cromatogramas obtidos por meio CLAE das subfrações da fração *n*-butanol do EB das flores de *T. patula*.

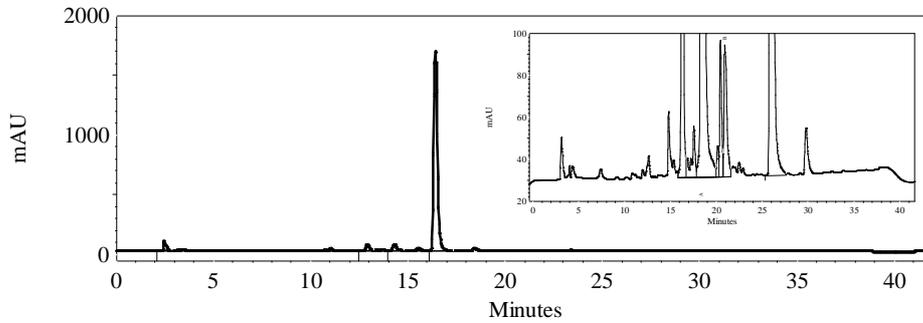


Figura A1.01 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 4 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

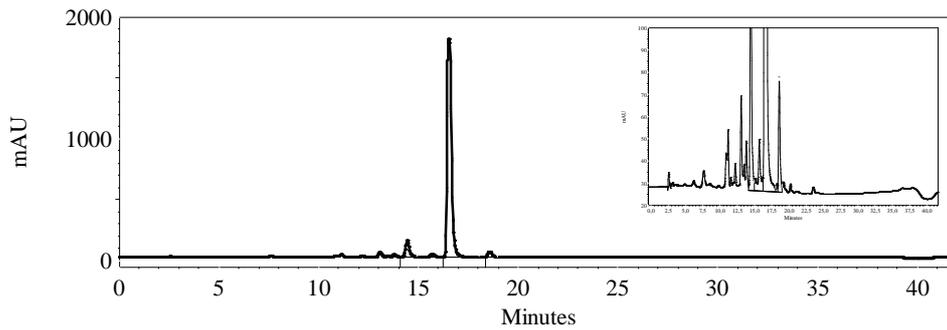


Figura A1.02 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 5 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

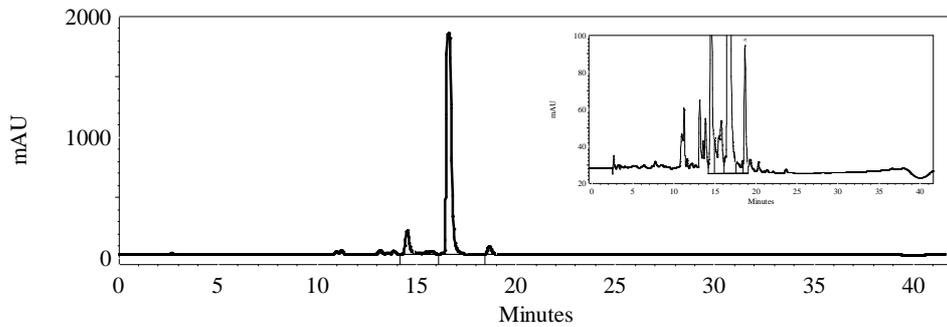


Figura A1.03 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 6 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

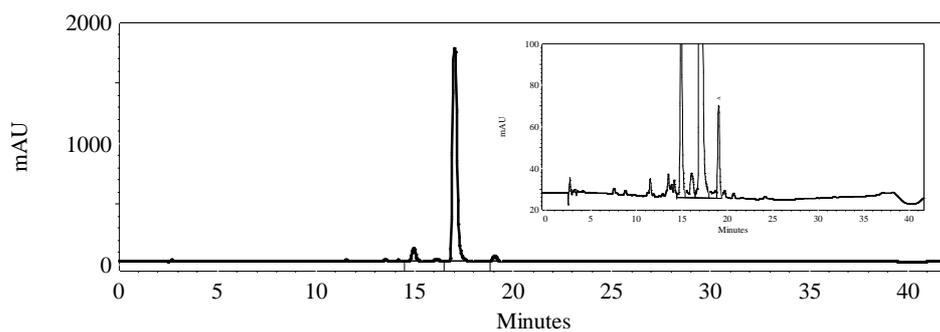


Figura A1.04 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 10 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

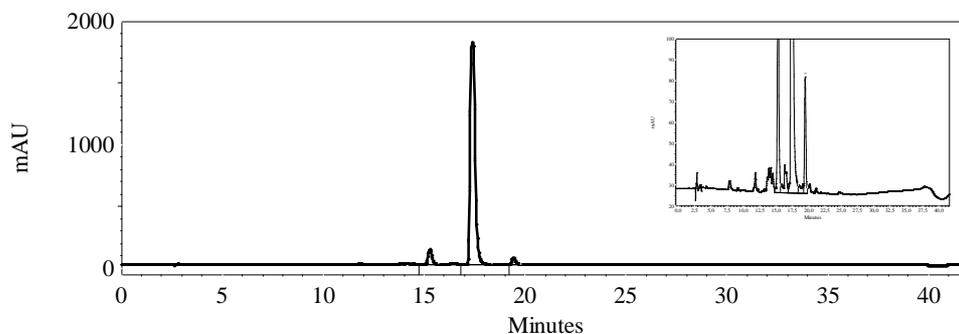


Figura A1.05 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 11 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

