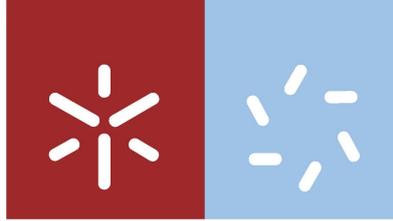




Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Isabel Ferreira Lopes

**Valorização de extratos de plantas
e análogos sintéticos pelo encapsulamento
em nanossistemas baseados em lípidos
e quitosano**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Isabel Ferreira Lopes

**Valorização de extratos de plantas
e análogos sintéticos pelo encapsulamento
em nanossistemas baseados em lípidos
e quitosano**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da
**Professora Doutora Elisabete Maria dos Santos
Castanheira Coutinho**
e do
Professor Doutor António Belmiro Gil Silva Fortes

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-Compartilha
CC BY-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais, irmãos, familiares e amigos pelo incansável apoio quer a nível monetário quer emocional para a realização desta dissertação e por me ajudarem a clarificar o meu percurso académico até ao presente dia.

Não posso deixar de agradecer aos meus supervisores ao Professor Doutor António Gil Fortes e a Professora Doutora Elisabete Coutinho, pela sua prontidão, paciência e disponibilidade de me ajudar e esclarecer sempre que me deparei com alguma dificuldade no percurso desta investigação. Queria agradecer à Professora Doutora Sameiro Torres Gonçalves pela oportunidade de me permitir trabalhar neste projeto abrindo as portas do seu laboratório. Agradeço ao Professor Doutor David Pereira da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pelo profissionalismo na realização dos testes biológicos.

Tenho que agradecer à Universidade do Minho, especificamente à Escola de Ciências, tanto no Departamento de Química como pelo Departamento de Física, pela disponibilidade de espaço para a realização da parte experimental da minha dissertação e pela confiança que depositaram em mim e à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT – Portugal) e FEDER pelo projeto PTDC/ASP-AGR/30154/2017.

Agradeço também, às técnicas de RMN e Espectrometria de massa, a Dr. Elisa Pinto e a Dr. Vânia Azevedo, respetivamente pela sua disponibilidade e profissionalismo.

À Ana Rita Leite e a Mariana Monteiro, pela ajuda de fornecimento de algum material teórico para a realização desta dissertação e principalmente à Ana Rita Leite pela sua paciência e disponibilidade para me ajudar sempre, orientando-me de uma maneira melhor. Muito obrigada às duas!

Agradeço aos meus colegas, Sérgio, Raquel e a Dra Ana Rita Oliveira pela ajuda e persistência, que me permitiram ultrapassar as dificuldades e obstáculos, através da sua sabedoria e conhecimento. Também não posso deixar de agradecer as minhas colegas Raquel Rainha, Cátia Martins e Sandra Dias pela ajuda e partilha do conhecimento e o companheirismo durante esta etapa das nossas vidas. Laboratório 40 sempre!

Por fim, agradeço a oportunidade da realização desta dissertação, apreendendo autonomia e conhecimento, qualidades que levo para o mercado de trabalho.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducentes à sua elaboração. Mais declaro que conheço e respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Título: Valorização de extratos de plantas e análogos sintéticos pelo encapsulamento em nanossistemas baseados em lípidos e quitosano.

Resumo: Atualmente, é cada vez maior o interesse nas plantas como potencial fonte de moléculas bioativas com aplicação em diferentes áreas, desde a cosmética aos fármacos, bem como na indústria alimentar. É possível extrair vários compostos fitoquímicos por diferentes técnicas de extração, bem como isolar e determinar a sua composição recorrendo a técnicas de caracterização adequadas. Apesar do seu elevado interesse, muitos dos fitoquímicos apresentam algumas limitações quanto ao seu potencial, devido à sua elevada volatilidade bem como à fácil degradação quando expostos ao ar. Nesta perspetiva, sistemas de nanoencapsulamento deste tipo de compostos, que permitam a sua preservação e libertação controlada, são alvo de particular interesse. Neste trabalho, foram submetidas a extração por Soxhlet as onze espécies vegetais diferentes, *Prunus lusitana* L., *Mentha suaveolens* Ehrh., *Camellia japonica* L., *Ulex europaeus* L., *Phytolacca americana* L., *Chelidonium majus* L., *Tagetes patula* L., *Rute graveolens* L., *Punica granatum* L. *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb e *Ginkgo biloba* L. Os extratos obtidos a partir da parte foliar foram sujeitos a remoção de clorofilas. O ácido gínggólico foi identificado e isolado nos extratos de *Ginkgo biloba* L. e foi usado como percussor na síntese de um derivado por reação de alquilação. O ácido 3-Aminobenzóico e o ácido Antranílico foram também usados para obter análogos do ácido gínggólico através da reação do grupo NH₂ com haletos de alquilo com 12, 13 e 15 carbonos. Os compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de absorção no UV-Visível, RMN (¹H e ¹³C), espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massa. Os extratos de *Mentha suaveolens* Ehrh., *Phytolacca americana* L., *Rute graveolens* L. e *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb foram sujeitos a ensaios de encapsulamento e de libertação controlada em nanoemulsões de quitosano e em lipossomas de lecitina de soja, preparados quer por injeção etanólica, quer por hidratação de filme lipídico. Verificou-se que as nanoemulsões de quitosano são adequadas para uma libertação total e rápida do agente encapsulado, enquanto os lipossomas retardam a libertação. Foram realizados ensaios preliminares de citotoxicidade na linha celular de insetos Sf9 (proveniente dos ovários imaturos de *S. frugiperda pupae*), tendo-se obtido resultados promissores para o extrato em diclorometano das folhas de flores laranja de *Tagetes Patula* L. e para o ácido gínggólico alquilado a concentrações acima de 100 µM.

Palavras chaves: Atividade inseticida; Extratos de plantas; Libertação controlada; Nanoencapsulamento; Síntese orgânica;

Title: Valorization of plant extracts and synthetic analogues by encapsulation in lipid and chitosan nanosystems

Abstract: Nowadays, there is a growing interest in plants as potential source of bioactive molecules with application in several areas, from cosmetics to drugs, as well as in the food industry. It is possible to extract phytochemicals by different extraction techniques, as well as to isolate and determine their composition using suitable characterization techniques. Despite their high interest, many phytochemicals exhibit a limited potential, due to high volatility as well as easy degradation when exposed to air. In this perspective, nanoencapsulation systems for this type of compounds, allowing their preservation and controlled release, are currently of particular interest. In this work, eleven different plant species, *Prunus lusitana* L., *Mentha suaveolens* Ehrh., *Camellia japonica* L., *Ulex europaeus* L., *Phytolacca americana* L., *Chelidonium majus* L., *Tagetes patula* L., *Rute graveolens* L., *Punica granatum* L. *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb and *Ginkgo biloba* L. were subjected to extraction by Soxhlet. The extracts obtained from the leaf part were subjected to chlorophyll removal. Ginkgolic acid was identified and isolated in *Ginkgo biloba* L. extracts and was used as a precursor in the sample of a derivative by alkylation reaction. 3-Aminobenzoic acid and Anthranilic acid were also used to obtain ginkgolic acid analogs by reacting the NH₂ group with 12, 13 and 15 carbon alkyl halides. The synthesized compounds were characterized by UV-visible absorption spectroscopy, NMR (¹H and ¹³C), infrared spectroscopy and mass spectrometry. The extracts of *Mentha suaveolens* Ehrh., *Phytolacca americana* L., *Rute graveolens* L. and *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb were subjected to nanoencapsulation and controlled release assays in chitosan nanocapsules and liposomes of soybean lecithin, prepared either by ethanolic injection method or by lipid film hydration. It was observed that the chitosan nanocapsules are suitable for a complete and rapid release of the encapsulated extract, while liposomes exhibit a delayed release. Preliminary assays of cytotoxicity using the Sf9 insect cell line (from immature ovaries of *S. frugiperda pupae*) were performed. Promising results were obtained for the dichloromethane extract of *Tagetes patula* L. leaves of orange flowers and the alkylated ginkgolic acid for concentration above 100 μM.

Keywords: Controlled release; Insecticide activity; Nanoencapsulation; Plant extracts; Organic synthesis;

ÍNDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	XVI
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XX
COMUNICAÇÕES.....	XXIII

Capítulo 1 – Introdução

1.1.ENQUADRAMENTO	2
1.2.OBJETIVOS	3
1.3.ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	4

Capítulo 2 – Estado de arte

2.1.FITOQUÍMICOS	6
2.2.CLASSIFICAÇÃO DE FITOQUÍMICOS	9
2.2.1. Compostos Fenólicos	9
2.2.1.1. Ácidos fenólicos	9
2.2.1.2. Flavonóides.....	10
2.2.1.3. Taninos.....	11
2.2.2. Terpenóides	14
2.2.3. Alcalóides	17
2.3.ÓLEOS ESSENCIAIS	18
2.4.ESPÉCIES DE PLANTAS	20
2.4.1. <i>Prunus lusitanica</i> L.....	20
2.4.2. <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	22
2.4.3. <i>Camellia japonica</i> L.....	23
2.4.4. <i>Ulex europaeus</i> L.	28

2.4.5. <i>Phytolacca americana</i> L.	32
2.4.6. <i>Chelidonium majus</i> L.	33
2.4.7. <i>Tagetes patula</i> L.	35
2.4.8. <i>Ruta graveolens</i> L.	38
2.4.9. <i>Punica granatum</i> L.	39
2.4.10. <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb.	42
2.4.11. <i>Ginkgo biloba</i> L.	43
2.5.SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO ÁCIDO GINKGÓLICO (C17:1)	46
2.6.TÉCNICAS DE EXTRAÇÕES DE MATÉRIA VEGETAL	51
2.6.1. Maceração, infusão, percolação e decocção	51
2.6.2. Soxhlet.....	52
2.6.3. Hidrodestilação	52
2.6.4. Outras técnicas de extração	53
2.7.NANOENCAPSULAMENTO	54
2.7.1. Sistemas baseados em lipossomas	54
2.7.2. Sistemas baseados em quitosano.....	55
2.8.NANOPESTICIDAS	56

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1.EXTRAÇÃO DE MATÉRIA VEGETAL	59
3.1.1. Materiais.....	59
3.1.2. Procedimento experimental	59
3.1.2.1. <i>Preparação da matéria vegetal</i>	59
3.1.2.2. <i>Extração</i>	61
3.2.REMOÇÃO DE CLOROFILAS	61
3.2.1. Materiais.....	61
3.2.2. Procedimento experimental	62
3.2.3. Avaliação por Espectroscopia de absorção no UV-visível.....	63
3.3.SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO ÁCIDO GINKGÓLICO (C17:1)	64
3.3.1. Materiais e reagentes químicos	64
3.3.2. Procedimentos experimentais.....	65
3.3.2.1. <i>Extração do ácido ginkgólico 17:1</i>	65
3.3.2.2. <i>Síntese do ácido 2-(heptadec-10-en-1-il) -6-metoxibenzóico</i>	66
3.3.2.3. <i>Tentativa da reação de proteção no ácido ginkgólico 17:1</i>	67

3.3.2.4. Síntese de 3 - dodecilaminobenzóico	68
3.3.2.5. Síntese de 2 - dodecilaminobenzóico	69
3.3.2.6. Síntese de 2 - tridecilaminobenzóico	70
3.3.2.7. Síntese de 2 - pentadecilaminobenzóico	71
3.3.3. Técnicas de Caracterização.....	72
3.3.3.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)	72
3.3.3.2. Espectroscopia de infravermelho (IV).....	74
3.3.3.3. Espectrometria de massa (EM)	75
3.4. ENSAIOS DE NANOENCAPSULAMENTO	76
3.4.1. Materiais e reagentes	76
3.4.2. Procedimentos experimentais.....	76
3.4.2.1. Preparação de lipossomas por injeção etanólica	76
3.4.2.2. Preparação de lipossomas por hidratação do filme lipídico.....	77
3.4.2.3. Preparação das nanoemulsões de quitosano	77
3.4.3. Determinação do tamanho dos nanossistemas	77
3.4.4. Eficiência de encapsulamento e estudos de libertação.....	78
3.5. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	78
3.5.1. Cultivo da linha celular	79
3.5.2. Determinação da viabilidade celular por MTT.....	79

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. EXTRAÇÕES.....	81
4.2. REMOÇÃO DE CLOROFILAS	84
4.2.1. <i>Phytolacca americana</i> L. (Erva-tintureira)	84
4.2.2. <i>Tagetes patula</i> L. (Cravo-de-França).....	85
4.2.3. <i>Ulex europaeus</i> L. (Tojo).....	87
4.2.4. <i>Prunus lusitanica</i> L. (Azereiro)	88
4.2.5. <i>Camellia japonica</i> L. (Japoneira).....	89
4.2.6. <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb (Sargacinha).....	91
4.2.7. <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. (Mentrasitos).....	91
4.2.8. <i>Ruta graveolens</i> L. (Arruda)	92
4.3. SÍNTESE DE ANÁLOGOS DO ÁCIDO GINKGÓLICO (C17:1).....	94
4.3.1. Extração do ácido ginkgólico 17:1	95
4.3.2. Alquilação do ácido ginkgólico 17:1	96
4.3.3. Tentativa de reação de proteção do ácido ginkgólico 17:1.....	97

4.3.4. Síntese do ácido 3 - dodecilaminobenzóico	98
4.3.5. Síntese do ácido 2 - dodecilaminobenzóico	99
4.3.6. Síntese do ácido 2 - tridecilaminobenzóico.....	101
4.3.7. Síntese do ácido 2 - pentadecilaminobenzóico	102
4.4. ENSAIOS DE NANOENCAPSULAMENTO E LIBERTAÇÃO	103
4.4.1. Retas de calibração	104
4.4.2. Eficiência de encapsulamento	106
4.4.3. Caracterização por Difusão Dinâmica da Luz (DLS).....	107
4.4.4. Ensaio de liberação controlada	107
4.5. ATIVIDADE INSETICIDA	110
 Capítulo 5 – Conclusão e Perspectivas Futuras	
5.1. CONCLUSÃO.....	115
5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS	116
 Capítulo 6 - Bibliografia.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico.....	9
Figura 2 – Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.....	10
Figura 3 – Esqueleto base de fenilbenzopirona e as principais classes de flavonóides.....	11
Figura 4 – Representação do Isopreno.....	14
Figura 5 – Exemplos de compostos alcalóides.....	17
Figura 6 – Características da espécie <i>Prunus lusitanica</i> L.....	20
Figura 7 – Principais constituintes da espécie <i>Prunus lusitanica</i> L.....	21
Figura 8 – Características da espécie <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.....	22
Figura 9 – Composição do óleo essencial de <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.....	23
Figura 10 – Características da espécie <i>Camellia japonica</i> L.....	23
Figura 11 – Características da espécie <i>Ulex europaeus</i> L.....	28
Figura 12 – <i>Ulex europaeus</i> L.....	28
Figura 13 – Compostos maioritários de <i>Ulex europaeus</i> L.....	30
Figura 14 – Características da espécie <i>Phytolacca americana</i> L.....	32
Figura 15 – Principais constituintes da espécie <i>Phytolacca americana</i> L.....	33
Figura 16 – Características da espécie <i>Chelidonium majus</i> L.....	33
Figura 17 – Alcalóides de benzilisoquinolinas de <i>Chelidonium majus</i> L.....	34
Figura 18 – Características da espécie <i>Tagetes patula</i> L.....	35
Figura 19 – Flavonóides presentes nas flores de <i>Tagetes patula</i> L.....	36
Figura 20 – Características da espécie <i>Ruta graveolens</i> L.....	38
Figura 21 – Furocumarinas de <i>Ruta graveolens</i> L.....	39
Figura 22 – Características da espécie <i>Punica granatum</i> L.....	39

Figura 23 – Casca de romã seca e triturada com um tamanho de partículas d e 900 µm.....	40
Figura 24 – Compostos maioritários da casca de romã.....	41
Figura 25 – <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Grisel.....	42
Figura 26 - Características da espécie <i>Ginkgo biloba</i> L.....	43
Figura 27 – Compostos químicos maioritários das folhas de <i>Ginkgo biloba</i> L.....	44
Figura 28 – Estruturas dos principais ácidos ginkgólicos.....	47
Figura 29 – Montagem e equipamento da extração por Soxhlet.....	52
Figura 30 – Montagem e equipamento da extração por Hidrodestilador.....	53
Figura 31 – Matéria vegetal após a secura e/ou liofilização com um tamanho de partículas de 900 µm: a) <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. (folhas); b) <i>Phytolacca americana</i> L. (raiz).....	60
Figura 32 – Extração de clorofilas utilizando Chromabond C18 [®] em que se visualiza a separação dos componentes do extrato ao longo da sílica.....	62
Figura 33 – Visualização numa câmara de UV- vis (365 nm) das frações de <i>Ruta graveolens</i> L. após a extração das clorofilas por Chromabond C18 [®] , indicando as diversas cores presentes no extrato: a) Azul; b) Alaranjado; c) Vermelho e d) Amarelo.....	62
Figura 34 - Atenuação da luz após absorção da amostra.....	63
Figura 35 – Estrutura química do ácido ginkgólico 17:1.....	65
Figura 36 – Estrutura química do ácido ginkgólico 17:1 alquilado.....	66
Figura 37 – Estrutura química de 2-(heptadec-10-en-1-il) -6-metoxibenzoato de metilo.....	68
Figura 38 – Estrutura química de 3 – dodecilaminobenzóico.....	68
Figura 39 – Estrutura química de 2 – dodecilaminobenzóico.....	69
Figura 40 – Estrutura química de 2 – tridecilaminobenzóico.....	70
Figura 41 – Estrutura química de 2 – pentadecilaminobenzóico.....	71
Figura 42 – Estados de spin de um próton.....	72

Figura 43– Deslocamento químicos de compostos orgânicos nos espectros de RMN de próton e de carbono.....	73
Figura 44 – Componentes do espectrômetro de massa.....	75
Figura 45 – Espectro de absorção da folha <i>Phytolacca americana</i> L., a uma concentração de 4,1 mg/mL.....	85
Figura 46 – Espectros de absorção das folhas de <i>Tagetes patula</i> L.: a) folhas de flores amarelas a uma concentração de 1,8 mg/mL b) folhas de flores laranja a uma concentração de 1,3 mg/mL e c) folhas de flores vermelhas a uma concentração de 0,99 mg/mL.....	86
Figura 47 – Espectro de absorção da folha <i>Ulex europeus</i> L., a uma concentração de 0,1 mg/mL.....	88
Figura 48 – Espectro de absorção da folha <i>Prunus lusitanica</i> L., a uma concentração de 4,6 mg/mL.....	88
Figura 49 – Espectro de absorção da folha <i>Camellia japonica</i> L., a uma concentração de 0,13 mg/mL.....	89
Figura 50 – Espectro de absorção da folha <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb, a uma concentração de 0,45 mg/mL.....	91
Figura 51 – Espectro de absorção da folha <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh, a uma concentração de 3,6 mg/mL.....	92
Figura 52 – Espectros de absorção das folhas de <i>Ruta graveolens</i> L.: a) Extraído com diclorometano a uma concentração de 0,198 mg/mL e b) Extraídos com acetato de etilo a uma concentração de 0,154 mg/mL.....	93
Figura 53 – a) Espectros de absorção do extrato de e b) Curva de calibração de <i>Ruta graveolens</i> L. (absorvância vs concentração)	104
Figura 54 – a) Espectros de absorção do extrato de <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. e b) Curva de calibração de <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. (absorvância vs concentração)	105
Figura 55 – a) Espectros de absorção do extrato de <i>Phytolacca americana</i> L. e b) Curva de calibração de <i>Phytolacca americana</i> L. (absorvância vs concentração)	105

Figura 56 – a) Espectros de absorção do extrato de <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb e b) Curva de calibração de <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb (absorvância vs concentração)	105
Figura 57 – Perfis de liberação do extrato de <i>Ruta graveolens</i> L., em função do tempo (h) nos três sistemas de encapsulamento testados.....	108
Figura 58 – Perfis de liberação do extrato de <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh., em função do tempo (h) nos três sistemas de encapsulamento testados.....	109
Figura 59 – Perfis de liberação do extrato de <i>Phytolacca americana</i> L., em função do tempo (h) nos três sistemas de encapsulamento testados.....	109
Figura 60 – Perfis de liberação do extrato de <i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb, em função do tempo (h) nos três sistemas de encapsulamento testados.....	110
Figura 61 – Efeito dos extratos de etanol: água (1:1) de bagas e folhas de na viabilidade da <i>Phytolacca americana</i> L. membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: UCBA 2h: Bagas, 2h de extração; UCBA 4h: Bagas, 4h de extração; UCBA 9h: Bagas, 9h de extração; UCFA 9h: Folhas, 9h de extração. Os resultados correspondem à média ± DP de, pelo menos, três ensaios independentes.....	111
Figura 62 – Efeito dos extratos de diclorometano de bagas e folhas de <i>Phytolacca americana</i> L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: UCB 2h: Bagas, 2h de extração; UCB 4h: Bagas, 4h de extração; UCB 9h: Bagas, 9h de extração; UCF 4h: Folhas, 4h de extração. Os resultados correspondem à média ± DP de, pelo menos, três ensaios independentes. ** p <0,01, **** p <0,0001.....	111
Figura 63 – Efeito dos extratos de etanol: água (1:1) de folhas de flores de <i>Tagetes patula</i> L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: CFFFA-AE: folhas das flores amarelas, 9h de extração; CFFFL-AE 9h: folhas de flores laranja, 9h de extração; CFFV-AE: folhas de flores vermelhas, 9h de extração. Os resultados correspondem à média ± DP de, pelo menos, três ensaios independentes.....	112

Figura 64 – Efeito dos extratos de diclorometano de folhas e flores de *Tagetes patula* L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: CFFFA: folhas das flores amarelas, 4h de extração; CFFFL: folhas de flores laranja, 4h de extração; CFFFV: folhas de flores vermelhas, 4h de extração; CFFV: flores vermelhas, 4h de extração. Os resultados correspondem à média ± DP de, pelo menos, três ensaios independentes. **** p < 0,0001.....112

Figura 65 – Viabilidade celular da membrana da linha celular Sf9 para o ácido gínggólico alquilado.....113

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Classificação de taninos.....	13
Esquema 2 – Atividade de <i>Tagetes patula</i> L. e <i>Tagetes erecta</i> L. contra organismos vivos.....	37
Esquema 3 – a) Síntese de éster AG (13:0) 115 b) Síntese de AG (13: 0) 117 com 9-BBN. c) Síntese de AG (13: 0) sem 9-BBN.....	48
Esquema 4 – Obtenção do ácido gíngólico alquilado e protegido.....	49
Esquema 5 – Síntese de análogos do AG a partir de 6-metilsalicilato.....	50
Esquema 6 – Classificação de lipossomas de acordo com parâmetros estruturais.....	55
Esquema 7 – Potenciais riscos da utilização de nanopesticidas.....	57
Esquema 8 – Preparação da matéria vegetal para a extração de componentes naturais.....	60
Esquema 9 – Síntese de análogos a partir a) 3 – aminobenzóico e b) ácido antranílico.....	94
Esquema 10 – Representação esquemática da reação de alquilação do ácido gíngólico 17:1...96	
Esquema 11 – Tentativa de reação de proteção do ácido gíngólico 17:1.....	97
Esquema 12 – Representação esquemática da síntese do análogo 3- dodecilaminobenzóico.....	98
Esquema 13 – Representação esquemática da síntese do análogo 2- dodecilaminobenzóico.....	99
Esquema 14 – Representação esquemática da síntese do análogo 2- tridecilaminobenzóico....	101
Esquema 15 – Representação esquemática da síntese do análogo 2- pentadecilaminobenzóico.	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos de fitoquímicos e as suas respetivas atividades biológicas.....	6
Tabela 2 – Classificação e características das diversas classes de terpenóides e exemplos.....	14
Tabela 3 – Classe dos principais constituintes dos óleos essenciais e exemplos de fármacos aromáticos e o composto químico mais predominante de cada fármaco.....	19
Tabela 4 – Composição química mais abundante nas folhas da <i>Camellia japonica</i> L. e as suas atividades biológicas.....	24
Tabela 5 – Compostos orgânicos voláteis presentes nas diferentes partes da planta e a sua percentagem de rendimentos total de extrato identificados através de CG e CG/EM.....	31
Tabela 6 – Componentes dos óleos essenciais das diferentes partes da planta da espécie <i>Tagetes patula</i> L.....	37
Tabela 7 – Atividade biológica e os mecanismos de ação do extrato de <i>Ginkgo biloba</i> L.....	45
Tabela 8 – Resultados de extração por Soxhlet com diferentes tempos (h), rendimentos mássicos da amostra (%) e a cor.....	81
Tabela 9 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido gínggólico 17:1, a uma concentração de 0,12 mg/mL em etanol.....	95
Tabela 10 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido gínggólico alquilado, a uma concentração de 0,17 mg/mL em etanol.....	97
Tabela 11 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 3 – dodecilaminobenzóico, a uma concentração de 0,2 mg/mL em etanol.....	98
Tabela 12 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 2 – dodecilaminobenzóico, a uma concentração de 1,2 mg/mL em etanol.....	100
Tabela 13 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 2 – tridecilaminobenzóico, a uma concentração de 0,08 mg/mL em etanol.....	101
Tabela 14 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 2 – pentadecilaminobenzóico, a uma concentração de 0,07 mg/mL em etanol.....	103

Tabela 15 – Eficiência de Encapsulamento ($EE\% \pm DP\%$) para os extratos de várias espécies vegetais em lipossomas e nanoemulsões de quitosano (DP: desvio padrão de três ensaios independentes)106

Tabela 16 – Diâmetro e polidispersividade (pdl) para os lipossomas e nanoemulsões de quitosano determinados por DLS.....107

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Transmitância é a razão entre a intensidade de luz transmitida (I) e a intensidade original (I_0).....	63
Equação 2 – Absorvância é o simétrico do logaritmo decimal da transmitância.....	63
Equação 3 – Lei de Lambert-Beer.....	64
Equação 4 – Energia absorvida entre os estados de spin.....	73
Equação 5 – Frequência de estiramento.....	73
Equação 6 – Taxa de eficácia de encapsulamento (EE%).....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

δ – Desvio químico.

λ – Comprimento de onda.

ε – Coeficiente de absorção molar.

$\nu_{\text{máx}}$ – Comprimento máximo (expresso em cm^{-1}).

Abs – Absorção.

AG – Ácido gínggólico.

CG – Cromatografia gasosa.

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa.

CW – Ondas contínuas.

d – Duplete.

DCM – Diclorometano.

dd- Duplo duplete.

DLS - Difusão dinâmica de luz.

DMAP – 4-dimetilaminopiridina.

DME - Éter dimetil.

DNA - Ácido desoxirribonucleico.

dt – Duplo tripleto.

EE – Eficiência de encapsulamento.

EGb 761 – Extrato de ginkgo biloba comercial.

EM – Espectrometria de massa.

EOs – Óleos essenciais.

eq. – Equivalentes.

ESI – Ionização por Eletrospray.

et al. – et alia (do Latim, referência de outras pessoas).

EtOH – Etanol.

EtOAc – Acetato de etilo.

F.P. – Farmacopeia Portuguesa.

GUV – Vesículas unilamelares gigantes.

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance.

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta performance acoplado com detector de díodos.

HRMS - Espetrometria de massa de alta resolução.

Hz – Hertz.

IV – Infravermelho.

J – Constante de acoplamento.

LUV – Vesículas unilamelares grandes.

m – Multipleteo.

MLV – Vesículas multilamelares.

MTT - Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio.

m/z – Razão entre massa e carga.

OLV – Vesículas oligolamelares.

RMN – Ressonância Magnética Nuclear.

ppm – Partes por milhão.

s – Singleto.

sl- Singleto largo.

SUV – Vesículas unilamelares pequenas.

TF – Transformada de Fourier.

TLC – Cromatografia de camada fina.

UV – Ultravioleta.

Vis – Visível.

COMUNICAÇÕES

Ana.I.F. Lopes, David M. Pereira, M. Sameiro T. Gonçalves, Elisabete M. S. Castanheira, A. Gil Fortes. "Plants extracts and cytotoxicity studies", comunicação em painel (P 22), 4 th Symposium on Medicinal Chemistry, Braga, Portugal, 24 de maio de 2019.

Ana.I.F. Lopes, David M. Pereira, M. Sameiro T. Gonçalves, A. Gil Fortes, Elisabete M. S. Castanheira. "Valorization of plant extracts by encapsulation in lipid nanosystems for application as potential insecticides", comunicação, The 23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-23), <https://sciforum.net/conference/ecsoc-23>, 15 de novembro a 15 de dezembro, publicado a 14 de Novembro de 2019.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO

As plantas são uma fonte de moléculas com diversas atividade biológica, cada vez mais utilizadas em várias áreas desde a indústria farmacêutica à alimentar. A utilização de diversas técnicas permite obter os extratos que, após purificação são sujeitos a caracterização analítica, de forma a determinar a sua composição. Com frequência, os extratos obtidos apresentam estabilidade reduzida sendo sensíveis a fatores externos nomeadamente exposição à luz solar, ar e processos oxidativos.

Uma das formas de ultrapassar esta dificuldade consiste no seu encapsulamento, melhorando a sua resistência à degradação biológica e/ou físico-química e aumentando a sua eficácia, libertação controlada, com diminuição da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação no alvo de interesse.

Existem diversos agentes transportadores, entre os quais se destacam os sistemas lipídicos, sistemas mistos de lípidos e surfactantes e sistemas baseados em biopolímeros.

Os lipossomas têm sido muito utilizados nas indústrias cosmética, farmacêutica, na agricultura e na indústria alimentar, protegendo a funcionalidade de compostos instáveis. São biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos e permitem encapsular tanto compostos lipofílicos como hidrofílicos. Têm sido utilizados como sistemas de libertação controlada, permitindo ao agente encapsulado atuar sobre o alvo, aumentando o índice terapêutico e minimizando efeitos colaterais.

Os sistemas baseados em biopolímeros, nomeadamente quitosano (um produto natural, de baixo custo, renovável, biocompatível, biodegradável e não tóxico), podem ser processados de diversas formas como soluções, filmes, cápsulas e outros sistemas de libertação controlada. O quitosano tem sido utilizado em diversas áreas como a agricultura, indústria alimentar e farmacêutica, e em particular na área biomédica, nomeadamente como biomaterial para reconstruções dentárias, ósseas e em sistemas de libertação controlada e prolongada tendo sido comprovado que é um excelente candidato possuindo efeitos colaterais mínimos.

1.2. OBJETIVOS

A presente dissertação tem como principal objetivo a extração, caracterização e encapsulamento de fitoquímicos e de análogos sintéticos em sistemas lipídicos e sistemas baseados em biopolímeros (quitosano). O projeto desenvolvido é constituído pelas seguintes tarefas:

- Extração de fitoquímico através extração por Soxhlet, usando água: etanol (1:1) e diclorometano (DCM) como solventes durante 4 a 9 horas;
- Remoção de clorofilas nos extratos obtidos na parte foliar;
- Purificação de extratos/compostos através de cromatografia em coluna;
- Síntese de derivados do ácido ginkgólico;
- Caracterização dos compostos extraídos, através de diversas técnicas como espectrometria de massa (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV), e ultravioleta visível (UV-Vis);
- Produção de lipossomas por injeção etanólica e hidratação de filme fino lipídico;
- Produção de nanoemulsões de quitosano através do método de gelificação ionotrópica;
- Determinação da eficiência de encapsulamento, dos tamanhos e polidispersividade dos sistemas e estudo da libertação controlada para alguns extratos selecionados;
- Verificação da sua atividade biológica numa linha celular de insetos (Sf9);

1.3. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em seis capítulos: Introdução, Estado de Arte, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões e Perspetivas Futuras e Bibliografia.

No primeiro capítulo, é efetuado um enquadramento do trabalho desenvolvido, sendo

definido o objetivo principal desta dissertação e as tarefas executadas no desenvolvimento da mesma.

O segundo capítulo foca-se na pesquisa bibliográfica referente aos diferentes tópicos que o trabalho aborda, nomeadamente nas plantas como fonte de fitoquímicos e as suas diferentes classes de compostos, espécies de plantas selecionadas, técnicas de extração de matéria vegetal, nanoencapsulamento, nanossistemas baseados em lipossomas, nanossistemas baseados em quitosano e nanopesticidas.

No terceiro capítulo são indicados o materiais, reagentes e solventes utilizados na preparação das amostras, assim como os procedimentos e caracterização das mesmas.

No capítulo quarto, são apresentados os resultados do trabalho experimental e a sua respetiva discussão.

No quinto capítulo são apresentadas as conclusões mais relevantes do trabalho e são sugeridas propostas de trabalho futuro.

O capítulo final lista a bibliografia referenciada na dissertação.

CAPÍTULO 2 – ESTADO DE ARTE

2.1. FITOQUÍMICOS

As plantas são uma fonte de produtos naturais, muitos destes possuindo atividade biológica que acumulam nas estruturas secretoras externas (tricomias, secretores e osmóforos) e nas estruturas secretoras internas (idioblastos, canais e bolsas) dos órgãos das plantas.^{1,2} Os fitoquímicos provenientes de plantas aromáticas e medicinais têm revelado constituir uma fonte importante de compostos para a saúde do ser humano devido ao valor nutricional.² Estes compostos são usados pela planta como proteção contra doenças e fatores externos (poluição e exposição à radiação UV) e também contribuem para melhorar os fatores intrínsecos da própria planta como a coloração, o aroma e o sabor. Muitos destes compostos são extraídos das plantas na forma de misturas complexas. A atividade biológica é diversificada destacando-se a atividade antimicrobiana, antibacteriana e antifúngica.²

Os metabólitos secundários existentes nas plantas podem ser divididos em diferentes classes: compostos fenólicos, flavonóides, taninos, alcalóides e terpenos. Na tabela 1 estão indicadas as principais classes de compostos e as diversas atividades biológicas que os caracterizam.

Tabela 1 – Grupos de fitoquímicos e as suas respetivas atividades biológicas.

Metabólitos Secundários	Atividade Biológica
	Atividade Antioxidante ^{1,2,3,4}
	Atividade Anti-radical ^{1,4}
	Inibidores Enzimáticos ^{3,4}
	Atividade Anti-inflamatória ^{2,3}
Compostos fenólicos	Combate em estados febris e gripais ⁴
	Atividade Antimicrobial ²
	Atividade Antitumoral ^{1,2}
	Atividade Antiespasmódica ²
	Atividade Antidepressiva ²

	Atividade Anticarcinogénica ^{1,4}
	Atividade Antialérgica ^{1,2}
	Atividade Anti-Inflamatória ^{1,2,3}
	Ação Anti-hepática ¹
	Atividade Antidiarreica ⁴
	Atividade Vasodilatadora ^{1,3,4}
Flavonóides	Efeito cardioprotetor ^{1,3,4}
	Atividade Antioxidante ^{2,3,4}
	Atividade Antitumoral ^{1,2,4}
	Atividade Antibacteriana ^{1,4}
	Protetor contra raios UV ⁴
	Atividade Analgésica ⁴
	Combate à Osteoporose ⁴
	Tratamento de diarreias ^{2,4}
	Problemas Estomacais ^{2,4}
	Atividade Antioxidante ^{2,4}
Taninos	Atividade Anti-Inflamatória ^{2,4}
	Atividade Antimicrobiana ⁴
	Combate nas doenças degenerativas ⁴
	Atividade Antitumoral ^{2,4}
	Ação Hemostático ⁴

	Efeito Sedativo ⁴
	Atividade Anti-inflamatória ^{3,4}
	Propriedades Hipertensoras ⁴
	Atividade Antioxidante ⁴
Terpenos	Ação coagulante ⁴
	Atividade Anticarcinogénica ^{2,4}
	Reguladores de crescimento para as plantas ²
	Atividade Antimalária ^{2,4}
	Ação Anti-úlceras ²
	Atividade Antimicrobiana ²

	Ação Sedativa ⁴
	Atividade Antimalária ^{2,4}
	Atividade Antigotosa ⁴
	Atividade Antitumoral ⁴
	Ação Emética ⁴
	Combate contra a tosse ⁴
	Atividade Anticarcinogénica ^{1,2}
Alcalóides	Efeito anti-hipertensivo ²
	Efeito antiarrítmico ²
	Usado como fero-hormonas no acasalamento de insetos ⁴
	Utilização de colquicina para duplicação de cromossomas na floricultura ⁴
	Atividade Antifúngica ²
	Atividade Antibacteriana ²

2.2. CLASSIFICAÇÃO DE FITOQUÍMICOS

2.2.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são a maior categoria de fitoquímicos e a mais amplamente distribuída no reino vegetal, representam um grupo grande e complexo de constituintes químicos encontrados nas plantas. Estruturalmente, os compostos fenólicos são constituídos por um anel aromático possuindo um ou mais substituinte hidroxilo, variando de simples compostos fenólicos a compostos poliméricos. São metabólitos secundários e apresentam várias propriedades farmacológicas, nomeadamente como antioxidantes que atua como função protectora contra processos de doenças mediadas por radicais livres. Os componentes fenólicos são divididos em sub-classes sendo os mais importantes: as cumarinas, quinonas, lignanos, destacando -se os flavonóides, os ácidos fenólicos, polifenóis e taninos.²

2.2.1.1. *Ácidos fenólicos*

O termo "ácidos fenólicos", em geral, designa fenóis que possuem um grupo funcional de ácido carboxílico. Os ácidos fenólicos de ocorrência natural contêm duas estruturas de carbono distintas: as estruturas hidroxicinâmica e hidroxibenzóica.²

o *Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico*

São bastantes abundantes na natureza, contendo os taninos hidrolisáveis (ácido gálico e do seu dímero, a ácido elágico) e também o ácido *p*-hidroxibenzóico **1**, ácido salicílico **2**, o ácido vanílico **3** e o ácido siríngico **4**.⁴

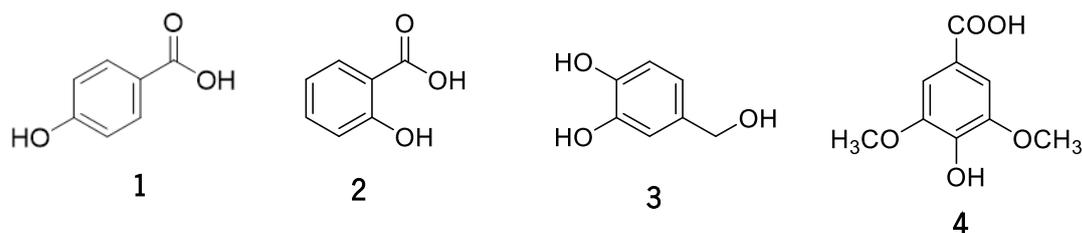


Figura 1 – Ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico.

o *Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico*

Estão difundidos na natureza, apresentam geralmente a forma de heterósidos fenilpropanóico, entre os quais se destacam o ácido *p*-cumárico **5a**, o ácido cafeico **5b**, ácido ferúlico **5c** e o ácido sinápico **6** e outros ácidos por vezes na forma de ésteres que estão presentes em diversos fármacos ⁴.

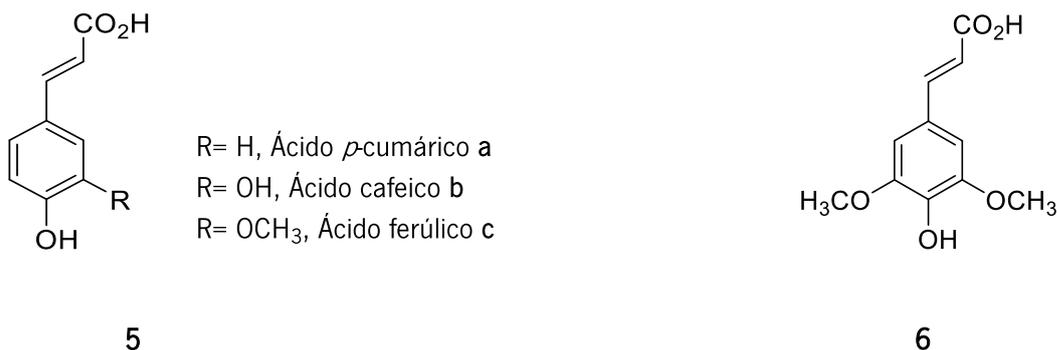


Figura 2 – Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico.

