



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
FACULDADE DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

JÚLIO CÉSAR DA SILVA CARDOSO

ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS
DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)

Belém - Pará
2018

JÚLIO CÉSAR DA SILVA CARDOSO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS
DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Química da Universidade Federal
do Pará, para a obtenção do grau de Bacharel em
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva.

Belém - Pará
2018

JÚLIO CÉSAR DA SILVA CARDOSO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS
DE MOGNO (*Swietenia macrophylla* King)**

Data de aprovação: ____/____/2018.

Banca examinadora:

_____ - Orientador

Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva
Doutor em Química – UFPA (ICEN)
Universidade Federal do Pará – UFPA

_____ - Membro

Prof. Me. Paulo Roberto da Costa Sá
Mestre em Química – UFPA
Instituto Federal do Pará – IFPA

_____ - Membro

Dr^a. Sônia das Graças Santa Rosa Pamplona
Doutora em Química – UFPA (ICEN)
Universidade Federal do Pará – UFPA

Belém - Pará
2018

AGRADECIMENTOS

Agradecer todos que me ajudaram foi umas das tarefas mais difíceis deste trabalho. Afinal, lembrar de tanta gente de forma alguma é uma coisa fácil. Sempre precisei de muita ajuda e tive sorte de encontrar as pessoas certas!

À Deus, pois com certeza me ajudou e para ele devo minha gratidão eterna. Afirmando que ele me deu muitas oportunidades e o livre arbítrio de enxergá-las da maneira que eu quisesse.

À minha mãe e minha avó (Maria Rita e Raimunda), por sempre me incentivarem aos estudos, me ensinando a ser cauteloso e astuto. Infelizmente, às estas duas pessoas não se têm como agradecer com meras palavras digitadas em *Time New Roman* e nem quaisquer fontes ou escrita. O agradecimento perfeito será com o que elas sempre desejaram para mim, o meu sucesso!

Aos meus tios e tias que me ajudaram sempre em diversas ocasiões.

Agradeço à Amanda Ellen pelo carinho e atenção oferecidos durante grande parte da minha graduação. Acredito que sem você minha saúde mental já teria definhado a muito tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Milton Nascimento da Silva e à Prof.^a Dr.^a Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva pelos ensinamentos e conselhos.

À Soninha, que me salvou em inúmeras vezes do “inferno” que era a ignorância com os equipamentos. Obrigado, Soninha!

À Luziane, Johan, Túlio, Abraão, Paulo Wender, Paulo Sá e Juliana que me ajudaram demais na construção deste trabalho, guardarei com carinho as lembranças de momentos com todos vocês.

E, por fim, meus agradecimentos a todos aqueles que eu esqueci de mencionar. Pois, geralmente são essas pessoas que me ajudaram muito também, e fizeram isso sem serem notadas. Infelizmente, por algum motivo nós esquecemos de pessoas muito especiais em momentos de euforia e lembramos delas em momentos totalmente aleatórios. Então, se eu esqueci alguém, minhas desculpas, mas saiba que um dia lembrarei e darei um merecido “muito obrigado”.

Não deixe que o mundo pese demais nas suas costas, não esqueça que o lugar dele é abaixo de seus pés.

Júlio C. S. Cardoso

RESUMO

Os limonoides são substâncias que são produzidas pelas plantas da família Rutaceae e Meliaceae, são exemplos de classes de produtos naturais que vem recebendo um maior destaque em estudos científicos nas últimas décadas. Atualmente, se sabe que estes compostos são responsáveis por uma diversidade de atividades farmacológicas. A espécie *Swietenia macrophylla*, membro da família Meliaceae, vem tendo seus limonoides como principal foco de estudos científicos, pois estão sendo relacionados à variados efeitos benéficos à saúde. Nesse sentido, foi realizado a prospecção fitoquímica com folhas deste vegetal com finalidade de isolar e caracterizar novos limonoides dessa espécie. Iniciou-se a partir da extração seletiva com hexano a frio, em duas bateladas de 24h. Após essa etapa, foi realizado o desenvolvimento da metodologia de isolamento *a priori* em Cromatografia em Coluna por Via Úmida (CCVU) para, então, o desenvolvimento em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - *High Performance Liquid Chromatography*. As frações posteriores a processos de separação foram analisadas em caráter qualitativo tanto no cromatógrafo líquido quanto com reagentes colorimétricos, estes dois testes não somente ajudaram no esclarecimento acerca dos componentes das frações, mas também contribuíram para o desenvolvimento do método cromatográfico em fase reversa e normal. Foi obtido ao final da metodologia de separação cromatográfica um composto que estaria supostamente isolado e pronto para as análises de caracterização em Ressonância Magnética e Nuclear (RMN) e frações com alta concentração de limonoides.

Palavras-chave: Limonoides. *Swietenia macrophylla*, cromatografia.

ABSTRACT

The limonoids are substances that are produced by the plants of the family Rutaceae and Meliaceae, are examples of classes of natural products that has been receiving a greater prominence in scientific studies in the last decades. It is now known that these compounds are responsible for a variety of pharmacological activities. The species *Swietenia macrophylla*, a member of the family Meliaceae, has been having its limonoids as the main focus of scientific studies, since they are related to the varied beneficial effects to health. In this sense, the phytochemical prospection with leaves of this plant was carried out in order to isolate and characterize new limonoids of this species. It was started from the selective extraction with cold hexane, in two batchings of 24h. After this step, the development of the a priori isolation methodology in Chromatography in Column by Wet Way was carried out, and then the development in High Performance Liquid Chromatography. The fractions after separation processes were analyzed qualitatively in both the liquid chromatograph and colorimetric reagents, these two tests not only helped to clarify the fractional components but also contributed to the development of the reverse phase and normal chromatographic method. At the end of the chromatographic separation methodology was obtained a compound that was supposedly isolated and ready for the characterization analyzes in Magnetic and Nuclear Resonance (NMR) and fractions with high concentration of limonoids.

Keywords: Limonoids. *Swietenia macrophylla*, Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Rota biossintética para formação de um limonoide a partir do eufol-tirucalol.....	17
Figura 2 Rota biogenética para formação de um limonoide com esqueleto do tipo mexicanolídeo.....	18
Figura 3 Limonoides isolados a partir do extrato hexânico das folhas de <i>Switenia macrophylla</i>	19
Figura 4 Fluxograma das etapas de separação cromatográfica, da obtenção do extrato bruto à obtenção de um composto supostamente isolado.	25
Figura 5 Cromatograma do extrato hexânico bruto.....	28
Figura 6 Cromatograma da fração FR3.	29
Figura 7 Cromatograma da fração FR4.....	30
Figura 8 Cromatograma do produto das frações reunidas de 42 a 56	31
Figura 9 Cromatograma do produto das frações reunidas de 1 a 14.	32
Figura 10 Cromatograma de íons totais da fração f1-14.	33
Figura 11 Íons 763,25m/z e 741,30 m/z identificados no cromatograma de íons totais da amostra após Clean up.	34
Figura 12 Íons 771,25 m/z, 773,25 m/z e 779,25 m/z identificados no cromatograma de íons totais da amostra após Clean up.	36
Figura 13 Cromatograma formado durante a etapa de separação em HPLC em escala preparativa e as regiões onde foram divididas em frações.	37
Figura 14 Análise em HPLC em escala analítica das cinco frações recolhidas do processo 5.4	38
Figura 15 Cromatograma formado durante a etapa de separação final	39
Figura 16 Análise de espectrometria de massas no modo positivo da amostra resultante da separação em HPLC em escala semipreparativa, corresponde ao pico da área 4 da figura 15.40	
Figura 17 Análise de espectrometria de massas no modo negativo da amostra resultante da separação em HPLC em escala semipreparativa, corresponde ao pico da área 4 da figura 15.40	

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
C	Celsius
CCDC	Cromatografia Clássica em Coluna Via Úmida
CCVU	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
DCL	Diclorometano
ESI	<i>Electrospray</i>
h	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC	horas
kV	Kilovolts
L/h	Litros por hora
LC-MS	<i>Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i>
MeOH	Metanol
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
nm	Micrômetros
[M+H]⁺	Molécula ionizada no modo positivo
QTOF	<i>Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry</i>
SPE	nanômetros
UPLC	<i>Solid Phase Extract</i>
UV/Vis	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
V	Ultravioleta Visível
VAS	Volts
$\lambda_{\max}$ $\lambda_{\min}$	Vanilina sulfúrica
μL	Lambda máximo/lambda mínimo
μm	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVOS	14
2.2	Geral	14
2.3	Específicos	14
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Família Meliaceae	15
3.2	Gênero Swietenia	15
3.3	Espécie <i>Swietenia macrophylla</i> King (Mogno)	15
3.3.1	Zona de ocorrência	15
3.3.2	Aspectos botânicos	16
3.3.3	Principais atividades medicinais relatadas	16
3.4	Limonoides	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Reagentes e instrumentos	21
4.2	Equipamentos	21
4.3	Descrição da coleta do material botânico	22
4.4	Etapas de tratamento do material botânico	22
4.5	Obtenção do extrato bruto	22
4.6	Fracionamento em Cromatografia em Coluna por Via Úmida (CCVU)	22
4.6.1	Primeiro fracionamento em CCVU	22
4.6.2	Segundo fracionamento em CCVU	23
4.6.3	Terceiro fracionamento em CCVU	24
4.7	<i>Clean up</i>	24
4.8	Processo de separação em HPLC em escala preparativa	25
4.9	Processo de separação em HPLC em escala semi-preparativa	25
4.10	Análise qualitativa por HPLC em escala analítica	26
4.11	Análises qualitativa em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	26
4.12	Análise qualitativa via LC-MS	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Aspectos acerca da escolha do tipo de extrato e análise deste por HPLC	28
5.2	Particularidades sobre o desenvolvimento do método em CCVU	29

5.2.1 Primeiro fracionamento em CCVU	29
5.2.2 Segundo fracionamento em CCVU	30
5.2.3 Terceiro fracionamento	31
5.3 Aspectos sobre o resultado da análise da fração F1-14 por LC-MS	32
5.4 Separação por HPLC em escala preparativa	37
5.5 Separação por HPLC em escala semi-preparativa	39
	40
6. CONCLUSÃO	41
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65% a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JR, 2005). Logo, surgiu a necessidade de regulamentação do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, que foi colocada em pauta na Conferência de Alma-Ata em 1978 na qual OMS recomendou a integração pelos países membros da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa aos sistemas de saúde. Assim, o Brasil, em 22 de junho de 2006, criou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF – regulamentada por meio do Decreto nº 5.813. Esta justifica-se pela presença da ciência fitoterápica no cotidiano das pessoas, aliada ao fato de o Brasil ser o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15% a 20%. Espera-se que esta política seja capaz de levar ao desenvolvimento de tecnologias e inovações científicas envolvendo fitoterapia; além disso, que minimizem a dependência tecnológica sobre os fármacos existente no Brasil e auxiliem no posicionamento de destaque do país no cenário internacional (TEIXEIRA et al, 2016).

No que refere à fitoterapia, a ação benéfica ao corpo pode ser atribuída à uma variedade de compostos ou somente a uma molécula bioativa produzida pelo metabolismo celular do vegetal (CORRÊA,1998). Quando se trata do metabolismo secundário dos seres vivos, a ciência que visa esclarecer as propriedades químicas dessas moléculas é a fitoquímica (VEIGA JR, 2005). O estudo fitoquímico poderá vir a ser incentivado pela tendência mundial em favor dos fitoterápicos.

Os limonóides, substâncias que são biossintetizados pelas plantas da família Rutaceae e Meliaceae, são classes de substâncias que vem recebendo destaque de estudos científicos nas últimas décadas devido às descobertas científicas sobre suas propriedades bioativas (ZHANG, 2017). A atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antimutagênica, anticâncer, antitumoral e antidiabética são exemplos dos efeitos atribuídos aos limonoides (MOGHADAMTOUSI et al, 2013). Estes estudos, apesar de relativamente novos, vêm obtendo resultados excelentes, portanto entender e acompanhar essa “tendência” poderá trazer novas descobertas igualmente excepcionais.