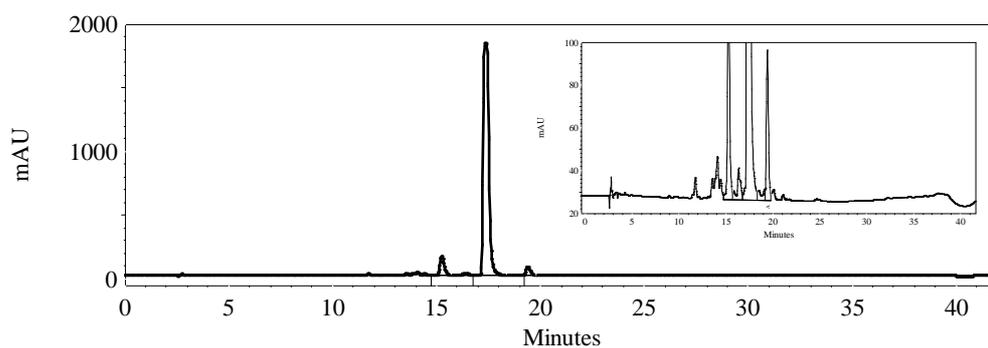


Figura A1.06 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 14 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

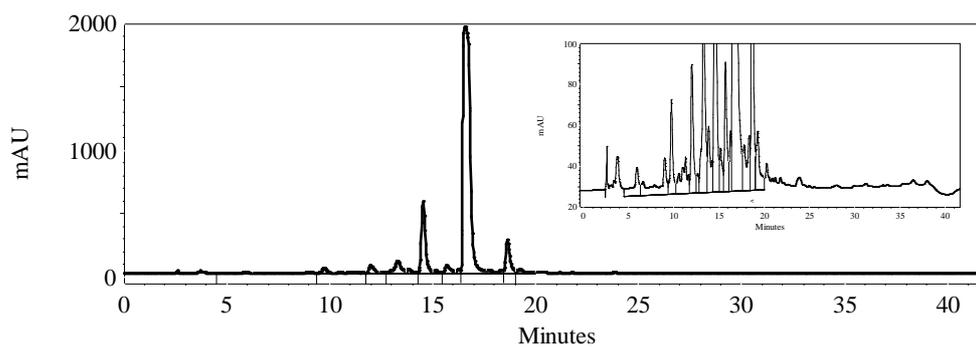


Figura A1.07 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 18 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

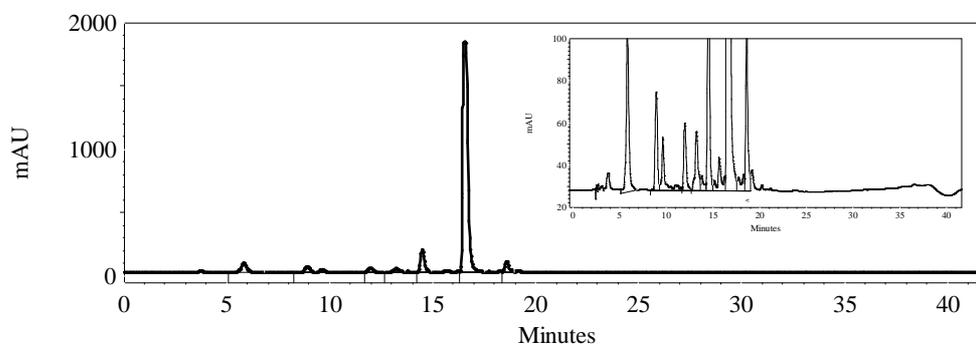


Figura A1.08 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 20 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

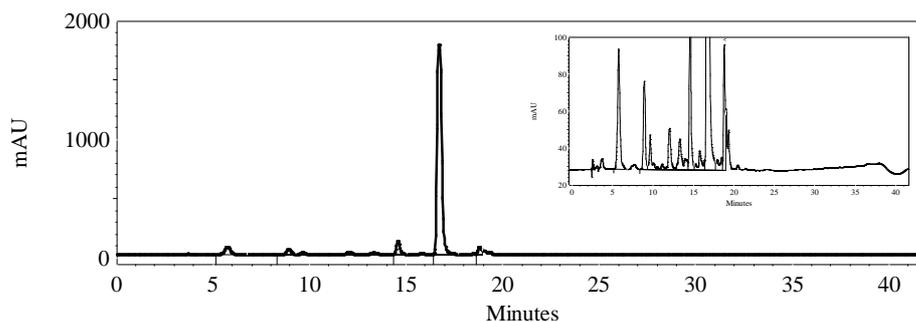


Figura A1.09 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 21 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

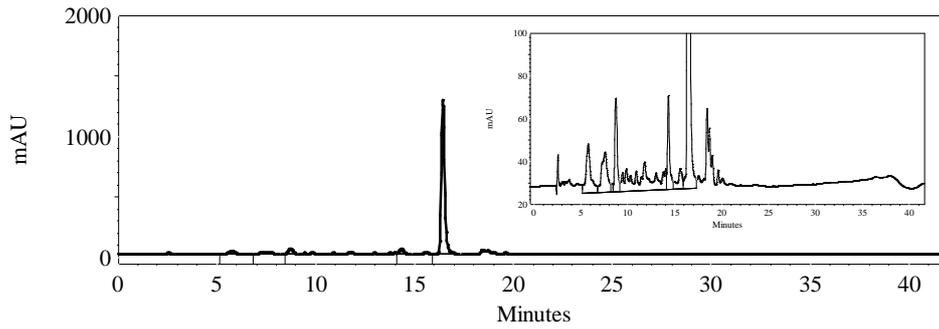


Figura A1.10- Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 24 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

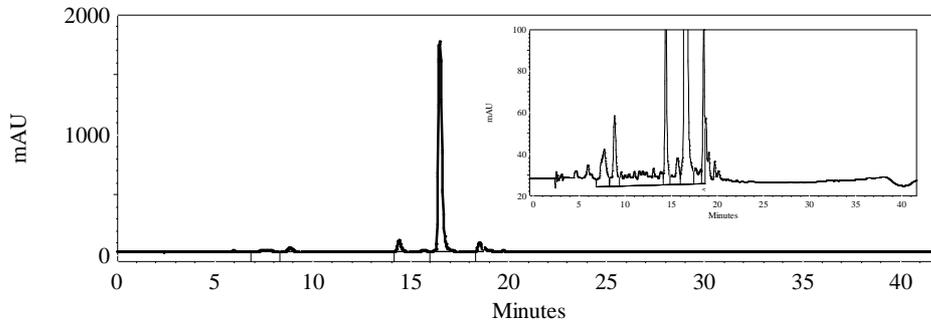


Figura A1.11 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 26 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