Estes compostos, sejam em forma de ésteres ou de heterósidos, são solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Quando estes, estão sob a forma de ácido são solúveis nos solventes orgânicos em meio ácido.⁴ Na presença de grupos fenólicos originam pontes de hidrogénio, o que explica a ligação às proteínas.⁴ A caracterização analítica é normalmente feita por métodos cromatográficos, normalmente, cromatografia em camada fina, e/ou por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), em fase reversa permitindo a identificação e quantificação do composto.⁴

2.2.1.2. *Flavonóides*

Os flavonóides estão incluídos num grupo de compostos que ocorrem naturalmente nas plantas, existindo mais de 4000 compostos fenólicos descritos na literatura. Os flavonóides possuem o esqueleto base da estrutura da fenilbenzopirona (composto **7**), consistindo de dois anéis aromáticos (A e B), ligados por uma unidade de três carbonos na forma de anel central de pirano (C). Apresentam diversas funções na natureza e inúmeras atividades biológicas. As suas estruturas predominantes são flavonóis e flavonas, sempre na forma heterosídica. As principais

classes de flavonóides são Flavanona **8**, Flavona **9**, Flavonol **10**, Isoflavanona **11**, Isoflavona **12**, Isoflavonol **13** e Antocianidina **14**.^{3,4}

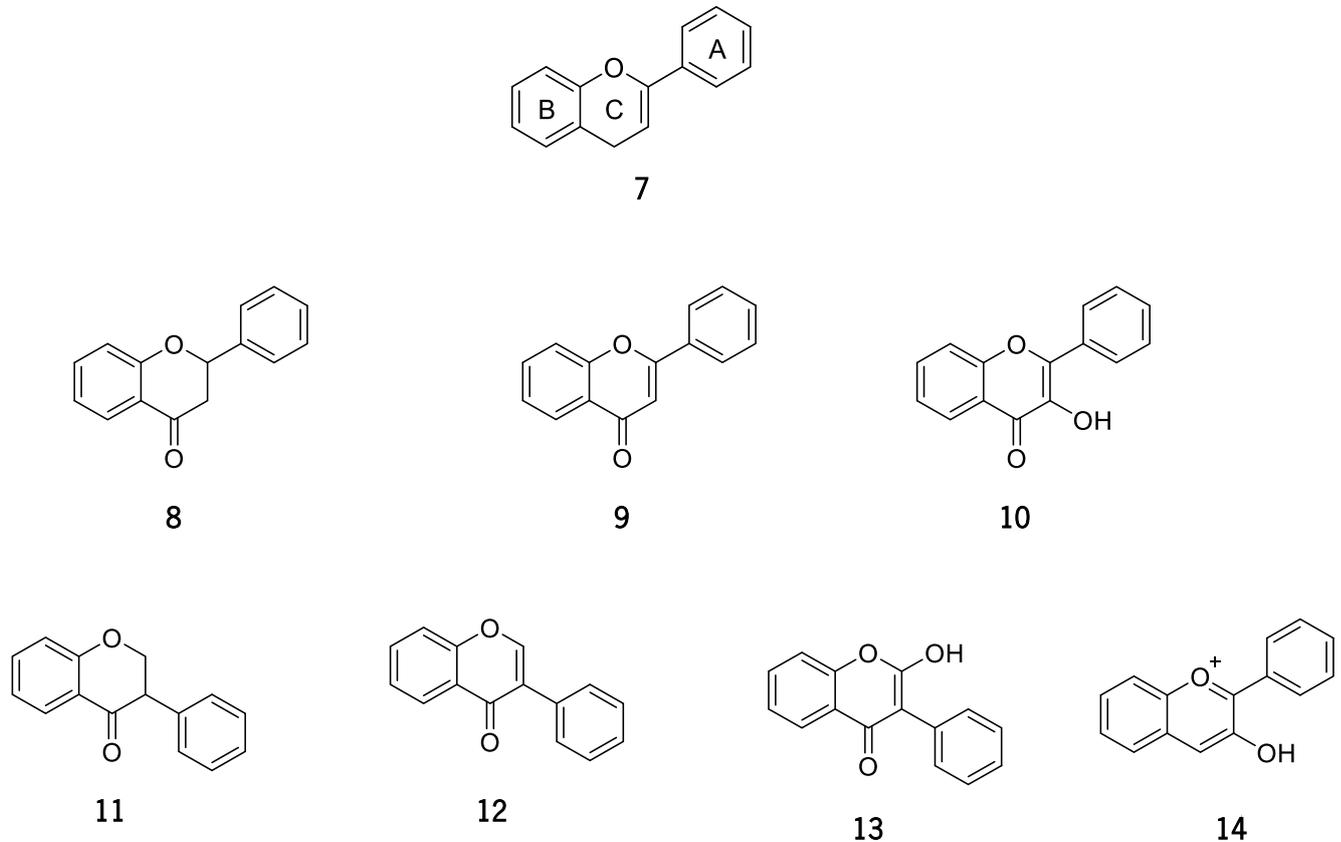


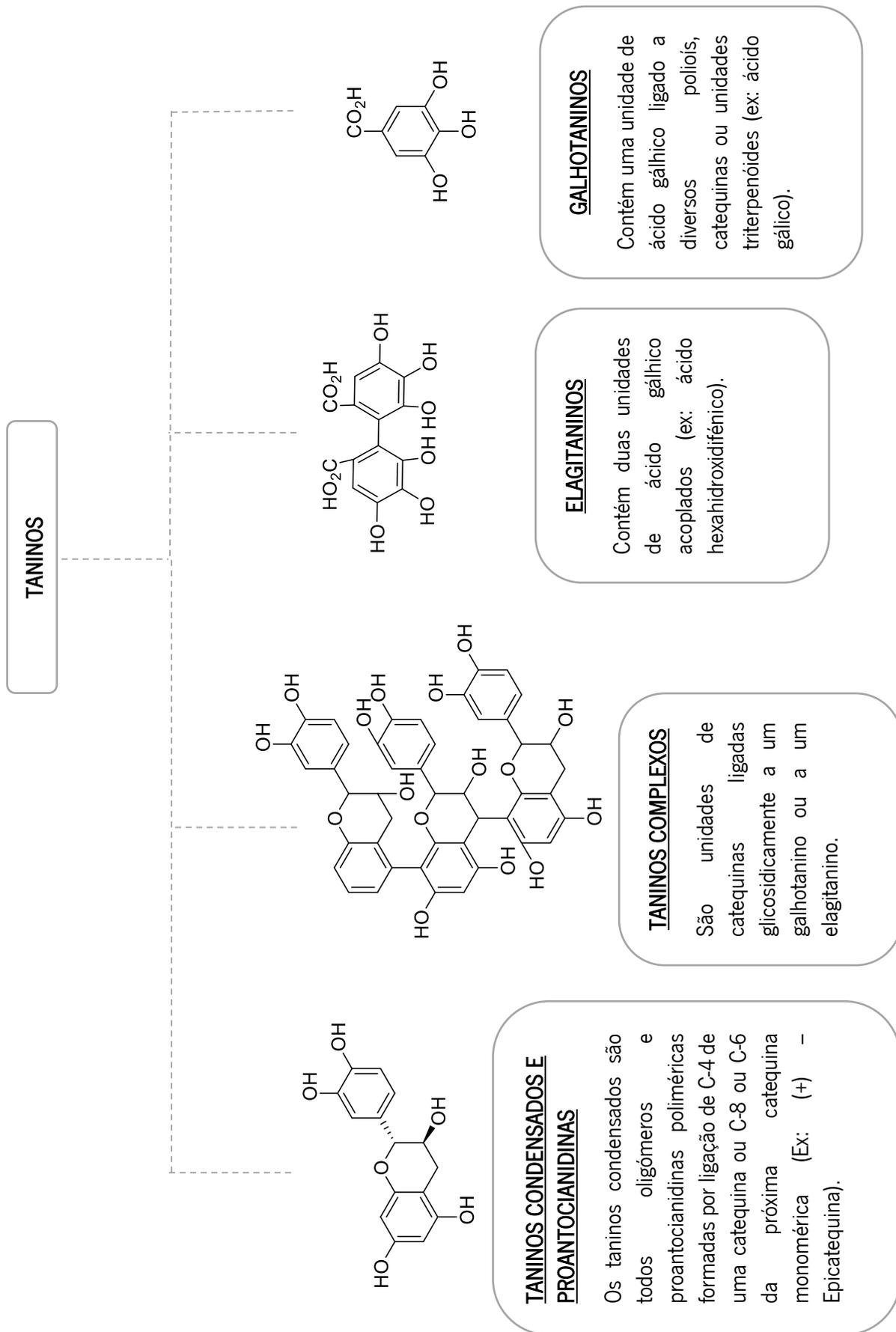
Figura 3 – Esqueleto base de fenilbenzopirona e as principais classes de flavonóides.

As flavanonas, flavonas e flavonóis diferem do incolor ao amarelo e as antocianinas apresentam cores como laranja-brilhante a azul, notando-se nas pétalas das flores e nos frutos das plantas superiores.⁴ Sendo produzidas pelas plantas em resposta a infecções microbianas, apresentam a mesma atividade “in vitro” contra muitos microorganismos.

2.2.1.3. Taninos

Taninos são compostos polifenólicos, solúveis em água com peso molecular a variar desde 500 a 4000.^{2,4} O termo tanino provém de “curtir as peles” sendo capaz de transformar a pele fresca dos animais em material imputrescível e pouco permeável, devendo-se as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogénio entre os grupos fenólicos dos taninos e algumas macromoléculas formando complexos com as fibras de colagénios da pele, conferindo resistência

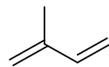
à água e ao calor.⁴ A sua estabilidade depende da sua estrutura, mas normalmente estas são instáveis.⁴ Precipitam com amidas ou substâncias aminadas e têm afinidade com proteínas que lhe conferem o carácter adstringente de alguns frutos.⁴ São divididos em três grupos distintos, devido às suas características estruturais: taninos hidrolisáveis (galhotaninos e elagitaninos), taninos complexos e taninos condensados ou proantocianidinas (esquema 1).^{1,4}



Esquema 1 – Classificação dos taninos.

2.2.2. Terpenóides

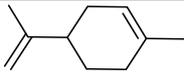
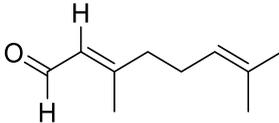
Os terpenos ou terpenóides são constituídos por um esqueleto carbonado de várias unidades de isopreno (2-metilbutadieno) **15**.^{2,5} No reino vegetal, os terpenóides são considerados como óleos essenciais, e contêm um forte potencial a nível comercial, em particular na alimentação e na cosmética, sendo usado como sabor e fragância.² O elevado interesse destes compostos para aplicações clínicas deve-se à vasta gama de propriedades biológicas descritos, destacando atividade anti-inflamatória, antioxidante, atividade anticarcinogénica e antimicrobial.^{2,4} Os terpenóides podem ser divididos em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos e esteróides de acordo com o número de unidades de isopreno. Algumas características dos terpenóides estão indicados na tabela 2.^{2,5}

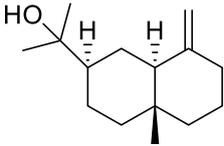
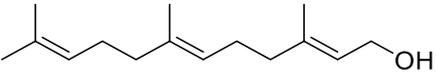
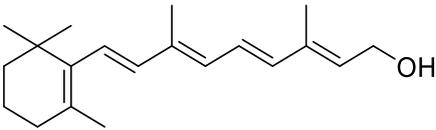
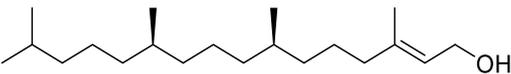
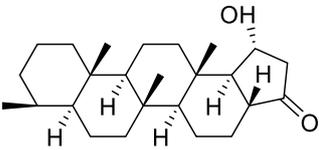


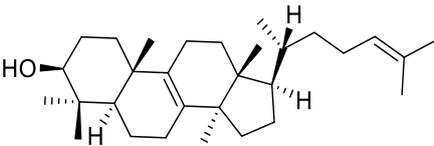
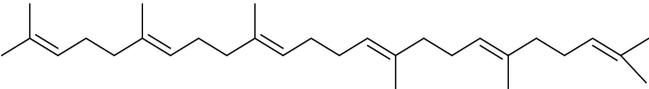
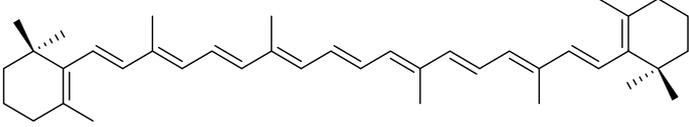
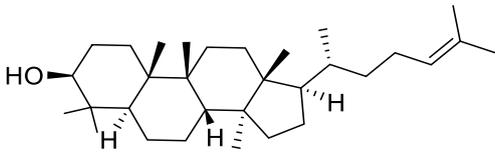
15

Figura 4 – Representação do isopreno.

Tabela 2 – Classificação e características das diversas classes de terpenóides e exemplos.

Classificação	Características	Exemplos
Monoterpenos	Possuem duas unidades de isopreno. Podem ser lineares ou conter anéis ^{2,5}	 Limoneno 16
		 Citral 17

<p>Sesquiterpenos</p>	<p>Provém de farnesil pirofosfato (FPP). Contêm três unidades de isopreno ^{2,5}</p>	 <p>Beta-eudesmol 18</p>  <p>Farnesol 19</p>
<p>Diterpenos</p>	<p>Deriva da geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Contêm quatro unidades de isopreno ^{2,5}</p>	 <p>Retinol 20</p>  <p>Fitol 21</p>
<p>Sesterterpenos</p>	<p>Derivados Deriva da geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). Encontrados em organismos marinos ^{2,5}</p>	 <p>Esclarina 22</p>

	<p>Cadeia precursora é o esqualeno isolado do fígado do tubarão, no</p>	 <p>Lanosterol 23</p>
<p>Triterpenos</p>	<p>fígado do rato, nos fungos e sementes de Amarantáceas. Contêm seis unidades de isopreno ^{2,5}</p>	 <p>Esqueleno 24</p>
<p>Tetraterpenos</p>	<p>Contêm oito unidades de isopreno e podem ser acíclicas, monocíclicas e bicíclicas ^{2,5}</p>	 <p>Beta-caroteno 25</p>
<p>Esteróides</p>	<p>Derivado dos lanosterol ^{2,5} Nas plantas, derivam do cicloartenol ^{2,5}</p>	 <p>Cicloartenol 26</p>

2.2.3. Alcalóides

Os alcalóides constituem uma classe de compostos heterocíclicos de nitrogénio com comportamento básico e atividade farmacológica.^{4,5} Apresentam uma elevada toxicidade e no reino vegetal estão presentes em diversas famílias como a família das Dicotiledóneas, principalmente as Apocianáceas, Asteráceas, Berberidáceas, Borragináceas, Buxáceas, Quenepodiáceas, Euforbiáceas, Fabáceas, Lauráceas, Magnoliáceas, Papaveráceas, Ranunculáceas, Rubiáceas, Rutáceas, Solanáceas, etc. Podem ser encontrados e ou acumulados nos diversos órgãos das plantas, principalmente em tecidos externos, como em tecidos em crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos.⁴ Os alcalóides podem ser divididos em subclasses como alcalóides com o núcleo pirrolidina, piridina, piperidina, tropano, pirrolizidina, etc.^{4,5} Na figura 5, verifica-se alguns exemplos de compostos alcalóides, destacando a adrenalina **27**, nicotina **28**, cocaína **29**, morfina **30** e heroína **31**.

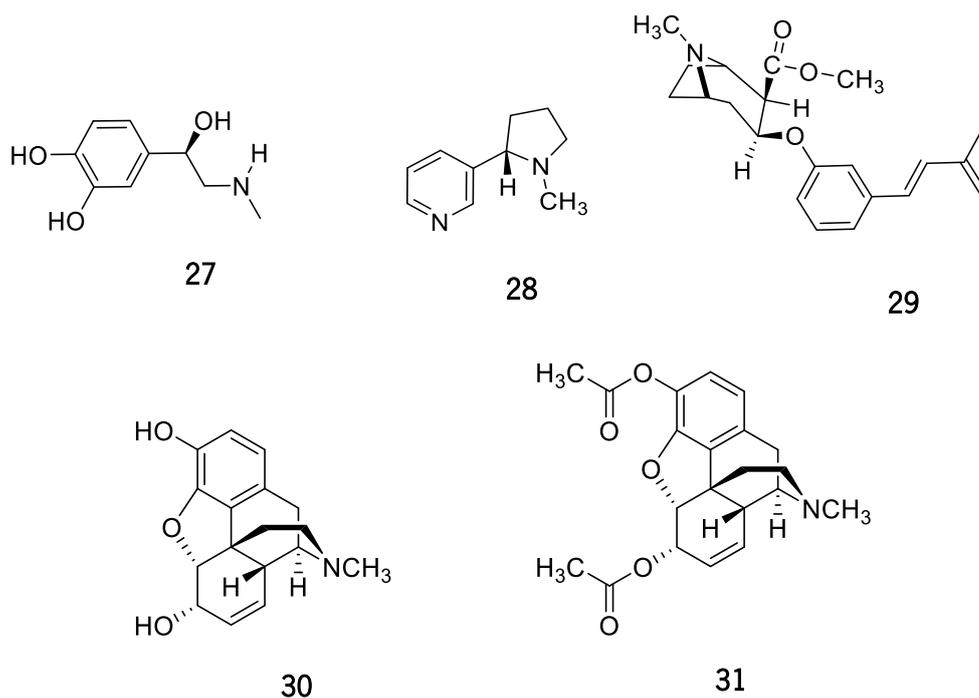
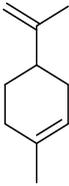
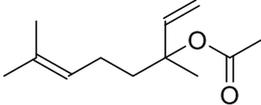
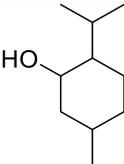
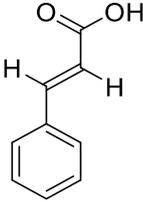
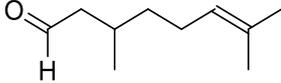
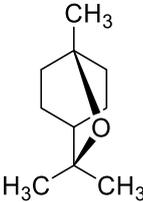
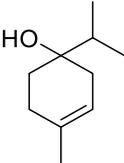


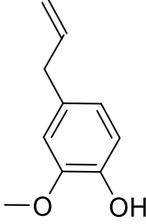
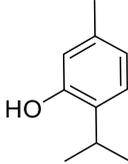
Figura 5 – Exemplos de compostos alcalóides.

2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (O.E.) e/ou essências, são misturas complexas de múltiplos compostos voláteis, com propriedades odoríferas.⁴ Os O.E. fornecem a essência, sabor ou aroma da planta, podendo ser extraídos por diversas técnicas, em particular hidrodestilação e destilação por arraste de vapor.⁴ A composição química é complexa, sendo constituídas por muitos compostos em diferentes concentrações, apresentando dois ou três componentes principais.⁴ A composição dos óleos geralmente é obtida por recurso às técnicas de cromatografia gasosa (C.G) e espectrometria de massa.⁴ Atividade biológica dos óleos essenciais é vasta destacando-se a atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica), antiviral, analgésica, anti-inflamatória e propriedades hepatoprotectoras.⁴ Atualmente, comprova-se que os óleos essenciais podem ter um efeito no combate de insetos e/ou outros animais prejudiciais para os cultivos, e é usado como “um pesticida verde” ajudando a salvaguardar a saúde humana e reduzindo a degradação e/ou desgaste dos solos com inúmeros produtos químicos.^{6,7} Os O.E. podem também ser usado a nível ambiental evitando a acumulação de resíduos nos solos e nos lençóis de água.^{6,7} Na tabela 3, temos as classes dos principais constituintes dos óleos essenciais e exemplos de fármacos aromáticos inscritos na farmacopeia portuguesa 9 (F.P. 9) correspondendo ao respetivo composto químico predominante de cada um.

Tabela 3 – Classe dos principais constituintes dos óleos essenciais e exemplos de fármacos aromáticos e o composto químico predominante de cada fármaco.

Classe dos principais constituintes	Fármaco aromático inscrito na F.P. 9	Composto químico predominante	Nome
Hidrocarbonetos	Óleo essencial de limão		Limoneno 16
	Óleo essencial de terebintina		Alfa-pineno 32
Álcoois e ésteres	Óleo essencial de alfazema		Acetato de linalilo 33
	Hortelã-pimenta		Mentol 34
Aldeídos e cetonas	Óleo essencial de caneleira		Ácido cinâmico 35
	Erva-cidreira		Citronelal 36
1,8-cineol	Óleo essencial de eucalipto		1,8- Cineol 37
	Óleo essencial de melaleuca		Terpineno-4-ol 38

Fenóis e éteres fenólicos	Óleo essencial de cravinho		Eugenol 39
	Óleo essencial de tomilho		Timol 40

2.4. ESPÉCIES DE PLANTAS

O critério de seleção para escolha destas espécies foi baseado na localização onde se encontram inseridas (Norte de Portugal) e/ou falta de informação científica das mesmas. As espécies utilizadas foram *Prunus lusitanica* L., *Mentha suaveolens* Ehrh, *Camellia japonica* L., *Ulex europaeus* L., *Phytolacca americana* L., *Chelidonium majus* L., *Tagetes patula* L., *Ruta graveolens* L., *Punica granatum* L., e *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb. Foi também selecionado a *Ginkgo biloba* L., por ser uma espécie rica em compostos bioativos, nomeadamente os ácidos ginkgólicos.

2.4.1. *Prunus lusitanica* L.



Espécie: *Prunus lusitanica* L.

Nome comum: Azereiro

Família: Rosaceae

Usos medicinais: estimula a respiração, melhora a digestão e dá uma sensação de bem-estar.⁸

 **Advertências:** não é especificamente desta espécie, mas esta família produz cianeto de hidrogénio, o que pode ser tóxico em elevadas quantidades e é produzido nas folhas e nas sementes. O excesso pode levar a sintomas como insuficiência respiratória ou morte.⁸

Figura 6 – Características da espécie *Prunus lusitanica* L.

Designada como o loureiro de Portugal e pode ser encontrada em Portugal continental e ilhas, Espanha, ilhas Canárias havendo também alguns registos da existência em Marrocos.^{9,10} Necessita de humidade no solo para se reproduzir sexualmente distribuindo-se perto de riachos e/ou lagos.¹⁰ Atualmente, devido a ameaças ecológicas e antropogénicas, esta espécie está listada como espécie vulnerável e/ou ameaçada tendo sido tomadas medidas de proteção pelo ministério do meio ambiente Espanhol e Regional das ilhas Canárias.¹⁰ Os maiores constituintes químicos de *Prunus lusitanica* L., são maioritariamente, terpenos e ácidos fenólicos, como ácido ursólico **41**, ácido caféico **5b**, ácido *p*-hidroxibenzóico **1**, ácido protocatecuico **42**, Álcool 3,4-di-hidroxibenzílico **43**, ácido vanílico **44** e “vanilloylcalleryanin” **45**.^{9,11,12} Esta espécie revela atividade anti-inflamatória e atividade anti proliferativa.¹³

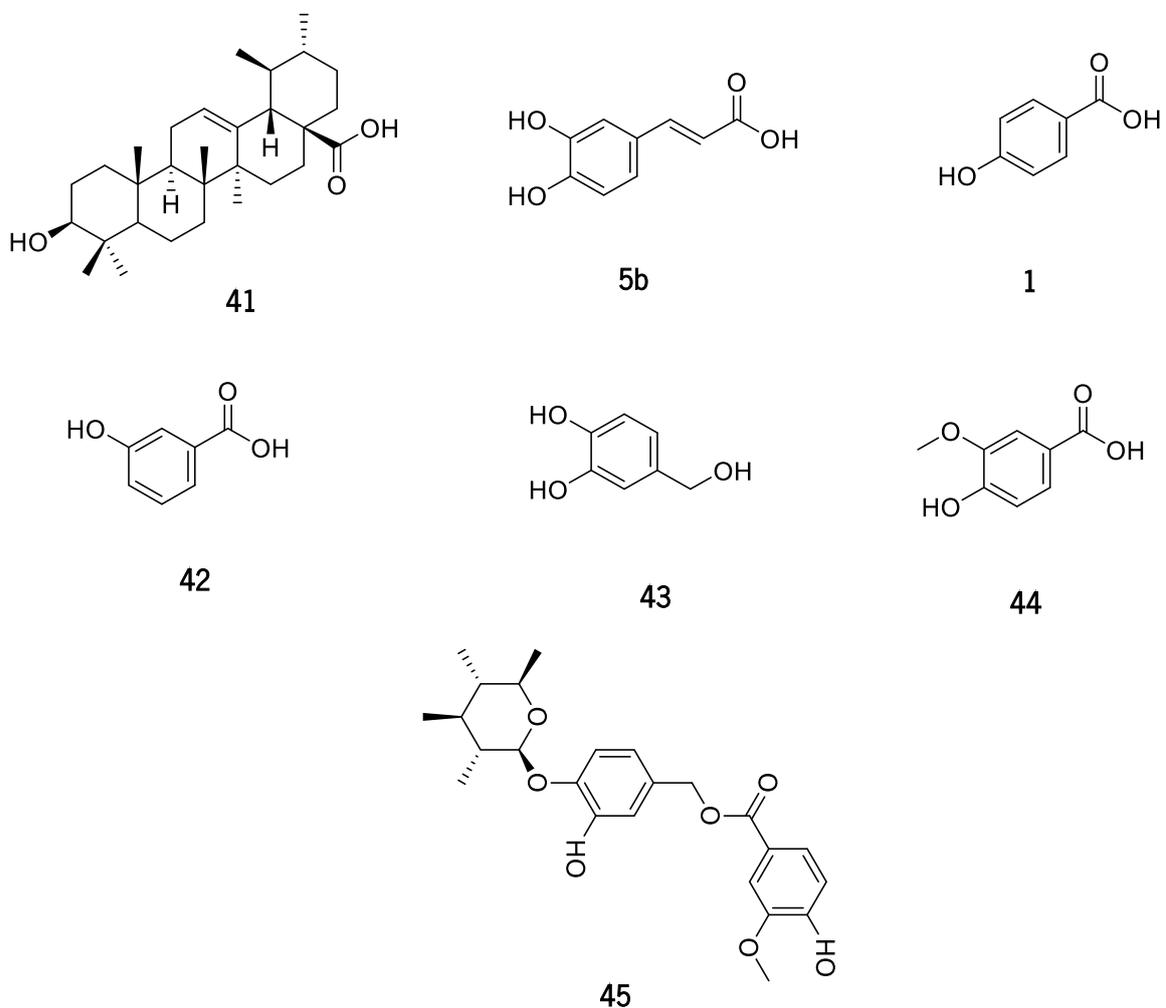


Figura 7 – Principais constituintes da espécie *Prunus lusitanica* L.

2.4.2. *Mentha suaveolens* Ehrh.



Espécie: *Mentha suaveolens* Ehrh.

Nome comum: Mentrastos

Família: Lamiaceae

Usos medicinais: a infusão pode ser usada para o tratamento de febres, dores de cabeça e distúrbios digestivos. O óleo essencial é antisséptico.¹⁴

⚠ Advertências: em grandes doses, esta planta pode ser abortiva e tóxica para o ser humano.¹⁴

Figura 8 – Características da espécie *Mentha suaveolens* Ehrh.

Conhecida como hortelã-maçã, é uma erva herbácea com 100 cm de altura, sendo a sua origem na Europa Sul e Central, mas também se encontra distribuída no Norte da Europa. Esta espécie encontra-se em locais húmidos, como lagos e riachos.¹⁵ As diversas espécies de menta são distinguidas devido as suas propriedades medicinais e de aromoterapia e segundo diversos escrivas, os ancestrais romanos, gregos e egípcios usavam-na como condimento e medicamento e os seus óleos essenciais como perfumes. Atualmente, ainda é usada para tratamento de doenças tais como reumatismo, disenteria, dispepsia, alergias de pele, calafrios, icterícia, infeções na garganta, constipação, espasmos, pedras na bexiga, pedras na vesícula, diarreia, dor de dentes, dores de estômago, dispneia, gastrodinia, diaforético, diurético, tónico estomacal, anti-infeccioso, sedativo, repelente de insetos, antimicrobacteriano, antifúngico, antialérgico, viricida, radioprotetor, anti-inflamatórios e hemostáticos.^{15,16} Os óleos essenciais apresentam diversos constituintes químicos, entre os quais se destacam óxidos (óxido de piperitona **46** e óxido de piperitenona **47**), álcoois (mentol **36**) e cetonas (pulegona **48**, piperitenona **49** e carvona **50**) representados na figura 9.¹⁵⁻¹⁷

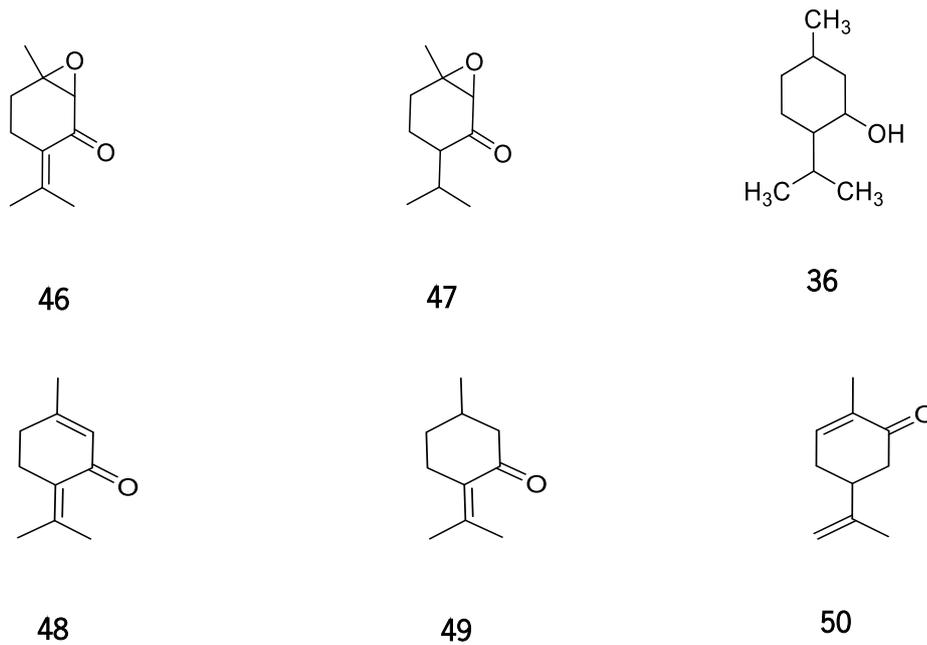


Figura 9 – Composição do óleo essencial de *Mentha suaveolens* Ehrh.

Esta espécie apresenta diversas atividades biológicas tais como atividade antimicrobial, inseticida, analgésica e anti-inflamatória, citotóxica, capacidade de inibição da acetilcolinesterase e propriedades antioxidantes.¹⁵⁻¹⁸ Na atividade inseticida, comprovou-se que o óleo essencial de *Mentha suaveolens* Ehrh., contém atividade larvicida, devido ao seu constituinte maioritário, o óxido de piperitenona mostrando-se eficaz na espécie *culex pipiens* com $LD_{50}=47,88$ mg/l.¹⁷

2.4.3. *Camellia japonica* L.



Espécie: *Camellia japonica* L.

Nome comum: Japoneira

Família: Theaceae

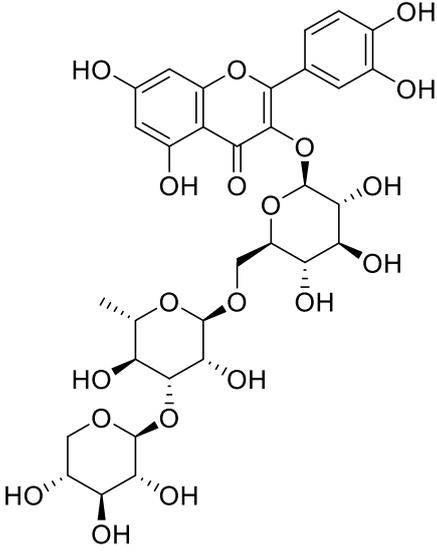
Usos medicinais: as flores apresentam propriedades adstringentes, hemostáticas, salivares e tónicas e misturados com óleo de gergelim podem ser usadas para o tratamento de queimaduras. A planta demonstra atividade anticancerígena.¹⁹

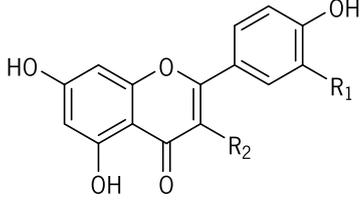
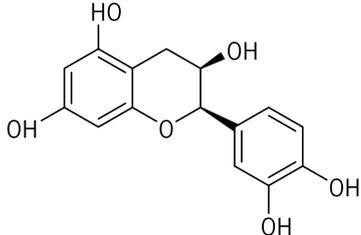
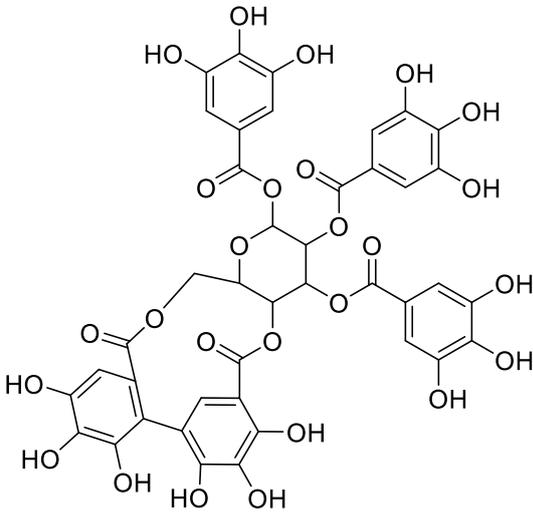
⚠ Advertências: não são identificadas contraindicações para o uso desta planta.¹⁹

Figura 10 – Características da espécie *Camellia japonica* L.

Nativa da Coreia do Sul, Japão e China apresenta uma enorme importância na cultura oriental utilizando para tratamentos de doenças estomacais, sangramentos e inflamações através da medicina tradicional.²⁰⁻²² Os constituintes químicos presentes nesta espécie são, na maioria, triterpenos, saponinas, flavonóides glicosilados e taninos, que apresentam atividades biológicas como antioxidante, antifúngica, antiviral e potencial citotóxico. Nas folhas estão presentes os seguintes constituintes, Camellianoside **51**, Quercetina **52a**, Apigenina **52b**, “Kaempferol” **52c**, Rutina **52d**, Quercetrina **52e**, Hiperosida **52f**, Isoquercetrina **52g**, (-) Epicatequina **53**, “Tellimagrandin II” **54**, Strictinina **55**, 1, 2, 3, 4, 6-penta-O-galloyl- β -D-glucose **56**, “Pedunculagin” **57**, Heterofilina A **58** e Cameliatanino H **59**. Na tabela 4, mostram-se as estruturas químicas mencionadas anteriormente e respectiva classificação pelo seu grupo fitoquímico e a atividade biológica.²⁰⁻²⁹

Tabela 4 - Composição química mais abundantes encontradas nas folhas de *Camellia japonica* L. e as suas atividades biológicas.

Grupo fitoquímico	Atividade biológica	Estrutura química
Flavonol glicosilado	Atividade antioxidante ²⁰	 <p style="text-align: center;">51</p>

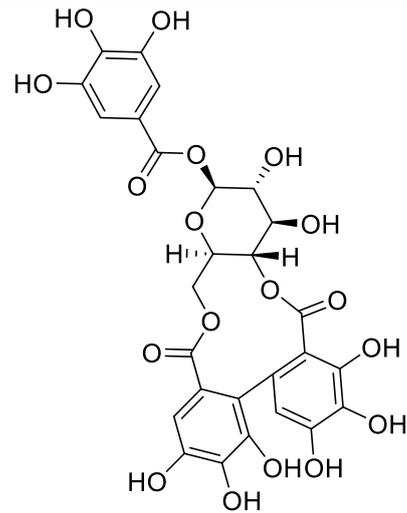
<p>Compostos fenólicos</p>	<p>Atividade antioxidante²⁰</p> <p>Potencial antiradical²¹</p>	 <p style="text-align: center;">52</p> <p>a R₁=OH; R₂=OH (Quercetina) b R₁=R₂ = H (Apigenina) c R₁=H; R₂=OH (Kaempferol) d R₁=OH; R₂=OGlu-Ramn (Rutina) e R₁=OH; R₂=ORamn (Quercetrina) f R₁=OH; R₂=OGal (Hiperosida) g R₁=OH; R₂=OGlu (Isoquercetrina)</p>
<p>Catequinas</p>	<p>Atividade antioxidante²⁴</p>	 <p style="text-align: center;">53</p>
<p>Taninos</p>	<p>Atividade microbial²⁵</p> <p>Atividade antifúngica²⁵</p>	 <p style="text-align: center;">54</p>

Taninos

Atividade antibacteriana ²⁶

Efeito laxante ²⁶

Atividade antiviral ²⁶

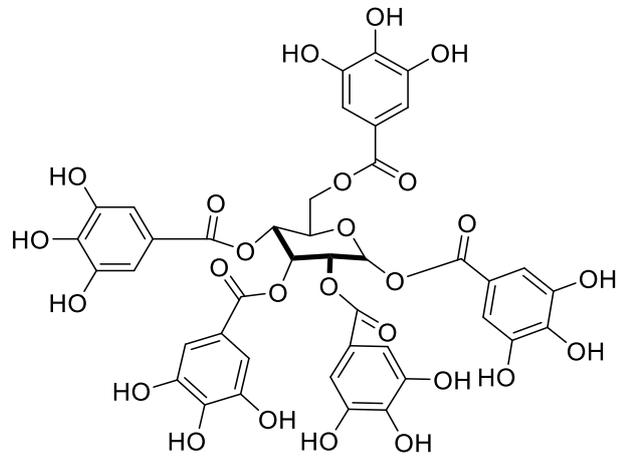


55

Taninos

Atividade anticolinesterásica ²⁷

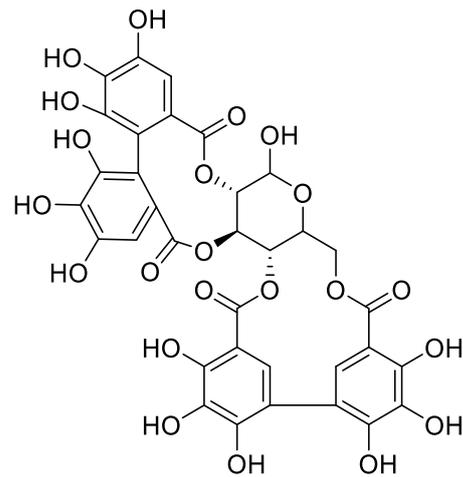
Atividade antioxidante ²⁷



56

Taninos

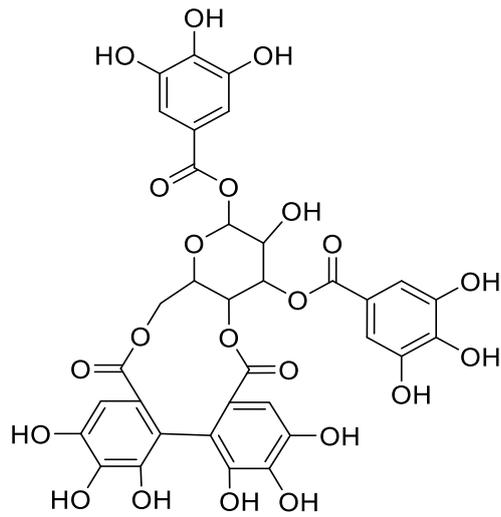
Atividade antitumoral ²⁴



57

Taninos

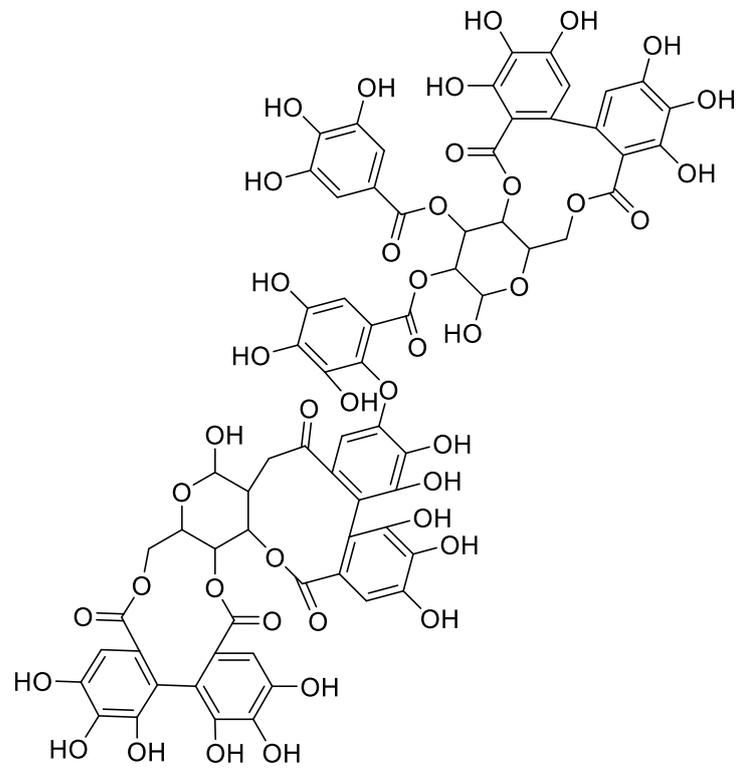
Atividade antiviral²⁸



58

Taninos

Atividade antiviral²⁹



59

2.4.4. *Ulex europaeus* L.