A espécie *Swietenia macrophylla* King (Família Meliaceae), importante vegetal para regiões tropicais, tem sido amplamente utilizado na medicina popular para tratar várias doenças. Seus efeitos vêm sendo relacionados, pela comunidade científica, aos limonóides

produzidos em seus frutos, sementes e folhas (MOGHADAMTOUSI et al, 2013). Nesse sentido, o estudo minucioso visando a prospecção fitoquímica deste vegetal pode revelar uma grande diversidade de limonóides, o que poderia ajudar a esclarecer a composição gerada pelo metabolismo secundário dessa espécie, assim como estudos futuros acerca da utilidade medicinal atribuída à ela.

2. OBJETIVOS

2.2 Geral

Desenvolver metodologia de isolamento e caracterização para limonoides oriundos do extrato hexânico das folhas da espécie *Swietenia macrophylla* King.

2.3 Específicos

- Desenvolver o método de separação em Cromatografia em Coluna por Via Úmida (CCVU) para os compostos do extrato hexânico das folhas de *Swietenia macrophylla* King;
- Desenvolver métodos de isolamento de novos limonóides através das técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para os compostos químicos oriundos das frações obtidas da separação em CCVU;
- Caracterizar os compostos presentes nas fração(s) resultante dos diversos métodos de separação em LC-MS (Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Família Meliaceae

A família Meliaceae é constituída por 51 gêneros e cerca de 1400 espécies de plantas lenhosas distribuídas nos trópicos e subtropicais de ambos os hemisférios (BANERJI, 1984). No Brasil estão representados sete gêneros, dos quais *Carapa*, *Cedrela* e *Swietenia* apresentam grande interesse econômico por parte das indústrias madeireiras, destacando-se as espécies *Carapa guianensis* (andioba), *Cedrela odorata* (cedro-branco, cedro-rosa e cedro-vermelho) e *Swietenia macrophylla* (mogno). As espécies desta família destacam-se por serem boas fornecedoras de madeiras de alto valor comercial. Além disso, a característica química marcante da família Meliaceae é a presença de substâncias amargas conhecidas como meliacinas ou limonóides (CHAMPAGNE et al, 1992).

3.2 Gênero Swietenia

Os indivíduos do Gênero *Swietenia* são encontrados principalmente na região de Neotrópico (região biogeográfica que compreende a América Central, uma pequena parte da América do Norte e a América do Sul), assim como algumas regiões da Ásia. É constituída a princípio de três espécies: *S. mahagoni* Jacq., *S. macrophylla* King e *S. humilis* Zucc. Além desses, dois híbridos naturais também existem: um é produto da combinação entre *S. macrophylla* e *S. humilis* e é encontrado nas áreas de distribuição em que as duas espécies se sobrepõem; o outro é entre *S. macrophylla* e *S. mahogani*, denominado *S. x aubrevilleana* que foi encontrado próximo às plantações das duas espécies (PENNINGTON, 1981).

3.3 Espécie *Swietenia macrophylla* King (Mogno)

3.3.1 Zona de ocorrência

Na Amazônia brasileira, encontra-se distribuída numa faixa que passa pelos estados do Acre, Rondônia, Amazonas, Pará, Mato Grosso e Maranhão. Se apresenta de forma tão numerosa que é superior ao conjunto das populações de todos os outros países onde ocorre, o que equivale a 74% da população mundial (FIGUEROA, 1994). Dentre as áreas de ocorrência de mogno, o sul do Estado do Pará apresenta a sua maior concentração de indivíduos (VERÍSSIMO et al, 1995).

3.3.2 Aspectos botânicos

O epíteto específico *macrophylla* significa “folha grande”, o que corresponde a esta árvore de grande porte, podendo atingir até 50 metros de altura e dois metros de diâmetro (GULLISON et al, 1996). Possui fuste cilíndrico, reto e sapopemas basais, folhas perenes, com curto período de desfolhagem por ocasião da maturação das sementes, no período de julho a outubro (VERÍSSIMO et al, 1995). A casca apresenta coloração pardo-avermelhada, escura, rosada internamente, espessa e sulcada. As copas das árvores maduras apresentam folhagens densas, a copa é caracterizada por apresentar poucos galhos primários de grande porte (GULLISON et al, 1996).

3.3.3 Principais atividades medicinais relatadas

Segundo Moghadamtousi e colaboradores (2013), a *S. macrophylla* tem sido usada na Ásia e em muitos outros países para tratar diversas doenças com base em seus efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antimutagênicos, anticancerígenos, antitumorais e antidiabéticas. Quase todas as partes da planta são usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças humanas.

O fruto de *S. macrophylla* tem sido usado comercialmente em produtos de cuidados para a melhoria da circulação sanguínea e da condição da pele. A semente, em particular, tem propriedades medicinais significativas como, por exemplo: na Malásia, são usadas tradicionalmente para tratar hipertensão, diabetes e aliviar a dor; na Amazônia boliviana, um grupo étnico usa as sementes para a leishmaniose e como um medicamento para o aborto; na Indonésia, têm sido utilizadas como medicamento popular no tratamento de diabetes, hipertensão e malária, enquanto que a casca tem sido usado como um adstringente para feridas. (MOGHADAMTOUSI et al, 2013)

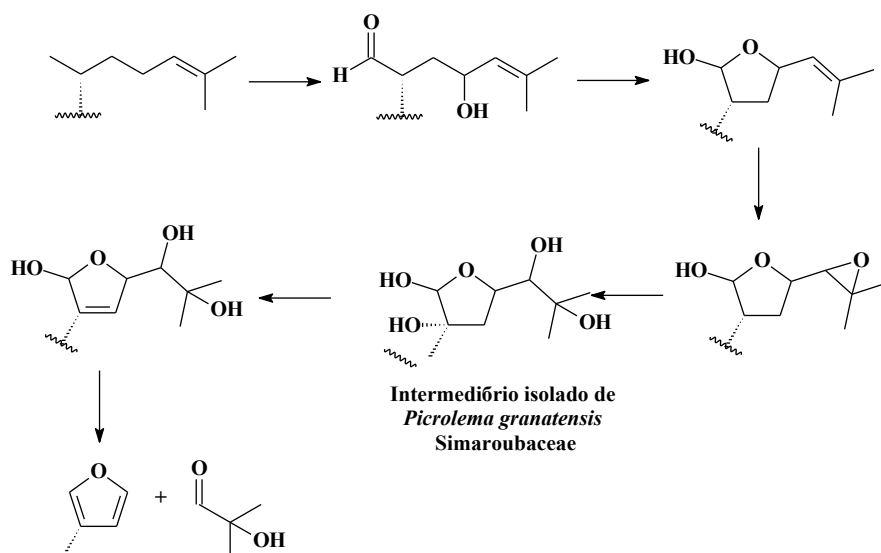
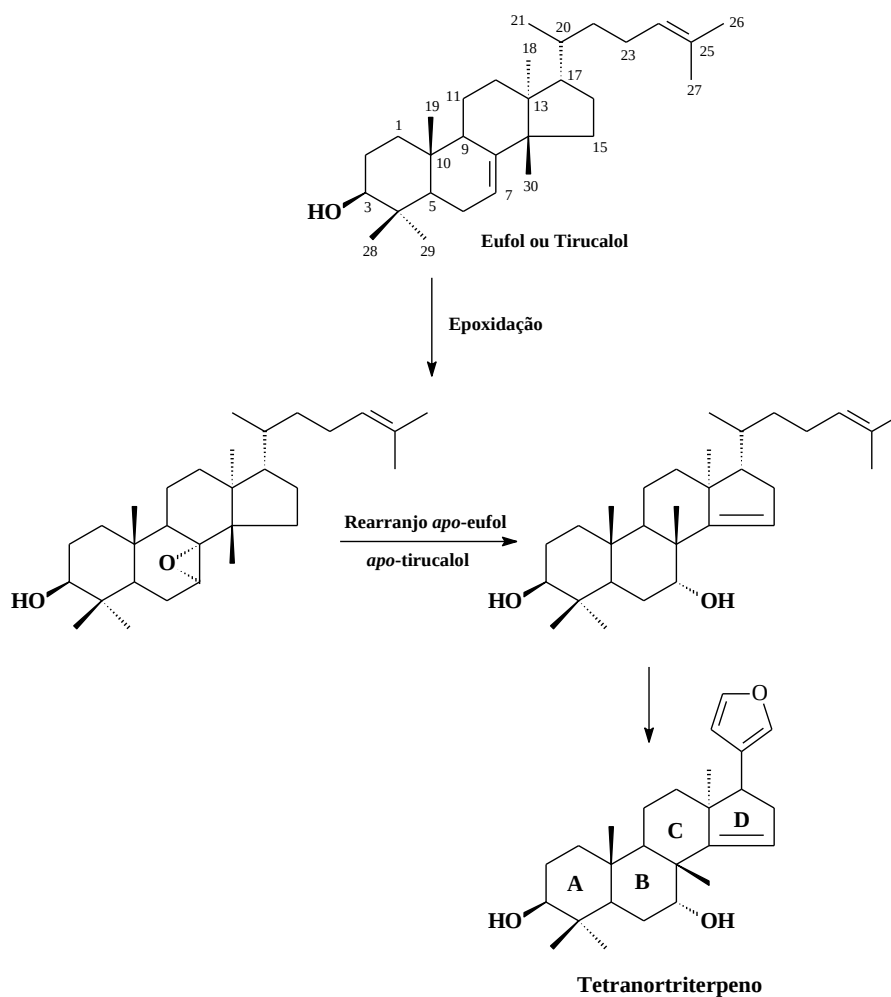
3.4 Limonoides

Os limonoides são substâncias amargas, marcantes na família Meliaceae e, por isso, também são conhecidas como meliacinas apresentam um esqueleto básico de 26 átomos de carbono que também são encontrados, nas famílias Rutaceae e Cneuraceae (CHAMPAGNE et al., 1992).

Segundo WATERMANN (1983, *apud* SILVA 2005) afirma que quimicamente os limonóides são formados quimicamente a partir de um precursor Δ^7 -tirucalol-[C-20(R)] ou

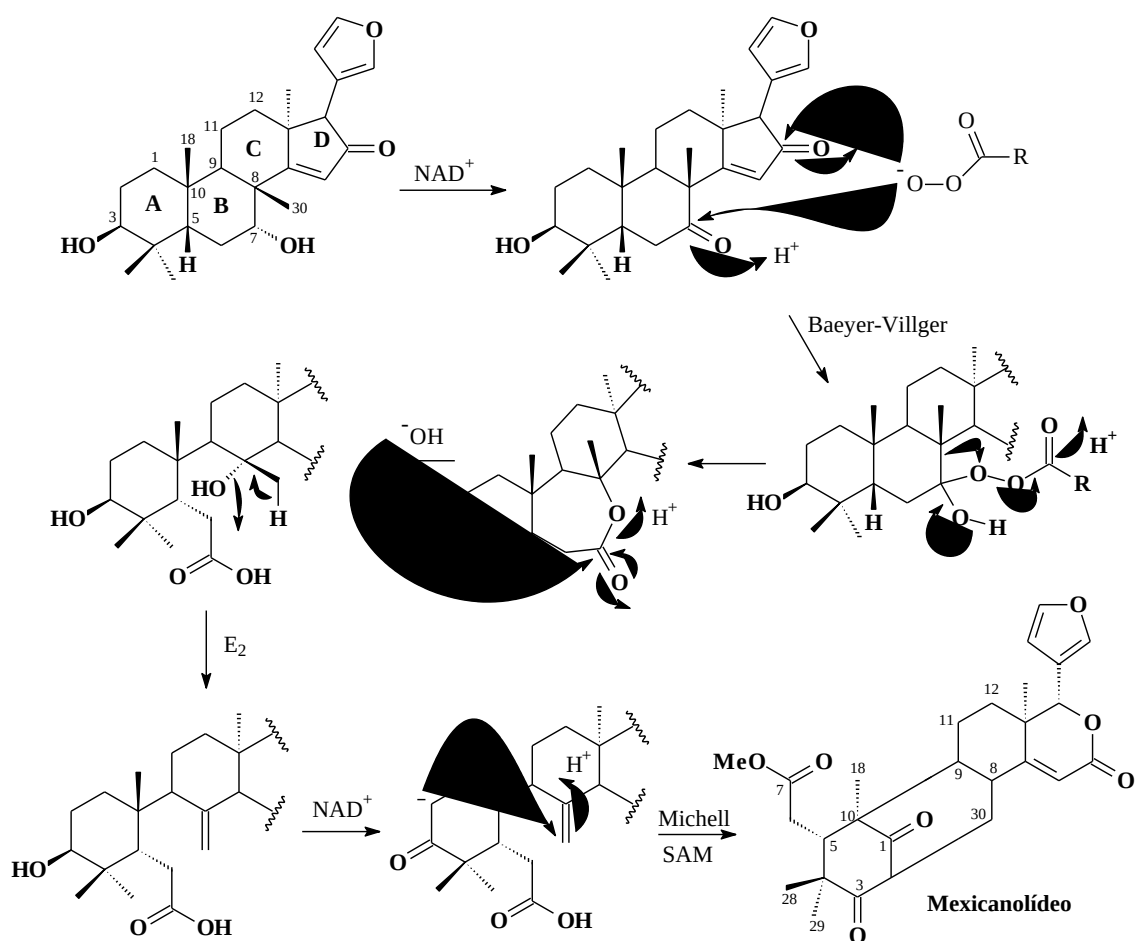
Δ^7 -eufol-[C-20(S)]. Muitos quassinóides e triterpenos de Rutales possuem a configuração C-20 (R), sugerindo o tirucalol como precursor, exemplificado na figura 1.