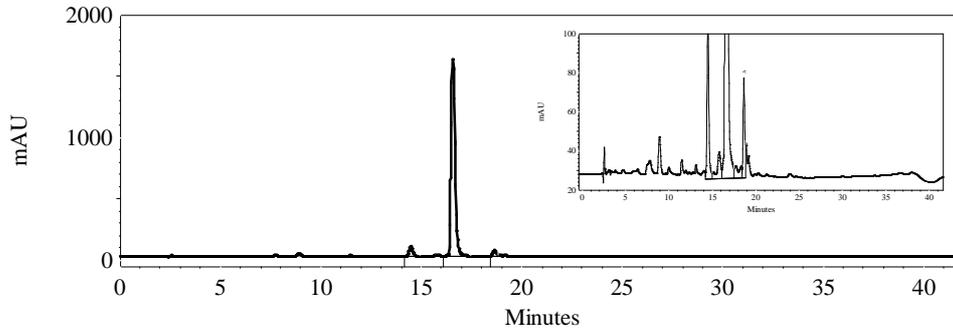


Figura A1.12 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 28 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

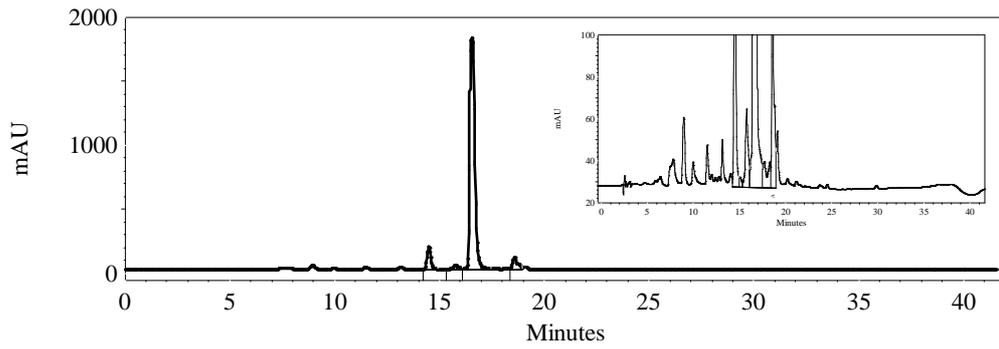


Figura A1.13 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 30 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

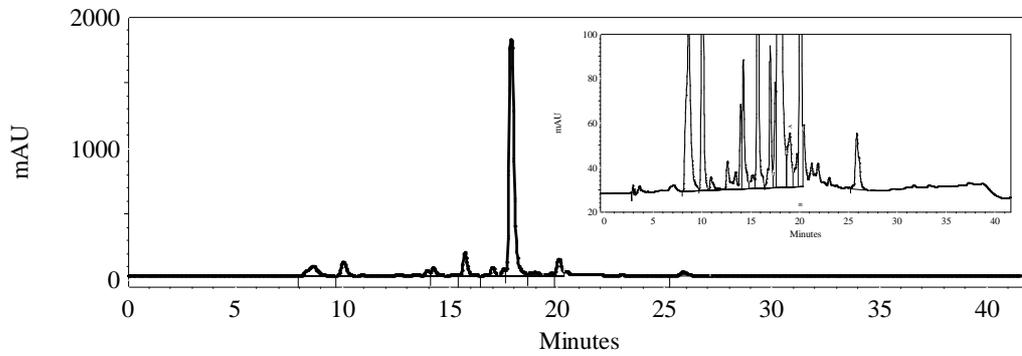


Figura A1.14 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 32 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

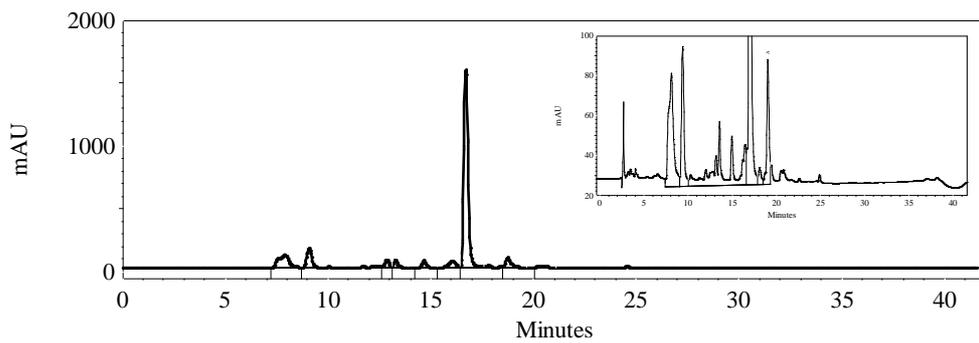


Figura A1.15 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 35 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

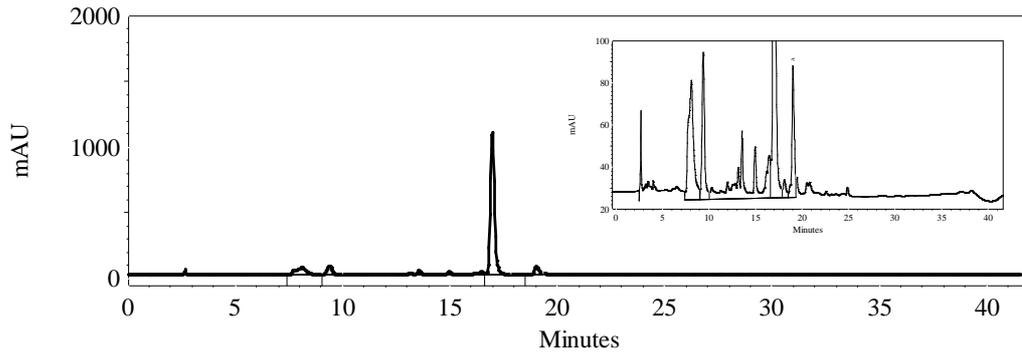


Figura 01.16 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 36 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