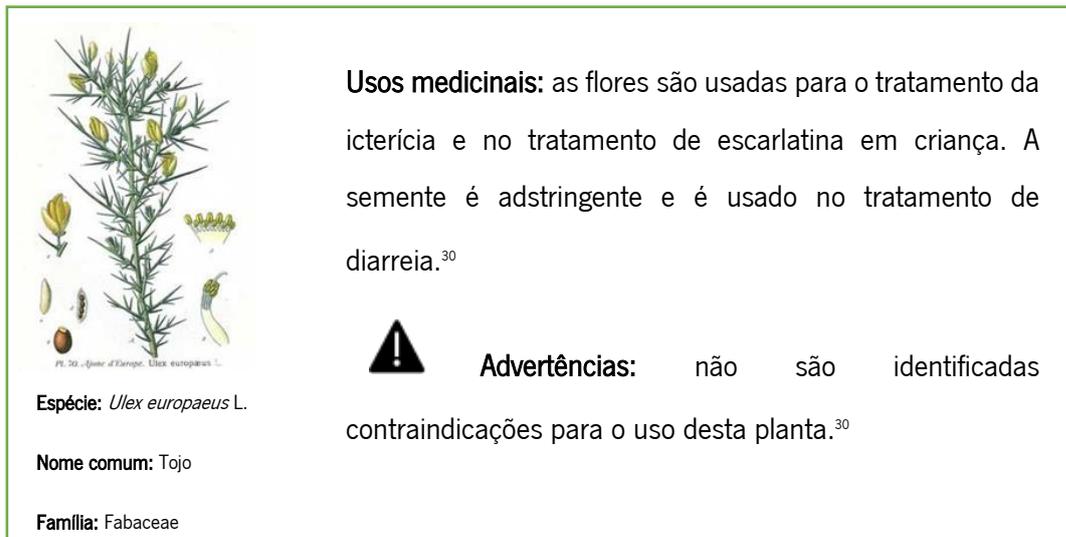


Figura 11– Características da espécie *Ulex europaeus* L.

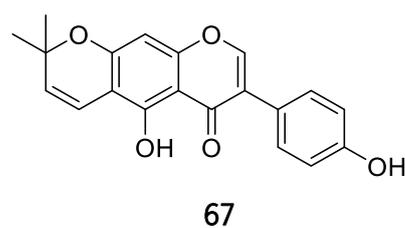
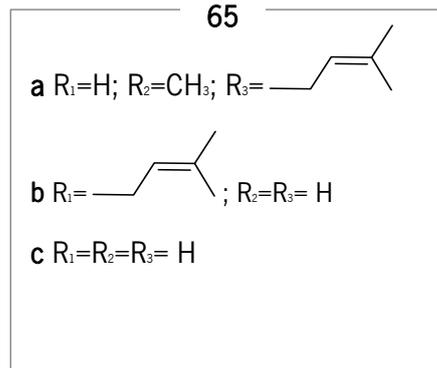
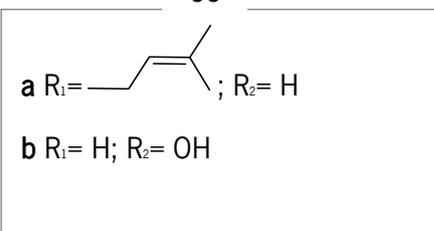
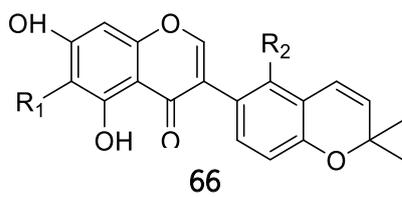
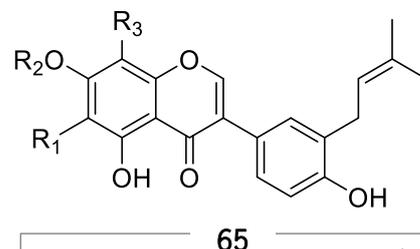
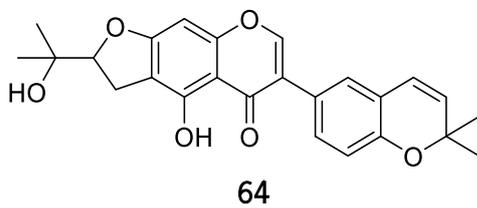
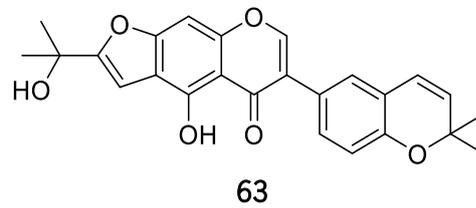
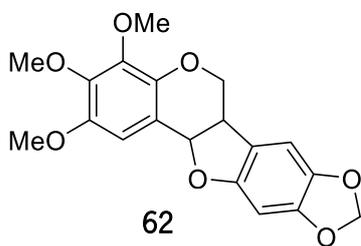
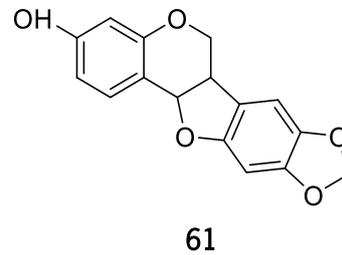
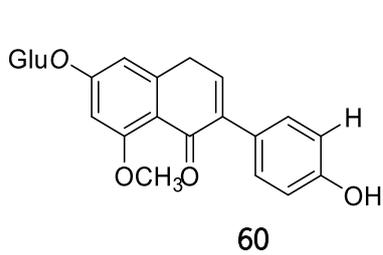
A espécie *Ulex* L. está bastante presente em Portugal, existindo mais de dez subespécies espalhadas por Portugal continental e ilhas. Foi introduzida no país pela primeira vez no século XIX, na ilha da Madeira e atualmente tornou-se numa espécie invasora.³¹⁻³³ *Ulex* L. floresce todo o ano e as suas flores são vendidas em seco nas ervanárias para tratamentos de doenças do fígado, diabetes, asma e hipertensão (figura 12).^{31,33}

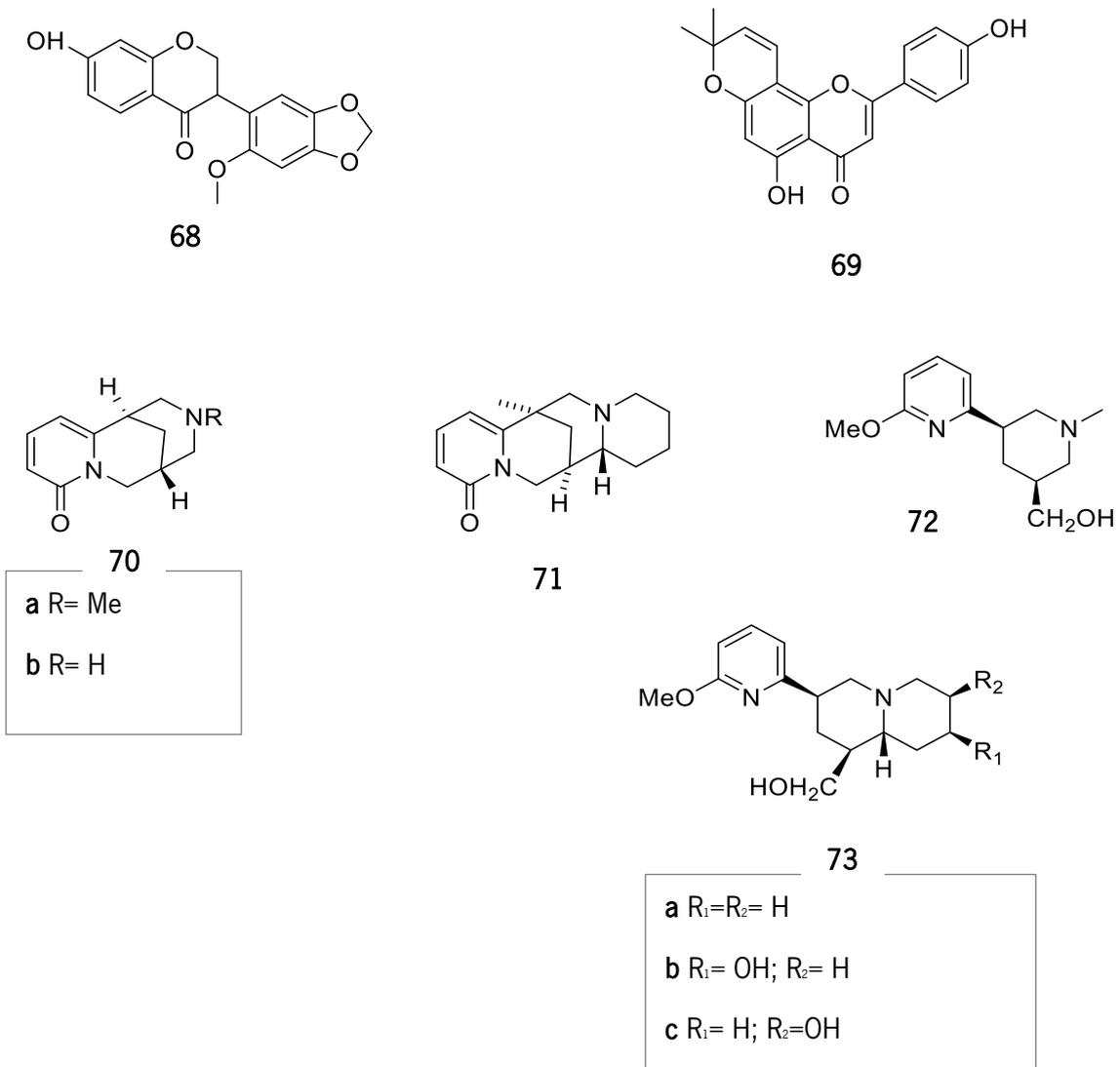


Figura 12 – *Ulex europaeus* L.

Reportada como uma boa fonte de flavonóides (isoflavonóides e pterocarpans) e alcalóides, entre os quais se destacam 5-O-metilgenisteína 7-O- β -D-glucopiranosídeo **60** (atividade antiviral), 2-hidroxi-4-metoxipterocarrino **61**, “maackiain” **62**, ulexina C **63**, ulexina D **64**, 7-O-metilisolupalbigenina **65a**, lupalbigenina **65b**, “isowighteone” **65c**, isochandalone **66a**, licoisoflavo

na B **66b**, alpinumisoflavona **67**, onogenina **68**, atalantoflavona **69**, (atividade antifúngica), N-metilcitisina **70a**, citisina **70b**, anagirina **71** e “jussiaeiines” A **72**, B **73a**, C **73b** e D **73c** (figura 13).³¹⁻³⁵




 Figura 13- Compostos maioritários de *Ulex europaeus* L.

Os compostos orgânicos voláteis provenientes dos ramos floridos e das flores do tojo demonstram comportamentos herbicidas em duas espécies invasoras, *Amaranthus retroflexus* e *Digitaria sanguinalis*. Verifica-se que no caso de *A. retroflexus* houve uma variação de inibição de 40% no comprimento da raiz e 30% na parte aérea da planta; no caso de *D. Sanguinalis* somente o comprimento das raízes foi reduzido em 45%. Através da cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/EM), foram identificados monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos oxigenados, compostos aromáticos e compostos alifáticos (tabela 5).³

Tabela 5 – Compostos orgânicos voláteis presentes nas diferentes partes da planta e o rendimento total de extrato (%) identificados através de CG e CG/EM.

Compostos	Parte da planta	Rendimento do extrato (%)
Isomentone	Ramos floridos	0,32
<i>E</i> -nerolidol	Ramos floridos	0,45
	Flores	0,70
6,10,14-trimetilpentadecanona	Ramos floridos	0,52
	Flores	0,74
Fitol	Ramos floridos	1,85
	Flores	0,92
Theaspirane A e B	Ramos floridos	0,24 e 0,30
Eugenol	Ramos floridos	0,21
Nonanal	Ramos floridos	0,29
1-octen-3-ol	Ramos floridos	3,37
	Flores	0,91
<i>n</i> -heneicosane	Ramos floridos	2,46
	Flores	3,06
<i>n</i> -docosane	Ramos floridos	0,58
	Flores	1,28
<i>n</i> -tricosane	Ramos floridos	21,29
	Flores	30,01
<i>n</i> -tetracosane	Ramos floridos	2,50
	Flores	3,99
Ácido láurico	Ramos floridos	1,57
	Flores	1,10
<i>n</i> -pentacosane	Ramos floridos	12,80
<i>n</i> -hexacosano	Ramos floridos	16,81
Ácido mirístico	Ramos floridos	3,62
	Flores	8,82
Ácido palmítico	Ramos floridos	13,25
	Flores	12,59

2.4.5. *Phytolacca americana* L.

Espécie: *Phytolacca americana* L.

Nome comum: Erva-tintureira

Família: Phytolaccaceae

Usos medicinais: a raiz é anódina, anti-inflamatória, catártica, expetorante, narcótica e purgativa, sendo que seca é usada como anti-inflamatório e fresca como cataplasma em contusões e dores reumáticas. O fruto tem propriedades semelhantes à raiz em que o sumo da baga é usado para o tratamento de cancro, hemorroidas e tremores. As folhas são catárticas, eméticas e expetorantes.³⁷



Advertências: as sementes, raiz e folhas apresentam toxicidade. A seiva da planta pode causar dermatites em peles sensíveis. Apresenta substâncias que causam divisão celular, podendo danificar os cromossomas, aconselha-se que o manuseamento da planta seja feito com luvas para evitar contacto com a pele. Não aconselhável para grávidas.³⁷

Figura 14 – Características da espécie *Phytolacca americana* L.

Phytolacca americana L. é também conhecida com erva-tintureira devido à coloração intensa vermelha que as bagas contêm. É uma espécie originária da América do Norte, mas atualmente está distribuída pelo resto do mundo, sendo considerada pela União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) como uma planta invasora.³⁸ Esta espécie é usada em tratamento de tumores, regeneração de tecidos ósseos e moles e em tratamentos de amigdalites. Apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.³⁸⁻⁴³ Os compostos fitoquímicos presentes dependem da parte da planta; na raiz salienta-se a presença de saponinas e glicoproteínas, na folha compostos fenólicos e nas bagas compostos fenólicos, taninos e betalainas. Na figura 15 estão representados alguns constituintes de betalainas (betanidina **74**), lignanas (americanol A **75**), compostos fenólicos (ácido gentísico **76**) e saponinas (α -spinasterol **77** e ácido gentísico **78**), presentes na figura 15.³⁸⁻⁴³

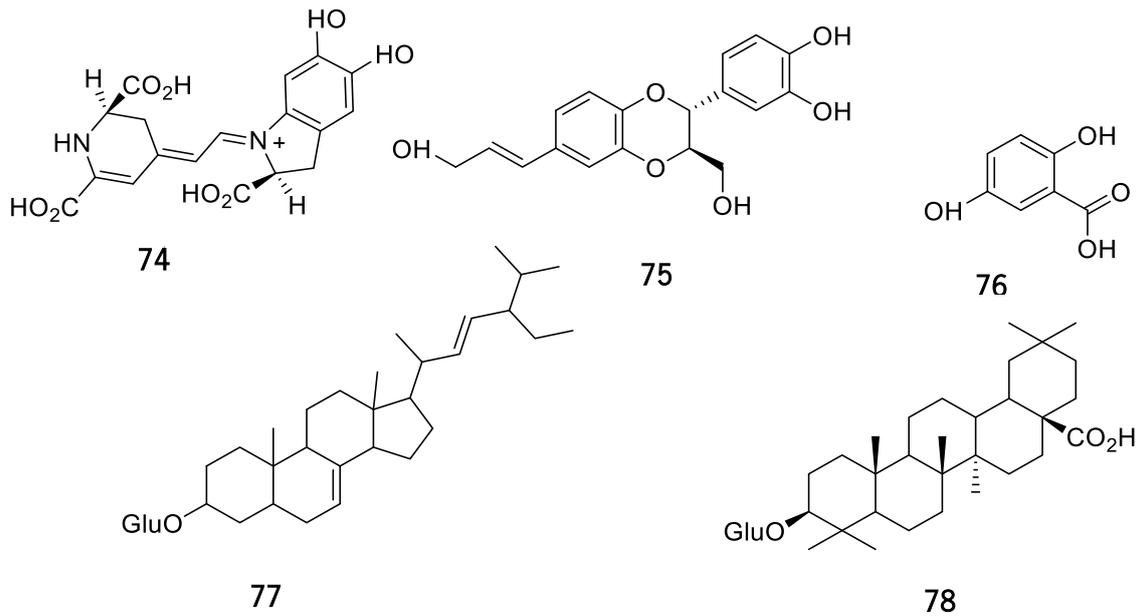


Figura 15 – Principais constituintes de *Phytolacca americana* L.

2.4.6. *Chelidonium majus* L.



Usos medicinais: antigamente esta planta era usada como oftálmica, na limpeza dos olhos e o látex no uso externo em verrugas. Sabe-se atualmente, que o latex e as folhas apresentam diversas propriedades como anódinas, antiespasmódicas, cáusticas, colagogas, diaforéticas, diuréticas, narcóticas, purgativas, anticancerígenas e analgésica sendo estas usadas para o tratamento de bronquite, coqueluche, asma, icterícia, cálculos biliares e dores na vesícula biliar.⁴⁴

Espécie: *Chelidonia majus* L.

Nome comum: Ceruda

Família: Papaveraceae



Advertências: o látex, em doses pequenas provoca alergias e em doses elevadas, sonolência, irritação no trato respiratório e na pele, dispneia, úlceras, sensação de ardor na boca, náuseas e vômitos. Não é recomendado para pessoas com doenças hepáticas, grávidas e crianças menores de 12 anos.⁴⁴

Figura 16 – Características da espécie *Chelidonium majus* L.

Conhecida também como Quelidónia-maior, é uma planta herbácea perene com uma altura entre 30-120 cm, folhas largas e flores amarelas.^{45,46} Distribuída pela Europa, Asia, Noroeste de Africa e América do Norte e era usada na medicina tradicional principalmente as folhas no tratamento de doenças do fígado e do trato gastrointestinal.⁴⁵⁻⁴⁹ Vasylnovytskyi, um químico Ucrainiano, produziu “Ukrain” em 1978, um medicamento alternativo para o tratamento de cancro baseado no quelidónio e afirmando ser uma resposta para o tratamento de todos de cancros, doenças induzidas pela radiação e sida. Este medicamento, está inserido no sistema de saúde da Ucrânia, mas ainda não é aceite por toda a comunidade científica impedindo a comercialização no resto do mundo.⁴⁶ Os metabolitos secundários são maioritariamente alcalóides de benzilisoquinolinas, como benzofenantridinas (queleritrina **79**, quelidonina **80**, sanguinarina **81** e isocelidonina **82**), protoberberinas (berberina **83**, coptisina **84** e estilopina **85**) e protopinas (protopina **86**), figura 17.⁴⁵⁻⁴⁹

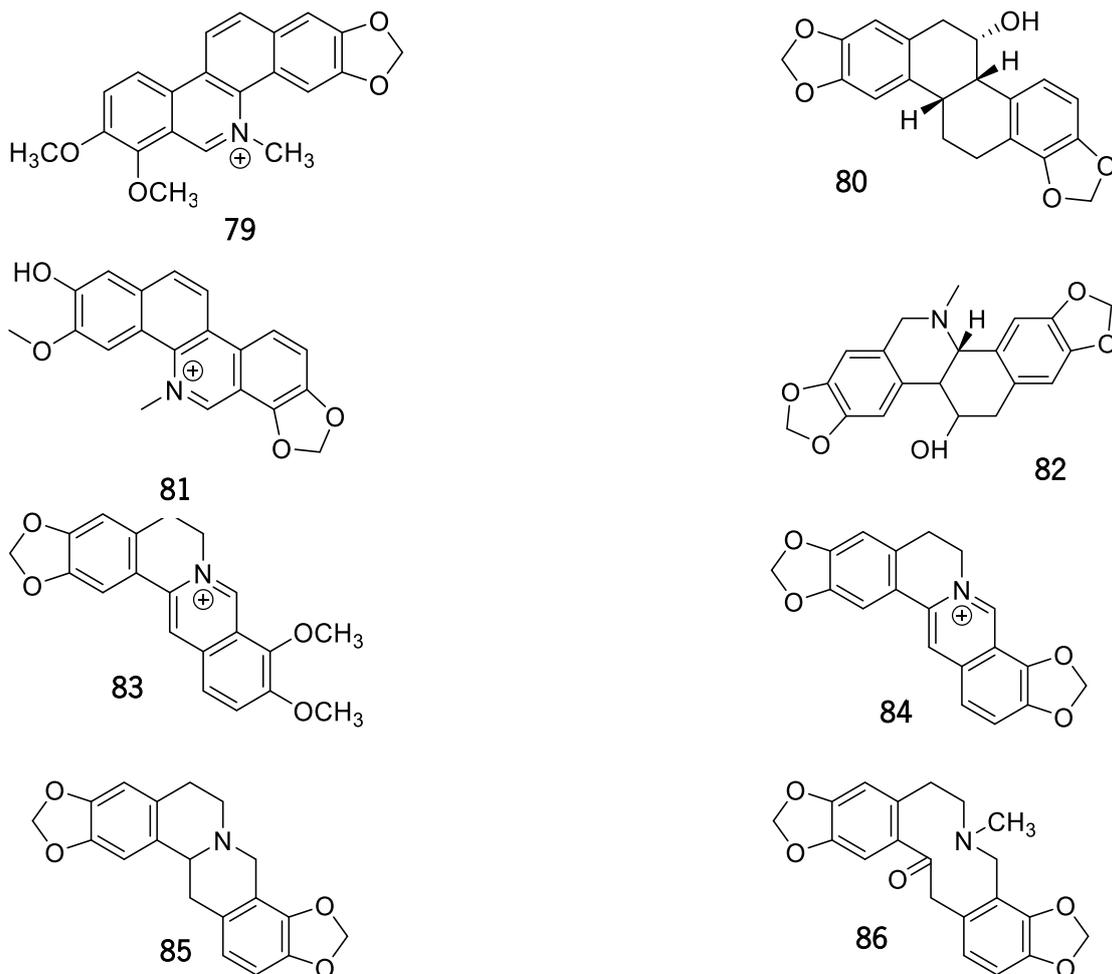


Figura 17 – Alcalóides de benzilisoquinolinas maioritarios da *Chelidonium majus* L.

As atividades biológicas características desta espécie são atividade anticancerígena e tumoral, microbial, antioxidante, apoptogênico e proapoptótico, propriedades imunomodulador, efeito antimitótico, atividade anti-inflamatória e analgésica, antiasmática e propriedades inseticidas.⁴⁵⁻⁴⁹

No caso das propriedades inseticidas, através de estudo intitulado como “larvicidal activity and insecticidal mechanism of *Chelidonium majus* on *Lymantria díspar*” publicado na revista “Pesticide Biochemistry and Physiology” é sugerido que os componentes de *Chelidonium majus* L., podem ter influência nos insetos reduzindo a ingestão de alimentos e diminuindo a expressão de mRNAs dos genes da enzima, podendo ser uma resposta para o combate contra insetos e pragas de uma maneira ecológica.⁴⁹

2.4.7. *Tagetes patula* L.



Espécie: *Tagetes patula* L.

Nome comum: Cravo-de-França

Família: Asteraceae



Advertências: não são identificadas contra-indicações para o uso desta planta.⁵⁰

Usos medicinais: a planta é aromática apresentando propriedades digestivas, diuréticas e sedativas. Pode ser usada externamente (tratamento olhos doloridos e reumatismos) e internamente (indigestão, cólica, constipação grave, tosse e disenteria).⁵⁰

Figura 18 – Características da espécie *Tagetes patula* L.

Cravo-de-França é uma planta oriunda do México, aproximadamente 40 cm e crescem acima do nível do mar 1500-2500 m^{51,52}. Em particular, as flores são conhecidas pelas suas propriedades antimicrobial, antissépticas, diuréticas, hepatoprotetoras, pesticidas, nematicidas e repelente de moscas⁵²⁻⁵⁴. Os constituintes maioritários das flores são flavonóides (figura 19), como quercetina **52a**, quercetagina **87**, patuletina **88**, quercetina-3-glicosídeo **89**, quercetagina-7-glicosídeo **90**, quercetagina-3,7-diglicosídeo **91** e luteína **92**⁵²⁻⁵⁵.

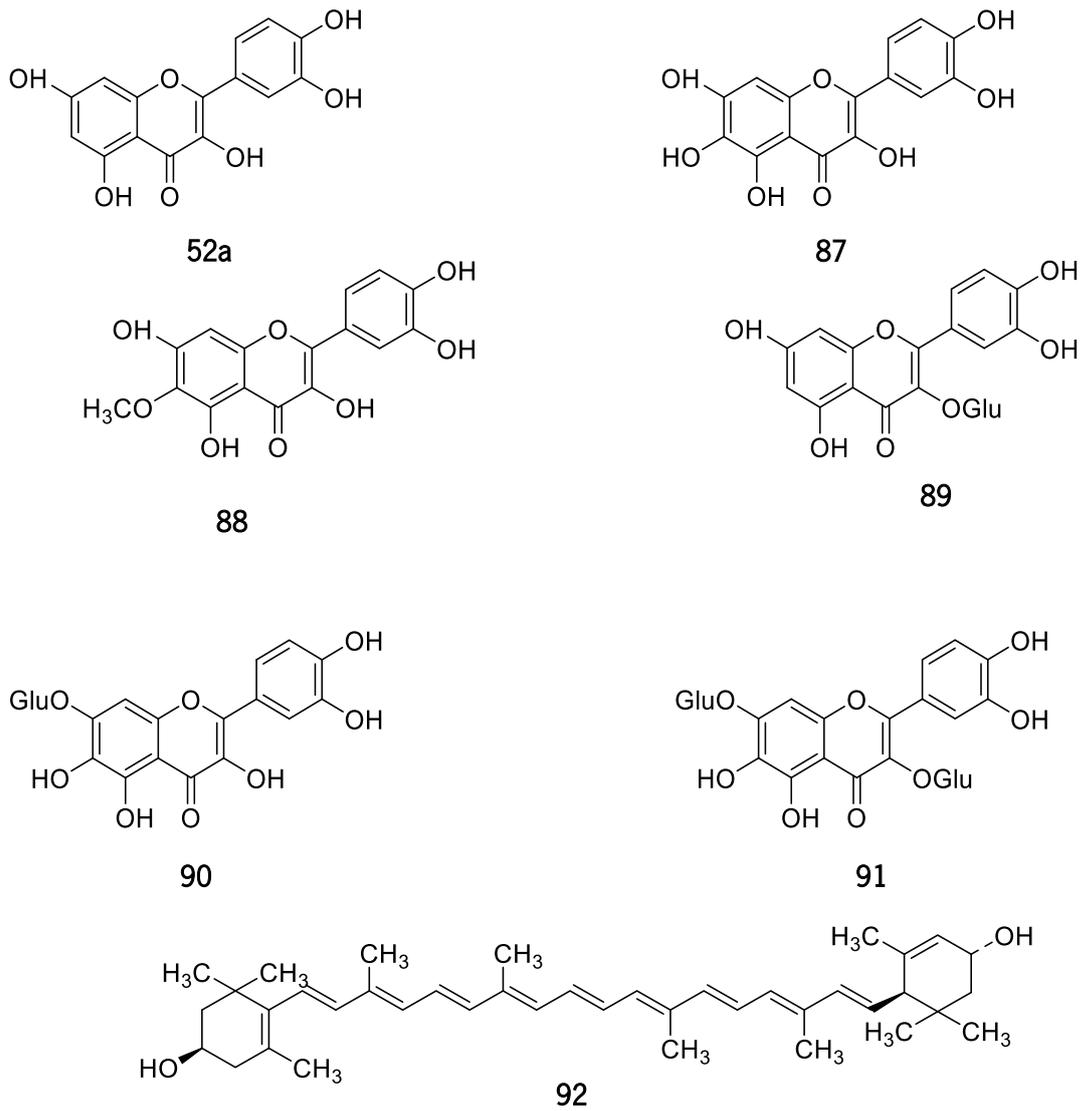


Figura 19 – Flavonóides presentes nas flores de *Tagetes patula* L.

Os compostos químicos dos óleos essenciais da *Tagete patula* L. (tabela 6), têm mostrado grande atividade no combate aos organismos vivos prejudiciais, apresentando ter propriedades antibacterianas e antifúngicas (esquema 2) ^{56,57}.

Tabela 6 – Componentes dos óleos essenciais das diferentes partes da planta da espécie *Tagetes patula* L.

Componentes químicos	Parte Aérea	Capítulo	Folhas
(<i>E</i>)- β -ocimeno	×	×	
di-hidrotagetona	×		
(<i>Z</i>)-tagetone	×		
(<i>Z</i>)- tagetonona	×	×	×
(<i>E</i>)- tagetonona	×	×	
(<i>E</i>)-tagetone	×		×
Limoneno	×		×
Germacreno B	×		
β -cariofileno	×	×	
Terpinoleno		×	×
Piperitona			×
Piperitenona		×	×

Tagetes ssp

Tagete patula L.

- *Sarcina lutea*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*
- *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *Micrococcus luteus*.

Tagete patula L. e *Tagete erecta* L.

- *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella enterica* ser. Typhi, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Salmonella enterica* ser. Aboni, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Bacillus circulans*, e *S. aureus*.

Esquema 2 – Atividade de *Tagete patula* L. e *Tagete erecta* L. contra organismos vivos.

2.4.8. *Ruta graveolens* L.


Usos medicinais: reduz a fraqueza capilar. A planta geral é abortiva, antelmíntica, antídoto, antiespasmódica, carminativa, emética, emenagoga, expetorante, hemostática, oftálmica, rubefaciente, fortemente estimulante, estomacal, uterotônica, anti-inflamatória e antiespasmódico. A infusão é usada no tratamento de afeções histéricas, tosses e flatulências. O óleo da planta pode ser usado para o tratamento de dores de ouvidos. No entanto a mastigação da folha, também traz benefícios aliviando tonturas, dores de cabeças repentinas e palpitações.⁵⁸

Espécie: *Ruta graveolens* L.

Nome comum: Arruda

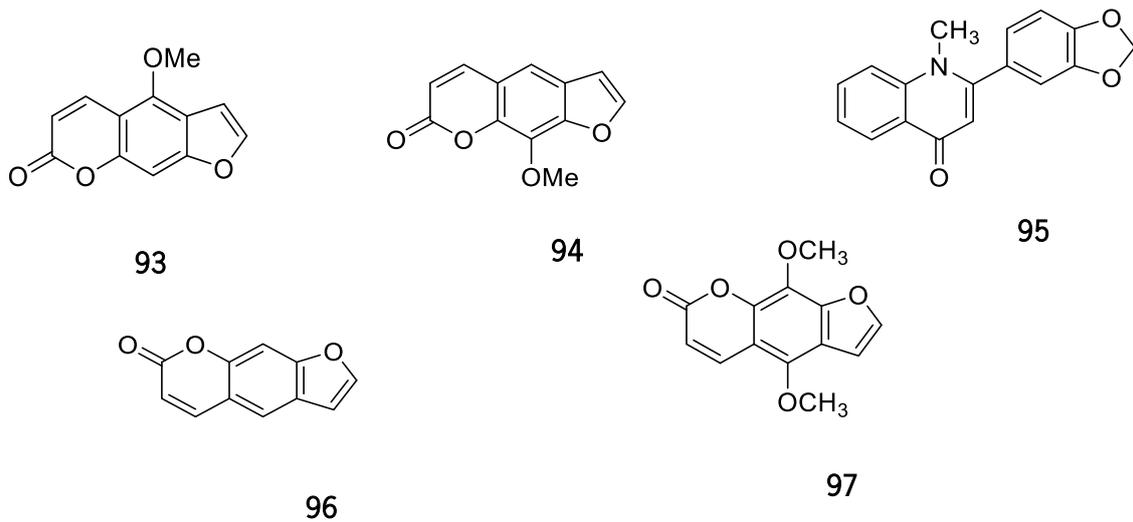
Família: Rutaceae

⚠️ Advertências: venososa em grandes quantidades. Não deve ser usada em grávidas, podendo induzir o aborto. A seiva pode causar bolhas ou dermatites em pessoas sensíveis.⁵⁸

Figura 20 – Características da espécie *Ruta graveolens* L.

A arruda é nativa da Europa do Sul e Norte de África, tendo diversas propriedades farmacológicas, como atividade antioxidantes, repelência a insetos, atividade larvicida, atividade antimicrobial, propriedades antiandrogénica, propriedades antidepressivas, atividades anti-hiperglicémica, propriedades anti-hiperlipidémicas, atividade anti-inflamatória, propriedades antitumorais estando estas associadas aos metabolitos presentes nesta espécie que são alcalóides, cumarinas, flavonóides e terpenóides⁵⁹.

As furanocumarinas têm ocorrência natural nas plantas e têm sido responsáveis pelas propriedades fotorreativas, também tem sido destacada pela sua atividade antimicrobial e antifúngica. As furanocumarinas presentes nesta espécie são xanthotoxina **93**, bergapten **94**, graveoline **95**, psoraleno **96** e isopimpinelim **97** (figura 21)^{60,62}.

Figura 21 – Furanocumarinas de *Ruta graveolens* L.

2.4.9. *Punica granatum* L.



Espécie: *Punica granatum* L.

Nome comum: Romã

Família: Punicaceae

Usos medicinais: uso externo para tratamento de corrimentos vaginais, feridas e infecções na boca e garganta. As flores podem ser usadas para a disenteria, dores de estômago e tosse; as sementes são demulcentes e estomacais e tanto as sementes como as folhas e o caule são usadas para expelir vermes. A fruta, para além de ser usado como refresco pode ser usado para o combate de febres, é cardíaco e estomacal. A casca seca é usada para o tratamento de disenteria amebiana, diarreia e também como remédio para combate de tênia. Apresenta propriedades como antibacteriana, antiviral e adstringente ⁶³.

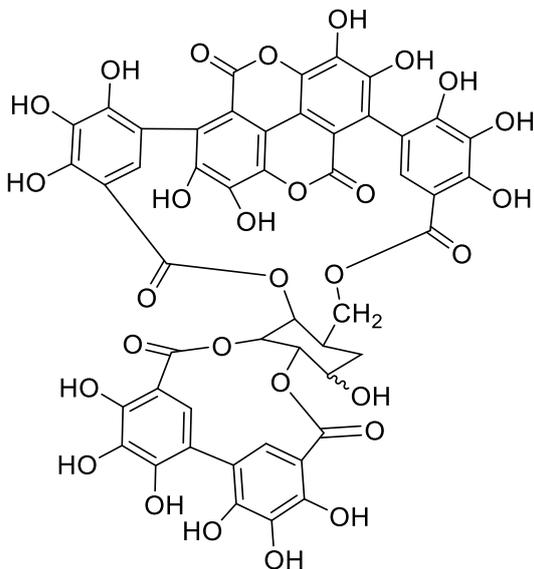
⚠ Advertências: sobredosagem no uso da casca, pode apresentar sintomas como irritação gástrica, vômitos, tontura, calafrios, distúrbios de visão, colapso e morte ⁶³.

Figura 22– Características da espécie *Punica granatum* L.

Os constituintes da casca de romã são utilizados nas diversas indústrias desde farmacêutica, alimentar e têxtil ⁶⁴. A casca da romã (figura 23) apresenta 26-40% do peso do fruto e contém diversos compostos químicos, como flavonóides (antocianinas, catequinas, entre outros), taninos hidrolisáveis e alcalóides (Figura 24). A pele de romã é estudada pelas suas atividades biológicas, das quais se destacam atividade inseticida, atividade antioxidante, propriedades antimicrobial e antibacterial, atividade anti-inflamatória, atividade anticancerígena (no cancro da pele, cancro do colon e próstata), atividade antiproliferativa, propriedades antitumorais, propriedades neuroprotetoras, propriedades cardioprotetoras, atividade antidiabéticas, atividade antimutagénica, atividade antifúngica, atividade antialérgica e propriedades antimalárica ⁶⁴⁻⁷³.

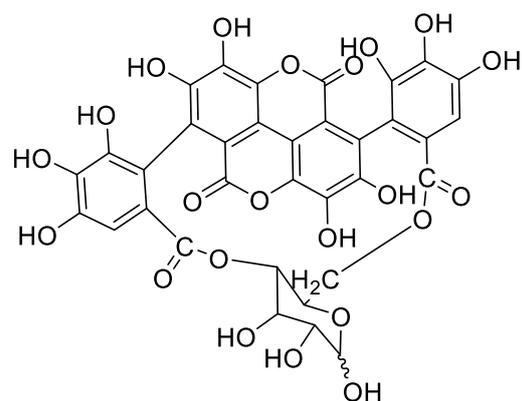


Figura 23 – Casca de romã seca e triturada com um tamanho de partículas de 900 µm.