Figura 1 Rota biossintética para formação de um limonoide a partir do eufol-tirucalol.



Uma possibilidade é uma série de reações do tipo: oxidação Baeyer-Williger, abertura do anel B, eliminação E₂, e posterior ciclização via reação de Michell, que levam à formação do esqueleto do tipo Mexicanolídeo (figura 2).

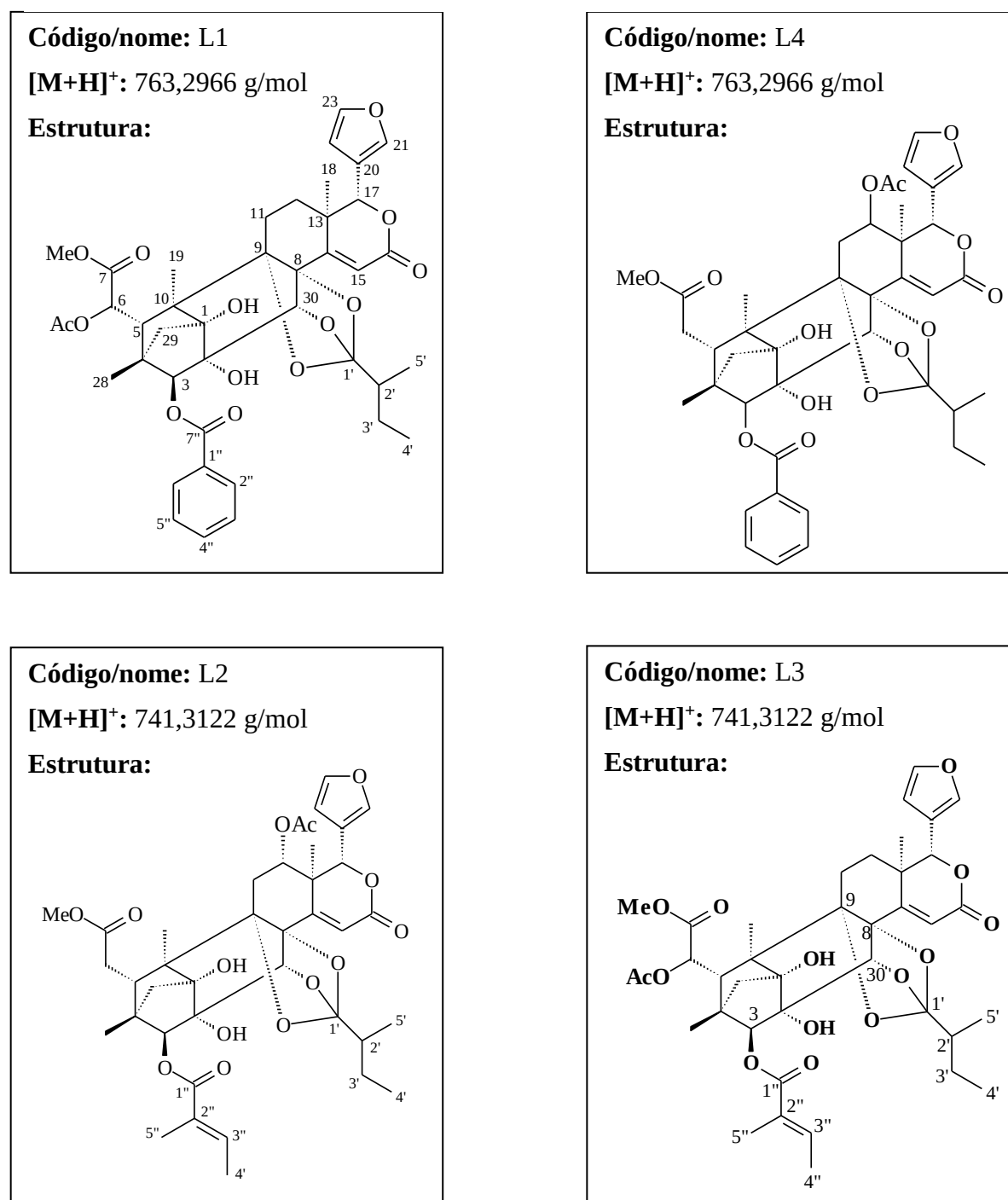
Figura 2 Rota biogenética para formação de um limonoide com esqueleto do tipo mexicanolídeo



Fonte: (WATERMANN, 1983 *apud* SILVA 2005)

A partir da estrutura do esqueleto Mexicanolídeo há uma grande possibilidade de rotas biosintéticas que levaram a diversos compostos. Alguns limonoides das folhas da espécie *Switenia macrophylla* já foram isolados e caracterizados por Silva (2005) conforme visto a seguir (figura 3). Suas características e metodologia de isolamento serviram como base para o presente trabalho.

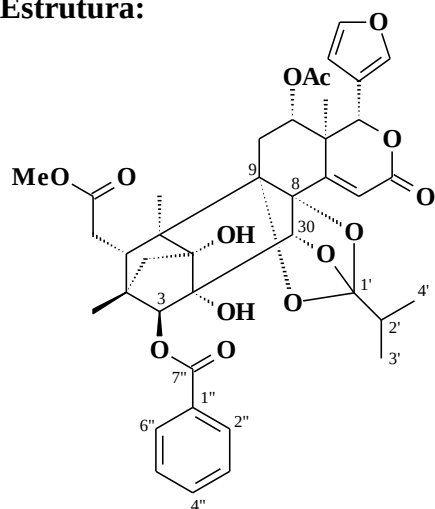
Figura 3 Limonoides isolados a partir do extrato hexânico das folhas de *Switenia macrophylla*



Código/nome: L6

[M+H]⁺: 749,2809 g/mol

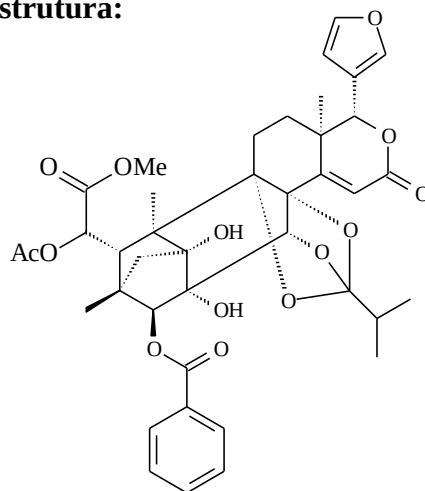
Estrutura:



Código/nome: L8

[M+H]⁺: 749,2809 g/mol

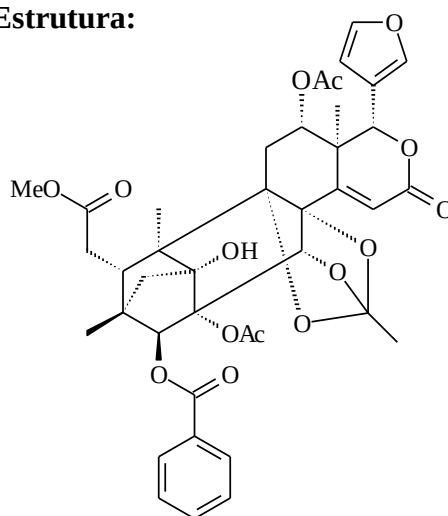
Estrutura:



Código/nome: L9

[M+H]⁺: 763,2602 g/mol

Estrutura:



Fonte: (SILVA, 2005)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e instrumentos

- Solventes: acetonitrila e metanol (Tedia[®]) | LiChrosolv[®];
- Solventes grau P.A: hexano, etanol, acetato de etila (Tedia[®]);
- Ácido fórmico (CPQ[®]);
- Vanilina sulfúrica 1% (VAS);
- Sílica gel Flash G[®] 60 (60-200 μm);
- Filtro de seringa de nylon 0,45 μm ;
- Coluna analítica Gemini C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) Phenomenex[®];
- Coluna Semi-preparativa Gemini C18 (250 x 10,0 mm, 5 μm) Phenomenex[®];
- Coluna Preparativa Gemini C18 (250mm x 21,20mm, 10 μm) Phenomenex[®];
- Coluna Kinetex (100 mm x 4,6 mm, 2,6 μm) Phenomenex[®];
- Percolador de aço inox;
- Colunas de vidro para cromatografia CCVU;

4.2 Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – LC-20AD (Shimadzu[®]) – com detector de diodo SPD-M20A, auto-injetor SIL-20A e interface de comunicação CBM-20A integrado com software *LC solution* versão 1.25 SP2.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – LC-6AD PROMINENCE (Shimadzu[®]) – com detector de diodo SPD-10AV, auto-injetor LC-8A e interface de comunicação CBM-20A integrado com software *LC solution* versão 1.25 SP2.
- Espectrômetro de Massas XEVO G2-S QToF (Waters[®]) acoplado a um Cromatógrafo Líquido UPLC (Waters[®]);
- Espectrômetro de Massas LC- MS 2020 (Shimadzu[®]);
- Balança Analítica AUW220D (Shimadzu[®]);
- Ultrassom 2510 (Branson[®]);
- Purificador de água Direct-Q5 da Millipore (Merck[®]).

4.3 Descrição da coleta do material botânico

A coleta foi realizada nas proximidades do município de Castanhal-PA, na BR-316, onde haviam espécimes de *Swietenia macrophylla* com aproximadamente 3 metros de altura. O critério de seleção do material botânico foi a “identificação macroscópica”, como prevê a Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Tais aspectos consideram características sensoriais, como: cor, textura, consistência, etc. Desse modo, foram coletados cerca de 4 Kg de folhas.

4.4 Etapas de tratamento do material botânico

As folhas de *S. macrophylla* passaram por um procedimento de descontaminação simples. Assim, efetivou-se primeiramente com a lavagem com água destilada e depois com água sanitária 0,1%. Após isso, houve a secagem do material botânico, realizada em estufa de circulação de ar a 45°C.

O material foi posteriormente triturado em moinhos de facas até obtenção de granulometria de pó semifino (180-355 µm) conforme propõe SIMÕES et al. (2017). A porção resultante deste processo resultou em cerca de 1 Kg.

4.5 Obtenção do extrato bruto

Realizou-se a extração a frio do material botânico seco e triturado (1 Kg) com auxílio de um percolador e de 4 L de n-hexano, durante 24 horas. Após este período, a solução foi recolhida e ao resíduo foi adicionado novamente 4 L de solvente extrator (n-hexano) por mais 24 horas, perfazendo duas bateladas. A solução produto da extração foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida, dando origem ao extrato hexânico (EH) com massa de 50,13g.