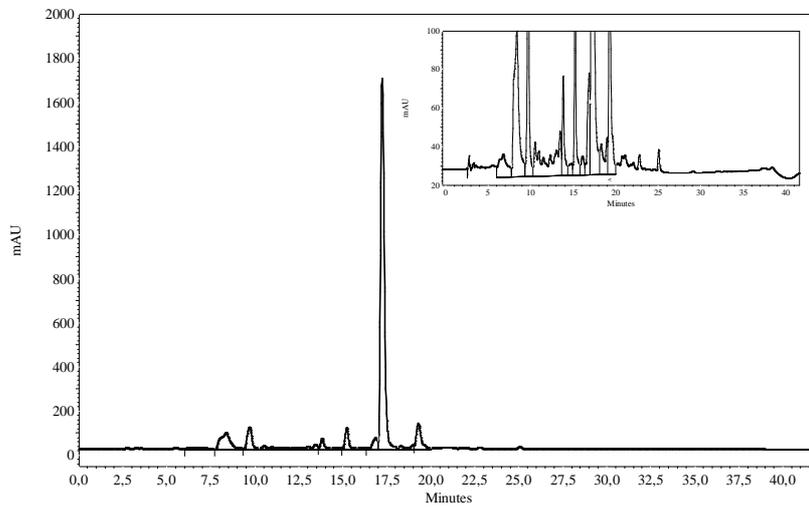


Figura A1.17 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 41 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

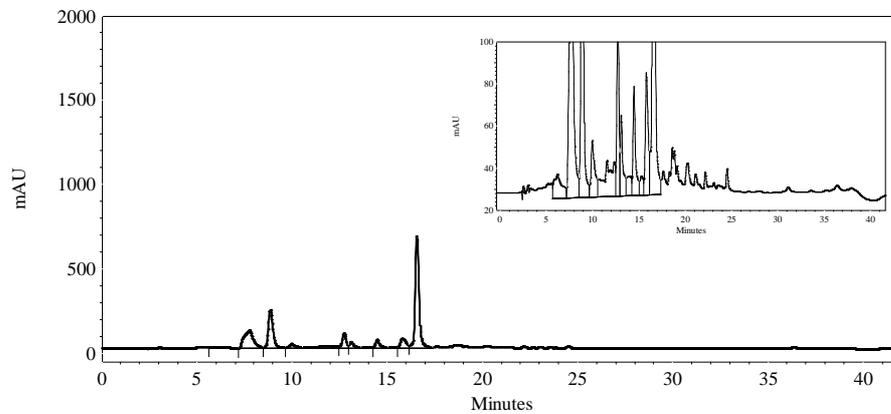


Figura A1.18 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 47 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

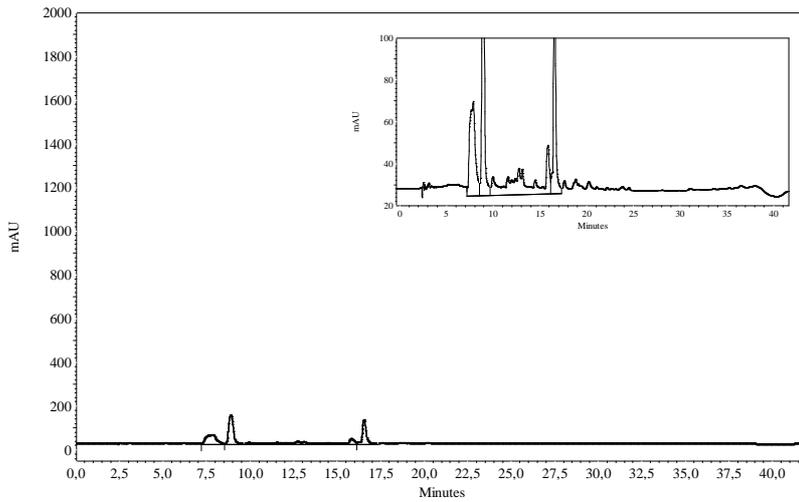


Figura A1.19 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 49 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

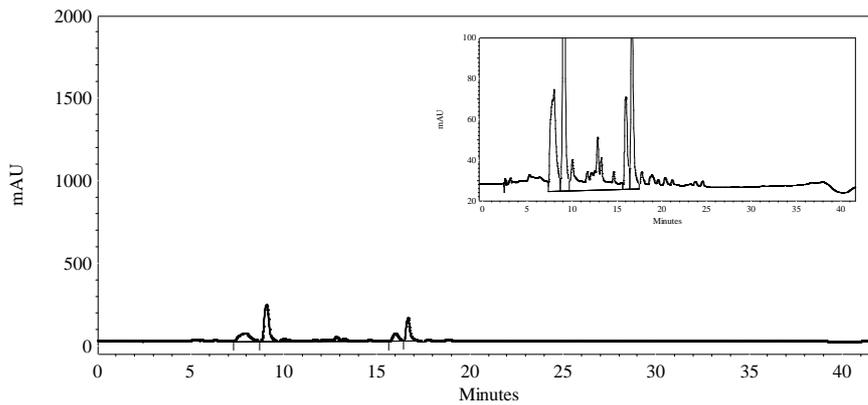


Figura A1.20 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 51 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