Punicalagina

98



Punicalina

99

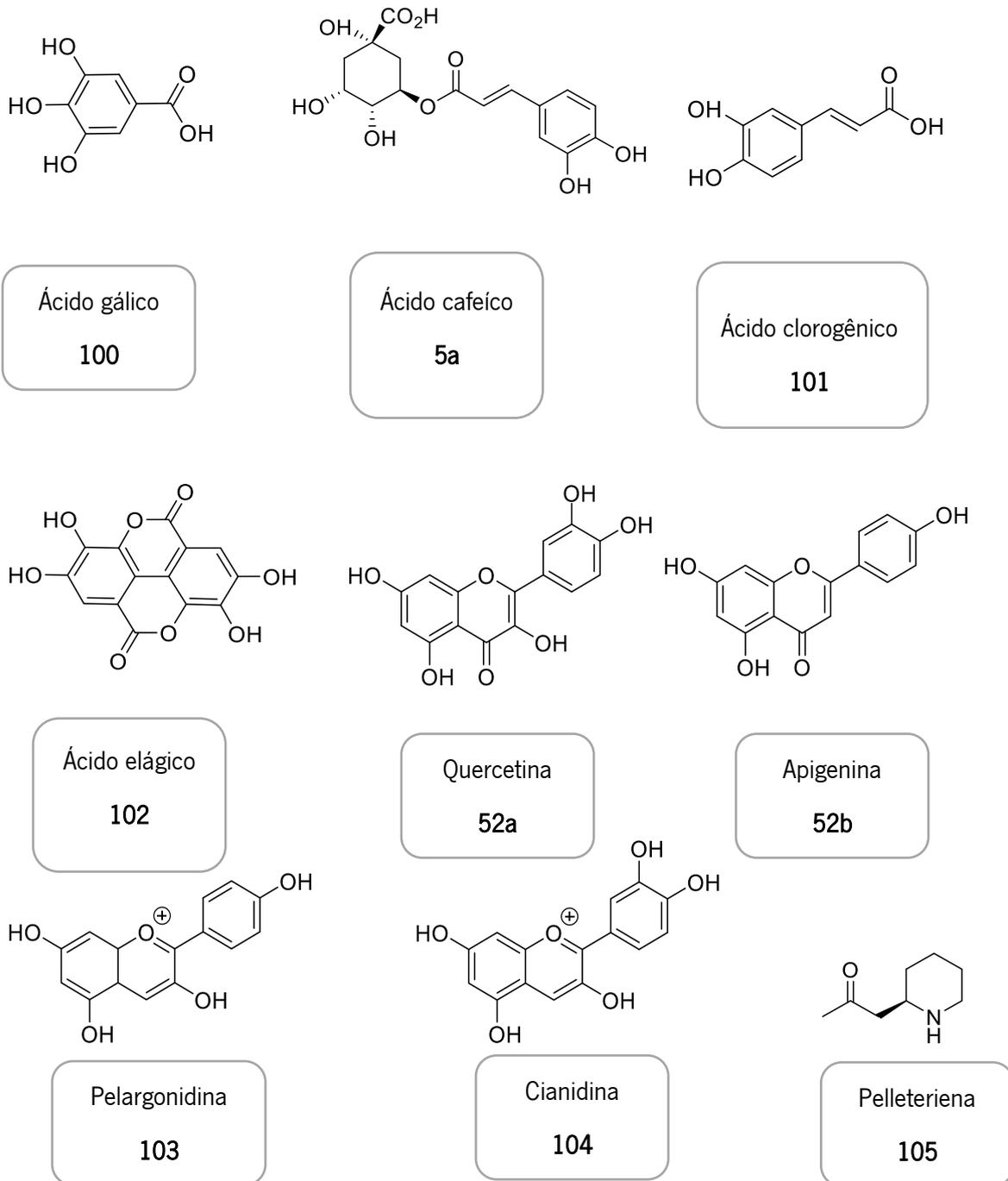


Figura 24 – Compostos maioritários da casca de romã.

Devido à presença de compostos bioativos, alguns constituintes da romã foram nanoencapsulados e usados em diversos sistemas de liberação de drogas como nanoemulsões, nanopartículas, nanolipossomas, fitossomas, nanovesículas e niossomas. Os estudos de encapsulação dos extratos de romã têm sido direcionados para linhas celular com o objetivo de ver o seu potencial antioxidante e anticancerígeno, revelando resultados bastante promissores.⁷⁴

2.4.10. *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb.

Familia: Boraginaceae

Esta espécie está distribuída pela Península Ibérica não se conhecendo a sua composição química em específico. Botanicamente, as folhas são oblongas e cobertas de pêlo e apresenta o nervo médio muito marcado; as flores agrupam-se em inflorescência definida de 6 a 14 flores ao longo do eixo principal e a carola é formada por 5 pétalas de cor azul intenso (figura 25).⁷⁵ Através de um estudo etnobotânico pelo parque natural da Arrábida e na Serra de S. Mamede, é conhecida o uso desta planta na medicina tradicional, principalmente as partes áreas (frescas ou secas), através de infusão ou decocção. Estão referidas na literatura, apresentam propriedades abortivas, hipercolesterolemia, antitussígenos, analgésico e protetor gástrico, antipirético, antipneumônio, dismenorreico, antidermatosico, sedativos e antirreumático e é usada para o combate de problemas sanguíneos, em frieiras, resfriados, doenças provenientes do mar, gripes e intoxicações.^{76,77}

Figura 25 – *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb.

2.4.11. *Ginkgo Biloba* L.

Espécie: *Ginkgo biloba* L.

Nome comum: Ginkgo

Família: Ginkgoaceae

Usos medicinais: as folhas estimulam a circulação sanguínea e têm um efeito tônico para o cérebro, melhorando a memória, proporcionando uma sensação de bem-estar e a circulação arterial periférica melhora. As folhas contêm ginkgolides que são usadas para inibição de alergias e para o tratamento de doenças como asma, distúrbios oculares e senilidade. A fruta apresenta propriedades como antibacteriana, antifúngica, adstringente, cancerígena, digestiva, expetorante, sedativa e vermífuga; a polpa da fruta após a maceração é utilizada para o tratamento de doenças do foro respiratório. As sementes cruas têm propriedades anticancerígenas e as sementes cozidas apresentam propriedades antitússicas, adstringentes e sedativas e estabilizam a espermatogênese.⁷⁸

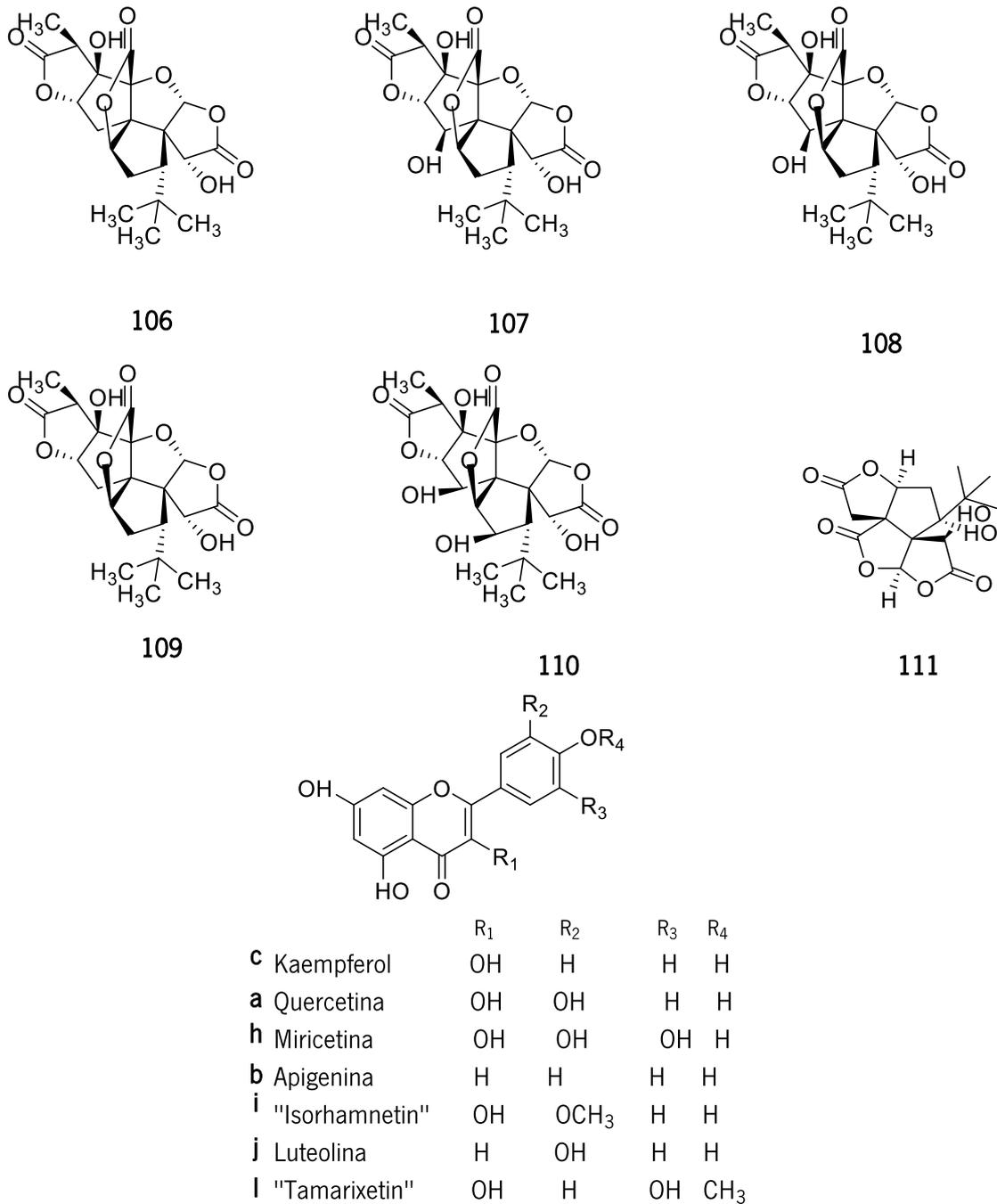


Advertências: as sementes apresentam toxicidade, sendo reduzidas se estas forem cozidas. Não é recomendada a crianças e a pessoas que estejam a tomar medicação para o sangue. O uso excessivo pode levar a envenenamento, hipotensão e tonturas.⁷⁸

Figura 26 – Características da espécie *Ginkgo biloba* L.

Ginkgo biloba, uma das espécies mais antigas do mundo é considerada um fóssil vivo, dada que a sua existência há mais de 250 milhões de anos. Oriunda da China, atualmente é cultivada pela Ásia, Europa, Norte da América, Nova Zelândia e Argentina.⁷⁹⁻⁸¹ Apresenta uma enorme importância económica, sendo produzido em massa na China, França e Estados Unidos, vendido em forma de folha, pó, tinturas e suplementos.^{80, 82}

Os compostos químicos presentes nas folhas são maioritariamente flavonóides glicosídicos, terpenos, proantocianidinas, ácidos orgânicos e outros constituintes, destacam-se Ginkgolide (A 106, B 107, C 108, J 109, M 110), bilobalide 111, kaempferol 52c, quercetina 52a, miricetina 52h, apigenina 52b, Isorhamnetin 52i, luteolina 52j e tamarixetin 52l (figura 27).^{79, 80}



52

Figura 27 – Compostos químicos maioritários da folha de *Ginkgo biloba* L.

Atividades biológicas associadas a esta planta são propriedades neuroprotetoras, propriedades vasculares, atividade anti-inflamatória, propriedades anticancerígenas, combate da icterícia, propriedades fotoprotetoras e atividade antioxidante. Na tabela 7, estão indicados as atividades biológicas e o seu mecanismo de ação.^{79,81,83}

Tabela 7 – Atividade biológicas e os mecanismos de ação do extrato de *Ginkgo biloba* L.

Atividade Biológica	Mecanismo de ação
Propriedades neuroprotetoras	EGb 761, protege os neurónios contra morte celular por hipoxia, peróxido de hidrogénio, glutamato, verapamil, amiloide β , óxido de nítrico, cianeto em concentrações 10-100 $\mu\text{g/ml}$; aumenta o fluxo sanguíneo por todo o cérebro em 50-100%; Recuperação significativa da memória espacial com o tratamento pós-isquémico; Reduz a atividade de superóxido dismutase (SOD); Influencia a neuromodulação da neuro transmissão andrenérgica, adquirindo o efeito positivo na cognição e no humor; Protege as mitocôndrias dos danos relacionados à idade e melhorar a funcionalidade mitocondrial e o metabolismo energético ^{79,81,83}
Propriedades vasculares	Aumenta o fluxo cerebral ⁷⁹ Efeitos hepatoprotetores ⁷⁹ Reduz a atividade de CCl_4 das enzimas antioxidante ⁷⁹ Reduz os níveis elevados de CCl_4 ⁷⁹
Atividade anti-inflamatória	Atividade antagonista ^{79,81} Efeito contra agregação plaquetas, aumentando o fluxo sanguíneo periférico; Ginkgolide B, mostra útil para o tratamento da asma ^{79,81}

Propriedades anticancerígenas	<p>Reparo de DNA devido ao stress oxidativo em <i>Saccharomyes cerevisiae</i>⁷⁹</p> <p>Ação protetora contra danos de DNA⁷⁹</p> <p>Diminui significativamente a troca de cromátídeos irmãs, aumenta a viabilidade celular e inibe a proliferação celular causada pela radiação de radiofrequência⁷⁹</p>
Combate à icterícia	<p>Reduz significativamente os níveis de transaminase sérica e melhora o dano histológico do fígado, levando a sua proteção⁷⁹</p>
Propriedades fotoprotetoras	<p>Proteção contra danos na barreira da pele e eritema⁷⁹</p>
Atividade antioxidante	<p>Tratamento com <i>Ginkgo biloba</i>, desacoplou parcialmente a oxidação mitocondrial por fosforilação que reduz a geração de radicais livres nas mitocôndrias e diminui o dano miocárdio induzido pela isquemia e estimula o grau de respiração pelo citocromo c exógeno^{79,81}</p>

2.5. SÍNTESE DE ANÁLOGO DO ÁCIDO GINKGÓLICO (C17:1)

Os ácidos ginkgólicos **112** são ácidos naturais proveniente de várias partes das plantas como da casca de caju, noz-moscada, algas castanhas, sarcotesta e das folhas de *Ginkgo biloba* L.⁸⁴

Os ácidos ginkgólicos são derivados naturais do ácido salicílico, possuindo uma cadeia alquílica de 13 a 17 carbonos na posição orto em relação ao ácido carboxílico entre zero a duas duplas ligações presentes na cadeia alquílica (figura 28). Os ácidos ginkgólicos apresentam elevada toxicidade, de tal forma que a elevada toxicidade que os extratos de ginkgo biloba devem apresentar um limite máximo <5 ppm nas farmacopeias europeia e americana. Os ácidos ginkgólicos exibem atividades biológicas diversas, nomeadamente antiviral, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e atividade inibitória de tirosinase.⁸⁴



Figura 28 – Estruturas dos principais ácidos ginkgólicos.

Apesar das suas propriedades biológicas, a sua disponibilidade natural é reduzida o que faz com novas estratégias de síntese sejam uma resposta eficiente para obtenção de ácidos ginkgólicos e estudo das propriedades biológicas.^{84,85}

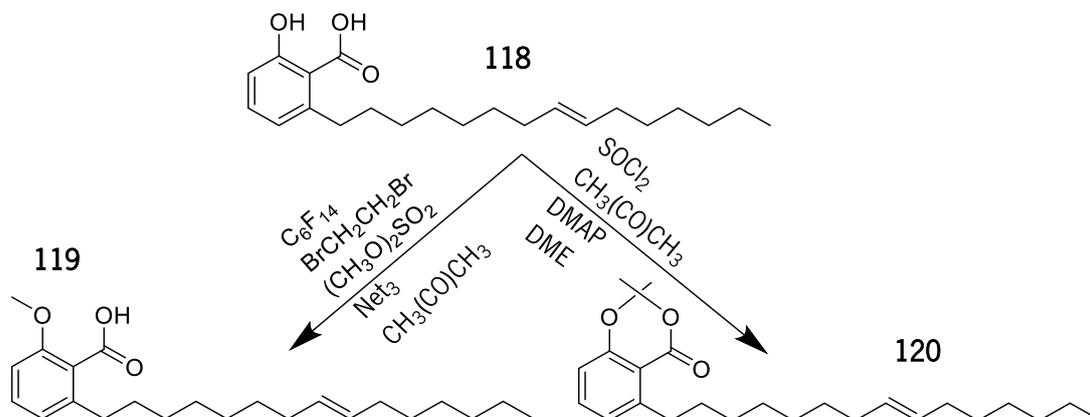
Tyman *et al.* aplicam estratégia de síntese envolvendo uma alquilação seguida de carboxilação de 2-fluoroanisol com alquilitio e dióxido de carbono, seguindo de desmetilação com BCl₃ obtendo assim AG (15:0) com baixos rendimentos; aumento de rendimento foi obtido através do alongamento da cadeia do 6- metilsalicilato.⁸⁴⁻⁸⁶ Fürstner *et al.* usaram um acoplamento cruzado de Suzuki para construir uma cadeia lateral diretamente na AG (15:0).^{84,85,87} Satoh *et al.* obtiveram AG (15:0)^{84,85,88,89} e AG (15:2)^{84,85,90} usando uma reação de anelação de isoxozoles com acetoacetato de etilo e uma reação de Wittig.⁸⁴

Yuanqing *et al.* aplicou uma nova estratégia para a síntese de AG (13:0), diferente das anteriores abordagens; uma nova via sintética usou o ácido 2,6-dihidroxibenzoico através de acoplamento catalisado por paládio e hidrogenação catalítica, levando à obtenção de AG (13:0) com um rendimento de 34% em cinco passos (esquema 3).⁸⁴

A preparação do composto **114** começa pela acetilação do ácido 2,6-dihidroxibenzoico de acordo com o procedimento descrito por Hadfield *et al.*,^{84,85,91} o grupo OH do composto **114** foi convertido em triflato originando o composto **115** e com um rendimento de 73% de acordo com o procedimento descrito por Uchiyama *et al.*^{84,85,92}

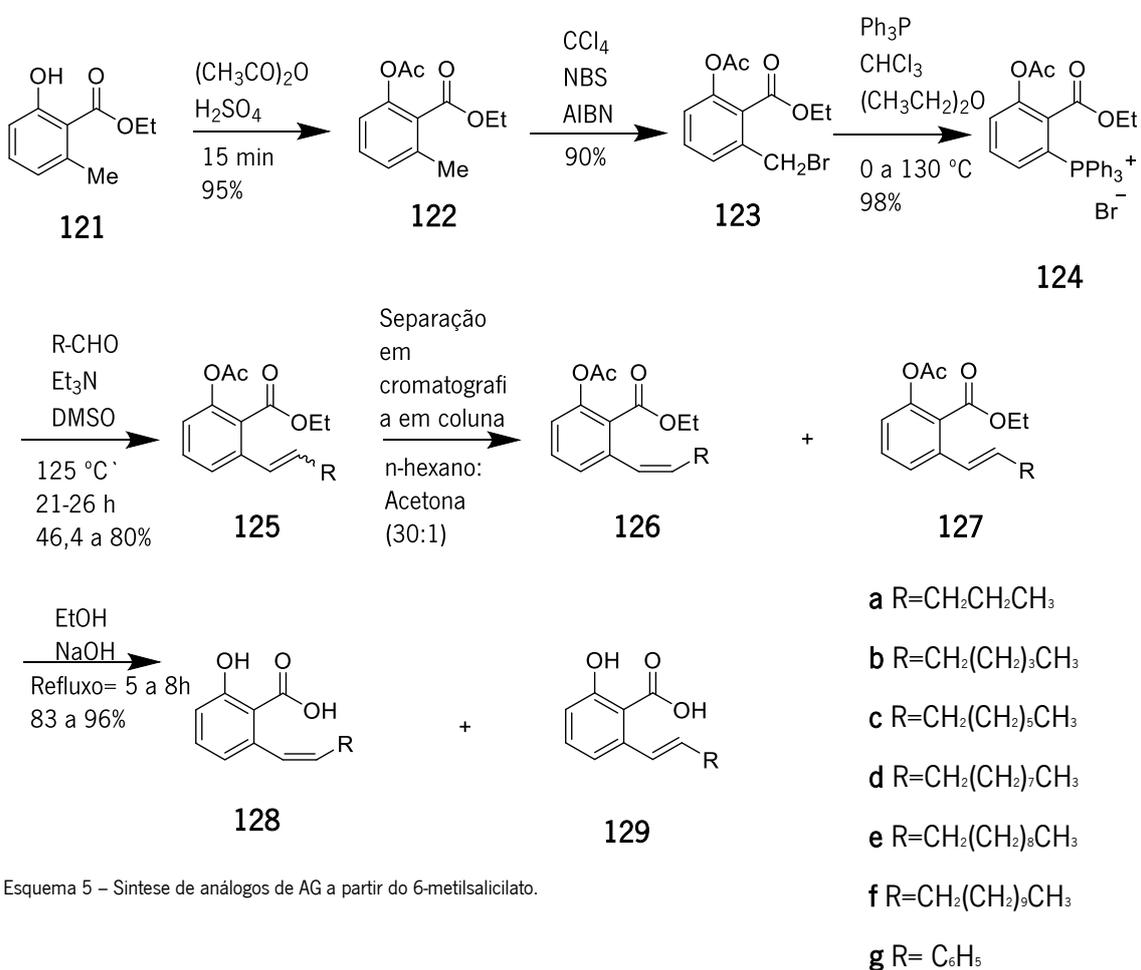
O ácido gínggólico (13:0) foi obtida por duas vias, uma na presença de 9-BBN e outra sem 9-BBN. Na presença de 9-BBN, a reação envolveu um acoplamento de Suzuki surgindo o método de Fürstner *et al.*^{84,85,87} 1-Tridecenoborano sofreu uma hidroboração com adição de 9-BBN gerando *in situ* o 1-tridecenoborano. O alquilborano resultante foi tratado com K_2CO_3 para formar o complexo de boro ativado que participou como nucleófilo na reação de acoplamento de Suzuki catalisada por paládio acoplado ao triflato **116**. Na ausência de 9-BBN, ocorre acoplamento direto do 1-trideceno com o triflato, originando o composto **116a** na presença de K_2CO_3 e numa quantidade catalítica de $PdCl_2$ (dppf) sob atmosfera de azoto em DMF anidro (esquema 3).^{84,85}

A obtenção do composto do ácido gínggólico alquilado e protegido foi obtido com sucesso através do método de Araujo, A. R. L.⁸⁵ Partindo do ácido gínggólico (15:1) **118**, usou-se duas fases distintas para obtenção do ácido gínggólico alquilado. Na primeira fase introduz-se o perfluorohexano e 1,2-dibromoetano e o sulfato de dimetilo é adicionada permitindo a separação em duas fases distintas a formação das duas fases distintas é quando se introduz o ácido gínggólico dissolvido em trietilamina obtendo o composto **119** (esquema 4). A reação de proteção do ácido gínggólico 15:1, é obtida através da adição de DMAP e DME no ácido gínggólico 15:1 seguido da adição da acetona e cloreto de tionilo em temperatura ambiente, conseguindo o composto **120** (esquema 4).⁸⁵



Esquema 4 – Obtenção do ácido gínggólico alquilado e protegido.

Outro método foi desenvolvido por Zhang *et al.* com o objetivo de produzir análogos sintéticos de ácido ginkgólico validando em cada um deles a sua atividade moluscicida. O estudo da relação estrutura-atividade concluiu que o encurtamento da cadeia alquílica decrescia a atividade moluscicida. Foram obtidos a partir do ácido metilsalicílico uma série de isômeros Z/E dos análogos de ácido ginkgólico variando a cadeia carbonada e o anel aromático, contendo um dupla ligação.^{85,93} As misturas não hidrolisadas dos isômeros Z e E **122a-g** foram sintetizadas a partir de 6-metilsalicilato de etilo de acordo com a sequência reacional delineada no esquema 5. Os isômeros foram separados por cromatografia em coluna com sílica gel, obtendo-se os compostos alvo **125a-g**, **124a-g** por hidrólise do éster, após extração de uma solução ácida com clorofórmio.^{85,93}



Esquema 5 – Síntese de análogos de AG a partir do 6-metilsalicilato.

2.6. TÉCNICAS DE EXTRAÇÕES DE MATÉRIA VEGETAL

Há diversas técnicas de extração de produtos naturais usando solventes orgânicos e/ou aquosos. A extração por solventes é um procedimento importante retirando os componentes bioativos da matéria vegetal através de um solvente, separando os metabolitos solúveis dos não solúveis (resíduo).⁹⁴⁻⁹⁶

2.6.1. Maceração, infusão, percolação e decocção

A maceração é uma técnica que foi inicialmente utilizada em vinhos, mas foi adaptada para plantas. Envolve a imersão de matéria vegetal, em grosso ou em pó, num recipiente fechado com solvente e é deixado em repouso, aproximadamente durante 3 dias, à temperatura ambiente e em agitação. O procedimento destina-se a amolecer, quebrando as paredes celulares para se libertarem os fitoquímicos solúveis. A escolha do solvente determinará o tipo de compostos bioativos extraídos.⁹⁴ O procedimento de extração termina quando é alcançado o equilíbrio entre a concentração de metabolitos no extrato e na matéria vegetal usada para extração. No final da extração, a matéria vegetal residual é separada do solvente através de um processo de decantação/filtração.

O princípio da infusão e da decocção é o mesmo que a da maceração, matéria vegetal é imersa em solvente, mas o solvente utilizado é água fria ou fervida. A diferença entre a maceração e a infusão está na diferença de tempo de extração, sendo a infusão um procedimento mais rápido em que é fervida num volume específico de água. A decocção é adequada para compostos resistentes a temperaturas altas e a material vegetal dura, como raízes e cascas, resultando geralmente em compostos oleosos.⁹⁴

É usado um percolador para a execução da percolação, em que as amostras secas são colocadas num coador e introduzindo água fervida e deixando durante duas horas a macerar; é um procedimento meticuloso, utilizando um fluxo de 6 gotas/min até a extração estar completa, obtendo-se um extrato concentrado.⁹⁴

2.6.2. Soxhlet

A técnica de extração por Soxhlet, a amostra não está em contacto directo com a fonte de calor amostra (em fresco ou em pó) é colocada num cartucho de celulose, dentro do Soxhlet. O solvente é introduzido no balão, que está numa manta de aquecimento, e o solvente é aquecido refluxo. O conteúdo líquido presente no Soxhlet, quando atingindo o braço do sifão, é novamente introduzido no balão e o procedimento volta a ser repetido até ao tempo definido (figura 29). A vantagem deste método, em comparação com os métodos descritos anteriormente, é que grandes quantidades de extrato podem ser extraídas com muito menor quantidade de solvente.^{95,96}

A principal desvantagem da extração por Soxhlet, reside no facto de os solventes orgânicos poderem causar efeitos tóxicos no extrato final, qual pode ainda sofrer alterações de aroma e sabor.⁹⁷

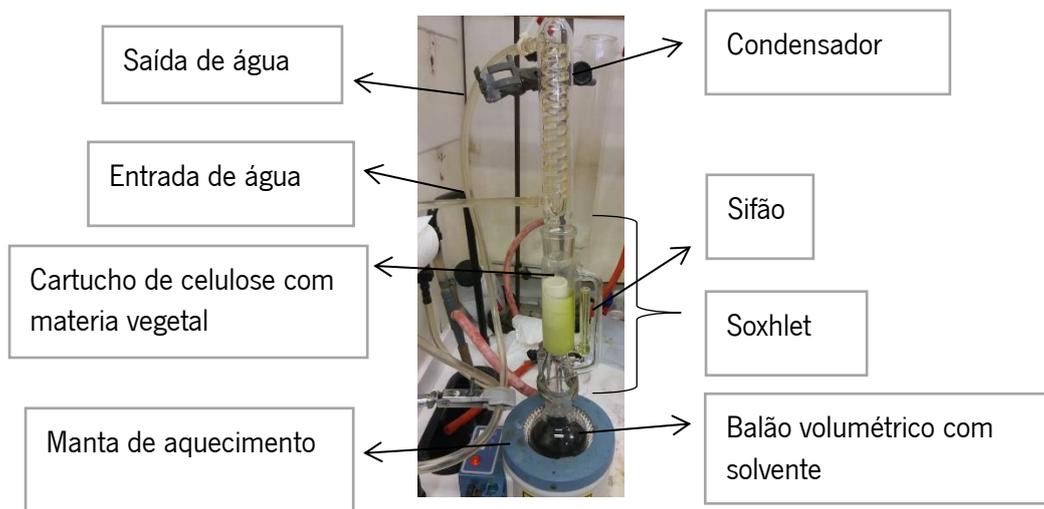


Figura 29 – Montagem e equipamento de extração por Soxhlet.

2.6.3. Hidrodestilação

A material vegetal é imersa directamente em água dentro de um balão e o solvente é levado a ebulição. O princípio da extração é baseado no princípio azeotrópico, ou seja, a pressão atmosférica e a água juntamente com as moléculas de óleo essencial formam uma mistura heterogénica (Figura 30).^{95,96}

A utilização da água tem diversas vantagens, uma delas é o facto de esta ser imiscível com os óleos essenciais, o que permite uma separação fácil através de decantação.^{95,96}



Figura 30 – Montagem e equipamento do hidrodestilador.

2.6.4. Outras técnicas de extração

Além das extrações convencionais, existem técnicas mais inovadoras de extração de matéria vegetal, entre as quais destacamos extração por ultrassons, extração por micro-ondas e extração com CO₂ supercrítico. Comparando com as convencionais, o custo do equipamento e manutenção é muito superior aos dos métodos convencionais.^{95,96}

A técnica de ultrassons vai permitir uma maior e mais eficiente extração dos óleos. A matéria prima é imersa em água ou em solvente orgânico e é submetido à ação de ultrassons, o qual induz uma vibração mecânica nas paredes celulares e membranas da planta libertando o óleo essencial.^{95,99}

O uso desta técnica está associado ao conceito de extração verde. Na extração assistida por micro-ondas existem algumas variantes como hidrodestilação assistida, extração por micro-ondas sem solvente, destilação a vapor acelerada por micro-ondas e destilação a vapor de micro-ondas ^{95,96}. É uma técnica muito promissora, oferecendo alta reprodutividade em tempos mais curtos, fácil de manipular e menor consumo de energia.^{95,96}

A extração com CO₂ supercrítico é obtido quando a temperatura é entre 31 a 55 °C e pressão entre 0,5 a 7,4 Mpa e nestas condições o CO₂ comporta-se como um solvente não-polar. Possui vantagens em relação aos outros métodos convencionais destacando-se: devido a extração ser a baixas temperaturas permite que a amostra não sofra danos causados pelo calor e por alguns solventes orgânicos; não tem nenhum resíduo de solventes e é um procedimento de extração

ecológico.^{95,96}

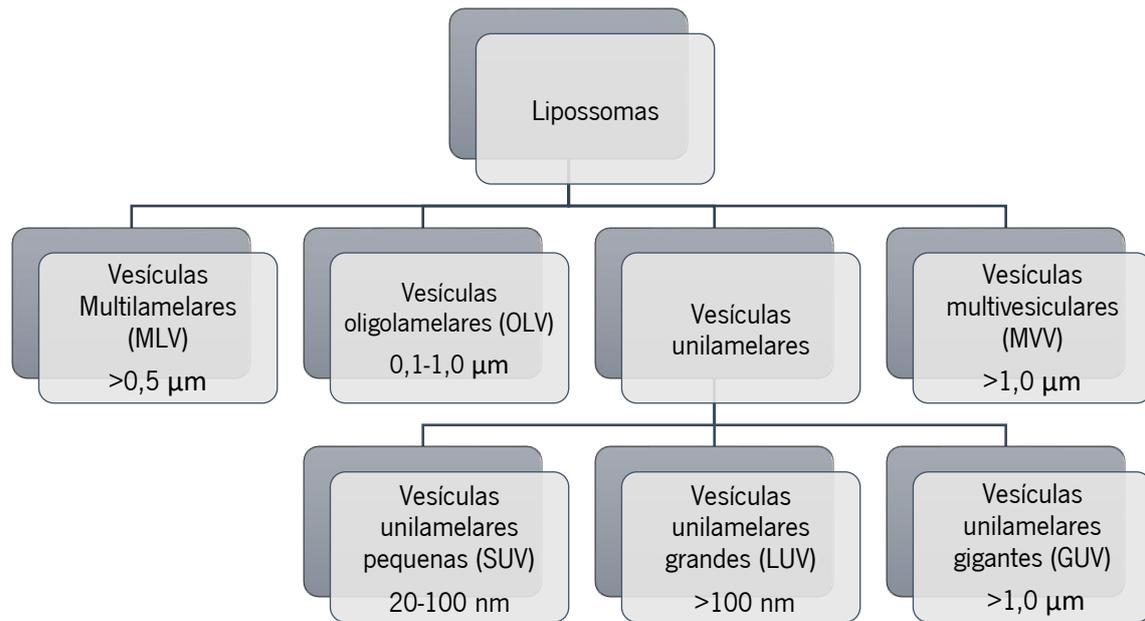
2.7. NANOENCAPSULAMENTO

O encapsulamento de agentes bioativos à nanoescala é conhecido por nanoencapsulamento, aplicável em diversas áreas como a farmacêutica, cosmética, ambiental e alimentar. A vantagem do encapsulamento é que este confere proteção a polifenóis, micronutrientes, enzimas, antioxidantes e nutracêuticos, protegendo de fatores ambientais que comprometem a integridade do composto. O sistema de encapsulamento é selecionado de acordo com o uso pretendido na formulação final, que pode variar dependendo em tamanho, forma ou natureza. Destacam-se as micropartículas, nanopartículas, nanopartículas lipídicas, lipossomas, micelas, nanoemulsões e nanoemulsões baseadas em polímeros.^{95,98} Neste trabalho, focam-se os sistemas baseados em lipossomas e as nanoemulsões de quitosano.

2.7.1. Sistemas baseados em lipossomas

Os lipossomas são vesículas com um tamanho variável entre 20 nm e 2,5 µm e poderão ainda conter uma ou mais vesículas. O tamanho da vesícula é um parâmetro que influencia a semivida de circulação dos lipossomas, e tanto o tamanho como o número de bicamadas afetam a eficiência de encapsulação nos lipossomas. Com base no seu tamanho e número de bicamadas, os lipossomas podem ser classificados em vesículas multilamelares (MLV) ou vesículas unilamelares. As vesículas unilamelares são ainda classificadas em duas categorias: vesículas unilamelares grandes (LUV) e vesículas unilamelares pequenas (SUV) (esquema 6).⁹⁹⁻¹⁰¹

Estruturalmente, as bicamadas são geralmente constituídas por fosfolípidos, que são moléculas que possuem uma cabeça hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas hidrocarbonadas. A cabeça tem afinidade pela água e a cauda é repelida pela água.⁹⁹⁻¹⁰¹



Esquema 6 – Classificação dos lipossomas de acordo com parâmetros estruturais.

Os lipossomas são amplamente utilizados como transportadores de inúmeras moléculas nas indústrias farmacêutica, alimentar e agrícola. Tem sido descrito o uso de encapsulamento em lipossomas para sistemas de libertação incorporando compostos instáveis (por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, aromas e elementos bioativos), protegendo a sua funcionalidade, devido aos lipossomas apresentarem características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de transportar tanto compostos hidrofílicos como lipofílicos.⁹⁹⁻¹⁰¹

2.7.2. Sistemas baseados em quitosano

O quitosano é proveniente da hidrólise da quitina e tem sido utilizado por diversas indústrias como a farmacêutica e na área da bioengenharia, devido a apresentar propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade, acessibilidade e apresentando ainda atividade antibacteriana e antimicrobiana.¹⁰²⁻¹⁰⁶ As nanopartículas de quitosano podem ser produzidas por diversos métodos como emulsão água-em-óleo, coacervação/precipitação, produção de micelas invertidas e gelificação iónica.¹⁰²⁻¹⁰⁶

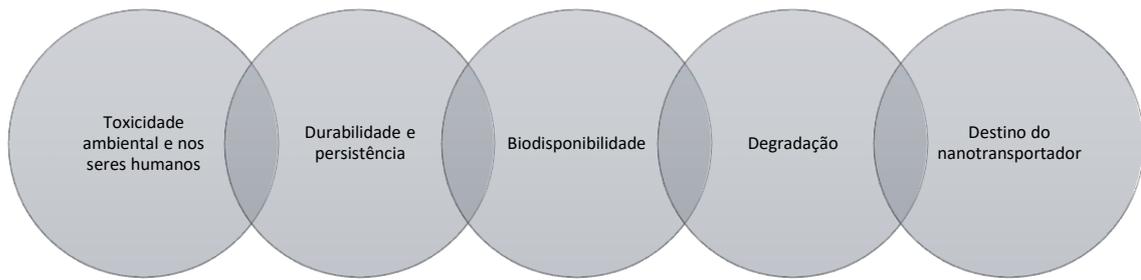
2.8. NANOPESTICIDAS

As nanopartículas poderão ter um papel fundamental no controlo de pragas e agentes patogénicos hospedeiros e o desenvolvimento de formulações pesticidas nanoencapsuladas têm sido estudados com vista a resolver problemas ecológicos e de saúde humana, devido a apresentarem propriedades de libertação lenta com solubilidade, especificidade, permeabilidade e estabilidade aumentadas com o encapsulamento.^{107,108}

Há diversos nanossistemas usados para pesticidas, tais como nanoemulsões e nanodispersores, nanopesticidas baseados em polímeros e nanopesticidas com nanopartículas sólidas.¹⁰⁷ As nanoemulsões são, geralmente, emulsões óleo-em-água, em que o pesticida é disperso na água em nanogotas com surfactante localizado na interface pesticida-água. Os nanodispersores são nanopartículas sólidas em água, sendo estabilizadas devido ao seu pequeno tamanho e à presença de moléculas surfactantes localizadas na superfície da partícula.¹⁰⁷

Os nanopesticidas à base de polímeros garantem um aumento na dispersão em meio aquoso, atuando como reservatório e facilitando a libertação controlada por difusão dos pesticidas. A libertação controlada e lenta das moléculas ativas poderá ser alcançada com base nas propriedades de degradação do nanotransportador, ou ligação dos ingredientes ativos ao material e ao meio ambiente. Os nanopesticidas com nanopartículas sólidas (contendo pesticidas e/ou biopesticidas) têm sido utilizados devido a possuírem propriedades bacterianas/inseticidas intrínsecas.¹⁰⁷

Devido ao facto de ser uma investigação recente, têm sido levantadas questões sobre o facto das concentrações de nanoformulações no solo, águas superficiais e subterrâneas terem algum impacto em organismos não-alvo. No esquema 7, estão presentes alguns dos problemas levantados com este tipo de sistemas.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹



Esquema 7 – Potenciais riscos da utilização de nanopesticidas.

CAPÍTULO 3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EXTRAÇÃO DE MATÉRIA VEGETAL

3.1.1. Materiais

Para a execução da extração de matéria vegetal foi utilizado um Soxhlet de capacidade de 100 ml e cartucho de extração de celulose com tamanho 25/29 x 80 de Filtres Prat Dumas. Os solventes utilizados na extração foram diclorometano (DCM, 99,99%) e água destilada/etanol absoluto (EtOH, 99,5%) 1:1.

3.1.2. Procedimento experimental

A matéria vegetal usada neste trabalho foi previamente tratada de acordo com procedimento standart e só depois foi usada nas técnicas de extração.

3.1.2.1. *Preparação da matéria vegetal*

As espécies usadas neste trabalho foram recolhidas no Norte de Portugal (Braga, Melgaço e Guimarães).

Os tratamentos usados na preparação da matéria vegetal dependem da espécie e das suas características. No caso da *Punica Granatum* L., a casca foi seca durante 45 dias, perto de uma zona de luminosidade solar e à temperatura ambiente. A raiz, folha, baga e caule de *Phytolacca americana* L., folha de *Chelidonium majus* L. e folhas e flores de *Tagetes patula* L. foram congeladas a -20°C até serem sujeitos a liofilização, sendo congeladas previamente durante dois dias a -80 °C.