4.6 Fracionamento em Cromatografia em Coluna por Via Úmida (CCVU)

4.6.1 Primeiro fracionamento em CCVU

O extrato hexânico bruto (50,13g) foi submetido à cromatografia em coluna por via úmida, método adaptado por Silva (2005), tendo como fase móvel misturas de solventes de polaridade crescente, onde se utilizou como fase estacionária Sílica gel com dimensões de partículas 20-60 µm. A princípio foram coletadas seis frações como mostra a tabela 1.

Tabela 1. Especificação da primeira etapa de fracionamento em CCVU a partir do extrato hexânico bruto.

Fase Móvel	Razão	Volume	Código
Hex/AcOEt	90:10	400mL	FR1
Hex/AcOEt	70:30	400mL	FR2
Hex/AcOEt	50:50	400mL	FR3
AcOEt	100	400mL	FR4
AcOEt /MeOH	80:20	400mL	FR5
MeOH	100	400mL	FR6

Fonte: Autor (2018).

4.6.2 Segundo fracionamento em CCVU

A terceira e quarta fração da etapa anterior, Fr3 e Fr4, se mostram semelhantes e logo foram reunidas resultando num total de 12,410 g, amostra essa que foi codificada como **Fr3-Fr4**. Este material foi submetido à segunda etapa de separação cromatográfica.

As novas condições desta eram: a coluna de vidro de diâmetro interno menor (cerca de 3,5 cm), massa de Sílica gel adicionada ao leito da coluna (proporcional a massa de amostra a ser fracionada) e conjunto de solventes que constituiu a fase móvel. A proporção de solventes foi estipulada com auxílio de testes pilotos em CCDC. Ao final desta etapa foram recolhidas 82 frações.

Tabela 2. Especificação da segunda etapa de fracionamento em CCVU a partir do produto da reunião das frações FR3 e FR4.

Fase Móvel	Razão	Volume
Hex/AcOEt	60:40	300mL
Hex/AcOEt	50:50	300mL
AcOEt	100	300mL
AcOEt/MeOH	80:20	300mL
MeOH	100	300mL

Fonte: Autor (2018).

4.6.3 Terceiro fracionamento em CCVU

Algumas frações que se mostraram semelhantes foram reunidas, dentre elas estavam as frações entre 42 e 56 (codificadas como **F42-46**). Frações estas que apresentavam bandas cromatográficas com R_f (fator de retenção) semelhantes ao padrão L1 quando analisados em CCDC.

F42-46 totalizou uma massa de 3,331g, o qual foi fracionado em coluna clássica. A separação se deu em CCVU novamente, porém numa coluna de 3 cm de diâmetro e com solução de solventes que obtiveram boa seletividade e força frente aos testes em CCDC. Dessa etapa, 45 frações foram obtidas.

Tabela 3. Especificação da terceira etapa de fracionamento em CCVU a partir do produto da reunião das frações entre F42 e F56.

Fase Móvel	Razão	Volume
DCL/ AcOEt	75:25	100mL
DCL/ AcOEt	50:50	100mL
DCL/ AcOEt/ MeOH	50:45:5	100mL
DCL/ AcOEt/ MeOH	50:35:15	100mL
MeOH	100	100mL

Fonte: Autor (2018).

4.7 Clean up

As frações de 1 a 14, resultantes do método 4.6.3, demonstraram resultados promissores frente aos testes qualitativos à presença dos limonoides. Estas foram reunidas e somaram 1,691g de amostra (codificada como **f1-14**).

A f1-14 passou por pré-tratamento (*Clean up*) em cartucho SPE Stracta C18 5g/20ml. Onde, condicionou-se o cartucho conforme as recomendações do fabricante: um volume (20mL) de orgânico, ACN, e outro de água. À amostra foi adicionado um volume de 20 mL da solução H₂O/ACN (50:50), depois essa mistura foi inoculada ao cartucho. Mais dois volumes de 20 mL de solução H₂O/ACN (20:80) foram adicionados ao cartucho. Estes dois volumes foram recolhidos e somados. A massa de amostra resultante após este processo foi de 1,415 g.

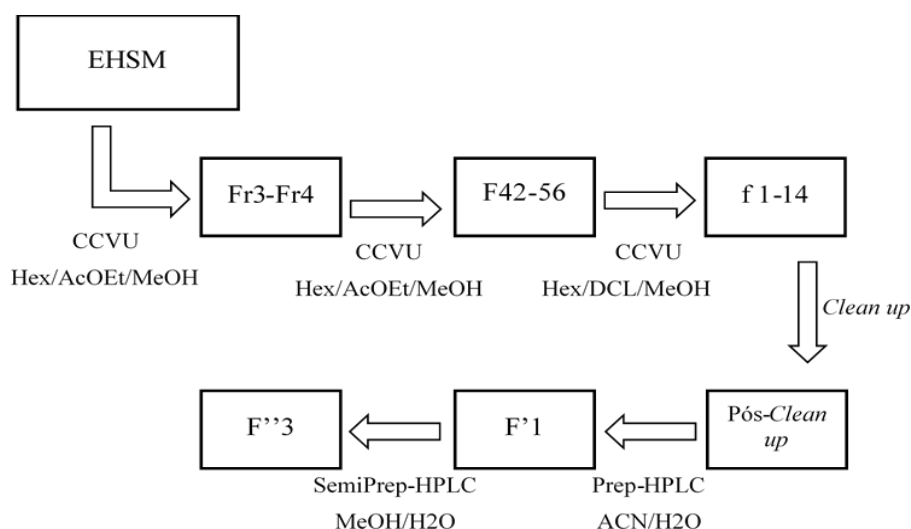
4.8 Processo de separação em HPLC em escala preparativa

Foi utilizado o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – LC-6AD dotado de coluna Gemini C18 (250mm x 21,20mm, 10 μ m). A separação ocorreu com produto resultante do *Clean Up*, 200 mg da amostra foi solubilizada em 500 μ L de solução de H₂O/ACN (40:60), então a solução passou por um filtro de seringa e foi injetada. As condições da fase móvel foram previamente estipuladas em HPLC analítico, os quais resultaram em uma composição de H₂O/ACN 60:40 como melhor escolha para a separação cromatográfica. O detector foi ajustado para os comprimentos de onda de 215nm e 254nm e a bomba para a vazão de 13 mL/min. O tempo que levou desde a injeção da amostra até o término do processo foi de 40 min. Foram feitas quatro injeções, obtendo 6 frações.

4.9 Processo de separação em HPLC em escala semi-preparativa

Utilizou-se também Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – LC-6AD ajustado para uma escala menor, ou seja, escala semi-preparativa. Onde dimensão de coluna (250 x 10,0 mm, 5 μ m) e o fluxo de fase móvel (4,5 mL/min) foram os principais fatores ajustados. A proporção de solventes na fase móvel foi de H₂O/MeOH (43:57) e o tempo foi de 60 min. A quantidade de amostra injetada foi de 15 mg, a qual foi solubilizada em 500 μ L de H₂O/MeOH (40:60). Foram feitas quatro injeções no equipamento.

Figura 4 Fluxograma das etapas de separação cromatográfica, da obtenção do extrato bruto à obtenção de um composto supostamente isolado.



Fonte: Autor (2018).

4.10 Análise qualitativa por HPLC em escala analítica

O método de SPE foi o método de pré-tratamento das amostras antes da análise em HPLC. O cartucho analítico de SPE foi condicionado conforme recomendações do fabricante. A amostra foi inoculada no cartucho com uma solução de H₂O/ACN (20:80). Assim, foram adicionados mais dois volumes distintos na proporção 20:80 H₂O/ACN, usados para eluir os analitos de interesse, os quais foram reunidos e concentrados. Após a evaporação do solvente, foi preparada uma solução de 1000 ppm, a partir de 1,0 mg da subfração, solubilizada em 1 mL de ACN, para, dessa maneira, a amostra estar apta a ser injetada.

A análise qualitativa em HPLC ocorreu com a injeção de 20 µL da amostra solubilizada no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – LC-20AD (Shimadzu®) com coluna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm DI) com 5 µm de tamanho de partícula dotada de pré-coluna.

A fase móvel foi composta por solvente A, água; e solvente B, acetonitrila. O método isocrático utilizando 60% de solvente B por 30 minutos, foi eficaz em uma análise preliminar de extrato hexânico das folhas *Swietenia macraphylla* e suas frações. Esta metodologia de análise qualitativa foi desenvolvida por meio empírico. Parâmetros avaliados e ajustados como tempo de retenção, força e outros são descritos em SNYDER apud CASS E DEGANI (2001).

4.11 Análises qualitativa em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Os testes em CCDC foram realizados tendo como fase móvel uma solução de solventes orgânicos de fase normal (Hexano, Diclorometano, AcOEt, etc) e como fase estacionária placas de CCDC composta por sílica gel aderida à uma superfície de alumínio. A técnica consiste na eluição do inóculo da amostra pela fase móvel no sentido contrário ao da gravidade, o percurso de separação é delimitado em 5 cm e o processo ocorre em cuba de vidro fechada que terá de ser previamente preparada com a saturação do ambiente pelo solvente utilizado na separação.

Para avaliação da separação cromatográfica na placa foi utilizado revelador colorimétrico capaz de reagir e mostrar a presença de certa classe de substância. O revelador colorimétrico utilizado foi o VAS (solução etanólica de vanilina acidificada com ácido sulfúrico), este revelador em contato com terpenoides em temperatura de 100 °C reage produzindo uma tonalidade violeta na placa. A aplicação de controle positivo de limonóides junto à amostra também foi utilizado. Esta metodologia é uma adaptação da proposta por WAGNER (1996) e MATOS (1997).

4.12 Análise qualitativa via LC-MS

Foram realizados testes no espectrômetro de massas LCMS- 2020 (Shimadzu®). Onde utilizou-se composição de H₂O/ACN como fase móvel e uma coluna de fase reversa Kinetex (100 mm x 4,6 mm) com 2,6 µm de tamanho de partícula. Uma alíquota de 2µL da amostra foi eluída em modo gradiente linear na faixa de composição de fase móvel 70-95% durante 12 min em fluxo 0,3 mL/min, com ionização em modo positivo.