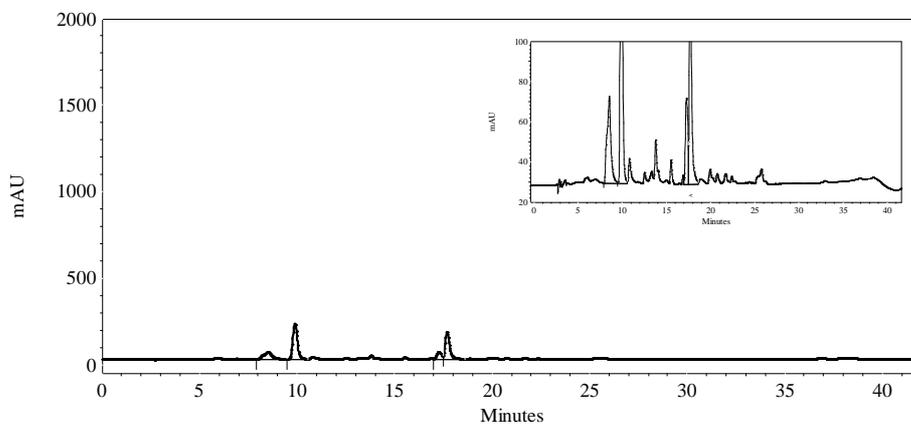


Figura A1.21 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 55 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

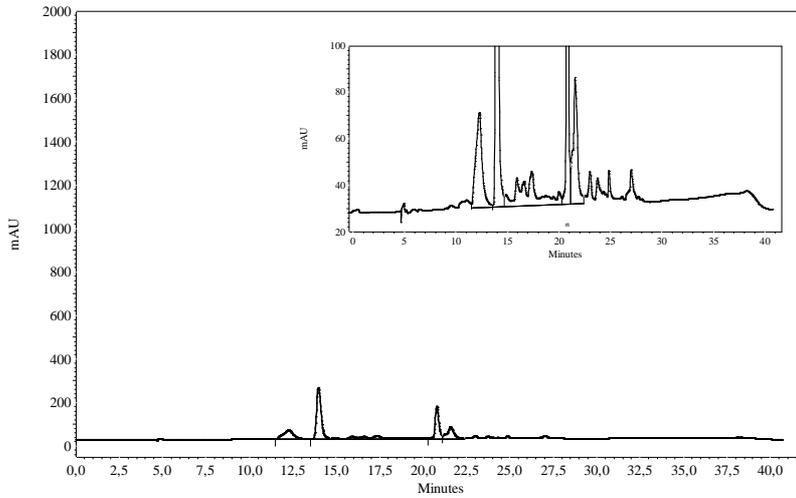


Figura A1.22 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 56 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

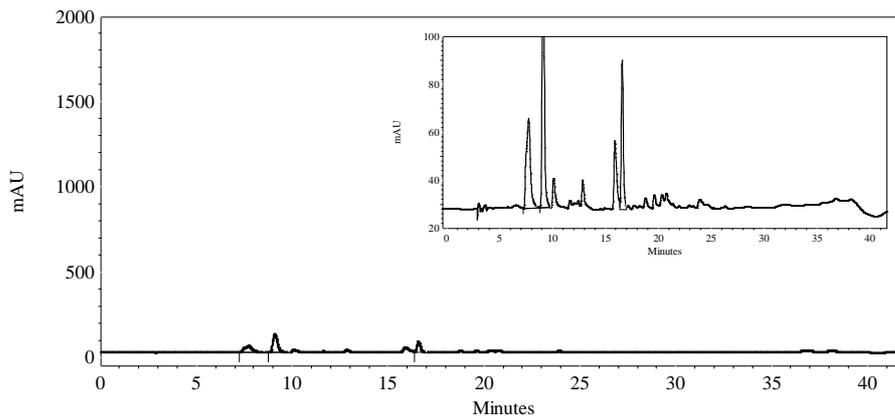


Figura A1.23 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 59 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

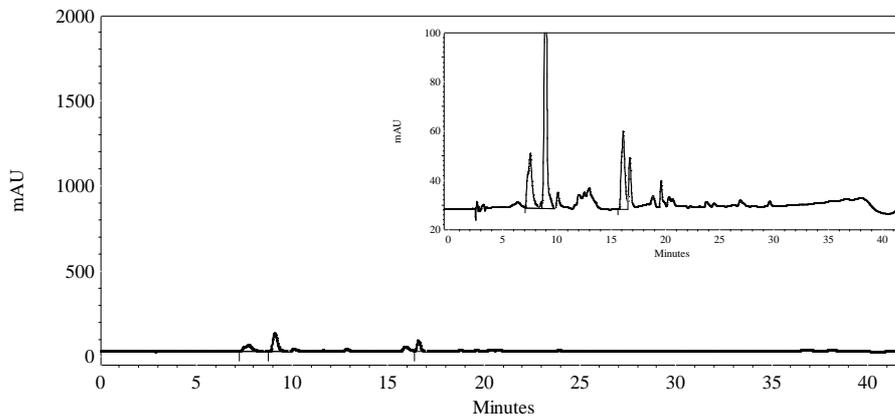


Figura A1.24 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 60 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

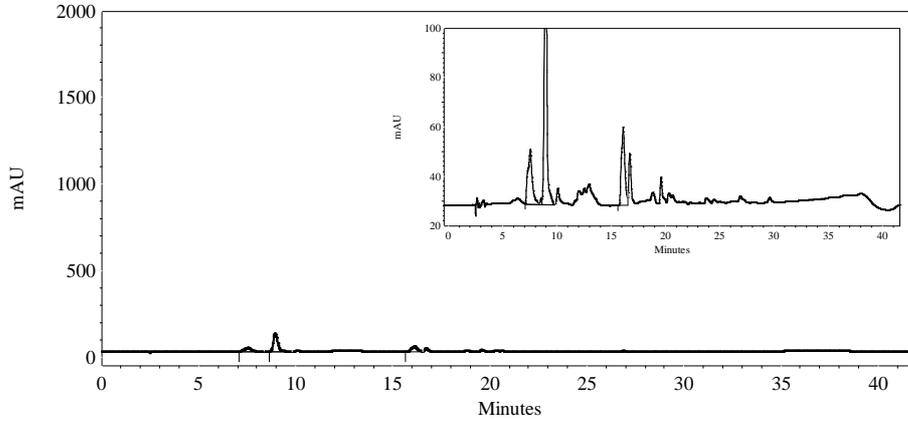


Figura A1.25 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 62 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