As folhas de *Camellia japonica* L., as folhas de *Prunus lusitanica* L. as folhas de *Mentha suaveolens* Ehrh., as folhas de *Ruta graveolens* L., as folhas e as flores de *Ulex europaeus* L. e as folhas e flores de *Lithodora prostrata* L. foram secas na estufa a 60°C durante 3 dias.

As folhas de *Ginkgo biloba* L. foram usadas frescas no processo de extração.

A matéria vegetal previamente seca/liofilizada, foi posteriormente triturada e pulverizada até obter um tamanho de partículas $\leq 900 \mu\text{m}$.

No esquema 8, está indicado o método de preparação da matéria vegetal das 11 espécies usadas.

<i>Punica Granatum</i> L. (Casca)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separar os componentes de interesse do resto do fruto. 2. Secar a casca de romã à temperatura ambiente durante 45 dias. 3. Triturar e pulverizar até obter um tamanho de partículas de $900 \mu\text{m}$.
<i>Phytolacca americana</i> L. <i>Chelidonium majus</i> L. <i>Tagetes patula</i> L.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separar os componentes de interesse do resto da planta e congelar a -20°C. 2. Após 2 dias, volta a congelar mas -80°C para liofilizar. 3. Depois de liofilizado, triturar e pulverizar até obter um tamanho de partículas de $900 \mu\text{m}$.
<i>Camellia japonica</i> L. <i>Prunus lusitanica</i> L. <i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. <i>Ruta graveolens</i> L. <i>Ulex europaeus</i> L. <i>Lithodora prostrata</i> L.	<ol style="list-style-type: none"> 1. Separar os componentes de interesse do resto da planta. 2. Secar numa estufa a 60°C durante 3 dias. 3. Triturar e pulverizar até obter um tamanho de partículas de $900 \mu\text{m}$.
<i>Ginkgo Biloba</i> L. (folhas)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Foram utilizadas folhas frescas.

Esquema 8 – Preparação da matéria vegetal para a extração de componentes naturais.

Após o tratamento da matéria vegetal, as amostras são guardas em embalagens de plásticos num exsiccador, protegidas de fatores ambientais, como luz, temperatura e humidade (figura 31).



a)



b)

Figura 31 – Matéria vegetal após a secura e/ou liofilização com um tamanho de partículas de $900 \mu\text{m}$: a) *Mentha suaveolens* Ehrh. (folha) b) *Phytolacca americana* L. (raiz).

3.1.2.2. Extração

A técnica de extração por Soxhlet foi o método selecionado para a obtenção dos extratos vegetais (figura 29).

Cada uma das espécies foi sujeitas a extração com diferentes solventes e tempos. Com o DCM, o tempo de extração foi de 4 horas e com H₂O/EtOH (1:1) era de 9 horas; no caso das folhas de *Ginkgo biloba* L. a extração foi efetuada com DCM (4 horas).

Após a montagem do extrato por Soxhlet, foi colocado a matéria vegetal no cartucho de celulose (8 gramas).

Os extratos obtidos com DCM, foram sujeitos a evaporação do solvente a 40°C num evaporador rotativo e levados a uma atmosfera obtidos com o solvente H₂O/EtOH (1:1), foram sujeitos a evaporação a 40°C num evaporador rotativo para retirar o etanol absoluto e levados a liofilizar para retirar os resíduos de água existentes no extrato.

Após a liofilização e/ou a evaporação do solvente, os extratos foram armazenados no exsiccador evitando qualquer contacto com fatores ambientais preservando assim a integridade da amostra.

3.2. REMOÇÃO DE CLOROFILAS

3.2.1. Materiais

Os extratos vegetais das partes foliar de *Phytolacca americana* L., *Tagete patula* L., *Ulex europaeus* L., *Prunus lusitanica* L., *Camellia japonica* L., *Lithodora prostrata* L., *Mentha suaveolens* Ehrh. e *Rute graveolens* L. foram sujeitos a remoção de clorofilas usando numa a coluna de Chromabond C18 e metanol como solvente (MeOH, 99,99%).

3.2.2. Procedimento experimental (adaptado de Mateos, R. *et al.*)¹¹⁰

Os extratos previamente dissolvidos em metanol (15 mL) são colocados na coluna Chromabond C18[®] (figura 32).



Figura 32 – Extração de clorofilas utilizando numa Chromabond C18[®] em que se visualiza a separação dos componentes do extrato ao longo da sílica.

As frações eluídas são recolhidas em tubos de vidro (5 mL) e com o auxílio de uma câmara de UV-Vis (365 nm), são juntas as frações que apresentam cor semelhante (figura 33). As clorofilas presentes ficam retidas na coluna.

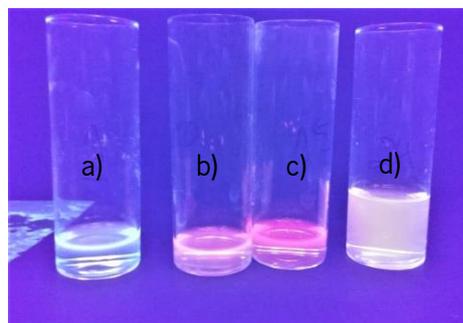


Figura 33 – Visualização numa câmara de UV-vis (365 nm) das frações recolhidas de *Ruta graveolens* L. após a extração das clorofilas por Chromabond C18[®], indicando as diversas cores presentes no extrato: a) Azul; b) Alaranjado; c) Vermelho e d) Amarelo.

3.2.3. Avaliação por Espectroscopia de absorção no UV-visível

A espectroscopia de absorção no UV-visível permite a identificação e quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos. Baseia-se na absorção de luz na região do ultravioleta e do visível, que excita as moléculas para estados eletrônicos excitados.¹¹¹

A fração de luz que passa pela amostra e é coletada pelo detetor é chamada de intensidade da luz transmitida (I), sendo que o valor de intensidade será mais baixo do que a intensidade original (I_0) da luz (figura 34).¹¹⁰ A razão entre as duas intensidades, I/I_0 , é a transmitância, T (equação 1).¹¹¹

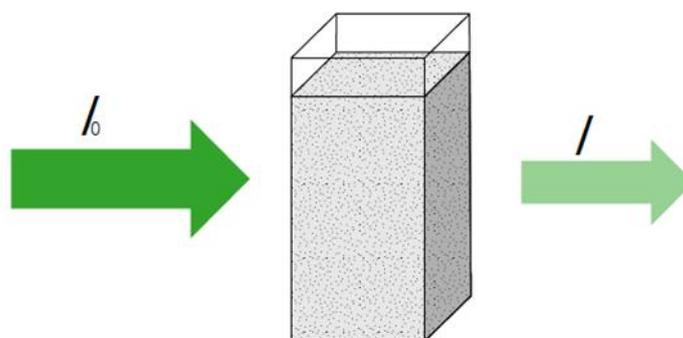


Figura 34 – Atenuação da luz após absorção pela amostra (adaptado de Evans, L.,2018) ¹¹¹

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Equação 1 – Transmitância é a razão entre a intensidade de luz transmitida (I) e a intensidade original (I_0).

Relacionada com a transmitância, usa-se também a grandeza absorvância, A . A absorvância é calculada pelo simétrico do logaritmo decimal da transmitância (equação 2).¹¹¹

$$A = -\log_{10} (T)$$

Equação 2 – Absorvância é o simétrico do logaritmo decimal da transmitância.

Num espectro de absorção, a intensidade das bandas é diretamente proporcional à concentração da amostra, desde que a lei de Lambert-Beer seja válida.¹¹¹ O comprimento da

cuvete também interfere com a atenuação da luz, o que é tido em conta pela lei de Lambert-Beer, definindo a absorvância (A) pelo produto do coeficiente de absorção molar, ϵ ($L/cm^1 mol^{-1}$), a concentração da amostra, c (mol/L) e o comprimento da cuvete b (cm) (equação 3).¹¹¹

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Equação 3 – Lei de Lambert-Beer.

A lei de Lambert-Beer determina a concentração da amostra a partir do valor da absorvância, sendo rigorosamente obedecida quando uma única molécula gera absorção. Ocorrem desvios a esta lei quando há diferentes formas de moléculas absorventes em estão em equilíbrio, quando o soluto e o solvente formam complexos por meio de algum tipo de associação, quando existe um equilíbrio entre o estado fundamental e um estado excitado de baixa energia ou quando compostos fluorescentes ou compostos modificados por irradiação estão presentes em concentrações elevadas.¹¹¹

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para comparar os extratos em crude com as diversas frações retiradas após a extração de clorofilas A análise foi realizada num espectrofotômetro Shimadzu UV-2501PC, na gama de comprimentos de onda 200 nm a 800 nm, utilizando-se o programa UVProbe.

3.3. SÍNTESE DE ANÁLOGOS DOS ÁCIDO GINKGÓLICO C17:1

3.3.1. Materiais e reagentes químicos

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram determinados no aparelho Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para 1H e 100,6 MHz para ^{13}C , usando o pico de solvente como referência interna, a 25 °C. Os desvios químicos são referidos em ppm, utilizando como referência o valor $\delta_H Me_4Si = 0$ ppm, e as constants de acoplamento (J) surgem em Hz. A atribuição dos sinais de 1H e ^{13}C foi efetuada por comparação dos desvios químicos, multiplicidade dos picos e valores de J . Os solventes deuterados usados foram clorofórmio- d_1 e dimetilsulfóxido-

d_6 com grau de deuteração superior a 99,8%, da euriso-top[®] ou da Acros Organics. Os reagentes usados foram produtos p.a. ou para síntese das empresas Sigma-Aldrich, BDH Chemicals e Acros Organics e os solventes usados foram produtos p.a. fornecidos pela Fisher Chemical, Panreac e Carlo Erba. Os materiais usados para uma caracterização prévia foram a cromatografia em camada fina (TLC), fornecido por Macherey-Nagel em placas de sílica gel com 0,20 mm de espessura com uma visualização posterior na câmara CN-6 com luz ultravioleta ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 e 365 nm). A purificação foi executada por cromatografia em coluna foram realizadas com sílica Acros Organics 60 gel (0,035-0,070 mm).

Os espectros de ultravioleta/visível (200-800 nm) foram obtidos num espectrofotómetro Shimadzu UV/3101PC. Os espectros de IV foram obtidos a uma frequência (4000 cm^{-1} e 500 cm^{-1}) no detetor FTLA2000. Os espectros de massa de baixa resolução foram efectuados num Finnigan LXQ. Os espectros de massa de alta resolução foram efectuados na Unidade de Espetrometria de Massa e Proteómica, CACTUS, em Santiago de Compostela, Espanha.

3.3.2. Procedimentos experimentais

3.3.2.1. *Extração do ácido Gínggólico 17:1*

As folhas frescas de *Ginkgo biloba* L. (166g) foram sujeitos a extração por Soxhlet usando como solvente DCM (1200 ml) durante 4h. O extrato foi purificado por cromatografia em coluna usando éter de petróleo/acetato de Etilo (1:3), obtendo um resíduo oleoso verde. O espectro de ^1H confirma a presença do ácido -2- (heptadec-10-en-1-il) -6-hidroxi-benzóico (ácido gínggólico 17:1) (3g) **130**.

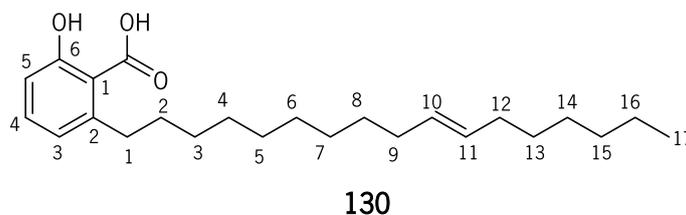


Figura 35 – Estrutura química de ácido gínggólico 17:1.

$R_f = 0,81$ (Etp/EtOAC 1:3)

UV (EtOH, 0,12 mg/ml) = $\lambda_{\text{máx}}$: 242 nm e 309 nm

IV (DCM) $\nu_{\text{máx}} = 2922, 2852, 1655, 1607, 1579, 1453, 1376, 1302, 1246, 1202 \text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H RMN } \delta_{\text{H}}$ (CDCl_3 , 400 MHz): 11,07 (sl, 1H, CO_2H), 7,36 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H-4), 6,87 (dd, $J = 7,2$ e $1,2 \text{ Hz}$, 1H, H-3), 6,78 (d, $J = 7,2 \text{ Hz}$, 1H, H-5), 5,35 (t, $J = 4,8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{HC}=\text{CH}$), 2,98 (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 2H, CH_2-1), 2,00-2,06 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,58-1,60 (m, 3H, CH_2-2), 1,19-1,33 (m, 24H, $14 \times \text{CH}_2$), 0,88 (t, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 3H, CH_3) ppm. $^{13}\text{C RMN } \delta_{\text{C}}$ (CDCl_3 , 100,6 MHz): 175,90 (CO_2H), 163,6 (C-6), 147,7 (C-2), 135,3 (C-4), 129,9 (C=C), 122,7 (C-3), 115,8 (C-5), 110,5 (C-1), 36,47 (CH_2-1), 32,03, 31,95, 31,92, 29,81, 29,76, 29,69, 29,65, 29,63, 29,58, 29,55, 29,48, 29,35, 29,31, 29,24, 28,98 ($15 \times \text{C}$), 13,98 (CH_3) ppm.

EM m/z (ESI): Valor calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$ [$\text{M}^+ + 1$]: 374,69. Valor obtido para $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$: 373,40.

3.3.2.2. Síntese do ácido 2- (heptadec-10-en-1-il) -6-metoxibenzoico 131

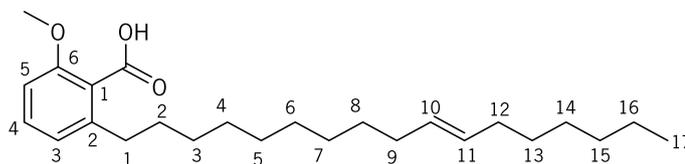


Figura 36 – Estrutura química de ácido ginkgólico 17:1 alquilado.

Num balão contendo perfluorohexano (0,214 mL, 1,1 mmol), 1,2 – dicloroetano (0,208 mL, 2,6 mmol) e sulfato de dimetilo (0,0275 mL, 0,29 mmol) em agitação, após 5 minutos introduz-se ácido ginkgólico 17:1 (0,100g, 0,37 mmol) e trietilamina (0,081 mL, 0,37 mmol) dissolvidos em acetona (0,86 mL). A mistura reacional é protegido com uma folha de alumínio e a reação ocorreu sob agitação durante 136 horas à temperatura ambiente, sendo a sua evolução monitorizada através de TLC. O solvente é evaporado e ao resíduo é adicionada água destilada (15 mL) e a mistura extraída com diclorometano (4x15mL). A fase orgânica é seca com o sulfato de magnésio anidro e é evaporado o restante solvente até obter resíduo oleoso amarelo-esverdeado.

O resíduo oleoso é sujeito a uma purificação por cromatografia em coluna usando como eluente éter de petróleo/diclorometano (1:1), obtendo-se o produto desejado na forma de um óleo transparente (ácido 2- (heptadec-8-en-1-il) -6-metoxibenzóico (0,0108 g, 0,028 mmol), **131**. Este procedimento, foi adaptado de Jana, N. K. et al.¹¹²

$R_f = 0,68$ (DCM/Etp 1:1)

UV (EtOH, 0,17mg/ml) = $\lambda_{\text{máx}}$: 245 nm e 312 nm

IV (DCM) $\nu_{\text{máx}} = 2925, 2854, 1736, 1609, 1577, 1449, 1301, 1250, 1212 \text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H RMN } \delta_{\text{H}}$ (CDCl₃, 400 MHz): 11,11 (sl, 1H, CO₂H), 7,30 (t, $J = 7,6 \text{ Hz}$ 1H, H-4), 6,84 (dd, $J = 7,2 \text{ Hz}$ e 1,2, 1H, H-3), 6,73 (dd, $J = 6,4 \text{ Hz}$ e 1,2, 1H, H-5), 5,37 (m, $J = 5,6 \text{ Hz}$, 2H, HC=CH), 3,97 (s, 3H, OCH₃), 2,87-2,91 (m, 2H, CH₂-1), 2,00-2,05 (m, 3H, CH₂-9 + CH₂-12), 1,50-1,58 (m, 2H, 2XCH₂), 1,27-1,34 (m, 22H, 12xH), 0,87-0,92 (m, 3H, CH₃) ppm. $^{13}\text{C RMN } \delta_{\text{C}}$ (CDCl₃, 100,6 MHz): 172 (CO₂H), 162,6 (C-6), 146,2 (C-2), 134,2 (C-4), 129,9 (C=C), 122,5 (C-1), 115,6 (C-3), 111, 8 (C-5), 52,12 (OCH₃) 36,62 (CH₂-1), 29,91, 29,88, 29,72, 29,67, 29,65, 29,63, 29,59, 29,55, 29,53, 29,51, 29,35, 29,30, 29,29, 29,01, 28,98 (15XC) 13,99 (CH₃) ppm.

EM m/z (ESI): Valor calculado para C₂₅H₄₀O₃ [M⁺ + 1]: 388,58. Valor obtido para C₂₅H₄₀O₃: 389,14.

3.3.2.3. Tentativa da reação de proteção no ácido gíngólico 17:1

A uma solução de ácido gíngólico 17:1 (0,100g, 0,37 mmol) dissolvido em acetona (0,44 mL) foi adicionado cloreto de tionilo (0,055 mL, 0,76 mmol) e DMAP (0,002 g, 0,016 mmol) dissolvido em 1,2 – dimetoxietano (0,215 mL); a mistura é agitada durante uma a 0°C sob agitação. Após uma hora, a solução é retirada do gelo e deixada em agitação sob temperatura ambiente num período de tempo entre 30 a 98 horas, sendo a reação monitorizada por TLC. Após a reação estar concluída, é adicionada uma solução saturada de bicarbonato de sódio (15 mL) e extraída com diclorometano (4x15 mL). A fase orgânica é seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado obtendo-se um resíduo oleoso acastanhado. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna usando éter de petróleo/diclorometano como eluente. O RMN confirma que o produto após a purificação não corresponde ao composto pretendido.

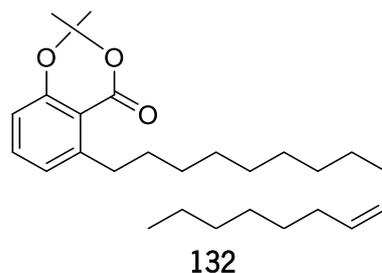


Figura 37 – Estrutura química de 2-(heptadec-10-en-1-il)-6-metoxibenzoato

3.3.2.4. Síntese de 3 – dodecilaminobenzóico **135**

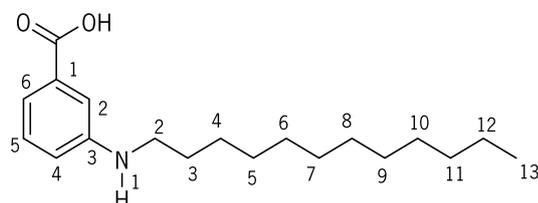


Figura 38 – Estrutura química de 3- dodecilaminobenzóico

Uma solução contendo ácido 3-aminobenzóico **133** (0,2 g, 1,5 mmol), 1-bromododecano (0.5 eq, 0,7 mL, 2,9 mmol) **134** dissolvidos em etanol (14 mL). Foi colocada sob agitação durante 50h. A evolução da reação foi controlada por TLC e após o término desta, o solvente foi evaporado obtendo-se um resíduo oleoso acastanhado. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna usando diclorometano/metanol (97:3) como eluente, obtendo o produto desejado na forma de um sólido acinzentado, ácido 3 – dodecilaminobenzóico (0,0191g, 0,062 mmol) **135**. Procedimento adaptado de Zhang, P. et al.⁹³

R= 0,23 (DCM/MeOH 9:1)

UV (EtOH, 0,2 mg/ml) = $\lambda_{\text{máx}}$: 227 nm, 257 nm e 340 nm

IV (DCM) $\nu_{\text{máx}}$ = 2955, 2922, 1679, 1606, 1587 cm^{-1}

^1H RMN δ_{H} (DMSO, 400 MHz): 7,15 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, H-6), 7,12-7,08 (m, 2H, H-2 + H-5), 6,6 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, H-4), 5,81 (sl, 1H, NH), 2,96 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2 -2), 1,45-1,50 (m, 2H, CH_2 -3), 1,17-1,29 (m, 18H, 9XCH_2), 0,79 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN δ_{C} (DMSO, 100,6

MHz): 168,6 (CO₂H), 149,1 (C-3), 131,7 (C-5), 129,6 (C-1), 117,3 (C-6), 117,1 (C-4), 113,1 (C-2), 43,5 (CH₂-2), 31,69, 29,42, 29,38, 29,26, 29,21, 29,09, 28,75, 26,95, 22,51 (9xC), 14,4 (CH₃) ppm.

HRMS m/z (ESI-TOF): Valor calculado para C₁₉H₃₁NO₂ [M⁺ +1]: 305,4549. Valor obtido para C₁₉H₃₁NO₂: 306,2430.

3.3.2.5. Síntese de 2 – dodecilaminobenzóico **137**

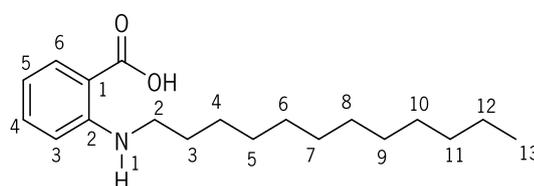


Figura 39 – Estrutura química de 2- dodecilaminobenzóico

Uma solução contendo ácido antranílico **136** (0,2 g, 1,5 mmol), 1-bromododecano (0,5 eq, 0,7 mL, 2,9 mmol) **134** dissolvidos em etanol (14 mL). Foi colocada sob agitação durante 64h. A evolução da reação foi controlada por TLC e após o término desta, o solvente foi evaporado obtendo-se um resíduo oleoso amarelo-esverdeado. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna usando diclorometano/metanol (98:2) como eluente, obtendo o produto desejado na forma de um sólido acinzentado, ácido 2 – dodecilaminobenzóico (0,2283g, 0,75 mmol) **137**. Procedimento adaptado de Zhang, P. et al.⁹³

R_f = 0,33 (DCM/MeOH 9:1)

UV (EtOH) = λ_{máx}: 222 nm, 256 nm e 355 nm

IV (DCM) ν_{máx} = 2918, 2848, 1669, 1579, 1640, 1574, 1550, 1415, 1255, 1160 cm⁻¹

¹H RMN δ_H (DMSO, 400 MHz): 7,76 (dd, J = 6,4 Hz e 1,6 Hz, 1H, H-6), 7,33 (dt, J = 6,8 Hz e 1,6 Hz, 1H, H-4), 6,69 (d, J = 8,4 Hz, 1H, H-3), 6,52 (t, J = 6,8 Hz, 1H, H-5), 3,13 (t, J = 7,2 Hz, 2H, CH₂-2), 1,53-1,60 (m, 2H, CH₂-3), 1,25-1,35 (m, 18H, 9XCH₂), 0,84 (t, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃) ppm.

¹³C RMN δ_C (DMSO, 100,6 MHz): 170,06 (CO₂H), 150,96 (C-2), 134,45 (C-4), 131,67 (C-6),

113,90 (C-5), 111,08 (C-3), 109,71 (C-1), 41,95 (CH₂-2), 31,28, 29,02, 28,99, 28,95, 28,72, 28,70, 28,56, 26,52, 22,08 (CX9), 13,93 (CH₃) ppm.

HRMS m/z (ESI-TOF): Valor calculado para C₁₉H₃₁NO₂ [M⁺ +1]: 305,4549. Valor obtido para C₁₉H₃₁NO₂: 306,2430.

3.3.2.6. Síntese de 2 – tridecilaminobenzóico **139**

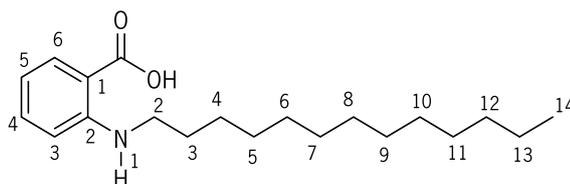


Figura 40 – Estrutura química de 2- tridecilaminobenzóico

Uma solução contendo ácido antranílico **136** (0,2 g, 1,5 mmol), 1-bromotridecano (0,7 eq, 1,58 mL, 6,9 mmol) **138** dissolvidos em etanol (16 mL). Foi colocada sob agitação durante 57h. A evolução da reação foi controlada por TLC e após o término desta, o solvente foi evaporado obtendo-se um resíduo oleoso acastanhado. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna usando diclorometano/metanol (98:2) como eluente, obtendo o produto desejado na forma de um sólido acinzentado, ácido 2 – tridecilaminobenzóico (0,2929g, 0,91 mmol) **139**. Procedimento adaptado de Zhang, P. et al.⁹³

R_f = 0,68 (DCM/MeOH 9:1)

UV (EtOH) = λ_{máx}: 221 nm, 256 nm e 355 nm

IV (DCM) ν_{máx} = 2917, 2848, 1668, 1580, 1415, 1256 cm⁻¹

¹H RMN δ_H (DMSO, 400 MHz): 7,76 (dd, J = 6,4 Hz e 1,6 Hz, 1H, H-6), 7,33 (dt, J = 6,8 Hz e 2 Hz, 1H, H-4), 6,69 (d, J = 8 Hz, 1H, H-3), 6,51 (t, J = 8 Hz, 1H, H-5), 3,13 (t, J = 7,2 Hz, 2H, CH₂-2), 1,53-1,60 (m, 2H, CH₂-3), 1,25-1,35 (m, 18H, 9XCH₂), 0,84 (t, J = 6,8 Hz, 3H, CH₃-19) ppm. ¹³C RMN δ_C (DMSO, 100,6 MHz): 170,06 (CO₂H), 150,96 (C-2), 134,45 (C-6), 131,67 (C-

4), 113,90 (C-5), 111,08 (C-3), 109,71 (C-1), 41,95 (CH₂-2), 31,28, 29,02, 28,99, 28,95, 28,72, 28,70, 28,56, 26,52, 25,49, 22,08 (CX10), 13,93 (CH₃) ppm.

HRMS m/z (ESI-TOF): Valor calculado para C₂₀H₃₃NO₂ [M⁺ +1]: 319,4815. Valor obtido para C₂₀H₃₃NO₂: 320,2588.

3.3.2.7. Síntese de 2 – pentadecilaminobenzóico **141**

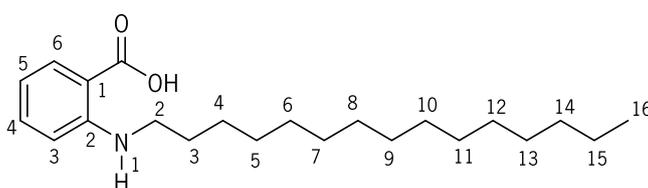


Figura 41 – Estrutura química de 2- pentadecilaminobenzóico

Uma solução contendo ácido antranílico **136** (0,2 g, 1,5 mmol), 1-bromopentadecano (0,7 eq, 1,79 mL, 6,2 mmol) **140** dissolvidos em etanol (16 mL). Foi colocada sob agitação durante 57h. A evolução da reação foi controlada por TLC e após o término desta, o solvente foi evaporado obtendo-se um resíduo sólido branco. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna usando diclorometano/metanol (98:2) como eluente, obtendo o produto desejado na forma de um sólido acinzentado, ácido 2 – pentadecilaminobenzóico (0,2141g, 0,61 mmol). Procedimento adaptado de Zhang, P. et al.⁹³

R_f= 0,86 (DCM/MeOH 9:1)

UV (EtOH) = λ_{máx}: 209 nm, 296 nm e 355 nm

IV (DCM) ν_{máx} = 2919, 2850, 1665, 1581, 1467, 1259 cm⁻¹

¹H RMN δ_H (DMSO, 400 MHz): 7,76 (dd, J= 6 Hz e 2 Hz, 1H, H-6), 7,33 (dt, J= 6,8 Hz e 1,6 Hz, 1H, H-4), 6,69 (d, J= 8 Hz, 1H, H-3), 6,52 (t, J= 7,2 Hz, 1H, H-5), 3,13 (t, J= 6,8 Hz, 2H, CH₂-2), 1,53-1,60 (m, 2H, CH₂-3), 1,25-1,35 (m, 24H, 12XCH₂), 0,84 (t, J=6,8 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C RMN δ_C (DMSO, 100,6 MHz): 170,04 (CO₂H), 150,97 (C-2), 134,45 (C-4), 131,67 (C-6), 113,92

(C-5), 111,10 (C-3), 109,66 (C-1), 41,95 (CH₂-2), 39,50, 39,29, 39,08, 38,87, 31,28, 29,02, 28,99, 28,97, 28,94, 28,69, 28,56, 26,52, 22,08 (CX13), 13,93 (CH₃) ppm.

HRMS m/z (ESI-TOF): Valor calculado para C₂₂H₃₇NO₂ [M⁺ +1]: 347,5347. Valor obtido para C₂₀H₃₃NO₂: 348,2895.

3.3.3. Técnicas de Caracterização

Para todos os compostos sintetizados, foram utilizadas quatro técnicas diferentes, nomeadamente espectroscopia de absorção UV-visível, Ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelho (IV) e espectrometria de massa de alta resolução. De seguida iremos descrever cada uma das técnicas, sendo que a espectroscopia de absorção no UV-Visível já foi descrita anteriormente.

3.3.3.1. *Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

É um método análise estrutural de compostos orgânicos. Muitos núcleos atômicos têm uma propriedade chamada spin: os núcleos comportam-se como se estivessem girando e qualquer núcleo atômico que tenha massa ou número atômico ímpar, ou ambos, têm um momento angular de spin e um momento magnético. Núcleo é uma partícula carregada, e qualquer carga que se desloca gera um campo magnético próprio; o núcleo tem um momento magnético (μ) gerado pela sua carga e spin. Por exemplo, no caso do hidrogénio pode ter spin ($+\frac{1}{2}$) ou ($-\frac{1}{2}$), em que os momentos magnéticos (μ) apontam em direções opostas. Num campo magnético aplicado, todos os prótons têm seus momentos magnéticos alinhados com o campo ou opostos a ele, como podemos visualizar na figura 42.¹¹³

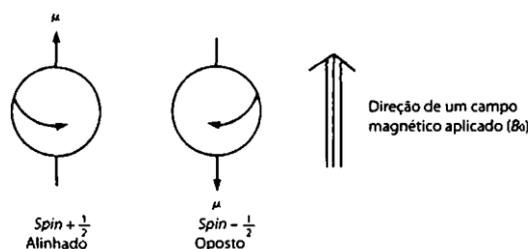


Figura 42 – Estados de spin de um próton (adaptado de Pavia, D., L. & et al., 2010)¹¹⁴

A absorção de energia é um processo quantificado, e a energia absorvida deve ser igual à diferença de energia entre os dois estados envolvidos, de acordo com a equação 4, em que

$$E = \left(E - \frac{1}{2} - E + \frac{1}{2} \right) = h\nu$$

Equação 4 –Energia absorvida entre os estados de spin

a energia é igual a energia do spin oposto menos o spin alinhado resultando na constante de planck multiplicado pela frequência.¹¹³

Podemos dividir a técnica em dois tipos: ondas contínuas (CW) e pulsadas ou Transformada de Fourier (TF RMN). As diferenças entre as duas é que na primeira o campo magnético ou a radiofrequência são varridos enquanto que na segunda a amostra é irradiada com os pulsos periódicos de radiofrequência com componente perpendicular ao campo magnético ¹¹³. A mudança química está associada à frequência Larmor de uma rotação nuclear para seu ambiente químico. O tetrametilsilano é geralmente usado como um padrão interno para determinar o deslocamento químico dos compostos: $\delta\text{TMS} = 0 \text{ ppm}$.¹¹³ O deslocamento químico de ^1H desempenha um papel na identificação de muitos grupos funcionais.¹¹³ O deslocamento químico de RMN do carbono é uma técnica operacional de pulso de alto campo juntamente com o desacoplamento heteronuclear de banda larga de todos os prótons.¹¹³

Na figura 43, podemos visualizar o deslocamento químicos dos compostos orgânicos nos espectros de RMN de próton e de carbono.¹¹³

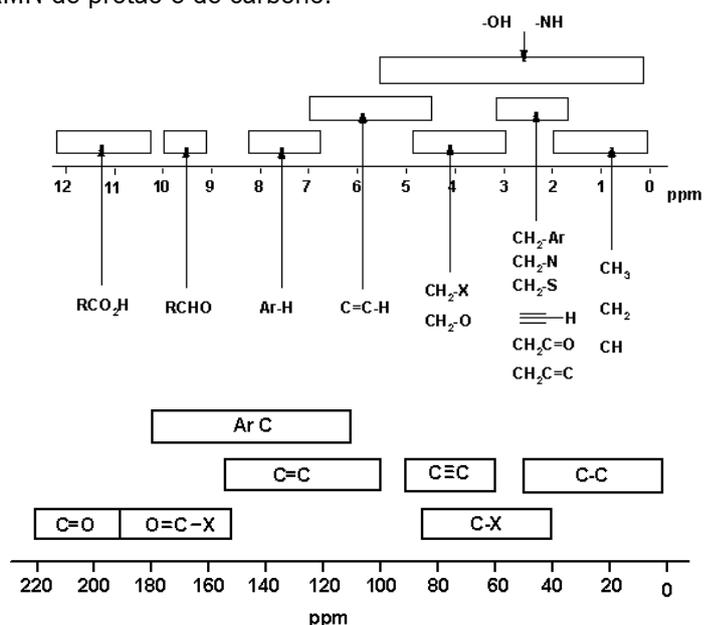


Figura 43 – Deslocamento químicos de compostos orgânicos nos espectros de RMN de próton e de carbono. (adaptado de <https://science.ucalgary.ca/>)

3.3.3.2. *Espetroscopia de infravermelho (IV)*

Ao absorver radiação infravermelha as moléculas são excitadas e passam a um estado de energia maior, correspondendo a alterações de energia por volta da ordem de 8 a 40 kJ/mol, no entanto nem todas as moléculas conseguem absorver na região do infravermelho, apenas as ligações dipolo que mudam com a função do tempo o conseguem fazer. As ligações simétricas não conseguem absorver na gama do infravermelho e para transferir energia a ligação deve apresentar -se como um dipolo elétrico pois este consegue acoplar-se como o campo magnético da radiação incidente que varia de forma senoidal. Uma ligação simétrica que tenha grupos idênticos ou quase idênticos em cada ponta não vai absorver radiação infravermelha e entre os grupos funcionais afetados por esta restrição são os alcenos e alcinos.¹¹³ Através dos espectros de infravermelho é possível distinguir entre duas moléculas idênticas através das bandas no espectro, uma vez que a cada ligação corresponde uma frequência específica.¹¹³

Os dois tipos de movimentos vibracionais da molécula que dão origem a absorção, são o estiramento e a deformação angular. Vibrações de estiramento assimétrico ocorrem em frequências mais altas do que as vibrações de deformação angular. Existem duas formas de estiramento, simétrico e assimétrico e na deformação angular existem o “scissoring” e “rocking” (dentro do plano) e “wagging” e “twisting” (fora do plano). Estes tipos de vibrações são chamados de vibrações fundamentais que são originadas pela excitação da molécula do estado fundamental para o estado excitado, resultando num espectro complexo devido à existência de bandas fracas conhecidas como bandas harmónicas. Quando duas frequências vibracionais acoplam numa molécula resulta numa nova frequência dentro da molécula.¹¹³

A frequência natural de uma vibração é dada pela equação 5:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}}}$$

Equação 5 – Frequências de estiramento.

$\bar{\nu}$ = frequência em cm^{-1}

c= velocidade da luz = 3×10^{10} cm/s

K =constante de força em dinas/s

m_1 e m_2 = é a massa dos átomos em gramas.

3.3.3.3. *Espetrometria de massa (EM)*

O espetrometro de massa é constituído por cinco componentes principais: unidade de entrada da amostra, fonte de ionização, analisador de massa, detetor e sistemas de dados.¹¹² A unidade de entrada da amostra faz com que esteja sujeita a pressões mais. A fonte de ionização onde permite a conversão das moléculas da amostra em iões na fase gasosa por um campo magnético. O analisador de massa, permite a separação dos iões da amostra com base na sua razão massa/carga (m/z); os iões passam pelo detetor e o sinal é registado e processado por um computador, obtendo-se espetro de massa onde é registado o número de iões em função da razão m/z (figura 44).¹¹³



Figura 44 – Componentes do espetrómetro de massa. (adaptado de Pavia, D., L. & et al., 2010)¹¹³

A fonte de ionização utilizada na análise dos compostos sintetizados neste trabalho foi a ionização por eletrospray (ESI), normalmente utilizada para o estudo de biomoléculas com um peso molecular alto e para compostos lábeis e não voláteis¹¹³. Uma solução que contém as moléculas da amostra é “borrifada” através da ponta de um tubo capilar fino para dentro de uma camara aquecida a pressão atmosférica. O tubo capilar passa por um potencial de alta voltagem na superfície e as gotículas carregadas são expulsas para dentro da camara de ionização e as gotículas carregadas enfrentam um contrafluxo de um gás de secagem, que é o nitrogénio, que evapora as moléculas de solvente das gotículas e assim a densidade de carga das gotículas aumentam até que as forças eletrostáticas excedam a tensão superficial da gotícula fazendo com

que estas se tornam menores.¹¹³ O processo continua até que os íões da amostra passam à fase gasosa.¹¹³

3.4. ENSAIOS DE NANOENCAPSULAMENTO

Os sistemas de nanoencapsulamento testados foram os lipossomas e as nanoemulsões de quitosano. Os lipossomas foram preparados por duas técnicas: injeção etanólica e hidratação de filme fino lipídico. No caso do quitosano, as nanoemulsões foram preparadas através de gelificação iónica. Neste subcapítulo, descreve-se o procedimento e material utilizado para a preparação dos lipossomas e das nanoemulsões de quitosano.

3.4.1. Material e reagentes

O material vegetal usado para os ensaios de encapsulamento foram os extratos de sargacinha (concentração 0,1 mg/ml), erva-tintureira (concentração 0,1 mg/ml), mentrastos (concentração 0,05 mg/ml) e arruda (concentração 0,025 mg/ml). A mistura lipídica usada para a preparação dos lipossomas foi a lecitina de soja (Sternchemie).

3.4.2. Procedimento experimental

3.4.2.1. *Preparação de lipossomas por injeção etanólica*¹¹⁴

150 µl de solução de lecitina de soja 20 mM e extrato de plantas dissolvido em tampão Tris-HCl pH=7,3 foram misturados e o solvente foi evaporado com uma corrente de azoto ultrapuro. Adicionou-se igual quantidade de etanol e injetou-se a mistura etanólica, sob vórtex, em tampão Tris-HCl de pH=7,3 (3 mL).

3.4.2.2. *Preparação de lipossomas por hidratação de filme lipídico*

Nesta preparação usou-se um procedimento adaptado de Yokota *et al.*¹¹⁵ 150 µl de solução 20 mM de lecitina de soja e extrato de plantas dissolvido em tampão Tris-HCl pH=7,3 foram misturados e o solvente foi evaporado lentamente. A mistura foi re-hidratada com a solução tampão e sonificada durante uma hora, para se formarem os lipossomas. Estes foram sujeitos a extrusão usando membranas de policarbonato de 200 nm (Whatman).

3.4.2.3. *Preparação das nanoemulsões de quitosano*

Foi utilizado um procedimento adaptado de Chauhan *et al.*¹⁰⁴ Assim, 2,8 mg de quitosano foram dissolvidos em tampão Tris-HCl pH=7,3, tendo-se adicionado ácido acético 1%. O pH de metade da solução foi ajustado a 4,6-4,8 com hidróxido de sódio. À restante solução, foram adicionados 14 µl de Tween 80. Juntaram-se as duas soluções e a mistura foi filtrada usando papel de filtro. Após a filtração, colocou-se a solução em agitação e adicionaram-se 693 µl de solução de Tripolifosfato de sódio, para completar a preparação das nanoemulsões de quitosano.