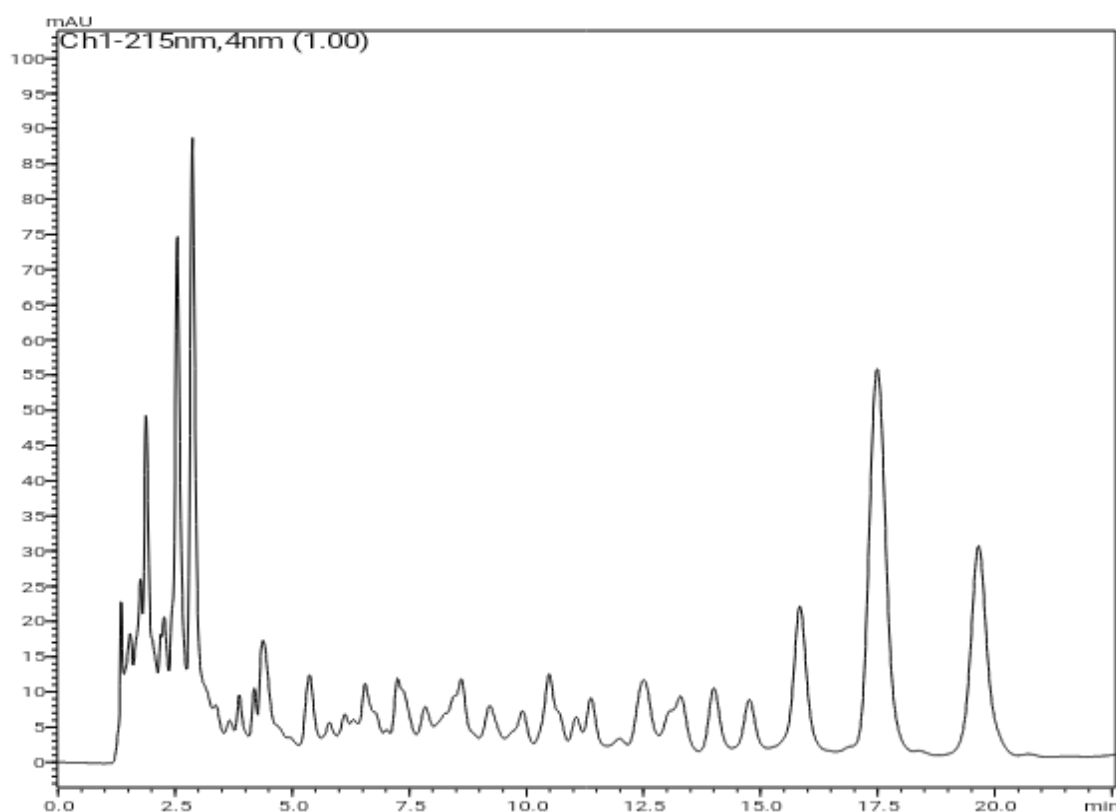
Além desse foi utilizado o Espectrômetro de Massas XEVO G2-S QToF (Waters®) acoplado a um Cromatógrafo Líquido UPLC (Waters®) num método de infusão direta de uma solução de 100 ppm de amostra solubilizada em ACN grau MS no modo positivo de ionização.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos acerca da escolha do tipo de extrato e análise deste por HPLC

A extração com hexano visou a obtenção de uma amostra bastante concentrada em compostos hidrofóbicos, assim como os limonoides. O cromatograma do extrato hexânico bruto (figura 5), mostra um resultado dentro das expectativas, pois outros trabalhos – como o apresentado AMORIM et al (2015) – relatam cromatogramas semelhantes quando analisados nas mesmas condições (descrita em 4.10). Algumas diferenças sutis podem ser notadas entre este cromatograma e os demais apresentados em trabalhos anteriores, como: tempo de retenção e absorção maior ou menor de alguns picos. Essas peculiaridades podem vir a ocorrer devido às condições do equipamento e peculiaridades do espécime de onde foram coletadas as folhas.

Figura 5 Cromatograma do extrato hexânico bruto.



Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 60% de ACN/ 30min; coluna: C18 5 μ (Phenomenex®) 250x4,6 mm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 1 mL/min; pressão: 181 kgf/cm²; temperatura: 24° C; volume injeção: 20 μ L (vial: 1 mg/mL ACN); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018).

Muitos dos limonoides das folhas de *S. macrophylla* já foram descritos na literatura, ou seja, foram isolados e elucidados. Estes compostos conhecidos se apresentam em picos

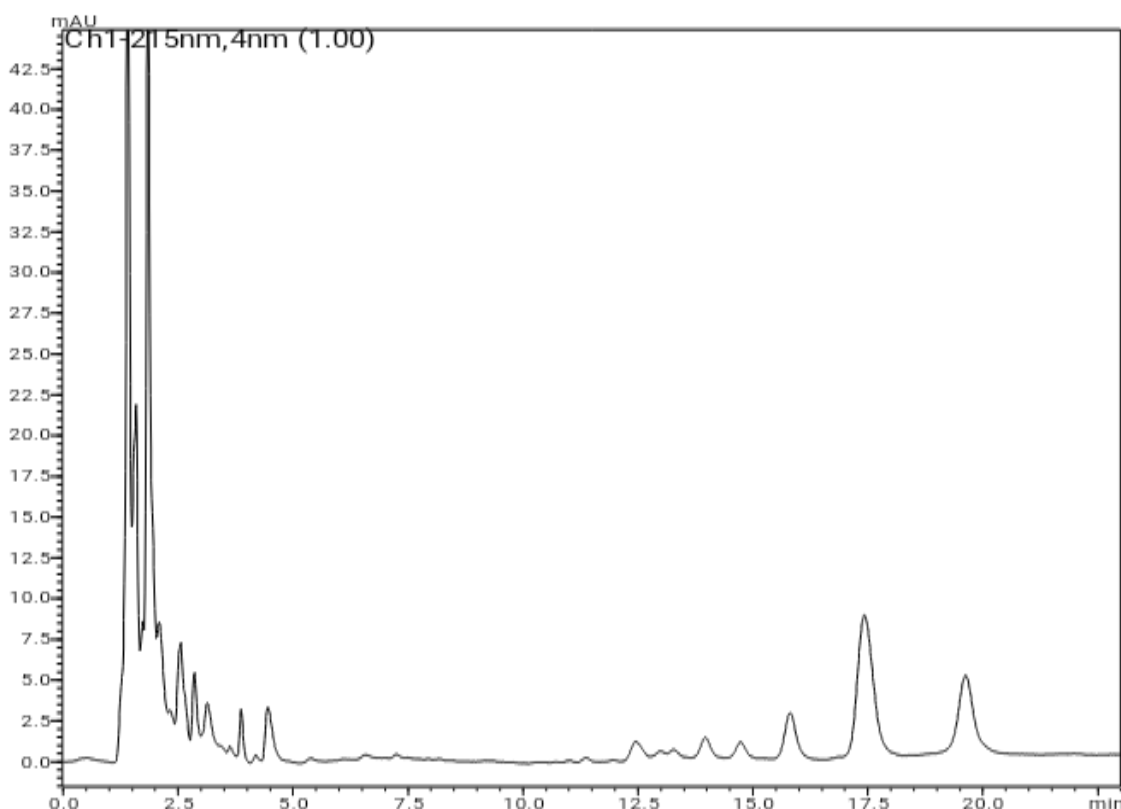
característicos no cromatograma, muitos deles saem entre 12 e 20 minutos no cromatograma da figura 5. Este trabalho visou buscar novos compostos referentes ao início do cromatograma da figura 5, mas que ainda fossem limonoides.

5.2 Particularidades sobre o desenvolvimento do método em CCVU

5.2.1 Primeiro fracionamento em CCVU

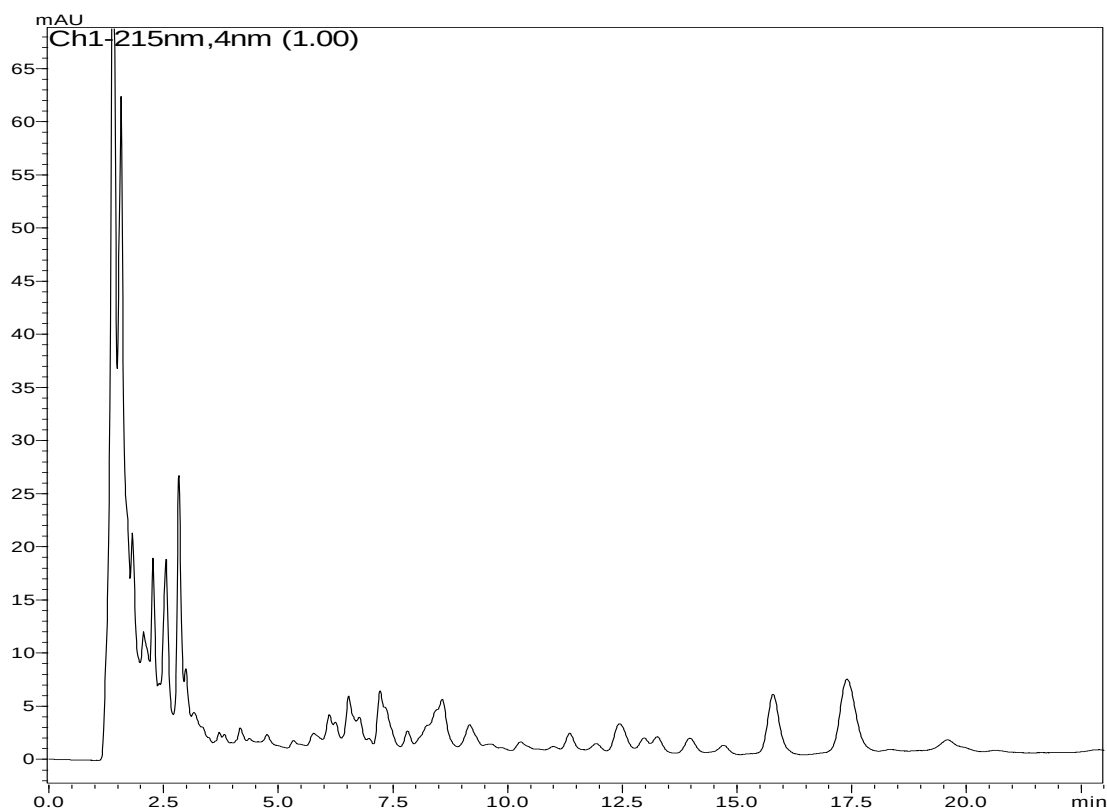
Conforme descrito na seção 4.6.1, este foi necessário devido à complexidade da amostra. Foi planejado com o intuito de reunir os componentes da matriz em grupos de substâncias de acordo com a polaridade. Assim, dentre as seis frações conseguidas, duas se mostraram interessantes (figura 6 e figura 7), a terceira e quarta frações (Fr3 e Fr4). Estas quando analisadas em HPLC, apresentavam os picos com tempo de retenção e absorção no ultravioleta característicos dos limonoides já relatados, enquanto as outras frações não apresentavam. Esta constatação surgiu a partir da comparação dos cromatogramas representados pelas figuras 5, 6 e 7. Embora os limonóides já conhecidos não fossem essencialmente os alvos a serem isolados, eles poderiam indicar frações com alto percentual desse tipo de composto. Assim, as duas frações em questão foram reunidas.

Figura 6 Cromatograma da fração FR3.



Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 60% de ACN/ 30min; coluna: C18 5 μ (Phenomenex®) 250x4,6 mm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 1 mL/min; pressão: 181 kgf/cm²; temperatura: 24° C; volume injeção: 20 μ L (vial: 1 mg/mL ACN); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018).

Figura 7 Cromatograma da fração FR4

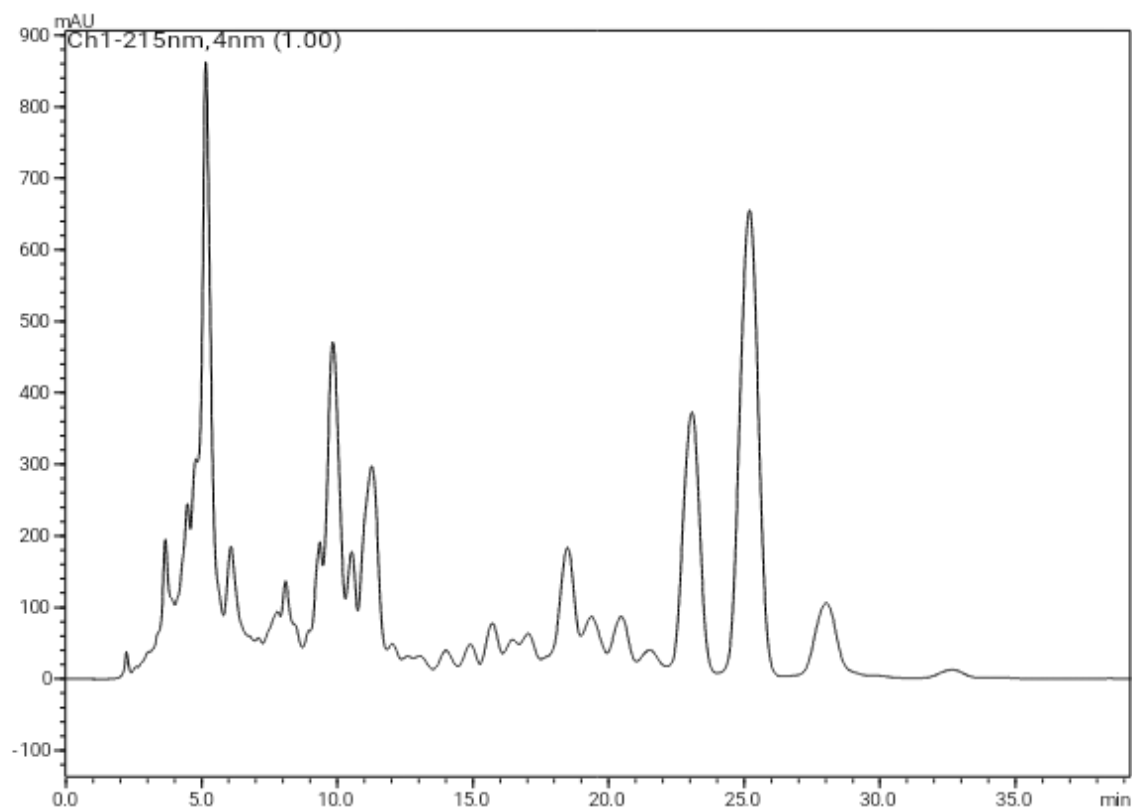
Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 60% de ACN/ 30min; coluna: C18 5 μ (Phenomenex®) 250x4,6 mm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 1 mL/min; pressão: 181 kgf/cm²; temperatura: 24° C; volume injeção: 20 μ L (vial: 1 mg/mL ACN); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018).