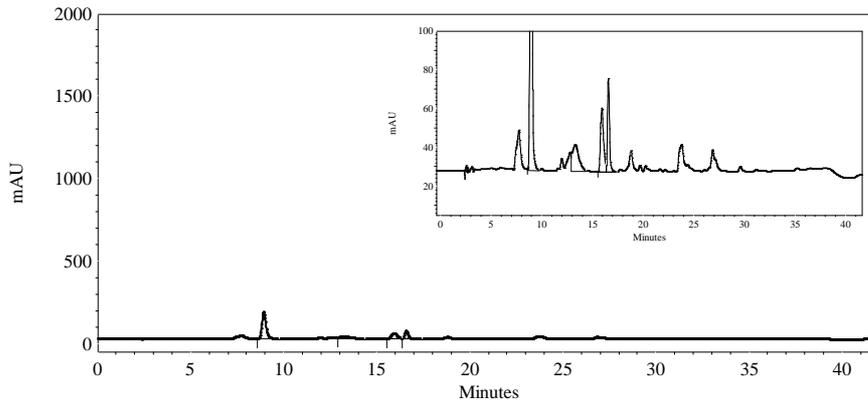


Figura A1.26 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 66 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

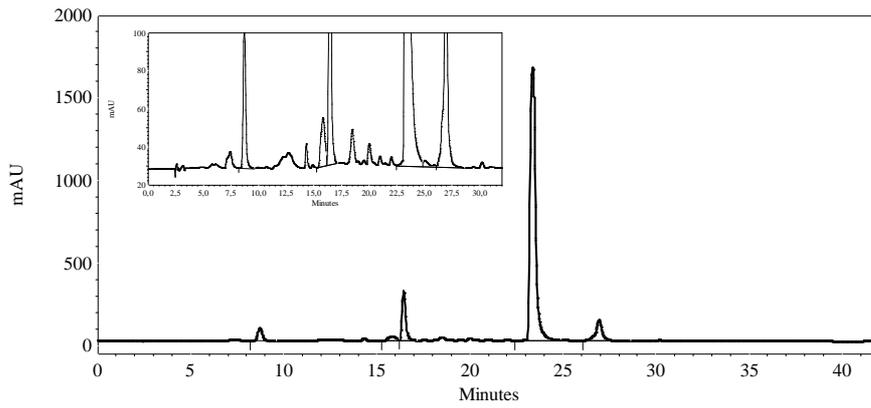


Figura A1.27 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 67 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

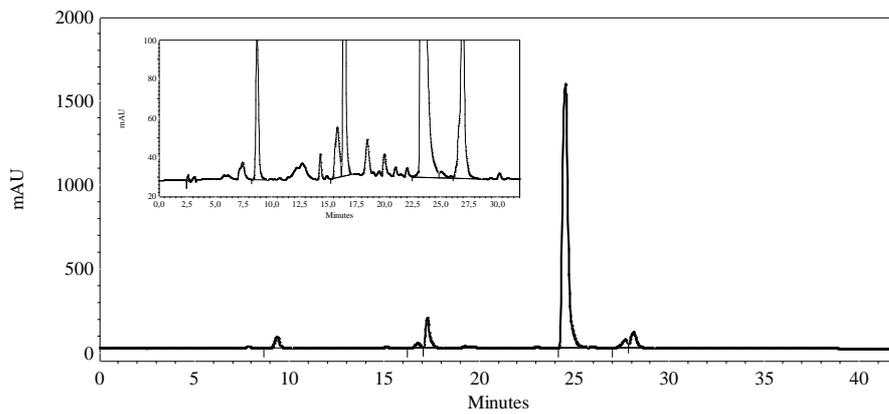


Figura A1.28 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 70 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

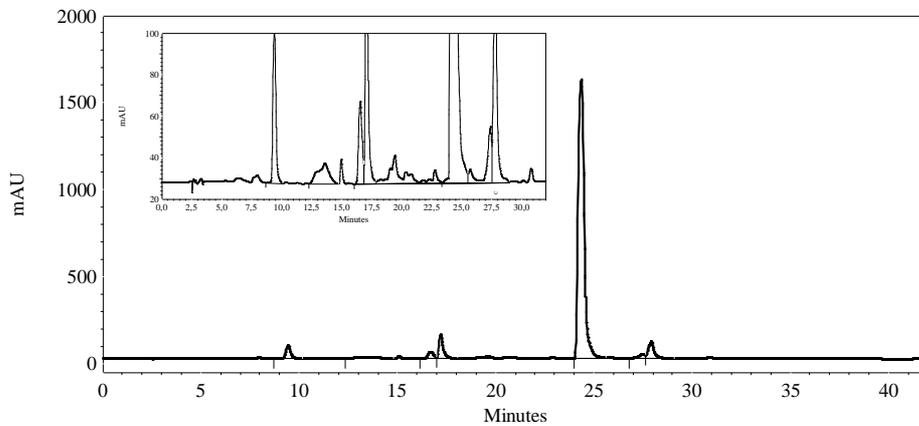


Figura A1.29 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 71 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

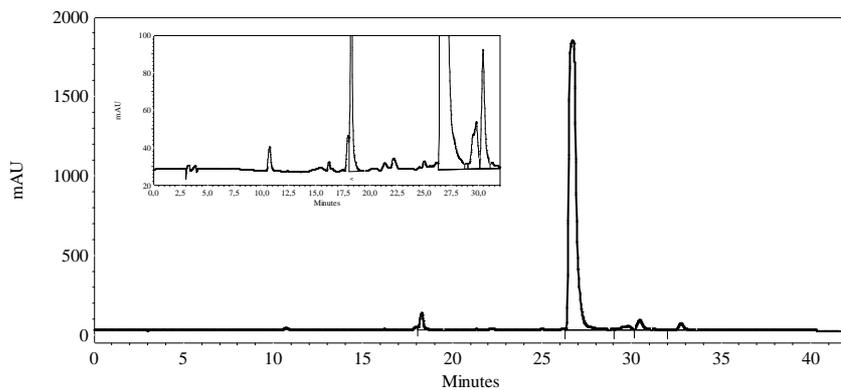


Figura A1.30 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 78 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