3.4.3. Determinação do tamanho dos nanossistemas

Para a determinação do tamanho dos sistemas de nanoencapsulamento, usou-se a técnica de Difusão Dinâmica de Luz (DLS). Esta técnica pode ser aplicada para partículas nanométricas com tamanhos compreendidos entre alguns nanómetros a 1 µm, em suspensão num líquido.¹¹⁶ A luz que incide na suspensão forma um padrão de difração aleatório que flutua no tempo, devido ao facto de as partículas se moverem em difusão browniana. Nas situações mais comuns, a suspensão é polidispersa, em que há uma distribuição de diferentes tamanhos de partículas. A técnica de DLS produz uma transformada de Laplace da distribuição dos coeficientes de difusão, sendo a quantidade de interesse obtida pela transformada inversa de Laplace, por ser menos sensível as incertezas experimentais e ser adequada a distribuições amplas de tamanhos, nomeadamente multimodais.^{116,117}

Neste trabalho, as amostras foram analisadas num equipamento Malvern Zetasizer Nano

e os dados foram analisados no *software* do equipamento.

3.4.4. Eficiência de encapsulamento e estudos de liberação

A eficiência de encapsulamento, *EE (%)*, foi determinada através de medidas de absorvância, usando retas de calibração (absorvância em função da concentração) previamente obtidas. Os sistemas contendo os extratos encapsulados foram sujeitos a centrifugação a 11000 rpm, durante 60 minutos, usando filtros Amicon-4 Ultra (Merck Millipore). O filtrado, contendo o extrato não encapsulado, foi analisado por espectroscopia de absorção UV-visível e a concentração foi determinada através da calibração obtida para cada um dos extratos. Foram realizados três ensaios independentes. A eficiência de encapsulamento foi determinada pela equação 6:

$$EE(\%) = \frac{\text{Concentração de composto total} - \text{Concentração de composto não encapsulado}}{\text{Concentração de composto total}} \times 100$$

Equação 6 – Eficiência de Encapsulamento (EE%).

Realizaram-se ainda ensaios de liberação dos quatro extratos selecionados nos três sistemas de encapsulamento, por um período de 48 a 72 horas, em solução tampão Tris-HCL com pH=7,3. As soluções contendo os extratos encapsulados foram mantidas sob agitação e a temperatura controlada. Fizeram-se recolhas do meio exterior ao filtro de hora a hora, repondo-se o volume de solvente retirado com tampão fresco. Foi medida a absorvância das amostras recolhidas, a fim de se determinar a sua concentração.

3.5. ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A linha celular escolhida para os ensaios biológicos foi a linha celular de insetos Sf9, que provém dos ovários imaturos de *S. frugiperda* pupae. Estudos anteriores sugerem o uso desta linha celular para ensaios de atividade pesticida, devido à sua vulnerabilidade a espécies reativas de oxigênio (ROS), associadas à apoptose e a danos oxidativos nas células.¹¹⁸ As células ativas convertem MTT em formazan (cor púrpura) e as células mortas perdem a capacidade de converter

MTT, sendo a formação de cor um indicador de viabilidade celular. Os estudos de atividade biológica em células Sf9 foram efetuados no REQUIMTE, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

3.5.1. Cultivo da linha celular

Em 3 ml de células de inseto, o meio foi enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina a 27 °C. Verificou-se que o tempo de duplicação das células se verifica num período de 18-24 horas e estas eram subcultivadas a cada 3 dias.^{118,119} A viabilidade é determinada através de exclusão de azul de tripano.^{118,119}

3.5.2. Determinação da viabilidade celular por MTT

A linha celular foi introduzida nas placas de 96 poços e, após um período de incubação, normalmente 24 horas, foram adicionados os extratos/compostos em estudo a diferentes concentrações usando DMSO como controlo.^{118,119} Depois de 24 - 96h de tratamento, foi adicionado o MTT em cada poço e, depois de 4 horas de incubação, o meio foi descartado e os poços foram secos ao ar. Adicionou-se aos poços álcool isopropílico para dissolver os cristais de formazan e a absorvância foi medida a 570 nm, usando o leitor de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO microplate.^{118,119}

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. EXTRAÇÕES

As amostras selecionadas (cap.3.1.3) foram sujeitas a extração por Soxhlet na presença de dois solventes de polaridades distintas: i) diclorometano e ii) água: etanol (1:1). Os tempos de extração e massas obtidos está indicado na tabela 7. Foi efetuada um estudo sobre a influência de tempo de extração sobre a composição/massa de extrato, tendo o extrato obtido sido analisado por ^1H RMN. As frações obtidas por ^1H RMN dos extratos de água: etanol (1:1) não permitiu a caracterização destes, no entanto foi elucidativa sobre o aumento da complexividade do extrato com aumento do tempo de extração até ao máximo de 9 horas. A maior complexidade do extrato ao fim de 9 horas permite concluir que à um maior número de componentes presente no extrato. No caso do DCM, conclui-se que o processo de extração atinge o máximo de extrato obtido ao fim de 4 horas. Em face desta informação, optou-se por usar 4 horas para extração com DCM e 9 horas para extração com água: etanol (1:1).

Tabela 8 – Resultados da extração por Soxhlet, com diferentes tempos (h), o rendimento mássico da amostra (%) e a cor.

Nome comum e parte da planta	Solvente	Método de extração e tempo (h)	Rendimentos de massa (%)	Cor
Erva-tintureira (Bagas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	13,25%	Acastanhado
		Soxhlet (4 horas)	3,71%	Rosa
		Soxhlet (2 horas)	20,7%	Rosa escuro
	Diclorometano	Soxhlet (9 horas)	7,57%	Verde
		Soxhlet (4 horas)	6,21%	Verde
		Soxhlet (2 horas)	8,4%	Verde
Erva-tintureira (Folhas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	18,25%	Verde
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	12,47%	Verde
Erva-tintureira (Caule)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	3,44%	Verde-acastanhado

Ceruda (Folhas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	26,90%	Castanho-alaranjado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	10,09%	Verde escuro
Cravo de França (Folhas de Flores Amarelas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	28,63%	Castanho
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	6,66%	Verde escuro
Cravo de França (Folhas de Flores Laranjas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	29,36%	Castanho
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	10,59%	Verde escuro
Cravo de França (Folhas de Flores Vermelhas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	32,78%	Castanho
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	5,43%	Verde escuro
Cravo de França (Flores Amarelas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	66,04%	Amarelo
Cravo de França (Flores Laranjas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	29,98%	Amarelo
Cravo de França (Flores Vermelhas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	20,57%	Bordô
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	4,12%	Amarelo-alaranjado
Romã (Casca)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	61,09%	Castanho - amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	1,03%	Amarelo
Tojo (Folha e Flor)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	42,83%	Castanho - amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	3,42%	Verde

Azereiro (Folha)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	42,55%	Castanho - amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	15,38%	Verde
Japoneira (Folha)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	43,75%	Castanho - amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	3,9519%	Verde
Sargacinha (Folha e Flor)	Água: etanol (1:1)	19- Soxhlet (9 horas)	20,73%	Castanho- amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	4,5751%	Verde
Mentrasos (Folhas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	17,39%	Castanho- amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	5,1606%	Verde
Uva cão (Raiz)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	25,89%	Amarelo
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	4,0138%	Castanho- amarelado
Arruda (Folhas)	Água: etanol (1:1)	Soxhlet (9 horas)	12,01%	Castanho- amarelado
	Diclorometano	Soxhlet (4 horas)	18,09%	Verde
	Acetato de etilo	Soxhlet (4 horas)	14,06%	Verde

No caso particular da arruda foi testado para além de DCM e água: etanol (1:1), um terceiro solvente foi utilizado para o estudo. De acordo com a literatura, o extrato obtido com acetato de apresentam maiores componentes fitotóxicos.^{61,62}

Relativamente aos rendimentos de extrato obtido, regra geral a utilização de água/ etanol (1:1) como solvente leva à obtenção de maior massa (tabela 8). A excepção foi a arruda onde se verificou que o DCM foi mais eficiente no processo de extração.

As cores dos vários extratos obtidos referentes à parte foliar, apresentam coloração esverdeada, quando se usam DCM ou EtOAc. A coloração esverdeada obtida para os extratos indicativos da presença de clorofilas, pelo que foi necessário efectuar a remoção destas de modo

a reduzir o número de componentes interferentes e que poderá complementar o potencial biológico do extrato.

4.2. REMOÇÃO DE CLOROFILAS

Com as extrações executadas com o solvente apolar (diclorometano) nas partes foliares dos extratos apresentam cor verde, por isso, se procede á extração das clorofilas com o objetivo de verificar o potencial biológico das espécies sem as clorofilas.

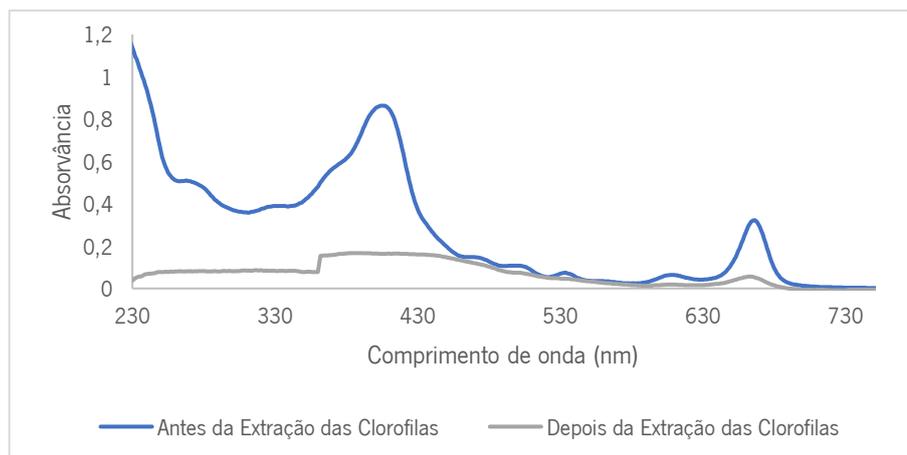
Apesar que o método utilizado não ser o método seletivo, pois através deste método poderemos para além de estar a extrair clorofilas também podemos estar a reter componente apolares. Sendo o método mais adequado para a extração de clorofilas seria HPLC-DAD com comprimento de onda (nm), permitindo a purificação seletiva do extrato.

e analisadas por UV-Vis a uma gama de comprimento de onda de 200 nm a 800 nm, com o solvente metanol. Primeiramente, analisamos o crude das amostras e posteriormente analisamos o extrato após a remoção da clorofila.

A clorofila a e a clorofila b, sendo corantes verdes, absorvem na banda dos azuis (400 nm a 500 nm) e vermelhos (600 nm a 700 nm).^{120,121} Na literatura, a clorofila a apresenta uma banda de absorção na região 617 - 664 nm (vermelho) e na região dos azuis apresenta uma banda de 434 – 418 nm. A clorofila b apresenta bandas na região do vermelho (651-603 nm) e nos azuis (471-454 nm).^{120,121}

4.2.1. *Phytolacca americana* L. (Erva-tintureira)

O espetro de absorção deste extrato foi medido a uma concentração de 4,1 mg/mL, em metanol.



45 – Espectro de absorção da folha de *Phytolacca americana* L. a uma concentração de 4,1 mg/mL.

No espectro de absorção antes da remoção das clorofilas, observam-se dois picos de elevada absorvância, que se apresentam na região de comprimentos de onda do vermelho e na banda do azul, indicando assim tratar-se de um corante verde. Na banda dos vermelhos, tem o pico máximo a 666 nm e na banda dos azuis a 405 nm, confirmando a presença de clorofilas a no extrato.^{120,121}

Após a remoção, podemos observar que o pico apresentado por volta dos 600 nm tem uma absorvância inferior do que antes da remoção, mas significando ainda alguma presença de clorofilas no extrato embora pouco significativa. Também a banda na região dos 400 nm desapareceu, confirmando que removemos praticamente a clorofila presente do extrato.^{120,121} De facto, o extrato sem remoção apresentava cor verde, como tinha sido referido, e após a extração de clorofila, o extrato recolhido apresenta cor amarela, perdendo toda a sua tonalidade verde.

4.2.2. Tagete patula L. (Cravo-de-França)

Como está indicado na tabela 8, extraiu-se a parte foliar das flores amarelas, laranjas e vermelhas de *Tagete patula* L., posteriormente removendo as clorofilas.

O espectro de absorção a) corresponde ao extrato de folhas das flores amarelas a uma concentração de 1,8 mg/mL, em metanol. O espectro de absorção b) corresponde às folhas das flores laranja a uma concentração 1,3 mg/mL, em metanol e o espectro de absorção c) é referente às folhas das flores vermelhas a uma concentração 0,99 mg/mL.

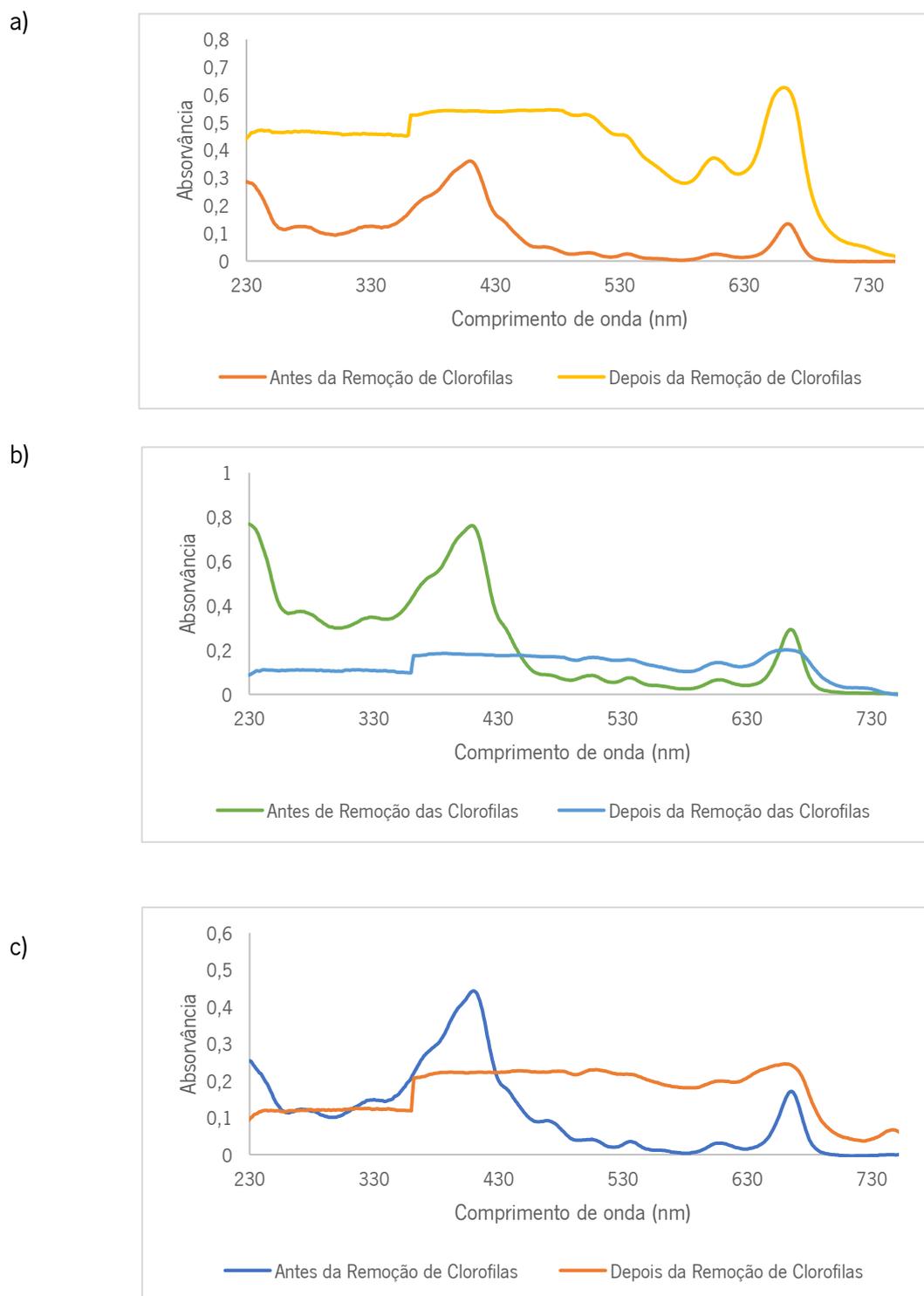


Figura 46 – Espectro de absorção das folhas de *Tagete patula* L.: a) Folhas de Flores amarelas a uma concentração de 1,8 mg/mL. b) Folhas de Flores laranja a uma concentração de 1,3 mg/mL e c) Folhas de Flores vermelhas a uma concentração de 0,99 mg/mL.

No espectro de absorção a) verificamos que, antes da remoção das clorofilas temos a presença dos dois picos característicos deste corante, um com absorção máxima a 665 nm e

outro com absorção máxima a 410 nm. Observando o espectro após a remoção de clorofilas, observamos ainda um pico significativo, na banda dos vermelhos, e uma absorção larga na região do azul, indicando a permanência das clorofilas no extrato. Também podemos considerar a mudança de cor do extrato apresentando uma cor amarela-acastanhada, como sendo indicativa de remoção parcial das clorofilas, considerando a tonalidade verde que apresentava inicialmente.^{120,121}

No espectro de absorção b), após a extração de clorofilas, verifica-se um pico menos intenso na gama dos vermelhos e o desaparecimento do pico na gama dos azuis, indicativo da diminuição da clorofila do extrato. Uma referência para a remoção, é a diferença de cor apresentada após a extração, em que apresentava com uma cor amarelo-acastanhado.^{120,121}

No espectro de absorção c), após a remoção de clorofilas, verifica-se que esta é incompleta, pois na região dos vermelhos e parte do azul tem-se um aumento de absorvância. A mudança de cor indica a remoção parcial das clorofilas, sendo que após a remoção passou de uma tonalidade verde para castanho-amarelado.^{120,121}

Apesar de as folhas serem de flores diferentes, elas têm comportamento muito semelhantes, no processo de extração das clorofilas, sendo que a extração parece ter sido mais eficiente no caso das folhas laranja.

4.2.3. *Ulex europaeus L.* (Tojo)

O espectro de absorção foi obtido a uma concentração de 0,1 mg/mL, em metanol. Na figura 47, temos o espectro de absorção antes da remoção de clorofilas (azul) e o espectro de absorção do depois da remoção de clorofilas (laranja).

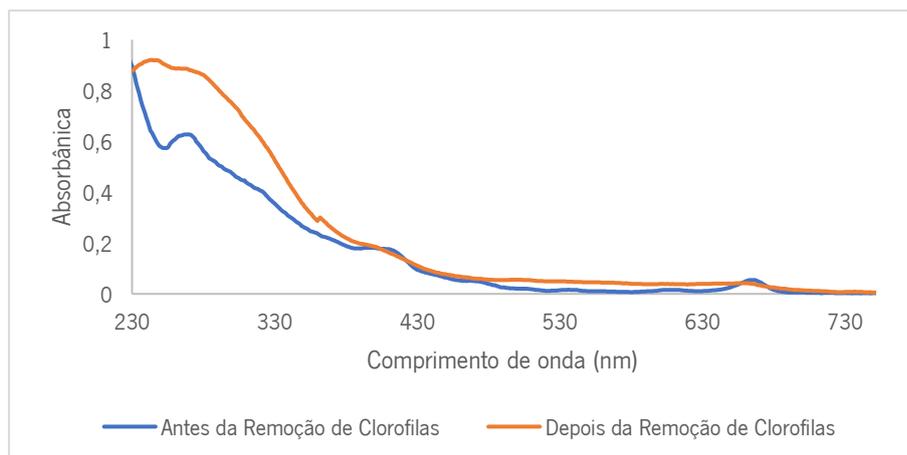


Figura 47 – Espectro de absorção das folhas de *Ulex europaeus* L. a uma concentração de 0,1 mg/mL

Na figura 47, no espectro de absorção do antes da remoção de clorofilas (azul), verifica-se que a intensidade de absorvância dos picos na gama dos 600-700 nm e 400-500 nm é muito baixa, apresentando um pico a 665 nm com uma absorvância de 0,055 e a 410 nm com uma absorvância de 0,176, devido à baixa concentração de extrato utilizada. Visualizando o espectro de depois da remoção das clorofilas, verifica-se o desaparecimento completo dos pequenos picos presentes.^{120,121}

4.2.4. *Prunus lusitanica* L. (Azereiro)

A uma concentração de 4,6 mg/mL em metanol, foi medido o espectro de absorção da parte foliar do azereiro.

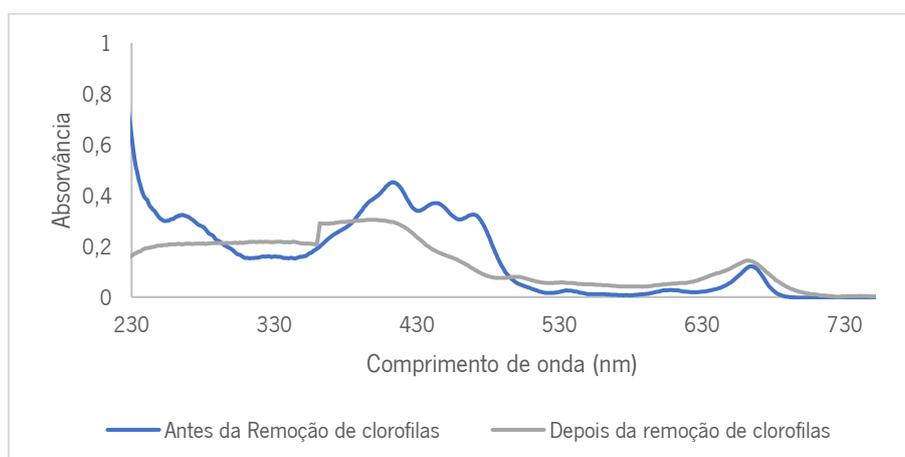


Figura 48– Espectro de absorção das folhas de *Prunus lusitanica* L. a uma concentração de 4,6 mg/mL.

Na gama dos 600 a 700 nm, esta espécie absorve a um comprimento de onda de 665 nm, o que segundo a literatura corresponde a um dos picos da clorofila a, mas verifica-se que este se mantém após a remoção das mesmas, indicando que ainda têm alguma presença de clorofila no extrato extraído. O mesmo podemos afirmar na gama de 400 a 500 nm, em que existe absorção da clorofila a, e na remoção das clorofilas verifica-se o desaparecimento dos picos na região do azul, mas não do vermelho, indicando a permanência de clorofilas no extrato.^{120,121}

4.2.5. *Camellia japonica* L. (Japoneira)

No caso da japoneira, o espectro de absorção foi executado a uma concentração de 0,13mg/mL, em metanol.

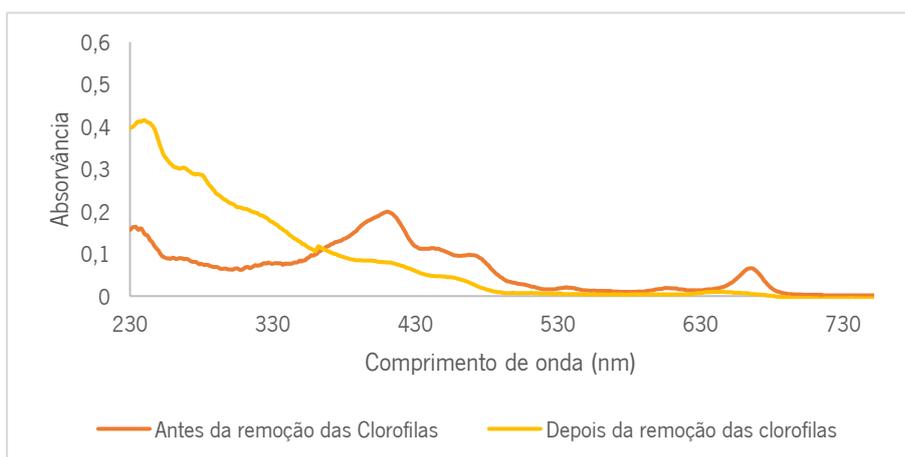


Figura 49 – Espectro de absorção das folhas de *Camellia japonica* L. a uma concentração de 0,13 mg/mL.

Após a remoção das clorofilas, visualiza-se o desaparecimento das duas bandas características destes pigmentos, destacando-se um pico a 240 nm com uma absorvância de 0,415, por isso afirma-se a eliminação da maioria das clorofilas que o extrato apresentava.^{120,121} Observa-se uma modificação de cor passando de verde para amarelado.

4.2.6. *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb (Sargacinha)

A concentração do extrato para a elaboração dos espectros de absorção visualizados na figura 33, é de 0,45 mg/mL, em metanol.

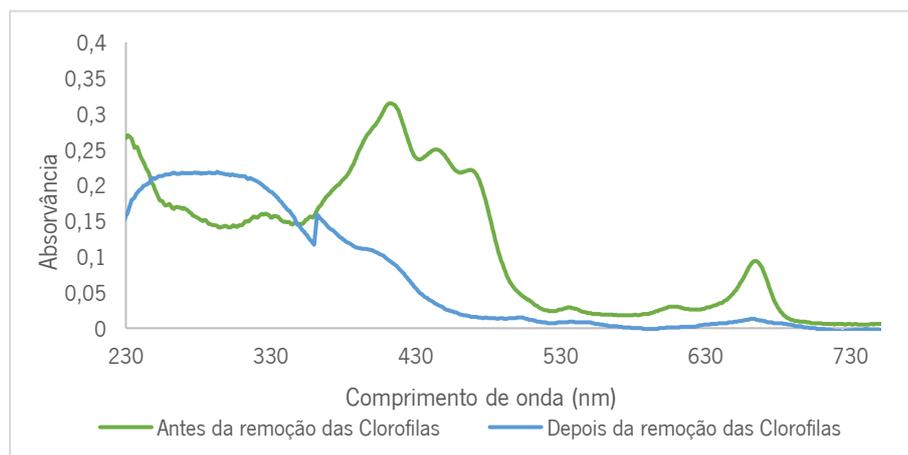


Figura 50 – Espectro de absorção das folhas de *Lithodora prostrata* L. a uma concentração de 0,45 mg/mL.

O espectro de absorção do crude (antes da remoção das clorofilas) apresenta picos característicos semelhantes aos das clorofilas a. Contêm um pico com absorção máxima em 665 nm e vários picos na gama dos 400 a 500 nm. Ao remover as clorofilas, o espectro de absorção tem uma forma diferente sendo que todos os picos mencionados anteriormente desaparecem, apresentando somente uma banda na região de 200 a 300 nm, suportando a conclusão de que as clorofilas foram maioritariamente eliminadas do extrato^{120,121}.

Ao remover as clorofilas, verifica-se que o extrato após a remoção perde a tonalidade verde que possuía e apresenta uma cor amarela-acastanha, sendo um indicativo de perda e/ou eliminação da clorofila a do extrato.

4.2.7. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Mentrasitos)

Em solvente orgânico metanol, a concentração usada para os mentrasitos foi de 3,6 mg/mL. Na figura 51, são apresentados dois espectros de absorção, um referente ao crude (azul) e o outro ao extrato sem clorofilas (laranja).

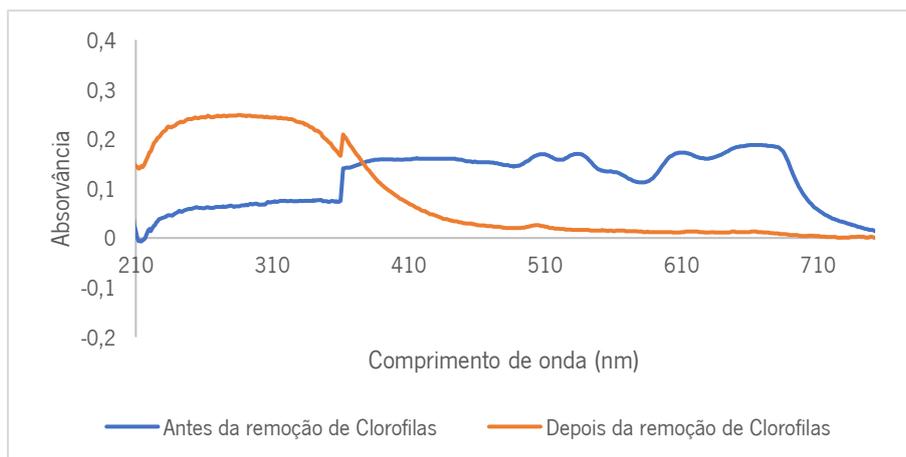


Figura 51 – Espectro de absorção das folhas de *Mentha suaveolens* Ehrh. a uma concentração de 3,6 mg/mL.

Visualiza-se que o espectro referente ao crude, mostra absorvância superior a partir os 400 nm, mas não se destaca nenhum pico em particular. Apesar de não se destacarem os picos referentes às clorofilas, na região de 600 nm aparece uma banda, levando a inferir a presença de clorofilas no extrato.^{120,121} Após a remoção, verifica-se que há absorvância significativa abaixo de 370 nm. Este extrato apresentava-se de cor verde escura, outra indicação da presença de clorofilas no extrato e após a remoção verifica-se a perda da tonalidade verde, indicativo de remoção das clorofilas.

4.2.8. *Ruta graveolens* L. (Arruda)

Extraíu-se na parte foliar da arruda com três solventes diferentes, mas dois dos extratos apresentaram tonalidades esverdeadas intensas (tabela 8). Por isso, removeu-se as clorofilas do extrato, extraído com diclorometano e acetato de etilo. O espectro de absorção a), referente ao extrato extraído com diclorometano, foi executado a uma concentração de 0,198 mg/mL e o espectro de absorção b) do extrato extraído com acetato de etilo, a uma concentração de 0,154 mg/mL.

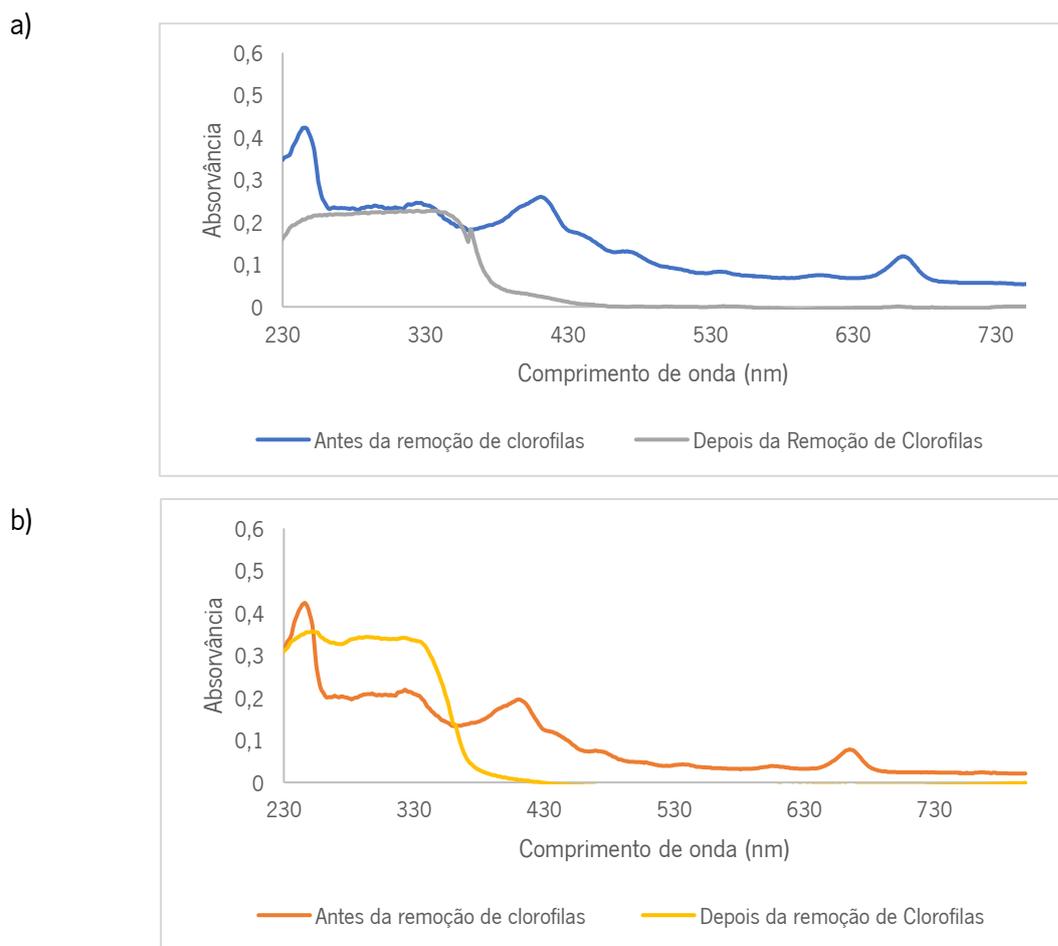


Figura 52 – Espetro de absorção das folhas de *Ruta graveolens* L.: a) Extraído com diclorometano a uma concentração de 0,198 mg/mL e b) Extraído com acetato de etilo a uma concentração de 0,154 mg/mL.

No espectro de absorção a), observam-se os picos característicos da clorofila. Após a remoção das clorofilas, no espectro de absorção os picos correspondentes às clorofilas desaparecem, indicando assim a sua remoção do extrato.^{120,121}

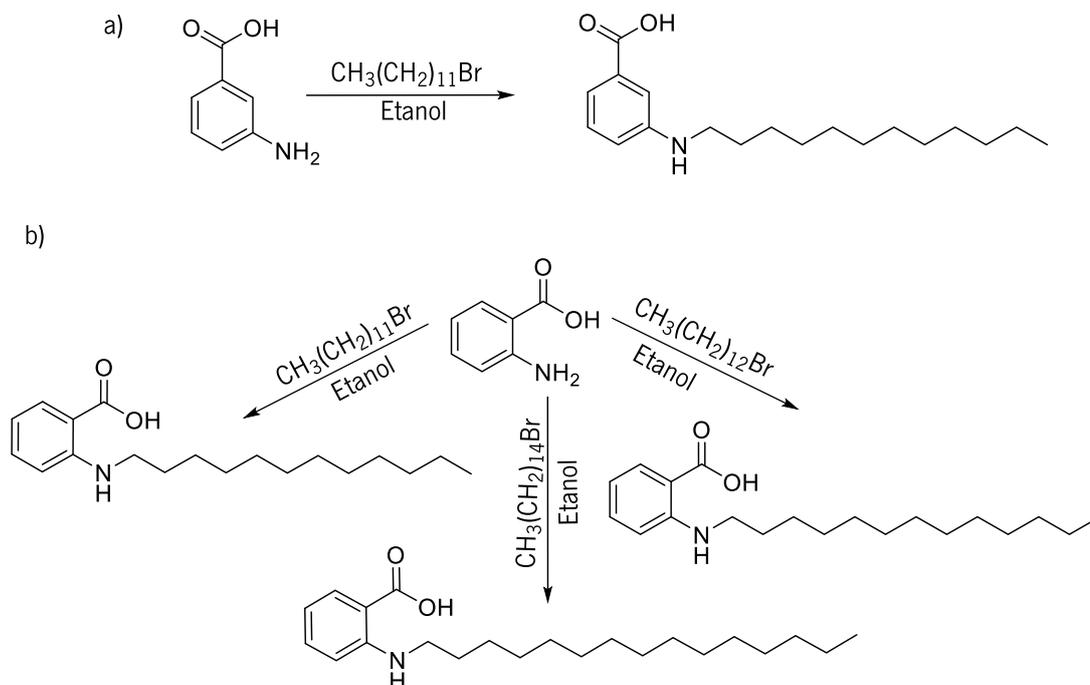
No espectro de absorção b), detetam-se também as duas bandas características das clorofilas. Depois da remoção, o desaparecimento das bandas mencionadas é notório, concluindo-se a ausência de clorofilas após a purificação.^{120,121}

Em comparação, os espectros de absorção a) e b), apesar de corresponderem a extratos extraídos com solventes diferentes, apresentam comportamento semelhante, indicando assim que os extratos devem ter composição idêntica. Após a remoção, a cor dos dois extratos muda, passando de verde para amarelo-acastanhado

4.3. SÍNTESE DE ANÁLOGOS

O ácido gínggólico presente em quantidades elevadas pode ser tóxico para o ser humano, mas por outro lado pode ser útil, nomeadamente como potencial biopesticida. Um dos objectivos deste trabalho consistiu na extração do ácido gínggólico e sua utilização como percursor para a síntese de derivados e determinar o seu potencial biológico. neste sentido foi obtido o derivado alquilado (número) por reacção do ácido gínggólico (número) com sulfato de dimetilo na presença de perfluohexano e trietilamina. O ácido gínggólico obtido possui na cadeia lateral com 17 carbonos e uma dupla ligação entre o carbono 10 e 11.

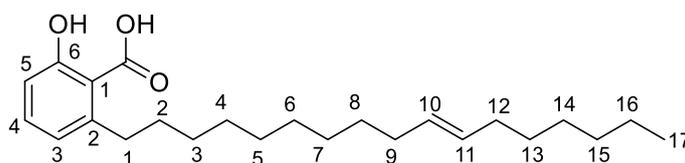
Em simultâneo foram preparados análogos do ácido gínggólico a partir do a) ácido 3-aminobenzóico e do b) ácido antranílico (esquema 9). Pretendeu-se com esta estratégia obter vários compostos de modo a avaliar a importância da presença de um heteroátomo (N) na cadeia lateral com diferentes comprimentos (13,14 e 16 átomos). Zhang, P & et al., que o aumento do comprimento de cadeia alifática e a adição de ligação dupla na cadeia alquil, aumentam atividade moluscicida.



Esquema 9 – Síntese de análogos sintéticos apartir: a) 3-aminobenzóico e b) ácido antranílico.

4.3.1. Extração do ácido gínggólico 17:1 **130**

O ácido-2-(heptadec-10-en-1-il) -6-hidroxi-benzóico (**130**), foi extraído das folhas de *Ginkgo biloba* L., por Soxhlet com diclorometano durante 4 horas. O extrato obtido foi caracterizado por espectroscopia de UV-Vis, RMN, IV e espectrometria de massa.

**130**

O espectro de de UV-vis foi obtido a uma concentração de 0,12 mg/ml em etanol, apresentando duas bandas significativos, um a 242 nm e outro 309 nm. Na literatura, o ácido gínggólico 17:1 em metanol, este apresenta também duas bandas, 243 nm e 310 nm, o que vai de encontro aos resultados obtidos.¹²⁴ Na tabela 9, estão indicados os valores máximos correspondentes às bandas referidas.

Tabela 9 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido gínggólico 17:1 a uma concentração de 0,12 mg/ml em etanol.

Comprimento de onda (nm)	Absorvância
242	0,542
309	0,319

O espectro de ¹H RMN indica a presença de um tripleto δ 0,88 ppm correspondente ao grupo metilo terminal da cadeia lateral e os prótons da ligação HC=CH, surgem como tripleto δ 5,35 ppm. Os prótons aromáticos surgem como tripleto δ 7,34 (H-4), duplo duplete a δ 6,87 (H-3), duplete a δ 6,78 (H-5). O ácido carboxílico está presente a δ 11,07 ppm como singlete. O espectro de carbono confirma a presença do grupo metil terminal δ 13,85 ppm e da dupla ligação a δ 129,9 ppm. Os carbonos do anel aromático estão surgem a δ 163,1 ppm (C-6), δ 147,7 ppm (C-2), δ 135,3 ppm (C-4), δ 122,7 (C-3), δ 115,8 ppm (C-5) e δ 110,5 ppm (C-1) e o sinal do grupo carboxílico aparece a δ 175,90 ppm.