5.2.2 Segundo fracionamento em CCVU

Após o segundo fracionamento descrito na seção 4.6.2, fez-se análise por CCDC e HPLC das 82 frações resultantes, isso para verificar as similaridades entre elas e qual delas poderiam vir apresentar os compostos alvo. Com base nesses testes as frações entre 42 e 56 se mostraram promissoras, pois eram as únicas frações que apresentavam picos com tempo de retenção similares aos padrões L1 e L10. Essas foram reunidas e novamente analisadas, como mostra o cromatograma da figura 8, porém a quantidade de picos ainda demonstrava a presença de muitos compostos, o que dificultaria ou impossibilitaria a etapa de isolamento no Cromatógrafo Líquido. Sendo assim necessária uma outra etapa de separação.

Figura 8 Cromatograma do produto das frações reunidas de 42 a 56



Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 60% de ACN/ 35min; coluna: C18 5 μ (Phenomenex®) 250x45 mm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 1 mL/min; pressão: 189 kgf/cm²; temperatura: 28° C; volume injeção: 15 μ L (vial: 1 mg/mL ACN); faixa de absorção UV: 215 nm.

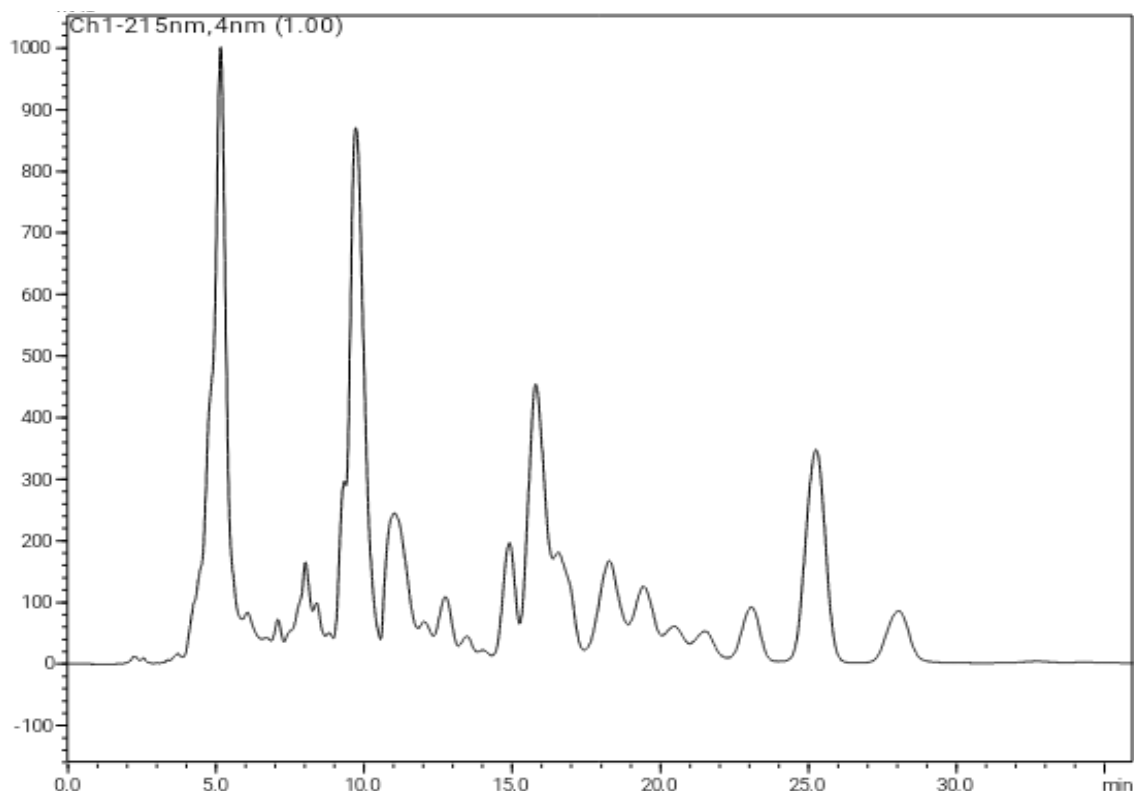
Fonte: Autor (2018)

5.2.3 Terceiro fracionamento

O novo fracionamento não foi tão efetivo quanto se esperava. A boa expectativa se deu devido à eficaz seletividade e força da fase móvel, estipulada em CCDC. A diferenciada combinação de solventes (Diclorometano, AcOEt e MeOH) resultou numa eficiente separação em CCDC, e assim deveria ser reproduzido em CCVU. O resultado ideal seria a obtenção de frações com no máximo cinco picos em seu cromatograma de HPLC. Contudo, as frações apresentavam indícios da pouca separação que essa técnica proporcionou. O resultado disso foram 35 frações ainda muito complexas para isolamento.

Embora o resultado não tenha efetivado o que foi idealizado – como pode ser visto na semelhança dos cromatogramas da figura 8 e a figura 9 – ainda houve significativa diferença entre algumas frações. As primeiras frações, de 1 a 14, foram reunidas para recuperação dos componentes desejados, totalizando 1,6915g de massa.

Figura 9 Cromatograma do produto das frações reunidas de 1 a 14.



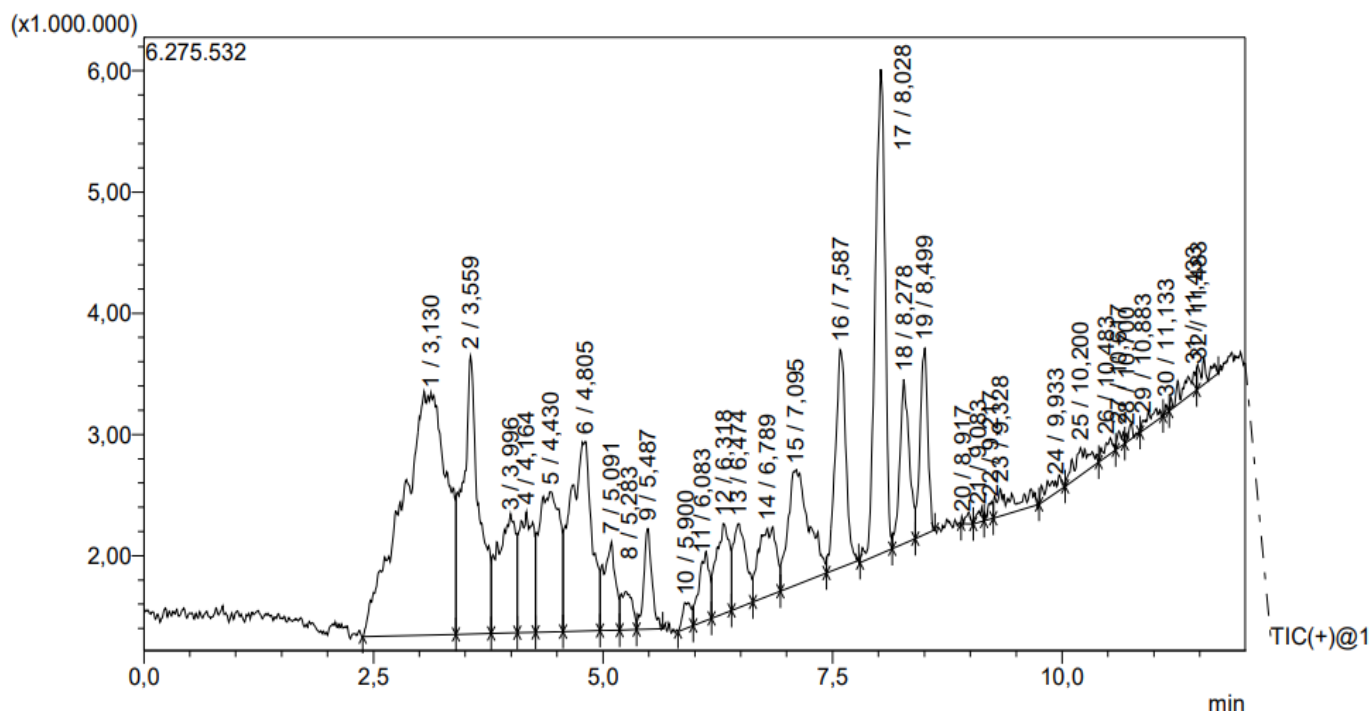
Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 60% de ACN/ 35min; coluna: C18 5 μ (Phenomenex®) 250x4,6 mm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 1 mL/min; pressão: 189 kgf/cm²; temperatura: 28° C; volume injeção: 15 μ L (vial: 1 mg/mL ACN); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018)

5.3 Aspectos sobre o resultado da análise da fração F1-14 por LC-MS

A inspeção por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas de baixa resolução utilizando o modelo da LC-2020 (Shimadzu®) não somente fundamentou a suposição sobre a presença dos limonóides, mas também direcionou a pesquisa aos compostos limonoídicos de estrutura ainda desconhecida. A amostra analisada foi a **f1-14** (produto das frações reunidas de 1 a 14 produzidas no terceiro fracionamento em CCVU).

A figura 10 apresenta o cromatograma de íon totais dessa amostra. Este cromatograma aponta uma quantidade de substâncias muito grande, visto que este é dividido em 32 regiões e nessas são identificados diversos íons que correspondem a várias substâncias e fragmentos, alguns deles conhecidos outros não.

Figura 10 Cromatograma de íons totais da fração f1-14.

Cromatograma de íons totais obtido em modo de eluição gradiente, 70-95%B / 12 min; coluna uma coluna de fase reversa (100 mm x 4,6 mm) Kinetex 2,6 µm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 0,3 mL/min; volume injeção: 2 µL (vial: 1000 ppm, solvente ACN).

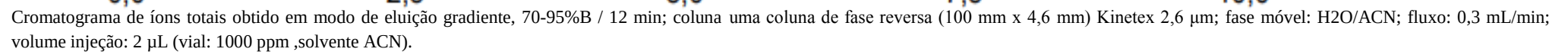
Fonte: Autor (2018)

Alguns dos compostos isolados por Silva (2005) podem ser identificados pelo método de espectrometria de massas, embora não se especifique características quanto a isomeria. Três íons foram correlacionados às substâncias conhecidas, estes foram: o íon 763,25 m/z, análogo às substâncias L1 e L4 ($[M+H]^+ = 763,2966$ m/z); o íon 749,25 m/z, análogo às substâncias L6 ou L8 ($[M+H]^+ = 749,2809$ m/z). A figura 11 mostra as regiões do cromatograma onde cada íon se encontra em maior intensidade.

Cromatograma de íons totais obtido em modo de eluição gradiente, 70-95%B / 12 min; coluna uma coluna de fase reversa (100 mm x 4,6 mm) Kinetex 2,6 µm; fase móvel: H2O/ACN; fluxo: 0,3 mL/min; volume injeção: 2 µL (vial: 1000 ppm, solvente ACN).