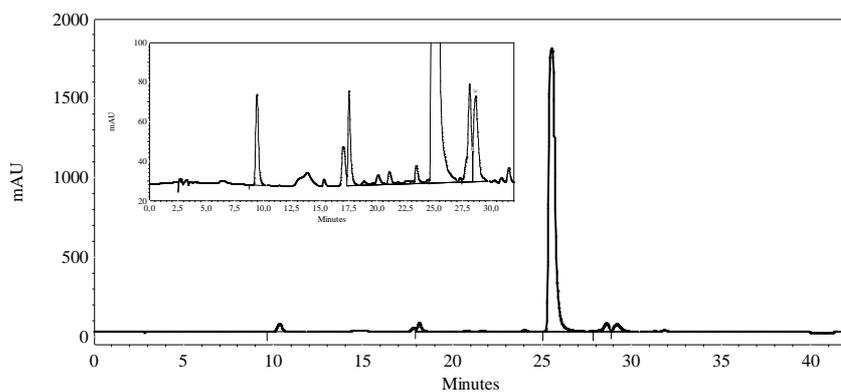


Figura A1.31 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 79 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

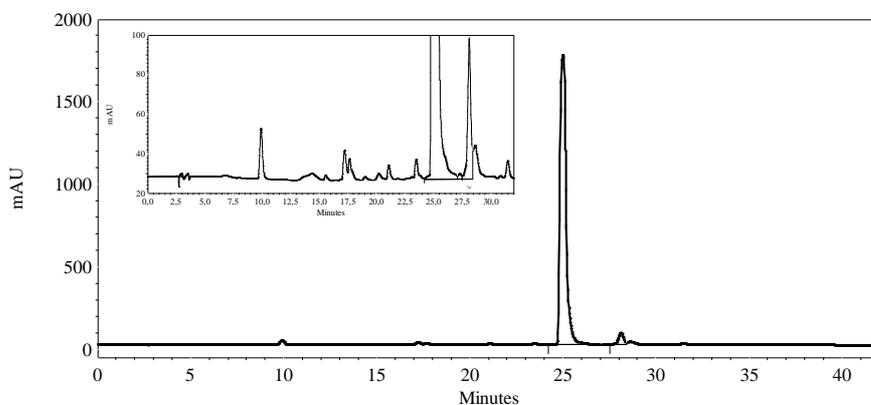


Figura A1.32 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 82 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

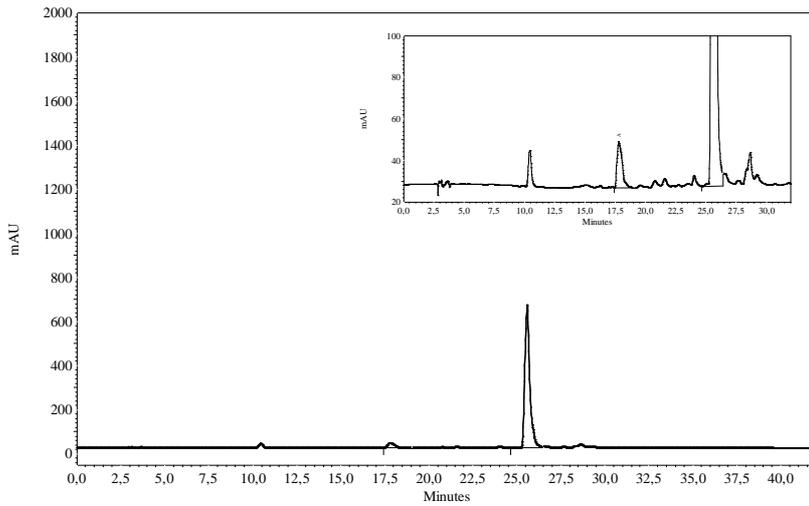


Figura A1.33 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 83 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

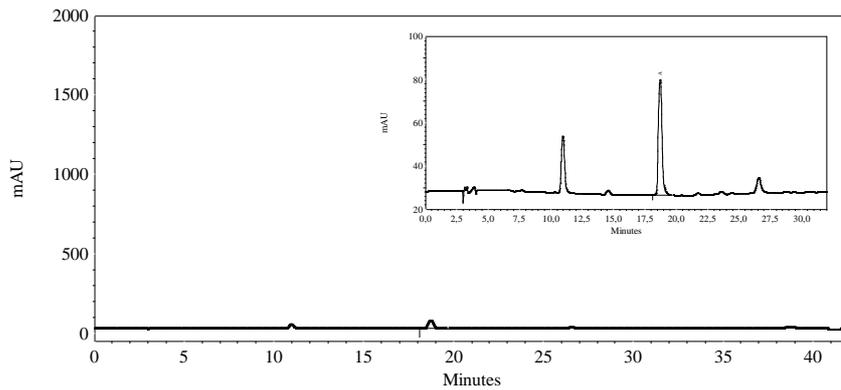


Figura A1.34 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 87 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