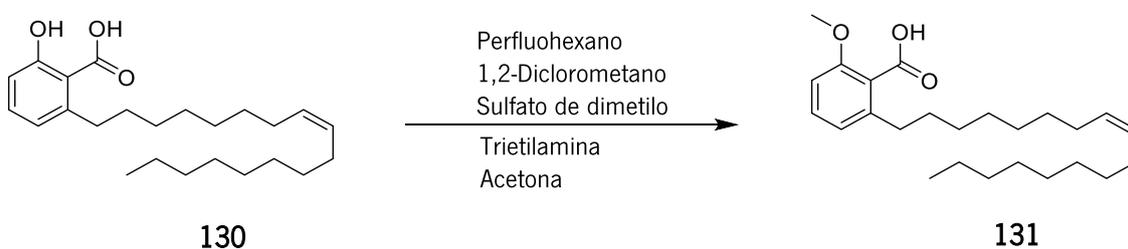
O espectro de infravermelho, apresenta bandas a 2922 e 2852 cm^{-1} são correspondentes ao estiramento do grupo O-H. As bandas a 1607 cm^{-1} , 1579 cm^{-1} e 1453 cm^{-1} , correspondem a

ligação C=C correspondente ao anel aromático. A 1302 cm^{-1} , 1246 cm^{-1} e 1202 cm^{-1} surgem bandas relativa à da ligação C-O do ácido carboxílico.¹¹²

O espectro de massa de baixa resolução apresenta um fragmento de massa 373,40 corresponde a $[M + H]^+$.

4.3.2. Alquilação do ácido ginkgólico 17:1 **131**

O método de alquilação do ácido ginkgólico foi adaptado do artigo de acordo com Jana, N. K. et al ¹¹¹, a reação de alquilação do ácido salicílico é efetuada em duas fases distintas com rendimento do produto alquilado de 90%. Inicialmente, são adicionados o perfluohexano, 1,2-dicloroetano e sulfato de dimetilo formando duas fases distintas ao qual é adicionado uma solução de ácido ginkgólico 17:1 em acetona e trietilamina (esquema 10). O produto alquilado composto **131** foi obtido após purificação por cromatografia de coluna usando uma mistura de éter de petróleo/diclorometano (1:1).



Esquema 10–Reação de alquilação do ácido ginkgólico 17:1.

O espectro UV-Vis do composto alquilado **131** em etanol ($c= 0,17\text{ mg/mL}$) indica a presença de 2 bandas a 245 nm e 312 nm (tabela 10); estes valores são semelhantes aos valores obtidos para o ácido ginkgólico.

Tabela 10 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima do ácido ginkgólico alquilado a uma concentração de 0,17 mg/mL em etanol.

Comprimento de onda (nm)	Absorvância
245	0,104
312	0,051

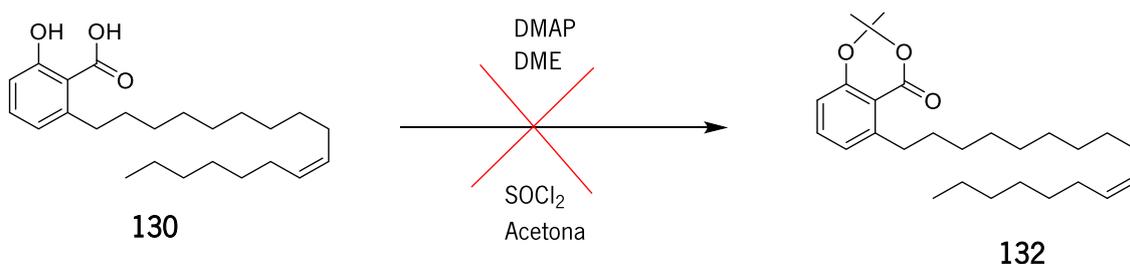
O espectro de ^1H RMN apresenta um singlete a $\delta 11,11$ ppm, corresponde ao CO_2H e os prótons relativos à dupla ligação surgem na forma de multiplete a $\delta 5,37$ ppm. O sinal correspondente ao OCH_3 surge como um singlete a $\delta 3,97$ ppm. Os restantes prótons da cadeia lateral surgem entre 3,0 e 0,9 ppm. A principal característica do espectro de ^{13}C RMN é a presença de um sinal a $\delta 52,12$ relativo ao OCH_3 , o que confirma o produto alquilado.

O espectro de IV apresenta bandas a 2925 e 2854 cm^{-1} correspondentes a ligação O-H do ácido carboxílico. Surge também uma banda a 1736 cm^{-1} , correspondente a ligação C=O do ácido carboxílico indo de encontro com a literatura ($1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$). As ligações C=C do anel aromático a 1609 cm^{-1} , 1577 cm^{-1} e 1449 cm^{-1} .¹¹²

A espectroscopia de massa de baixa resolução apresenta um fragmento de massa $388,58$, correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.3.3. Tentativa da reação de proteção no ácido ginkgólico 17:1 132

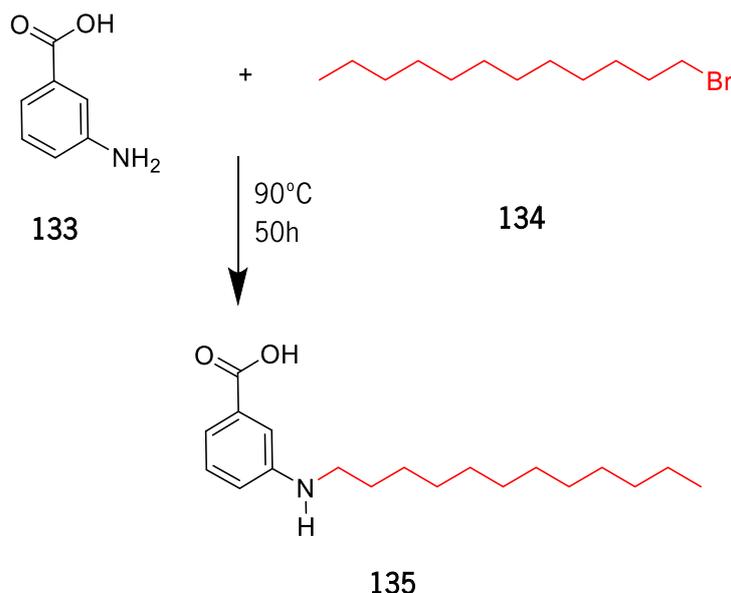
A reação de proteção do ácido ginkgólico efectuada de acordo com as condições indicadas por Fu *et al.*, usando DMAP como catalisador, mas o espectro de ^1H RMN indica que o composto **132** não foi obtido.⁸⁴ Estas condições reacionais foram repetidas, mas o resultado indicava sempre que o produto esperado não se formava.



Esquema 11– Tentativa de reação de proteção do ácido ginkgólico 17:1.

4.3.4. Síntese do ácido 3-dodecilaminobenzóico

A uma solução de ácido 3 – aminobenzóico em etanol foi adicionado 1 – bromododecano (5 eq) e a solução resultante foi refluxada durante cerca de 50 horas (esquema 12). Após o tratamento da mistura reacional o produto alquilado **135** foi obtido após a purificação por cromatografia em coluna usando uma mistura de solventes diclorometano/metanol (97:3).⁹³



Esquema 12 – Representação esquemática da síntese do análogo 3- dodecilaminobenzóico.

O espectro UV-Vis de **135** ($c = 0,2 \text{ mg/mL}$) apresenta três bandas a 227, 257 e 340 nm (tabela 11). Os resultados vão de acordo com a literatura.¹²³

Tabela 11 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 3-dodecilaminobenzóico a uma concentração de 0,2 mg/ml em etanol.

Comprimento de onda (nm)	Absorvância
227	0,582
257	0,194
340	0,048

Os espectros de ^1H RMN, apresentam um sinal a $\delta 5,81$ ppm correspondente ao grupo NH. Os prótons do anel aromático surgem como três sinais distintos, um tripleto ($J = 7,6 \text{ Hz}$) correspondente a H-6, um multipletto relativo ao H-2 + H-5 $\delta 7,12-7,08$ ppm e um dupletto a $\delta 6,6$

($J=6,8$ Hz) correspondente ao H-4.

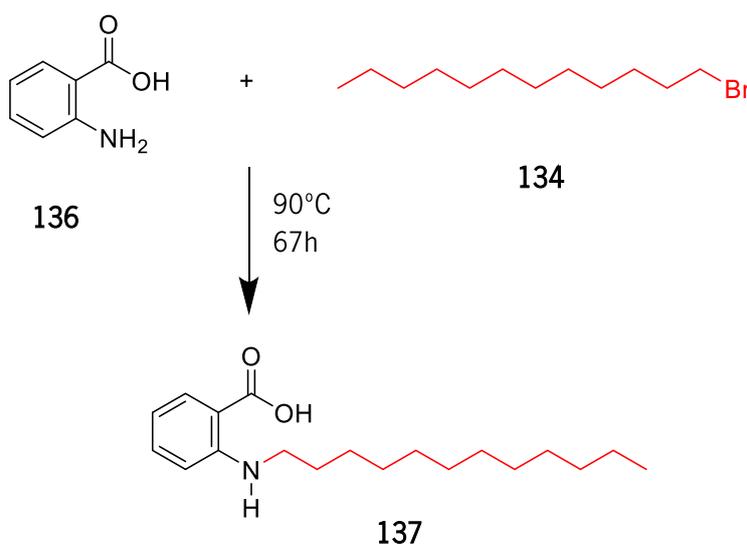
Relativamente à cadeia lateral surge um tripleto relativo ao grupo CH_3 terminal com $J=7,2$ Hz; os prótons metilénicos junto ao N-H surge como um tripleto a $\delta 2,96$ com $J=7,2$ Hz. O espectro de ^{13}C indica a presença de um sinal a $\delta 168,6$ ppm relativo ao grupo $\text{C}=\text{O}$; seis sinais entre $\delta 149$ e $\delta 113$ ppm relativos aos carbonos do anel aromático, dos quais os sinais a $\delta 149$ ppm e $\delta 131,7$ ppm correspondem aos carbonos quartenários. O DEPT 135 confirma a presença de 11 grupos metilénicos.

As principais características do espectro de IV são a presença de uma banda a 2955 cm^{-1} e 2922 cm^{-1} relativa aos C-H da cadeia lateral; A 1679 cm^{-1} surge uma banda relativa ao grupo carbonilo; A presença do grupo N-Hé confirmada pela banda a 1587 cm^{-1} .¹¹²

O espectro de massa (HRMS) confirma a presença do composto através de um sinal de massa $306,2428$ correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.3.5. Síntese do ácido 2-dodecilaminobenzóico **137**

O ácido **137** foi preparado por reação de ácido antranílico com 1 – bromododecano (0,5 eq) em refluxo em etanol durante 67h (esquema 13). O produto foi purificado por cromatografia por coluna, usando uma mistura de solventes diclorometano/metanol 98:2.⁹³



Esquema 13 – Representação esquemática da síntese do análogo 2- dodecilaminobenzóico.

O espectro UV-Vis de **137** ($c= 0,2$ mg/mL) apresenta três bandas a 222, 256 e 355 nm (tabela 12). Os resultados vão de acordo com a literatura.¹²⁴

Tabela 12 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 2-dodecilaminobenzoico a uma concentração de 1,2 mg/ml em etanol.

Comprimento de onda (nm)	Absorvância
222	0,497
256	0,184
355	0,095

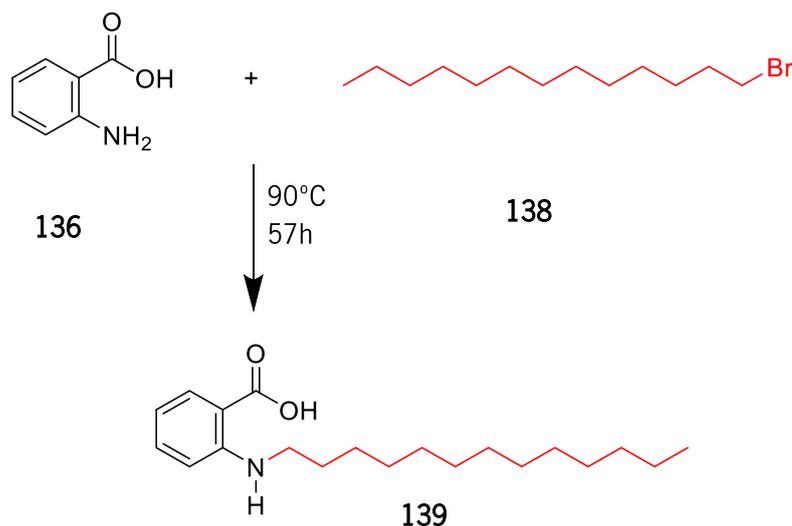
Os espectros de ^1H RMN, apresentam vários sinais dos prótons do anel aromático surgem como quatro sinais distintos, um duplo duplete a $\delta 7,76$ ($J= 6,4$ e $1,6$ Hz) correspondente a H-6, um duplo tripleto $\delta 7,33$ ppm correspondente H-4, um duplete a $\delta 6,69$ ($J= 8,4$ Hz) correspondente ao H-3 e um tripleto a $\delta 6,52$ (H-5). Relativamente à cadeia lateral surge $\delta 0,84$ um tripleto relativo ao grupo CH_3 terminal com $J= 6,8$ Hz. O espectro de ^{13}C indica a presença de um sinal a $\delta 170,06$ ppm relativo ao grupo $\text{C}=\text{O}$; seis sinais entre $\delta 150$ e $\delta 110$ ppm relativos aos carbonos do anel aromático; o sinal correspondente ao grupo CH_3 surge a $\delta 13,93$ ppm.

As principais características do espectro de IV são a presença de uma banda a 2918 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} relativa aos C-H da cadeia lateral; a 1669 cm^{-1} surge uma banda relativa ao grupo carbonilo; a presença do grupo N-H é confirmada pela banda a 1579 cm^{-1} ; as ligações C=C dos anéis aromáticos surge a 1579 cm^{-1} e a 1415 cm^{-1} .¹¹²

O espectro de massa (HRMS) confirma a presença do composto através de um sinal de massa 306,2428 correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.3.6. Síntese do ácido 2-tridecilaminobenzóico **139**

O ácido **139** foi preparado por reação de ácido antranílico com 1 – bromotridecano (2 eq) em refluxo em etanol durante 57h (esquema 14). O produto foi purificado por cromatografia por coluna, usando uma mistura de solventes diclorometano/metanol 98:2.⁹³



Esquema 14– Representação esquemática da síntese do análogo 2- tridecilaminobenzóico.

O espectro UV-Vis de **139** (c= 0,08 mg/mL) apresenta três bandas a 221, 256 e 355 nm (tabela 13). Os resultados vão de acordo com a literatura.¹²⁴

Tabela 13 – Comprimento de onda (nm) e absorção máxima da estrutura ácido 2 – tridecilaminobenzóico, a uma concentração de 0,08 mg/mL.

Comprimento de onda (nm)	Absorvância
221	0,324
256	0,124
355	0,061

Os espectros de ¹H RMN, apresentam vários sinais dos prótons do anel aromático surgem como quatro sinais distinto, um duplo duplete a δ 7,76 (J = 6,4 e 1,6 Hz) correspondente a H-6, um duplo tripleto δ 7,33 ppm (J = 6,8 e 1,6 Hz) correspondente H-4, um duplete a δ 6,69 (J= 8 Hz) correspondente ao H-3 e um tripleto a δ 6,52 (J= 8 Hz) correspondente H-5.

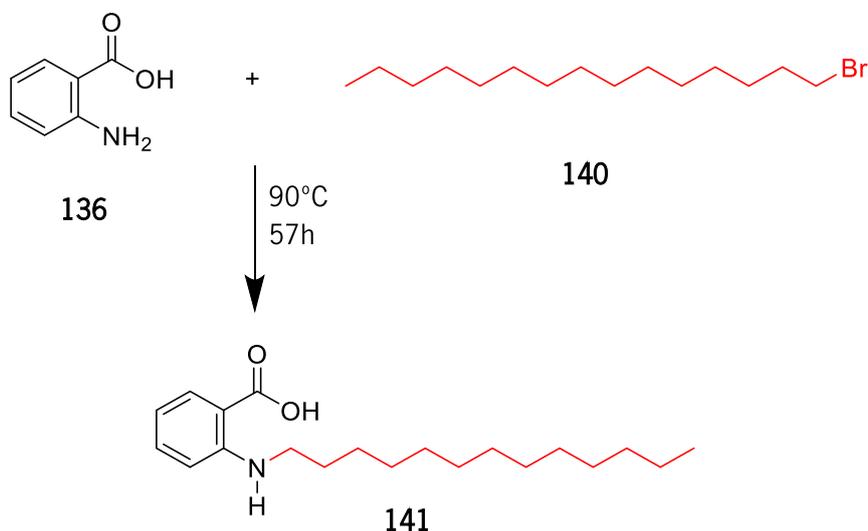
Relativamente à cadeia lateral surge $\delta 0,84$ um tripleto relativo ao grupo CH_3 terminal com $J = 6,8$ Hz. O espectro de ^{13}C indica a presença de um sinal a $\delta 170,04$ ppm relativo ao grupo $\text{C}=\text{O}$; seis sinais entre $\delta 151$ e $\delta 107$ ppm relativos aos carbonos do anel aromático; o sinal correspondente ao grupo CH_2 surge a $\delta 41,95$ ppm.

As principais características do espectro de IV são a presença de uma banda a 2917 cm^{-1} e 2848 cm^{-1} relativa aos C-H da cadeia lateral; a 1668 cm^{-1} surge uma banda relativa ao grupo carbonilo; as ligações C=C dos anéis aromáticos surge a 1580 cm^{-1} e a 1415 cm^{-1} .¹¹²

O espectro de massa (HRMS) confirma a presença do composto através de um sinal de massa $320,2588$ correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.3.7. Síntese do ácido 2-pentadecilaminobenzóico **141**

O ácido **141** foi preparado por reação de ácido antranílico com 1 – bromopentadecano (2 eq) em refluxo em etanol durante 57h (esquema 15). O produto foi purificado por cromatografia por coluna, usando uma mistura de solventes diclorometano/metanol 98:2.⁹³



Esquema 15 – Representação esquemática da síntese do análogo 2- pentadecilaminobenzóico.

O espectro UV-Vis de **141** ($c = 0,07$ mg/mL) apresenta três bandas a 209, 296 e 355 nm (tabela 13). Os resultados vão de acordo com a literatura¹²⁴.

Tabela 14 - Comprimento de onda e absorção máxima da estrutura ácido 2-pentadecilaminobenzoico a uma concentração de 0,07 mg/mL em etanol.

Comprimento de onda (nm)	Absorvância
209	0,108
296	0,038
355	0,029

Os espectros de ^1H RMN, apresentam vários sinais dos prótons do anel aromático surgem como quatro sinais distintos, um duplo duplete a $\delta 7,76$ correspondente a H-6, um duplo triplete $\delta 7,33$ ppm ($J = 6,8$ e $1,6$ Hz) correspondente H-4, um duplete a $\delta 6,69$ ($J = 8$ Hz) correspondente ao H-3 e um triplete a $\delta 6,52$ ($J = 7,2$ Hz) correspondente H-5. Relativamente à cadeia lateral surge $\delta 0,84$ um triplete relativo ao grupo CH_3 terminal com $J = 6,8$ Hz. O espectro de ^{13}C indica a presença de um sinal a $\delta 170,04$ ppm relativo ao grupo $\text{C}=\text{O}$; seis sinais entre $\delta 151$ e $\delta 107$ ppm relativos aos carbonos do anel aromático; o sinal correspondente ao grupo CH_3 terminal surge a $\delta 13,93$ ppm.

As principais características do espectro de IV são a presença de uma banda a 2919 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} relativa aos C-H da cadeia lateral; a 1665 cm^{-1} surge uma banda relativa ao grupo carbonilo; as ligações $\text{C}=\text{C}$ dos anéis aromáticos surge a 1581 cm^{-1} e a 1467 cm^{-1} .¹¹²

O espectro de massa (HRMS) confirma a presença do composto através de um sinal de massa 348, 2895 correspondente a $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4.4. ENSAIOS DE NANOENCAPSULAMENTO E LIBERTAÇÃO

Os ensaios de nanoencapsulamento foram realizados em lipossomas preparados por duas técnicas (injeção etanólica e hidratação de filme fino lipídico) e em nanoemulsões de quitosano. Para a preparação dos lipossomas foi usada a lecitina de soja, que é utilizada em vários processos industriais nas áreas alimentar, farmacêutica e têxtil.¹²⁵ O quitosano é um biopolímero natural que apresenta características favoráveis tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e utilização económica. As nanoemulsões foram produzidas pelo método de gelificação iónica.¹⁰⁴

Estes ensaios permitiram determinar a eficiência de encapsulamento (EE%) dos extratos de *Ruta graveolens* L. (arruda), *Phytolacca americana* L. (Erva-tintureira), *Mentha suaveolens* Ehrh. (mentrastos) e *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb (sargacinha), usando uma curva de calibração (absorvância em função da concentração) previamente obtida para cada extrato. A eficiência de encapsulamento é dada por:

$$EE(\%) = \frac{\text{Quantidade total} - \text{Quantidade não encapsulada}}{\text{Quantidade total}} \times 100$$

Posteriormente, a liberação controlada para uma solução tampão Tris-HCl de pH=7.28 foi monitorizada durante 48 horas, para cada um dos extratos referidos.

4.4.1. Reta de calibração

Para determinar as retas de calibração da absorvância em função da concentração, cada extrato foi diluído em tampão Tris-HCl, numa gama de concentrações em que se obtém uma relação linear, de acordo com a lei de Lambert-Beer (Figuras 53 a 56).

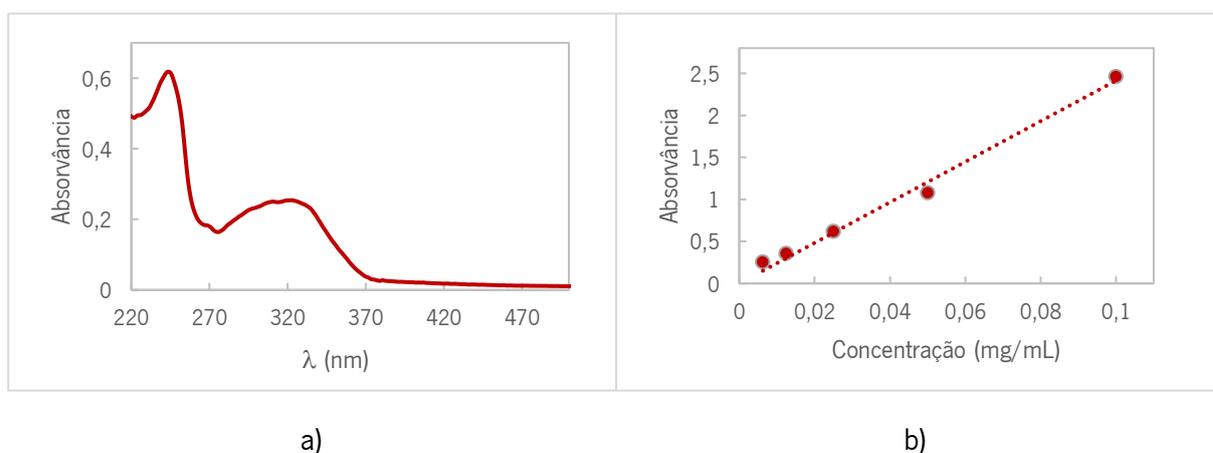


Figura 53- a) Espectro de absorção do extrato de *Ruta graveolens* L. b) Curva de calibração de *Ruta graveolens* L. (absorvância vs. concentração).

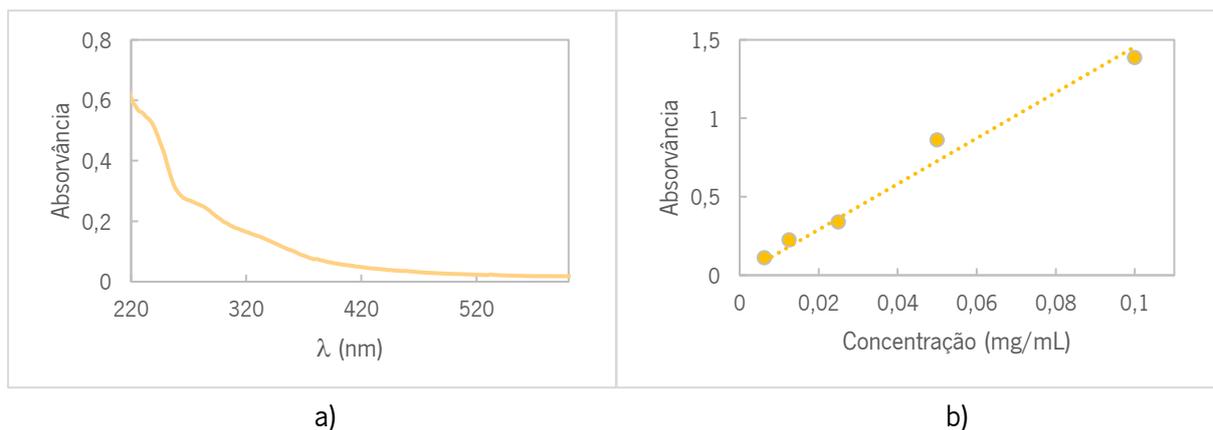


Figura 54 - a) Espectro de absorção do extrato de *Mentha suaveolens* Ehrh. b) Curva de calibração de *Mentha suaveolens* Ehrh. (absorvância vs. concentração).

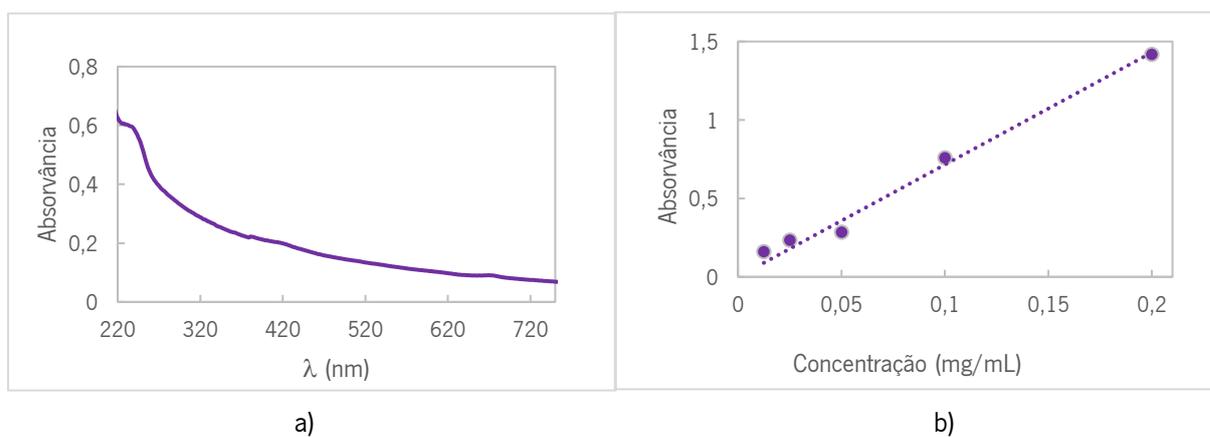


Figura 55 - a) Espectro de absorção do extrato de *Phytolacca americana* L. b) Curva de calibração de *Phytolacca americana* L. (absorvância vs. concentração).

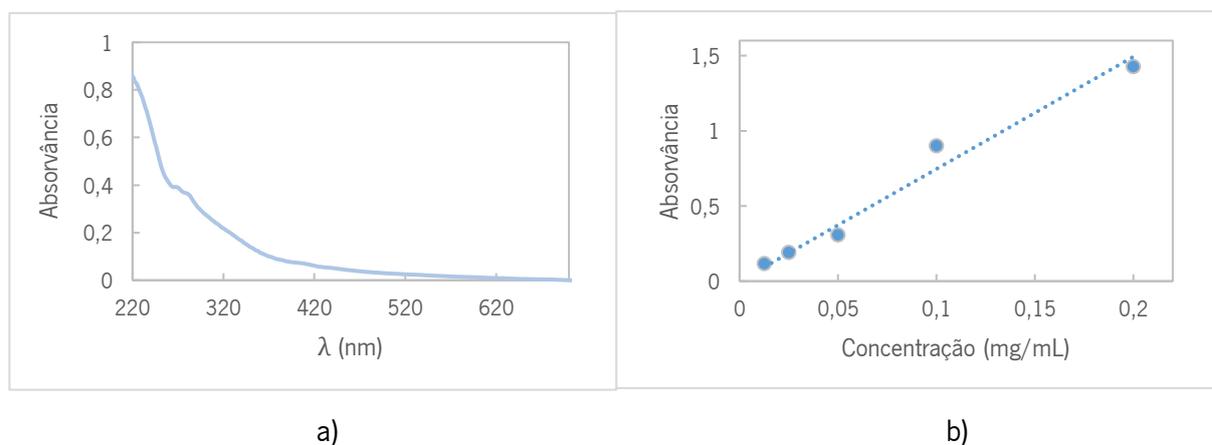


Figura 56 - a) Espectro de absorção do extrato de *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb. b) Curva de calibração de *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb (absorvância vs. concentração).

4.4.2. Eficácia de encapsulamento

Na tabela seguinte, apresenta-se a eficiência de encapsulamento (EE%) e respetivo desvio padrão (DP) dos quatro extratos selecionados nos três tipos de nanossistemas preparados, tendo sido realizados três ensaios independentes.

A técnica de hidratação de filme fino lipídico tem sido amplamente utilizada para incorporação de compostos hidrofílicos em lipossomas,¹²⁶ enquanto a técnica de injeção etanólica tem revelado elevadas taxas de encapsulamento quando utilizada para incorporar compostos hidrofóbicos e lipofílicos em nanossistemas lipídicos.¹²⁷

Tabela 15 – Eficiência de Encapsulamento (EE% ± DP%) para os extratos de várias espécies vegetais em lipossomas e nanoemulsões de quitosano (DP: desvio padrão de três ensaios independentes)

	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh. (mentrastos)	<i>Lithodora prostrata</i> (Loisel.) Griseb (sargacinha)	<i>Phytolacca americana</i> L. (Erva-tintureira)	<i>Ruta graveolens</i> L. (arruda)
Lipossomas por injeção etanólica	84.0 ± 6	88 ± 11	77.5 ± 6	93.3 ± 6
Lipossomas por hidratação de filme lipídico	81 ± 13	97.3 ± 3	73.3 ± 5	73.0 ± 9
Nanoemulsões de quitosano	60.7 ± 4	81 ± 19	63 ± 19	94.0 ± 2

Estes resultados sugerem que o método de injeção etanólica é o mais adequado para o encapsulamento da espécie *Ruta graveolens* L. em lipossomas, sendo a taxa de encapsulamento também muito elevada em nanoemulsões de quitosano. Para o extrato de *Mentha suaveolens* Ehrh., a eficiência de encapsulamento ultrapassa 80% em lipossomas, para ambas as técnicas de preparação, enquanto em nanoemulsões de quitosano ronda os 60%.

Os lipossomas são melhores agentes encapsulantes para *Phytolacca americana* L. do que as nanoemulsões de quitosano, não havendo grande diferença entre as duas técnicas de preparação dos lipossomas. Os lipossomas por hidratação de filme fino lipídico mostram uma eficiência de encapsulamento extremamente elevada para o extrato de *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb, muito próximo do encapsulamento completo. Tal poderá ser reflexo de uma maior

hidrofilicidade deste extrato, comparativamente aos restantes, uma vez que é o extrato para o qual os lipossomas preparados por hidratação de filme lipídico são mais eficientes.

4.4.3. Caracterização por Difusão Dinâmica de Luz (DLS)

O tamanho e o índice de polidispersividade (Pdl) dos nanossistemas produzidos foram determinados por Difusão Dinâmica de Luz (DLS), encontrando-se os resultados na tabela 16.

Tabela 16 – Diâmetro e polidispersividade (pdl) para os lipossomas e nanoemulsões de quitosano determinados por DLS.

	Diâmetro (nm)	Pdl
Lipossomas por injeção etanólica	234	0,320
Lipossomas por hidratação de filme lipídico	301,5	0,256
Nanoemulsões de quitosano	11,95 117,59	0,415

Os resultados de DLS mostram que os lipossomas preparados por injeção etanólica têm menor tamanho que os de hidratação de filme fino lipídico, embora apresentem uma maior polidispersividade.

Para as nanoemulsões de quitosano, obtidas pelo mesmo método de preparação aqui utilizado, foi reportado um tamanho de 100 nm e uma polidispersividade de 0,325¹⁰³. Neste caso, o tamanho das nanoemulsões é concordante, mas observam-se algumas estruturas de menor tamanho (possivelmente estruturas de tipo micelar invertido), o que contribui para uma maior polidispersividade.

4.4.4. Ensaio de libertação controlada

Foram realizados ensaios de libertação controlada, à temperatura de 25 °C, em tampão Tris-HCl de pH=7.28, para os três tipos de nanossistemas com os quatro extratos referidos. Os ensaios foram realizados com uma duração de 48 horas.

Na figura 57, apresentam-se os perfis de liberação cumulativa do extrato de *Ruta graveolens* L. em função do tempo. Pode observar-se que as nanoemulsões de quitosano permitem uma liberação quase completa do extrato decorridas 30 horas, enquanto os lipossomas produzidos por hidratação de filme fino lipídico libertam apenas 30% do seu conteúdo.

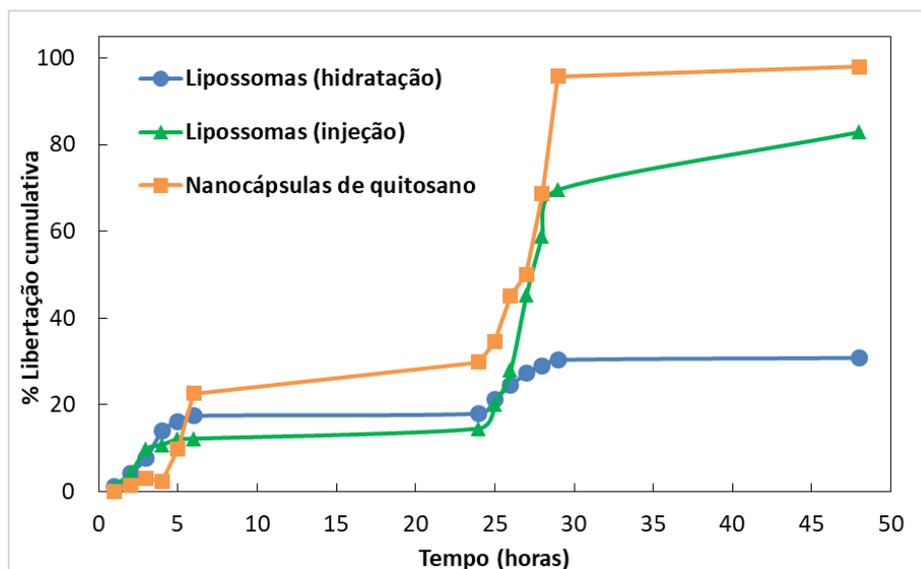


Figura 57 – Perfis de liberação do extrato de *Ruta graveolens* L. em função do tempo nos três sistemas de encapsulamento testados.

A figura 58 mostra os perfis de liberação para o extrato de *Mentha suaveolens* Ehrh., verificando-se que as nanoemulsões de quitosano são os nanossistemas mais efetivos a libertar este extrato (tal como nos restantes casos). Os lipossomas são muito pouco efetivos para esta liberação, em especial os de injeção, que libertam menos de 20% de extrato em 48 horas. Realizou-se ainda um ensaio em que, para *Mentha suaveolens* Ehrh. em lipossomas preparados por injeção, se prolongou a liberação por 72 horas, tendo-se obtido uma liberação de cerca de 70% do extrato (gráfico inserido na figura 58).

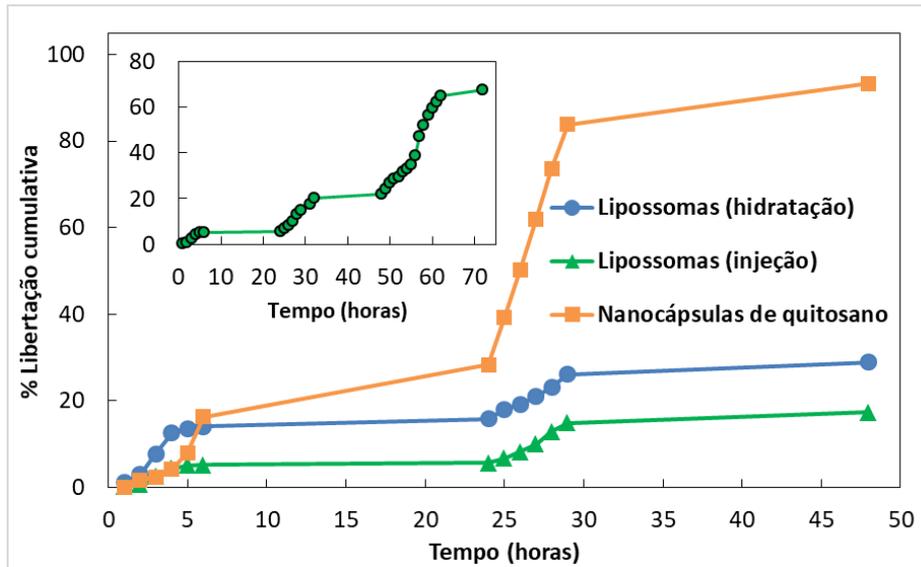


Figura 58 – Perfis de liberação do extrato de *Mentha suaveolens* Ehrh. em função do tempo nos três sistemas de encapsulamento testados.

Na figura 59, podem observar-se os perfis de liberação cumulativa do extrato de *Phytolacca americana* L. durante 48 horas. Neste caso, os três tipos de nanossistemas apresentam um comportamento mais similar entre si. Tal como no caso anterior, as nanoemulsões de quitosano são o nanossistema que permite uma maior liberação, com liberação completa ao fim de 27 horas. Os lipossomas produzidos por ambas as técnicas de preparação permitem libertar cerca de 80% do conteúdo às 48 horas, sendo o perfil de liberação mais lento inicialmente no caso dos lipossomas por hidratação de filme fino

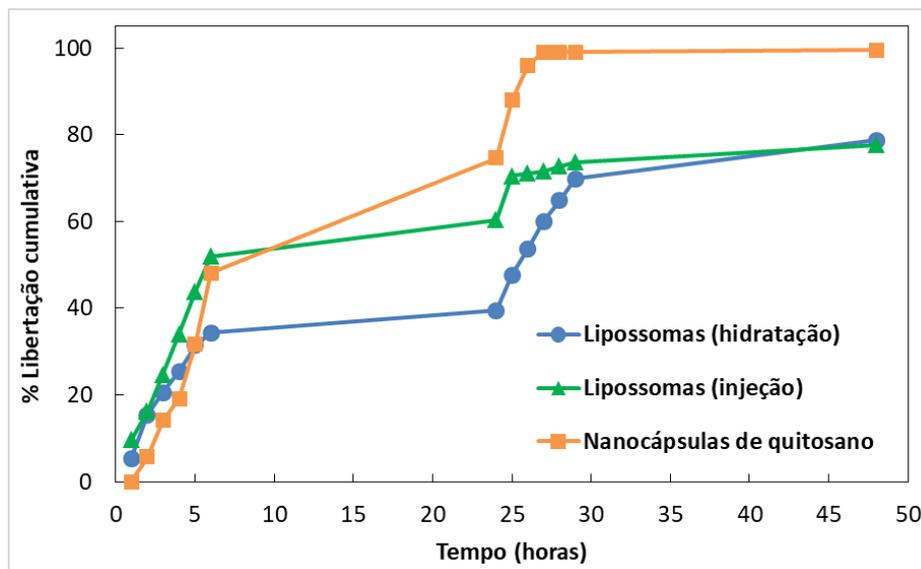


Figura 59 – Perfis de liberação do extrato de *Phytolacca americana* L. em função do tempo nos três sistemas de encapsulamento testados.