As substâncias conhecidas se apresentaram no final do cromatograma revelando sua afinidade com o solvente modificador da força (solvente B), visto que o experimento se realizou em modo gradiente. Entretanto, a análise apontou outros íons, com valores semelhantes aos já conhecidos, esses poderiam ser relacionados as substâncias ainda não caracterizadas no extrato hexânico das folhas de mogno. Estes se apresentam no início do cromatograma, dessa forma tendo mais afinidade com uma menor proporção do solvente B (ACN), logo seriam substâncias mais hidrofílicas. A figura 12 mostra estes íons no cromatograma. A análise com o espectrômetro de massas foi essencial ao prosseguimento do estudo, pois não só verificou a presença dos limonoides na fração estudada, mas também indicou quais picos deveriam ser focados para o isolamento de substâncias novas.



Fonte: Autor (2018)

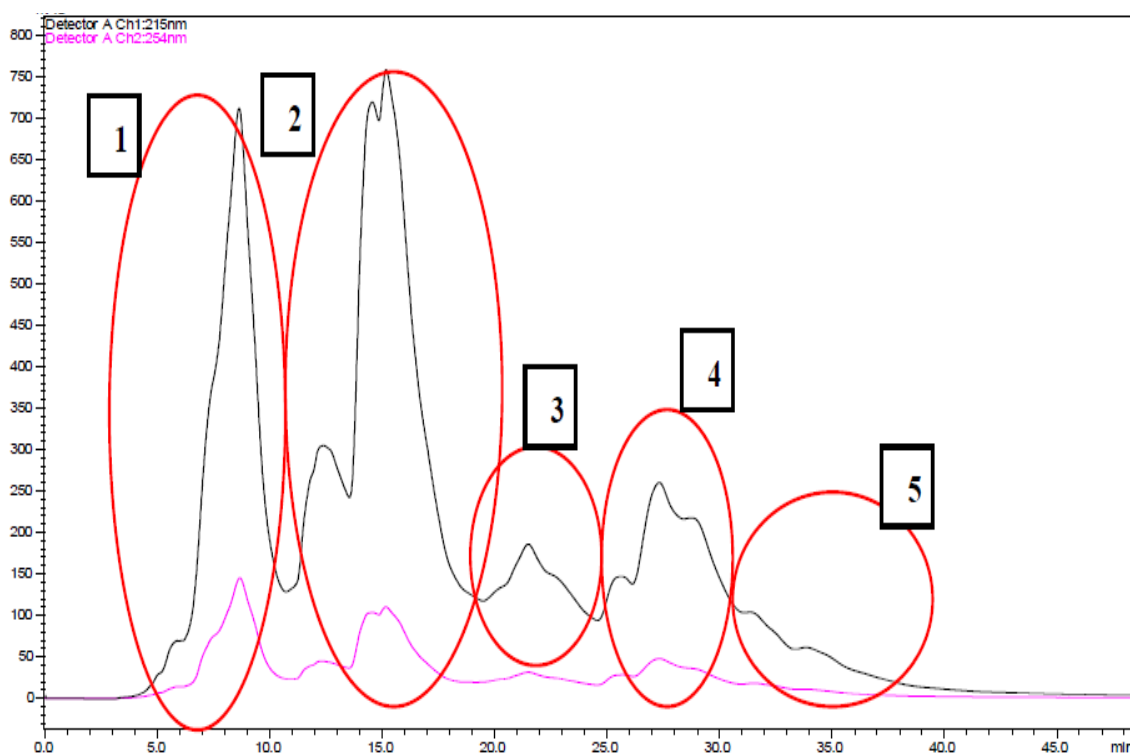
5.4 Separação por HPLC em escala preparativa

As análises feitas em HPLC e LC-MS após as três etapas de separação em CCVU apontaram uma perspectiva ainda muito distante do isolamento de quaisquer substâncias, devido à grande carga de substâncias que ainda restara. Então, optou-se por métodos de cromatografia com fase reversa e o HPLC.

A separação em HPLC em escala preparativa (método 4.8) foi muito mais eficiente em seu objetivo, como mostra a figura 13. O objetivo deste foi a separação em grupos de substâncias, o qual foi obtido cinco frações bem distintas.

A figura 13 mostra como foi o desenvolvimento da técnica de separação desenvolvida em HPLC em condições de escala preparativa. As marcações nesta figura 13 são relacionadas com o da figura 14. Sendo estas marcações picos que foram recolhidos e reanalisados em escala analítica.

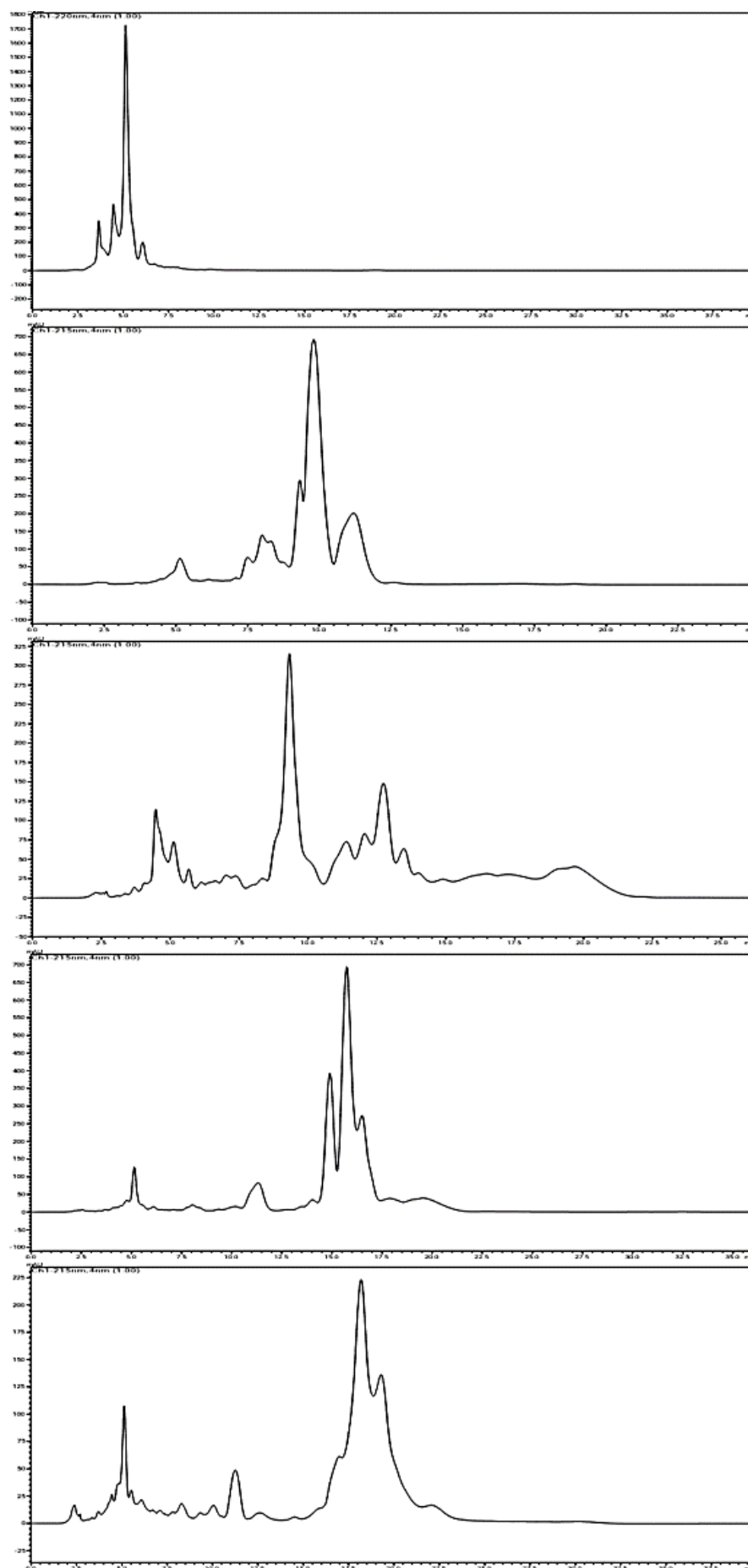
Figura 13 Cromatograma formado durante a etapa de separação em HPLC em escala preparativa e as regiões onde foram divididas em frações.



Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 60% de ACN/ 35min; coluna; modo em escala preparativa: Coluna Preparativa Gemini C18 (250mm x 21,20mm, 10 μ m) Phenomenex®; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 13 mL/min; temperatura: 24° C; injeção: 200 mg em 500 μ L de H₂O/ACN (40:60); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018)

Figura 14 Análise em HPLC em escala analítica das cinco frações recolhidas do processo 5.4



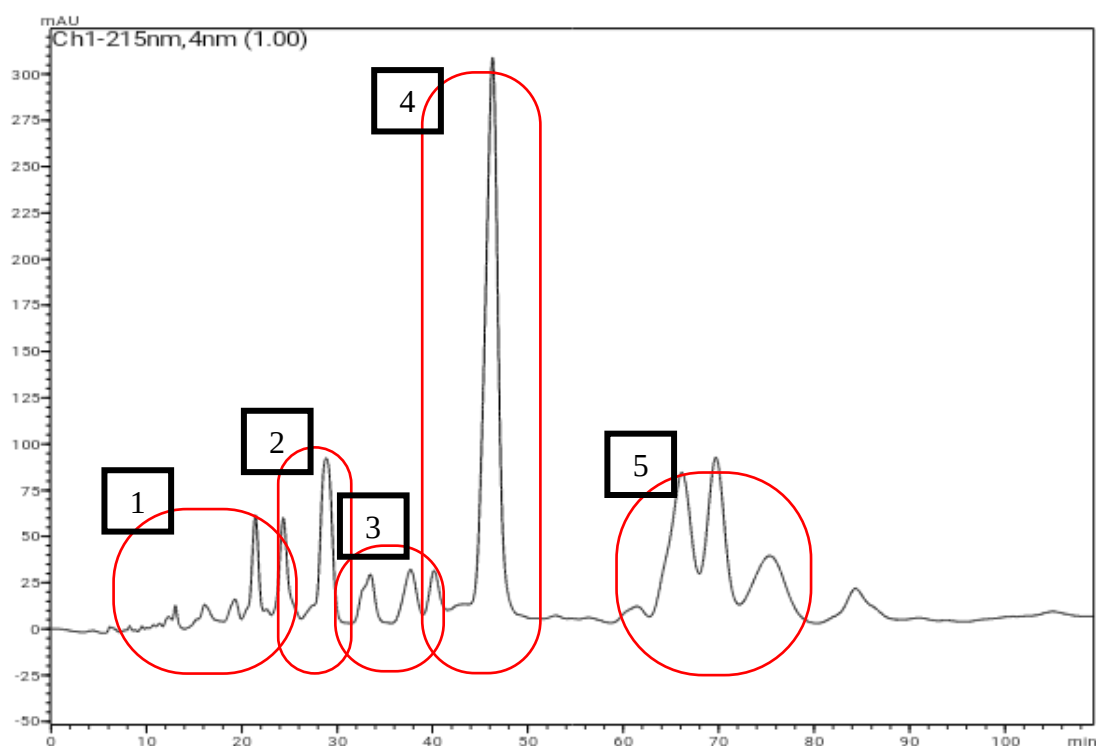
Cromatogramas obtidos em modo de eluição isocrática em um HPLC analítico, 60% de ACN/ 30min; coluna: C18 5 μ (Phenomenex®) 250x45 mm; fase móvel: H₂O/ACN; fluxo: 1 mL/min; pressão: 181 kgf/cm²; temperatura: 24° C; volume injeção: 20 μ L (vial: 1 mg/mL ACN); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018)

5.5 Separação por HPLC em escala semi-preparativa

A 1ª fração produzida na etapa anterior foi escolhida para a última etapa de separação cromatográfica, pois possivelmente apresentavam os compostos de interesse e já não era mais tão complexa para o isolamento. Foram recolhidas cinco frações, sendo a quarta fração um potencial composto isolado, dessa maneira, analisou-se esta por espectrometria de massas.