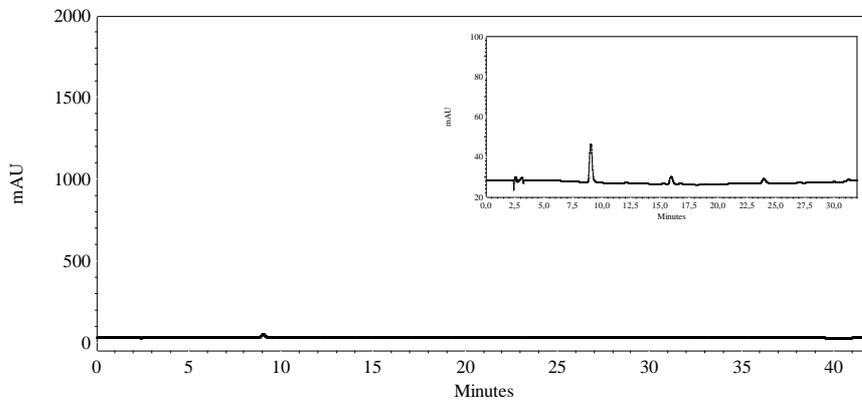


Figura A1.35 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 89 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

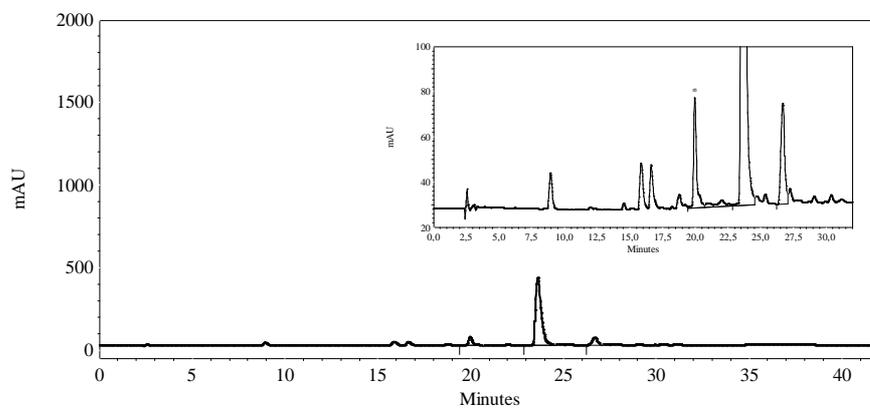


Figura A1.36 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 90 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

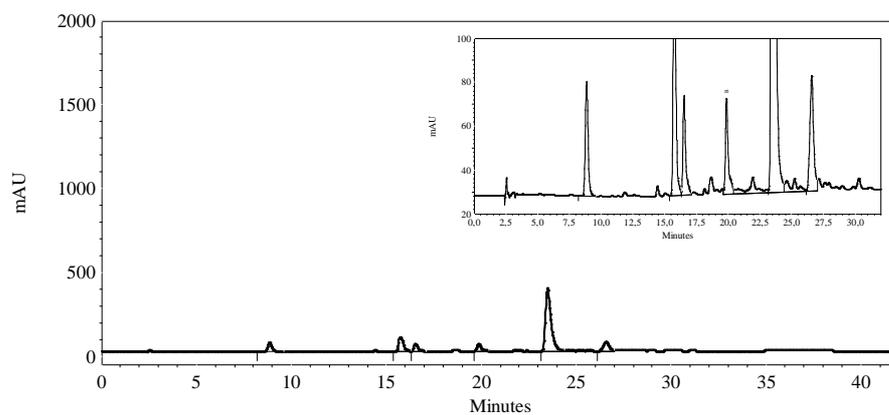


Figura A1.37 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 94 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

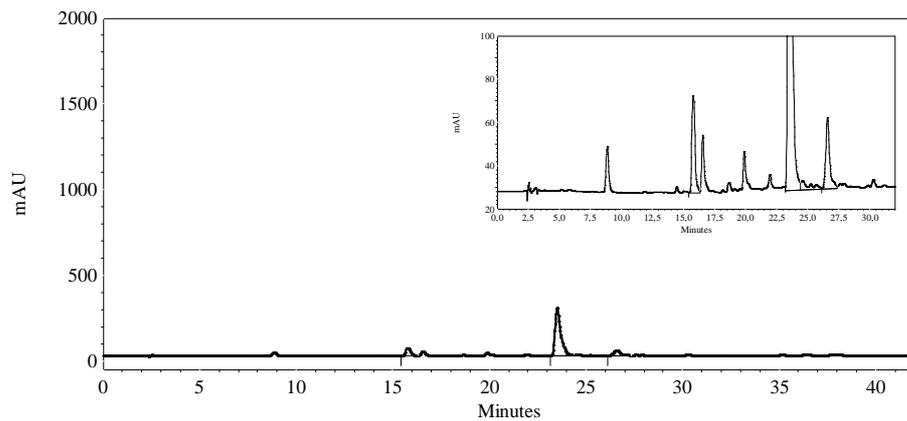


Figura A1.38 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 96 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.

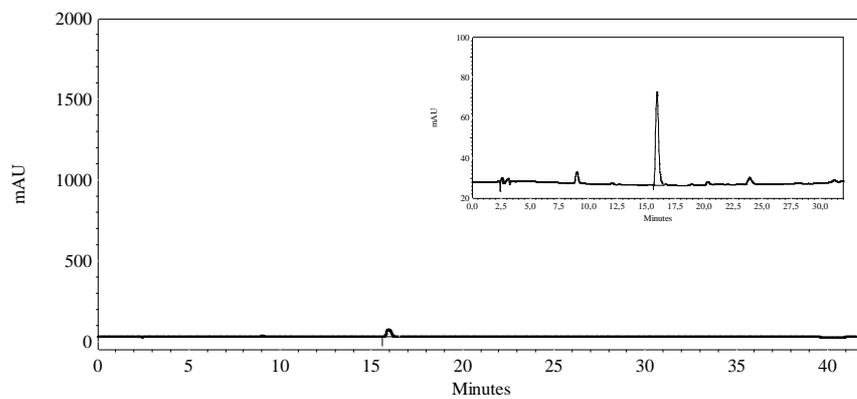


Figura A1.39 - Cromatograma CLAE ( $\lambda=254\text{nm}$ ) da subfração 100 da fração *n*-butanol do EB de *T. patula*.