Considerando o extrato de *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb., é possível observar uma maior liberação para as nanoemulsões de quitosano, tal como nos casos anteriores. Os lipossomas obtidos por hidratação de filme fino são mais efetivos a libertar este extrato que os de injeção, que exibem uma liberação mais lenta e em menor quantidade.

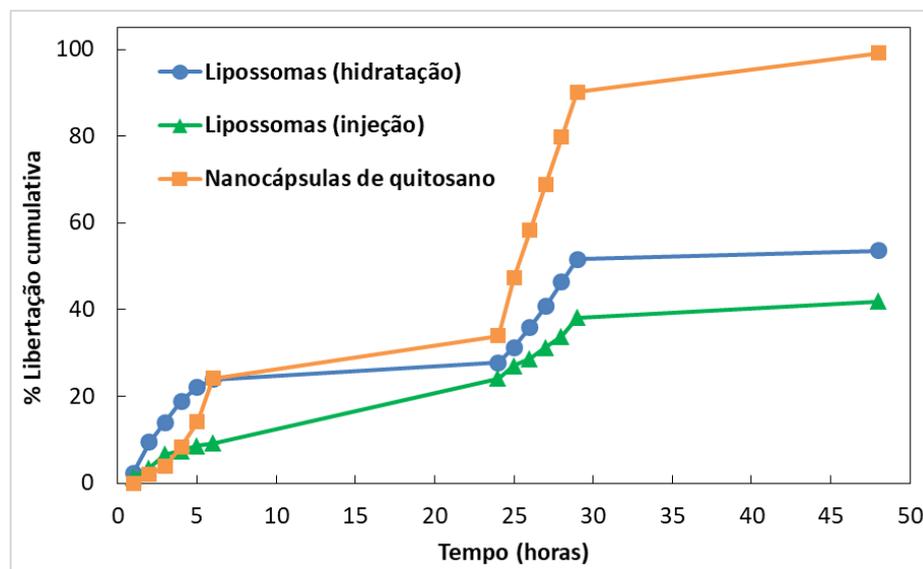


Figura 60 – Perfis de liberação do extrato de *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb. em função do tempo nos três sistemas de encapsulamento testados.

De um modo geral, pode concluir-se que, se for pretendida uma liberação mais rápida e efetiva do extrato, devem escolher-se as nanoemulsões de quitosano, que libertam completamente todos os extratos em 48 horas. Se for pretendido um efeito mais lento, em que o agente ativo é libertado durante mais tempo, num processo retardado, devem ser escolhidos os lipossomas.

4.5. ATIVIDADE INSETICIDA

A potencial atividade inseticida de alguns dos extratos foi avaliada usando a linha celular de insetos *Sf9*, um clone isolado da linha de células *Spodoptera frugiperda* Sf21 (IPLB-Sf21-AE). Os resultados foram obtidos por MTT, estando apresentados nas figuras 61 a 64.

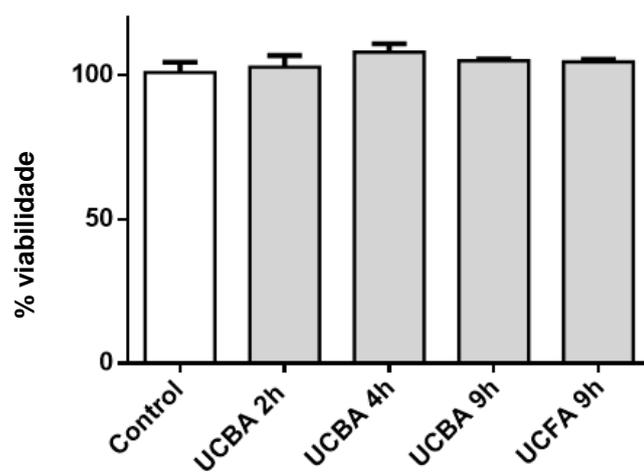


Figura 61 - Efeito dos extratos de etanol: água (1:1) de bagas e folhas de *Phytolacca americana* L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: UCBA 2h: Bagas, 2h de extração; UCBA 4h: Bagas, 4h de extração; UCBA 9h: Bagas, 9h de extração; UCFA 9h: Folhas, 9h de extração. Os resultados correspondem à média \pm DP de, pelo menos, três ensaios independentes.

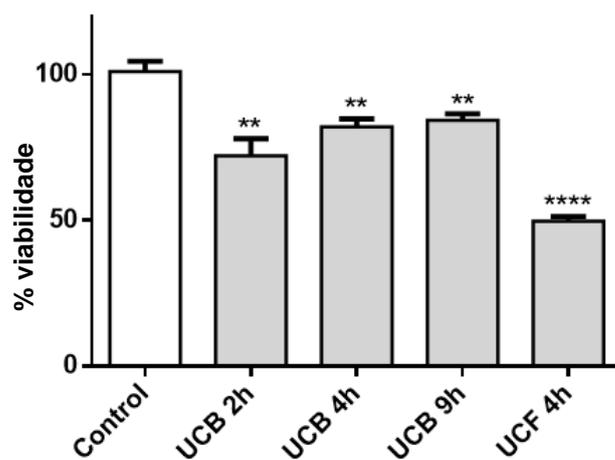


Figura 62 – Efeito dos extratos de diclorometano de bagas e folhas de *Phytolacca americana* L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: UCB 2h: Bagas, 2h de extração; UCB 4h: Bagas, 4h de extração; UCB 9h: Bagas, 9h de extração; UCF 4h: Folhas, 4h de extração. Os resultados correspondem à média \pm DP de, pelo menos, três ensaios independentes. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

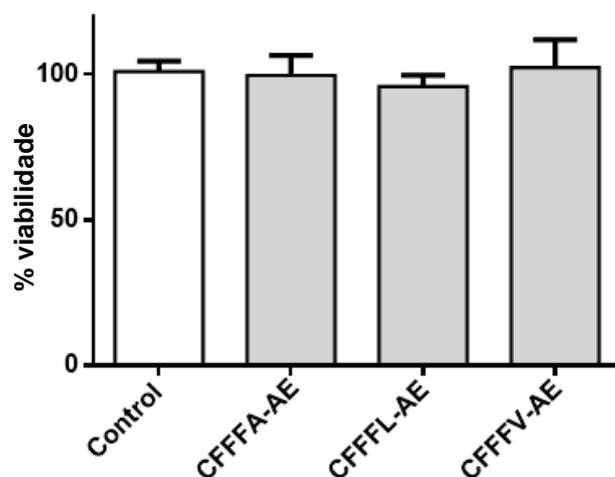


Figura 63 – Efeito dos extratos de etanol: água (1:1) de folhas de flores de *Tagetes patula* L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: CFFFA-AE: folhas das flores amarelas, 9h de extração; CFFFL-AE 9h: folhas de flores laranja, 9h de extração; CFFV-AE: folhas de flores vermelhas, 9h de extração. Os resultados correspondem à média \pm DP de, pelo menos, três ensaios independentes.

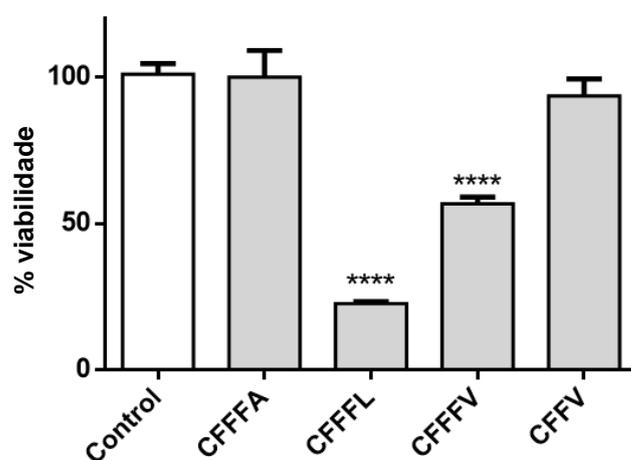


Figura 64 – Efeito dos extratos de diclorometano de folhas e flores de *Tagetes patula* L. na viabilidade da membrana na linha celular Sf9. As células foram incubadas com concentrações de 0,25 mg/mL durante 24 horas. Legenda: CFFFA: folhas das flores amarelas, 4h de extração; CFFFL: folhas de flores laranja, 4h de extração; CFFV: folhas de flores vermelhas, 4h de extração; CFFV: flores vermelhas, 4h de extração. Os resultados correspondem à média \pm DP de, pelo menos, três ensaios independentes. **** $p < 0,0001$

Nas figuras 61 e 64, é possível concluir que os extratos etanol/água 1:1 não apresentam potencial inseticida. Os extratos em diclorometano (figuras 61 e 63) apresentam atividade inseticida muito promissora no caso das folhas de *Phytolacca americana* L. (figura 61) e das folhas das flores laranja e vermelhas de *Tagetes patula* L. (figura 63), sendo as primeiras as mais ativas.

Foram ainda realizados ensaios de atividade com esta linha celular de insetos no caso do ácido gínggólico alquilado, com várias concentrações (figura 65).

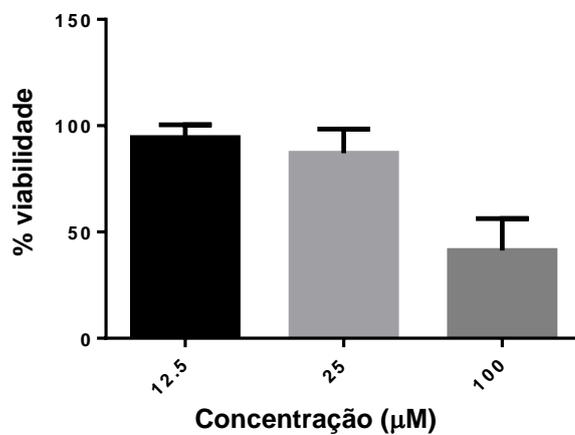


Figura 65 – Viabilidade celular da membrana da linha celular Sf9 para o ácido gínggólico alquilado.

O análogo sintético alquilado do ácido gínggólico apresenta atividade inseticida com o aumento da concentração, sendo a viabilidade celular da linha de insetos Sf9 inferior a 50% para a concentração de 100 µM.

Capítulo 5 – Conclusão e perspectivas futuras

5.1. CONCLUSÃO

As plantas possuem uma elevada diversidade fitoquímica, na qual muitos compostos apresentam atividade biológica. A instabilidade de alguns fitoquímicos é um problema para possíveis aplicações, no entanto esta instabilidade pode ser minimizada pelo recurso a técnicas de nanoencapsulamento. Neste trabalho foram selecionadas as espécies *Prunus lusitanica* L., *Mentha suaveolens* Ehrh, *Camellia japonica* L., *Ulex europaeus* L., *Phytolacca americana* L., *Chelidonium majus* L., *Tagetes patula* L., *Ruta graveolens* L., *Punica granatum* L., e *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb. e *Ginkgo biloba* L., para obtenção de extratos por recurso à extração por Soxhlet com solventes de polaridades distintas. Os extratos obtidos das folhas de *Phytolacca americana* L. e das folhas das flores laranja e vermelhas de *Tagetes patula* L., apresentam atividade inseticida na linha celular Sf9. O derivado alquilado do ácido ginkgólico obtido foi caracterizado por RMN, UV, IV e EM e foi avaliado o seu potencial inseticida, tendo-se verificado que aumento da concentração da amostra provoca um aumento do seu potencial inseticida. Análogos do ácido ginkgólico preparados a partir do ácido antranílico e do ácido aminobenzóico foram também caracterizados e enviados para ensaios biológicos.

As clorofilas presentes nos extratos em diclorometano obtidos da parte foliar de *Phytolacca americana* L., *Tagetes patula* L., *Ulex europaeus* L., *Prunus lusitanica* L., *Camellia japonica* L., *Lithodora prostrata* L., *Mentha suaveolens* Ehrh. e *Rute graveolens* L. foram removidas por cromatografia usando uma coluna Chromabond C18, de modo a reduzir a presença de interferentes indesejáveis que possam influenciar os testes biológicos.

As bagas de *Phytolacca americana* L. e as folhas de *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb, *Mentha suaveolens* Ehrh. e *Rute graveolens* L. foram sujeitas a estudos de encapsulamento e de libertação controlada em nanossistemas lipídicos e nas nanoemulsões de quitosano. Provou-se que os sistemas de encapsulamento mais adequados para as espécies selecionadas são os sistemas lipídicos. Para *Phytolacca americana* L., *Mentha suaveolens* Ehrh. e *Rute graveolens* L., os lipossomas por injeção etanólica apresentam maior taxa de encapsulamento, enquanto para *Lithodora prostrata* (Loisel.) Griseb os lipossomas por hidratação lipídica apresentam encapsulamento com uma taxa perto de 100%, podendo ser indicativo de maior hidrofiliidade. Nos ensaios de libertação, observou-se que as nanoemulsões de quitosano libertam completamente o extrato de forma eficaz ao fim de 48 horas e, para uma libertação mais lenta, o

ideal seriam os nanossistemas lipídicos. Relativamente ao tamanho e polidispersividade dos nanossistemas escolhidos, verifica-se que os lipossomas por injeção etanólica apresentam um tamanho inferior ao dos lipossomas pelo método de hidratação lipídica, mas apresentam uma polidispersividade maior. As nanoemulsões de quitosano apresentam dois tamanhos distintos e uma polidispersividade maior, sendo indicação da presença de estruturas micelares invertidas.

5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho futuro deverá envolver uma caracterização detalhada da composição dos extratos. A síntese de novos derivados e análogos do ácido ginkgólico será também um objetivo futuro. Os compostos a obter serão avaliados em relação à sua atividade biológica, antes e após encapsulamento. Os compostos que venham a revelar atividade biológica promissora como inseticidas serão testados em formulações de biopesticidas.

Capítulo 6 – Bibliografía

- [1] Dillard, C. J., & German, J. B. Review Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric.* **2000**, 80, 1744- 1756.
- [2] Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. Phytochemistry of Medicinal Plants. *J Pharmacogn Phytochem.* **2013**, 1(6), 168–182.
- [3] Howes, M. R. Phytochemicals as Anti-inflammatory Nutraceuticals and Phytopharmaceuticals. Immunity and Inflammation in Health and Disease. *Elsevier Inc.* **2018**, 28, 363-388.
- [4] Cunha, A. P. Farmacognosia e Fitoquímica. *Fundação Calouste Gulbenkian.* **2014**,
- [5] Lobo, A. M., & Lourenço, A. M. Biossíntese de produtos naturais. *IST Press.* **2007**,
- [6] Mossa, A. T. H. Green Pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Int J Environ Sci Technol.* **2016**, 9(5), 354–378.
- [7] Koul, O., Suresh, W., & Dhaliwal, G. Essential oils a green pesticide: Potential and constraints. *Biopestic Int.* **2008**, 4(1), 63–84.
- [8] Prunus lusitanica Portugal Laurel PFAF Plant Database. Retrieved May 29, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Prunus+lusitanica>
- [9] Brussels, H. W. A., Hoof, A. C. V. D. K., Bosch, J. J. K.D., & Salamink, C. A. Triterpenes of Prunus serotina and P. lusitanica. *Phytochem.* **1974**, 13, 203–207.
- [10] Pardo, A., Cáceres, Y., & Pulido, F. Rangewide determinants of population performance in Prunus lusitanica: Lessons for the contemporary conservation of a Tertiary relict tree. *Acta Oecol.* **2018**, 86, 42–48.
- [11] Poonam, V., Kumar, G., Reddy, C. S. L., Jain, R., Sharma, S. K., Prasad, A. K., & Parmar, V. S. Chemical Constituents of the Genus Prunus and their Medicinal Properties. *Curr Med Chem.* **2011**, 18, 3758–3824.
- [12] Challice, J. S., Loeffler, R. S. T., & Williams, A. H. Structure of calleryanin and its benzylic esters from Pyrus and Prunus. *Phytochem.* **1980**, 19(11), 2435–2437.
- [13] Costa, M. D. C., Duarte, P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Costa, F., & Rosado, C. Novel insight for permeant lead structures through in vitro skin diffusion assays of Prunus lusitanica L., the Portugal Laurel. *J Mol Struct.* **2015**, 1079, 327–336.

- [14] *Mentha suaveolens* Round-Leaved Mint, Apple mint, Pineapple Mint PFAF Plant Database. Retrieved May 29, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Mentha+suaveolens>
- [15] Božovic, M., Pirolli, A., & Ragno, R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. *Molecules*. **2015**, 20(5), 8605–8633.
- [16] Dharmawan, J., Kasapis, S., Curran, P., & Johnson, J. R. Characterization of volatile compounds in selected citrus fruits from Asia. Part I: Freshly-squeezed juice. *Flavour Frag J*. **2007**, 22(3), 228–232.
- [17] Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Ind Crops Prod*. **2011**, 34(1), 802–817.
- [18] Hanafy, D. M., Prenzler, P. D., Burrows, G. E., Ryan, D., Nielsen, S., El Sawi, S. A., Obied, H. K. Biophenols of mints: Antioxidant, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and histone deacetylase inhibition activities targeting Alzheimer's disease treatment. *J Funct Foods*. **2017**, 33, 345–362.
- [19] *Camellia japonica* Camellia, Common Camellia, Japanese Camellia PFAF Plant Database. Retrieved June 6, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Camellia+japonica>
- [20] Onodera, K., Hanashiro, K., & Yasumoto, T. Camellianoside, a Novel Antioxidant Glycoside from the Leaves of *Camellia japonica*. *Biosci Biotechnol Biochem*. **2006**, 70(8), 1995–1998.
- [21] Azuma, C. M., dos Santos, F. C. S., & Lago, J. H. G. Flavonoids and fatty acids of *Camellia japonica* leaves extract. *Rer Bras Farmacogn*. **2011**, 21(6), 1159–1162.
- [22] Yoon, I. S., Park, D. H., Kim, J. E., Yoo, J. C., Bae, M. S., Oh, D. S. & Cho, S. S. Identification of the biologically active constituents of *Camellia japonica* leaf and anti-hyperuricemic effect in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. **2017**, 39(6), 1613–1620.
- [23] Jin, Z., & Li, X. Study on chemical constituents from leaves of camellia. *J Chem Pharm Res*. **2014** 6(6), 1770–1776.
- [24] Zhang, Y. L., Yin, C. P., Kong, L. C., & Jiang, D. H. Extraction optimisation, purification and major antioxidant component of red pigments extracted from *Camellia japonica*. *Food Chem*. **2011**, 129(2), 660–664.

- [25] Lipińska, L., Klewicka, E., & Sójka, M. Structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: A general review. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* **2014**, 13(3), 289–299.
- [26] Hsieh, S. K., Xu, J. R., Lin, N. H., Li, Y. C., Chen, G. H., Kuo, P. C., Chen, W. Y., & Tzen, J. T. C. Antibacterial and laxative activities of strictinin isolated from Pu'er tea (*Camellia sinensis*). *J Food Drug Anal.* **2016**, 24(4), 722–729.
- [27] Sancheti, S., Sancheti, S., Um, B. H., & Seo, S. Y. 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -d-glucose: A cholinesterase inhibitor from *Terminalia chebula*. *S Afr J Bot.* **2010**, 76(2), 285–288.
- [28] Nakashima, H., Murakami, T., Yamamoto, N., Sakagami, H., Tanuma, S. ichi, Hatano, T., Yoshida, T. & Okuda, T. Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* **1992**, 18(1), 91–103.
- [29] Park, J. C., Hur, J. M., Park, J. G., Hatano, T., Yoshida, T., Miyashiro, H., Min, B. S., & Hattori, M. Inhibitory effects of Korean medicinal plants and camelliatannin H from *Camellia japonica* on human immunodeficiency virus type 1 protease. *Phytother Res.* **2002**, 16(5), 422–426.
- [30] *Ulex europaeus* Gorse, Common gorse PFAF Plant Database. Retrieved June 8, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Ulex+europaeus>
- [31] Máximo, P., Lourenço, A., Feio, S. S., & Roseiro, J. C. Flavonoids from *Ulex airensis* and *Ulex europaeus* ssp. *europaeus*. *J Nat Prod.* 2002, 65(2), 175–178.
- [32] Máximo, P., Lourenço, A., Tei, A., & Wink, M. Chemotaxonomy of Portuguese *Ulex*: Quinolizidine alkaloids as taxonomical markers. *Phytochem.* **2006**, 67(17), 1943–1949.
- [33] Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., Gouveia-Figueira, S., & Castilho, P. C. *Ulex europaeus*: From noxious weed to source of valuable isoflavones and flavanones. *Ind Crops Prod.* **2016**, 90, 9–27.
- [34] Sirat, H., & Russell, G. The isolation and identification of two antifungal Pterocarpanes from *Ulex europaeus* L. *Pertanika.* **1989**, 12(3), 395–398.
- [35] De Rodriguez, D., Chulia, J., Simões, C., Amoros, M., Mariotte, A., & Girre, L. Search for “in vitro” Antiviral Activity of a New Isoflavonic Glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Med.* **1990**, 56(01), 59–62.

- [36] Pardo-Muras, M., Puig, C. G., Lopez-Nogueira, A., Cavaleiro, C., & Pedrol, N. On the bioherbicide potential of *Ulex europaeus* and *Cytisus scoparius*: Profiles of volatile organic compounds and their phytotoxic effects. *PLoS One*. **2018**, 13(10), 1–21.
- [37] *Phytolacca americana* Pokeweed, American pokeweed, Garnet, Pigeon Berry, Poke PFAF Plant Database. Retrieved August 11, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Phytolacca+americana>
- [38] Guedes, V. *Phytolacca americana* L: potencial das bagas de uma planta invasora. Universidade do Porto. *Faculdade de Farmácia*. **2015**,1, 3-22.
- [39] Navabi, S.M., Ebrahimzadeh, M.A., Navabi, S. F. & Bahramian, F. In vitro antioxidant activity of *Phytolacca americana* berries. *Pharmacologyonline*. **2009**, 1, 81-88.
- [40] Bylka, W., & Matlawska, I. Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Pol Pharm*. **2001**, 58(1), 69-72.
- [41] Wang, L., Bai, L., Nagasawa, T., Hasegawa, T., Yang, X., Sakai, J., Bai, Y., Kataoka, T., Oka, S., Hirose, K., Tonida, A., Tsuruo, T., & Ando, M. Bioactive triterpene saponins from the roots of *Phytolacca americana*. *J Nat Prod*. **2008**, 71, 35-40.
- [42] Patra, J. K., Kim, E. S., Oh, K., Kim, H., Kim, Y., & Baek, K. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible of periodontal inflammatory diseases and dental caries. *BMC Complement Altern Med*. **2014**, 1-6.
- [43] Ding, L. J., Ding, W., Zhang, Y. Q., & Luo, J. X. Bioguided fractionation and isolation of esculentoside P from *Phytolacca americana* L. *Ind Crops Prod*. **2013**, 44, 534–541.
- [44] *Chelidonium majus* Greater Celandine, Swallow Wort, Greater Celandine PFAF Plant Database. Retrieved June 9, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Chelidonium+majus>
- [45] Jakovljević, Z. D., Stanković, S. M., & Topuzović, D. M. Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. *EXCLI J*. **2013**, 12, 260–268.
- [46] Miraj, S. Ethnobotanical study and pharmacological properties of *Chelidonium Majus*. *Der Pharma Chem*. **2016**, 8(14), 216–222.
- [47] Arora, D., & Sharma, A. A review on phytochemical and pharmacological potential of genus *Chelidonium*. *Pharmacogn J*. **2013**, 5(4), 184–190.

- [48] Maji, A. K., & Banerji, P. Chelidonium majus L. (Greater celandine) – A Review on its Phytochemical and Therapeutic Perspectives. *Int J Herb Med.* **2016**, 3(1), 10–27.
- [49] Zou, C. S., Lv, C. H., Wang, Y. J., Cao, C. W., & Zhang, G. C. Larvicidal activity and insecticidal mechanism of Chelidonium majus on *Lymantria dispar*. *Pestic Biochem Physiol.* **2017**, 142, 123–132.
- [50] Tagetes patula French Marigold, Dwarf French Marigold PFAF Plant Database. Retrieved June 17, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Tagetes+patula>
- [51] Rondon, M., Velasco, J., Hernandez, J., Pecheneda, M., Rojas, J., Morales, A., Carmona, J., & Diaz, T. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) collected from the Venezuela Andes. *Rev Latinoam Quim.* **2006**, 34(1/3), 32–36.
- [52] Faizi, S., Siddiqi, H., Bano, S., Naz, A., Lubna, Mazhar, K., Nasim, S., Riaz, T., Kamal, S., Ahmad, A., & Khan, S. A. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: Preparation of patuletin derivatives. *Pharm Biol.* **2008**, 46(5), 309–320.
- [53] Jain, R., Katare, N., Kumar, V., Kumar, A., Swati, S., & Shrotri, G. C. K. In Vitro Anti Bacterial Potential of Different Extracts of *Tagetes Erecta* and *Tagetes Patula*. *J Nat Sci Res.* **2012**, 2(5), 84–91.
- [54] Faizi, S., Dar, A., Siddiqi, H., Naqvi, S., Naz, A., Bano, S., & Lubna. Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula*. *Pharm Biol.* **2011**, 49(5), 516–525.
- [55] Faizi, S., Fayyaz, S., Bano, S., Yawar Iqbal, E., Lubna, L., Siddiqi, H., & Naz, A. Isolation of nematicidal compounds from *tagetes patula* L. yellow flowers: Structure-activity relationship studies against cyst nematode *heterodera zae* infective stage larvae. *J Agric Food Chem.* **2011**, 59(17), 9080–9093.
- [56] Chkhikvishvili, I., Sanikidze, T., Gogia, N., Enukidze, M., Machavariani, M., Kipiani, N., Vinokur, Y., & Rodov, V. Constituents of French Marigold (*Tagetes patula* L.) Flowers Protect Jurkat T-Cells against Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* **2016**, 2016, 1–10.

- [57] Salehi, B., Valussi, M., Flaviana Bezerra Morais-Braga, M., Nalyda Pereira Carneiro, J., Linkoln Alves Borges Leal, A., Douglas Melo Coutinho, H., Vitalini, S., Kregiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Crsitina Cirone Silva, N., Yousaf, Z., Martorell, N., Iriti, M., Carradori, S., & Sharifi-Rad, J. Tagetes spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity. *Molecules*. **2018**, 23, 2847.
- [58] Ruta graveolens Rue, Common rue, Herb of Grace, Garden Rue PFAF Plant Database. Retrieved June 18, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Ruta+graveolens>
- [59] Attia, E. Z., Abd El-Baky, R. M., Desoukey, S. Y., El Hakeem Mohamed, M. A., Bishr, M. M., & Kamel, M. S. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of Ruta graveolens plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future J Pharm Sci*. **2018**, 4(2), 254–264.
- [60] Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F., & Guckert, A. Ruta graveolens L.: A promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Sci*. **2001**, 161(1), 189–199.
- [61] Oliva, A., Meepagala, K. M., Wedge, D. E., Harries, D., Hale, A. L., Aliotta, G., & Duke, S. O. Natural fungicides from Ruta graveolens L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J Agric Food Chem*. **2003**, 51(4), 890–896.
- [62] Hale, A. L., Meepagala, K. M., Oliva, A., Aliotta, G., & Duke, S. O. Phytotoxins from the leaves of Ruta graveolens. *J Agric Food Chem*. **2004**, 52(11), 3345–3349.
- [63] Punica granatum Pomegranate, Dwarf Pomegranate PFAF Plant Database. Retrieved June 18, 2019, from <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Punica+granatum>
- [64] Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem*. **2003**, 80(3), 393–397.
- [65] Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem*. **2002**, 50(1), 81–86.
- [66] Ismail, T., Sestili, P., & Akhtar, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol*. **2012**, 143(2), 397–405.

- [67] Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food Chem.* **2015**, 174, 417–425.
- [68] Endo, E. H., Garcia Cortez, D. A., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol.* **2010**, 161(7), 534–540.
- [69] Loizzo, M. R., Aiello, F., Tenuta, M. C., Leporini, M., Falco, T., & Tundis, R. Pomegranate (*Punica granatum* L.). *In Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements.* **2019**, 2, 467-472.
- [70] Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: A review. *Food Chem.* **2018**, 261, 75–86.
- [71] Masci, A., Coccia, A., Lendaro, E., Mosca, L., Paolicelli, P., & Cesa, S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chem.* **2016**, 202, 59–69.
- [72] Hamouda, A. Ben, Mechi, A., Zarred, K., Chaieb, I., & Régional, C. Insecticidal Activities of Fruit Peel Extracts of Pomegranate (*Punica granatum*) against the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Tunis J Plant Prot.* **2014**, 9(1), 91–100.
- [73] Venkata, C., Prakash, S., & Prakash, I. Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (*Punica granatum*) Juice, Seed and Peel-A Review. *Int J Res Chem Environ.* **2011**, 1(1), 1–18.
- [74] Karimi, M., Sadeghi, R., & Kokini, J. Pomegranate as a promising opportunity in medicine and nanotechnology. *Trends Food Sci Technol.* **2017**, 69, 59–73.
- [75] Pastor, J. 12 - *Lithodora* Griseb. **1924**, 56.
- [76] Camejo-Rodrigues, J., Ascensão, L., Bonet, M. À., & Vallès, J. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *J Ethnopharmacol.* **2003**, 89(2–3), 199–209.
- [77] Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J Ethnopharmacol.* **2004**, 93(2–3), 183–195.
- [78] Ginkgo biloba Maidenhair Tree, Ginkgo PFAF Plant Database. Retrieved June 21, 2019, from <https://pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Ginkgo+biloba>

- [79] Mohanta, T. K., Tamboli, Y., & Zubaidha, P. K. Phytochemical and medicinal importance of Ginkgo biloba L. *Nat Prod Res.* **2014**, 28(10), 746–752.
- [80] Isah, T. Rethinking Ginkgo biloba L.: Medicinal uses and conservation. *Phcog Res.* **2015**, 9(18), 140.
- [81] Dziwenka, M., & Coppock, R. W. Ginkgo biloba. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. Elsevier Inc.* **2016**, 49, 681-691.
- [82] Singh, B., Kaur, P., Gopichand, Singh, R. D., & Ahuja, P. S. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia.* **2008**, 79(6), 401–418.
- [83] Cicero, A. F. G., Fogacci, F., & Banach, M. Botanicals and phytochemicals active on cognitive decline: The clinical evidence. *Pharmacol Res.* **2018**, 130, 204–212.
- [84] Fu, Y., Hong, S., Li, D., & Liu, S. Novel chemical synthesis of ginkgolic acid (13:0) and evaluation of its tyrosinase inhibitory activity. *J Agric Food Chem.* **2013**, 61(22), 5347–5352.
- [85] Araujo, A. R. L. Plant extracts: isolation, characterization, nanoencapsulation in lipids, cytotoxicity in AGS cells and synthesis of analogues. *Universidade do Minho, Escola de Ciências.* **2018**, 1-98.
- [86] Tyman, J. H. P., & Visani, N. Synthesis of Saturated Anacardic Acids, and Alkenyl and Alkynyl Analogues †. *J Chem Research.* **1997**, (14), 14–15.
- [87] Fürstner, A., & Seidel, G. Shortcut Syntheses of Naturally Occurring 5-Alkylresorcinols with DNA-Cleaving Properties. *J Org Chem.* **1997**, 3263(5), 3016–3020.
- [88] Satoh, M., Takeuchi, N., Fujita, T., Yamazaki, K., & Tobinaga, S. Synthesis of Anacardic Acids Utilizing an Annelation Reaction of Isoxazoles with Ethyl Acetoacetate. *Chem Pharm Bull.* **1998**, 46(10) 1501-1505.
- [89] Satoh, M., Takeuchi, N., Fujita, T., Yamazaki, K., Nishimura, T., & Tobinaga, S. Improved Synthesis of Anacardic Acids, 6-Pentadecylsalicylic Acid and 6-[8(*Z*)-Pentadecenyl]salicylic Acid, from Aldehyde and Acetoacetate. *Chem Pharm Bull.* **1999**, 47(8) 1115-1116.
- [90] Satoh, M., Takeuchi, N., Fujita, T., Nishimura, T., Ohta, T., & Tobinaga, S. Synthesis of Anacardic Acids, 6- [8 (*Z*), 11 (*Z*) -Pentadecadienyl] salicylic Acid and 6- [8 (*Z*), 11 (*Z*), 14-Pentadecatrienyl] salicylic Acid. *Chem Pharm Bull.* **2011**, 49(1), 18–22.

- [91] Hadfield, A., Schweitzer, H., Trova, M. P., & Green, K. Practical, Large-Scale Synthesis of 2,2-Dimethyl-5-Hydroxy-4-Oxo-Benzo-1,4-Dioxin. *Synth Commun.* **1994**, 24(7), 1025-1028.
- [92] Uchiyama, M., Ozawa, H., Takuma, K., Matsumoto, Y., Yonehara, M., Hiroya, K., & Sakamoto, T. Regiocontrolled Intramolecular Cyclizations of Carboxylic Acids to Carbon – Carbon Triple Bonds Promoted by Acid or Base Catalyst. *Org Lett.* **2006**, 8(24) 5517-5520.
- [93] Zhang, P., Pan, J., Duan, W., Li, X., Zhang, Y., Zhou, Y., Jiang, Q., Mao, Z., & Yu, P. Synthesis of Ginkgolic Acid Analogues and Evaluation of Their Molluscicidal Activity. *Molecules.* **2011**, 16, 4059–4069.
- [94] N, A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* **2015**, 04(03), 3–8.
- [95] Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. *Int J Pharmaceut.* **2015**, 483, 220–243.
- [96] Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. *International Centre for Science and High Technology.* **2008**, 1-260.
- [97] Sartor, R. B. Modelagem, Simulação e Otimização de Uma Unidade Industrial de Extração de Óleos Essenciais Por Arraste a Vapor. **2009**.
- [98] Gupta, S., & Variyar, P. S. Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials. *In Encapsulations.* **2016**, 15, 641-672.
- [99] Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., & Nejati-Koshki, K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett.* **2013**, 1–9.
- [100] Dua, J. S., Rama, A. C. & Bhandari, A. K. Liposome: Methods of preparation and applications. *Int J Pharm Sci Rev Res.* **2012**, 14-20.

- [101] Marín, D., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. Encapsulation of food waste compounds in soy phosphatidylcholine liposomes: Effect of freeze-drying, storage stability and functional aptitude. *J Food Eng.* **2018**, 132-143.
- [102] Jamil, B., Abbasi, R., Abbasi, S., Imran, M., Khan, S., Ihsan, A., Javed, S., Bokhari, S., & Imran, M. Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. *Front Microbiol.* **2016**, 7 (1580), 1-10.
- [103] Mo, F., Lin, B., Lai, F., Xu, C., & Zou, H. A green modified microsphere of chitosan encapsulating dimethyl fumarate and cross-linked by vanillin and its application for litchi preservation. *Ind Eng Chem Res.* **2016**, 55 (16), 4490-4498.
- [104] Chauhan, N., Dilbaghi, N., Gopal, M., Kumar, R., Kim, K. H., & Kumar, S. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *Int J Biol Macromol.* **2017**, 97, 616-624.
- [105] Xiao, Z., Xu, Z., & Zhu, G. Production and characterization of nanocapsules encapsulated linalool by ionic gelation method using chitosan as wall material. *Food Sci. Technol.* **2017**, 37 (4), 613-619.
- [106] Chauhan, N., Dilbaghi, N., Gopal, M., Kumar, R., & Kim, K.H. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. International. *Int J Biol Macromol.* **2017**, 97, 616-624.
- [107] Hayles, J., Johnson, L., Worthley, C., & Losic, D. Nanopesticides: a review of current research and perspectives. *In New Pesticides and Soil Sensors.* **2017**, 193-225.
- [108] Kookana, R. S., Boxall, A. B., Reeves, P. T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Cornelis, G., Fernandes, T. F., Gan, J., Kah, M., Lynch, I., Ranville, J., Sinclair, C., Spurgeon, D., Tiede, K., & Van den Brink, P. J. Nanopesticides: Guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *J Agric Food Chem.* **2014**, 62 (19), 4227-4240.
- [109] Prasad, R., Bhattacharyya, A., & Nguyen, Q. D. Nanotechnology in sustainable agriculture: Recent developments, challenges, and perspectives. *Front Microbiol.* **2017**, 8 (1014), 1–13.

- [110] Mateos, R. & Gracia-Mesa, A., J. Rapid and quantitative extraction method for the determination of chlorophylls and carotenoids in olive oil by high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* **2006**, (385), 1247-1254.
- [111] Evans, L. UV-VIS Spectrophotometry: A Brief Background to Spectrophotometry. *Biochrom.* **2018**, (1), 1–15.
- [112] Jana, N. K. & Verkade, J. G. Phase-Vanishing methodology for efficient bromination, alkylation, epoxidation and oxidation of organic substrates. *Org Lett.* **2003**, 5(21), 3787-3790.
- [113] Paiva, P. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. R. Introdução à espectroscopia. *CENGAGE Learning.* **2010**, 1-708.
- [114] Kremer, J. M. H., Esker, M. W. J. V. D., Pathmamanoharan, C., & Wiersema, P. H. Vesicles of Variable Diameter Prepared by a Modified Injection Method. *Biochemistry.* **1977**, 16(17), 3932–3935.
- [115] Yokota, D., Moraes, M., & Pinho, S. C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: A case study of casein hydrolysate microencapsulation. *Braz J Chem Eng.* **2012**, 29(2), 325–335.
- [116] Mailer, A. G., Clegg, P. S., & Pusey, P. N. Particle sizing by dynamic light scattering: Non-linear cumulant analysis. *J Phys Condens Matter.* **2015**, 27(14), 1-9.
- [117] Hassan, P. A., Rana, S., & Verma, G. Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir.* **2015**, 31(1), 3–12.
- [118] Wang, X. quan, Li, Y. gui, Zhong, S., Zhang, H., Wang, X. yun, Qi, P. pei, & Xu, H. Oxidative injury is involved in fipronil-induced G2/M phase arrest and apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. *Pestic Biochem Physiol.* **2013**, 105(2), 122–130.
- [119] Huang, J. F., Tian, M., Lv, C. J., Li, H. Y., Muhammad, R. ul H., & Zhong, G. H. Preliminary studies on induction of apoptosis by abamectin in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cell line. *Pestic Biochem Physiol.* **2011**, 100(3), 256–263.
- [120] Lichtenthaler, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Meth Enzymol.* **1987**, 148(C), 350–382.

- [121] Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement And Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*. **2005**, 2–2, 171–178.
- [122] Yang, X. M., Wang, Y. F., Li, Y. Y., & Ma, H. Le. Thermal stability of ginkgolic acids from *Ginkgo biloba* and the effects of ginkgol C17:1 on the apoptosis and migration of SMMC7721 cells. *Fitoterapia*. **2014**, 98, 66–76.
- [123] Stalin, T., & Rajendiran, N. Intramolecular charge transfer effects on 3-aminobenzoic acid. *Chem Phys*. **2006**, 322(3), 311–322.
- [124] Stalin, T., & Rajendiran, N. Intramolecular charge transfer associated with hydrogen bonding effects on 2-aminobenzoic acid. *J Photochem Photobiol A Chem*. **2006**, 182(2), 137–150.
- [125] Peters, S. E., & Brain, C. H. Benefits of a soy lecithin based nanotechnology for the animal and human food industry. *ACS Symp Ser*. **2009**, 1007, 183–197.
- [126] Zhang, H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods Mol. Biol*. **2017**, 1522, 17-22.
- [127] Jaafar-Maalej, C.; Diab, R.; Andrieu, V.; Elaissari, A.; Fessi, H.; Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *J. Liposome Res*. **2010**, 20, 228-243.