Figura 15 Cromatograma formado durante a etapa de separação final



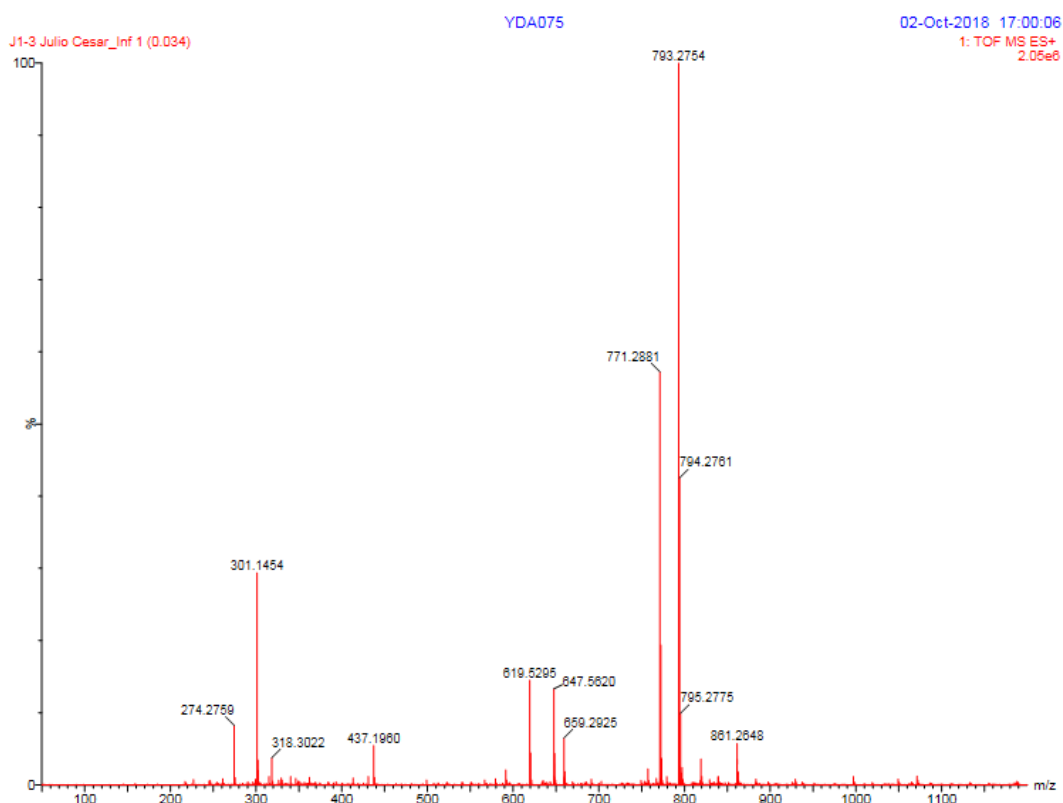
Cromatograma obtido em modo de eluição isocrática, 57% de B/ 90 min; coluna; modo em escala semi-preparativa: Coluna Preparativa Gemini C18 (250mm x 10,0mm, 5µm) Phenomenex®; fase móvel: H₂O/MeOH; fluxo: 14,5mL/min; temperatura: 24° C; injeção: 15 mg em 500 µL de H₂O/MeOH(40:60); faixa de absorção UV: 215 nm.

Fonte: Autor (2018)

As análises feitas por espectrometria de massas de alta resolução no modo positivo e negativo da fração quatro desta etapa pode ser visualizada respectivamente na figura 16 e 17. O valor correspondente da relação massa carga protonada, $[M+H]^+$, foi de 771,2881 m/z, apesar do íon que mais ioniza na amostra ser o 793,5794 m/z. A diferença entre estes valores é de aproximadamente 23 unidades, o que pode indicar a presença do íon sódio junto a molécula analisada. A análise no modo negativo foi eficaz na identificação da massa real da molécula. A massa molecular encontrada como resultado foi de 770,2802 g/mol.

As outras frações não foram analisadas da mesma maneira, pois não obtiveram massa suficiente para as análises ou foram contaminadas.

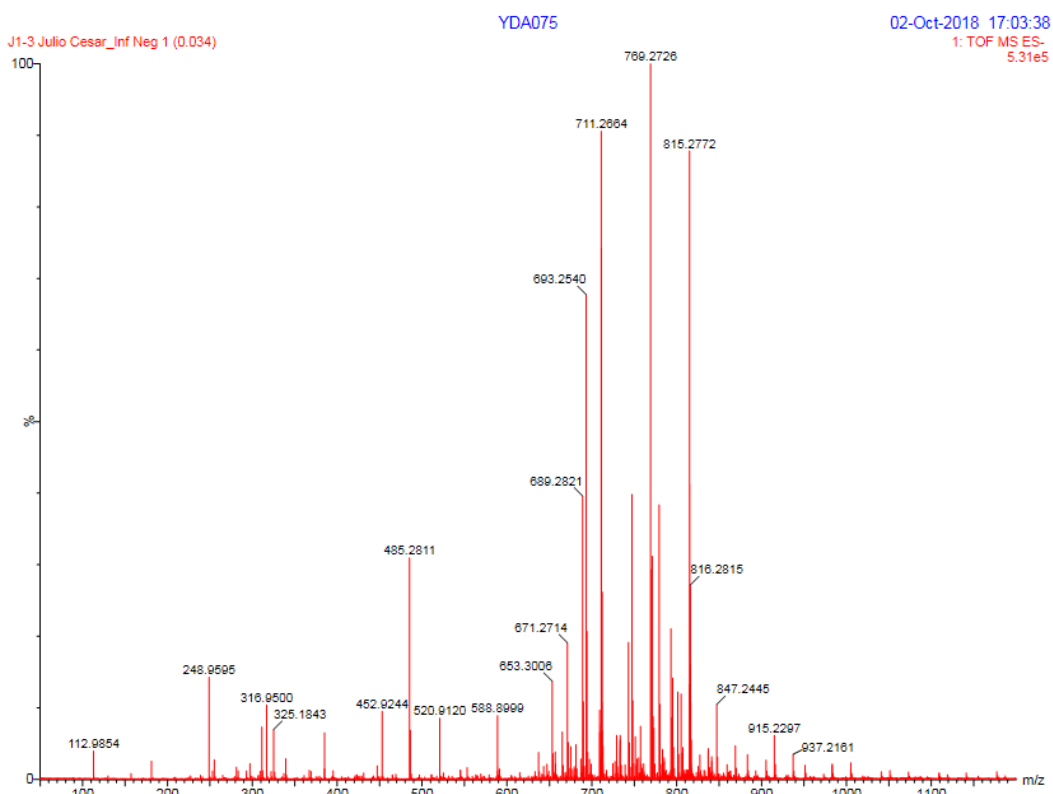
Figura 16 Análise de espectrometria de massas no modo positivo da amostra resultante da separação em HPLC em escala semipreparativa, corresponde ao pico da área 4 da figura 15.



Espectro de massas; Espectrômetro de Massas XEVO G2-S QToF (Waters®) acoplado a um Cromatógrafo Líquido UPLC (Waters®); modo positivo; método por infusão.

Fonte: Autor (2018)

Figura 17 Análise de espectrometria de massas no modo negativo da amostra resultante da separação em HPLC em escala semipreparativa, corresponde ao pico da área 4 da figura 15.



Espectro de massas; Espectrômetro de Massas XEVO G2-S QToF (Waters®) acoplado a um Cromatógrafo Líquido UPLC (Waters®); modo negativo; método por infusão.

Fonte: Autor (2018)

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico com as folhas de *Swietenia macrophylla* se objetivou pela busca por novos compostos com propriedades fitoterápicas, como se tratava de uma espécie membro da família Meliaceae essas substâncias seriam os limonoides. Considerou-se a hipótese de novos limonoides que ainda não teriam sido caracterizados no extrato hexânico. Essa especulação foi fundamentada pelos testes qualitativos realizados no presente estudo. Contudo, as dificuldades para o isolamento com métodos cromatográficos foram grandes, visto que houveram três etapas de separação em CCVU que não resultaram em um efeito esperado, sendo necessário mais uma etapa de fracionamento em HPLC para divisão em grupos e outra de isolamento.

Apesar dos entraves com o desenvolvimento do método de isolamento vale ressaltar que o composto isolado, resultante das várias etapas de separação, mostrou uma massa molecular distinta dos demais limonoides já isolados dessa espécie. Uma pesquisa minuciosa deve ser realizada em bancos de dados de moléculas orgânicas para verificar essas massas apontadas no cromatograma de íons totais. Além disso, a análise por RMN (Ressonância Magnética Nuclear) também deve ser realizada para caracterização estrutural da substância isolada.

As demais frações também devem receber atenção, pois o potencial de isolamento de outras substâncias é alto. O incremento desses testes, junto ao que foi desenvolvido neste trabalho, irá agregar novos conhecimentos sobre os limonoides e o metabolismo da espécie *Swietenia macrophylla* como este trabalho se propôs.

7. REFERÊNCIAS

- AMORIM, W.S.A. et al. Estudo Fitoquímico de *Swietenia macrophylla* e Avaliação da Atividade Antitumoral dos Limonoides Presentes na Espécie. In: Congresso Brasileiro de Química, 57, 2015, Goiânia, GO. Disponível: <<http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/1/7662-20951.html>> acesso em 8 de agosto de 2018.
- BANERJI, B.; NIGAM, S. K. Wood constituents of Meliaceae: a review. **Fitoterapia**, v. 55, n. 1, p. 3-36, 1984.
- BRASIL, M. S. Farmacopéia brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010.
- CASS, Quezia B.; DEGANI, Ana Luiza Gusmão. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. EdUFSCar, 2001.
- CHAMPAGNE, Donald E. et al. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Phytochemistry**, v. 31, n. 2, p. 377-394, 1992.
- CORRÊA, Anderson Domingues; SIQUEIRA-BATISTA, Rodrigo; QUINTAS, Luis Eduardo M. **Plantas medicinais, do cultivo a terapêutica**. Editora Vozes, 1998.
- DA SILVA, Vagner Pereira; OLIVEIRA, Rodrigo Rodrigues; FIGUEIREDO, Maria Raquel. Isolation of Limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 20, n. 1, p. 77-81, 2009.
- FIGUEROA COLON, J. C. An assessment of the distribution and status of big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla* King). **Puerto Rico Conservation Foundation and USDA Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, Rio Piedras, Puerto Rico**, 1994.
- GULLISON, R. E. et al. Ecology and management of mahogany (*Swietenia macrophylla* King) in the Chimanes Forest, Beni, Bolivia. **Botanical Journal of the Linnean society**, v. 122, n. 1, p. 9-34, 1996.
- MATOS, FJ de A. **Introdução à fitoquímica experimental**. edições UFC, 1997.
- MOGHADAMTOUSI, Soheil Zorofchian et al. Biological activities and phytochemicals of *Swietenia macrophylla* King. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10465-10483, 2013.
- PENNINGTON, Terence D. et al. **A monograph of neotropical Meliaceae (with accounts of the subfamily Swietenioideae by BT Styles and the chemotaxonomy by DAH Taylor)**. 1981.
- SILVA, M. N. D. **Estudo Fitoquímico de *Swietenia macrophylla*: Uma Contribuição ao controle de Broca do Mogno**. Tese (tese de doutorado em química). UFSCAR. São Carlos. 2005.
- SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.
- TEIXEIRA, JBP et al. A Fitoterapia no Brasil: da Medicina Popular à regulamentação pelo Ministério da Saúde. 2012. 2016.
- VEIGA JR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERISSIMO, Adalberto et al. Extração de um recurso natural de alto valor na Amazônia: o caso do mogno. **Ecologia Florestal e manejo** , v. 72, n. 1, p. 39-60, 1995.

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Springer Science & Business Media, 1996.

ZHANG, Yuanyuan; XU, Hui. Recent progress in the chemistry and biology of limonoids. **RSC Advances**, v. 7, n. 56, p. 35191-35220, 2017.