

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Aproveitamento de resíduos de *Chrysanthemum morifolium* da Agroindústria Capixaba para produção de larvicidas naturais**

**Utilization of *Chrysanthemum morifolium* residues from Capixaba agroindustry for the production of natural larvicides**

**Tamires Aliprandi Lima**

**Tese de Doutorado em Química**

**Vitória**

**2021**

Tamires Aliprandi Lima

Aproveitamento de resíduos de *Chrysanthemum morifolium*  
da Agroindústria Capixaba para produção de larvicidas  
naturais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre ou Doutor em Química.

**Área de Concentração:** Química

**Linha de Pesquisa:** Química de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras

Vitória  
2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de  
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

A412a Aliprandi Lima, Tamires, 1989-  
Aproveitamento de resíduos de *Chrysanthemum morifolium*  
da Agroindústria Capixaba para produção de larvicidas naturais /  
Tamires Aliprandi Lima. - 2021.  
132 f. : il.

Orientador: Ricardo Machado Kuster.  
Coorientador: Paulo Roberto Filgueiras.  
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do  
Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas.

1. *Aedes aegypti*. 2. Agroindústria. 3. Crisântemo. 4. Resíduos  
vegetais. 5. Quimiometria. I. Machado Kuster, Ricardo. II.  
Filgueiras, Paulo Roberto. III. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências Exatas. IV. Título.

CDU: 54

---

Aproveitamento de resíduos de *Chrysanthemum morifolium* da  
Agroindústria Capixaba para produção de larvicidas naturais

Tamires Aliprandi Lima

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências  
Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a  
obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovada em 01/03/2021 por:

---

Prof. Dr. Ricardo Machado Kuster<sup>1</sup>  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Filgueiras<sup>1</sup>  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Coorientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Naomi Kato Simas<sup>1</sup>  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Soraia Cristina Gonzaga Neves Braga<sup>1</sup>  
Instituto Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Wanderson Romão<sup>1</sup>  
Instituto Federal do Espírito Santo

---

Prof. Dr. Álvaro Cunha Neto<sup>1</sup>  
Universidade Federal do Espírito Santo

---

<sup>1</sup> O documento será assinado eletronicamente em conformidade com as normas prescritas na  
Portaria Normativa PRPPG/ UFES nº 03/2020.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
WANDERSON ROMÃO - SIAPE 99991218  
Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ/CCE  
Em 01/03/2021 às 22:32

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/147572?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
ALVARO CUNHA NETO - SIAPE 1703837  
Departamento de Química - DQ/CCE  
Em 02/03/2021 às 11:36

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/148072?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
PAULO ROBERTO FILGUEIRAS - SIAPE 2230605  
Departamento de Química - DQ/CCE  
Em 02/03/2021 às 14:35

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/148306?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
RICARDO MACHADO KUSTER - SIAPE 1213734  
Departamento de Química - DQ/CCE  
Em 03/03/2021 às 08:33

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/149010?tipoArquivo=O>

Dedico este trabalho, ao meu esposo,  
Elder Feu Nunes,  
grande incentivador.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela força concedida.

Ao meu orientador Ricardo Machado Kuster, gratidão pela confiança depositada em meu trabalho e no projeto de pesquisa. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados e por me manter motivada durante todo o processo.

Ao meu Coorientador Paulo Roberto Filgueiras, pelas valiosas contribuições dadas durante a pesquisa.

Ao professora Naomi Kato Simas e a equipe do Laboratório de Produtos Naturais e Ensaios Biológicos (LAPRONEB) – Faculdade de Farmácia – UFRJ, pelos ensaios larvicidas realizados e apoio científico.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia (LabPetro-UFES), por toda ajuda e confiança.

Ao Laboratório de Instrumentação (LabPetro-UFES), por disponibilizar o equipamento para a realização das análises de infravermelho.

Ao Laboratório de Quimiometria (LabPetro-UFES), especialmente os alunos Betina Pires Lovatti e Thalles Ramon Rosa por toda assistência e parceria.

Ao Laboratório de Petroleômica e Forense (LabPetro-UFES) e a todos alunos envolvidos diretamente nas análises de realizadas, deixo aqui meus sinceros agradecimentos pela dedicação.

Aos amigos conquistados nesta longa jornada dentro da Universidade.

Ao NCQP, em especial ao Professor Eustáquio Vinícius Ribeiro de Castro e Roberta Quintino Frinhan Chimin, que me acolheram por muitos anos no Laboratório de destilação compartilhando seus conhecimentos e amizade, gratidão eterna.

Também agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo e aos docentes por todos os ensinamentos oferecidos.

Ao meu marido Elder Feu Nunes, que acima de tudo é um grande amigo, sempre presente nos momentos difíceis com uma palavra de incentivo.

Aos meus pais Ivoni Aliprandi Lima e Luiz da Rocha Lima e meu irmão Thiago Aliprandi Lima que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as áreas da minha vida.

À FAPES, pelo incentivo ao projeto.

*“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.*

Josué 1:9

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.1.</b> Esquema das rotas biosintéticas para a formação dos metabólitos secundários <sup>15</sup> .                                                                 | 27 |
| <b>Figura 1.2.</b> Esquema de formação das estruturas de terpenos.                                                                                                             | 28 |
| <b>Figura 1.3.</b> Exemplo de estruturas de triterpenos.                                                                                                                       | 28 |
| <b>Figura 1.4.</b> Estrutura de flavonoides comuns na espécie <i>Chrysanthemum morifolium</i> .                                                                                | 29 |
| <b>Figura 1.5.</b> Ácido fenilpropanóico.                                                                                                                                      | 30 |
| <b>Figura 1.6.</b> Número de casos prováveis das doenças: Dengue, Chikungunya e Zika no Brasil - 2015 a 2019 <sup>33</sup> .                                                   | 35 |
| <b>Figura 1.7.</b> Diagrama de blocos para representar um cromatógrafo gasoso.                                                                                                 | 45 |
| <b>Figura 1.8.</b> Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.                                                                                                         | 46 |
| <b>Figura 1.9.</b> Regiões aproximadas em que alguns tipos comuns de ligação absorvem na região do infravermelho vibracional <sup>63</sup> .                                   | 48 |
| <b>Figura 1.10.</b> Diagramas esquemáticos de espectrofotômetros com Transformada de Fourier <sup>63</sup> .                                                                   | 49 |
| <b>Figura 2.1.</b> (a) Coleta de resíduos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> ; (b) resíduo de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> ; (c) resíduo seco; (d) resíduo triturado. | 70 |
| <b>Figura 2.2.</b> Esquema resumido do processo de extração dos 27 resíduos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> .                                                            | 71 |
| <b>Figura 2.3.</b> Sobreposição dos espectros MIR e gráfico de loadings para os extratos FA.                                                                                   | 76 |
| <b>Figura 2.4.</b> Análises PCA de extratos de diclorometano (FA) da espécie <i>Dendranthema x grandiflorum</i> Ramat submetidos ao FT-MIR.                                    | 76 |
| <b>Figura 2.5.</b> Amostras FA do grupo GA1 - banda intensa em 736 cm <sup>-1</sup> e bandas de média intensidade em 2851 e 2922 cm <sup>-1</sup> .                            | 77 |
| <b>Figura 2.6.</b> Amostras FA do grupo GA-2 - banda intensa em 2851 e 2922 cm <sup>-1</sup> e baixa intensidade em 736 cm <sup>-1</sup> .                                     | 78 |
| <b>Figura 2.7.</b> Sobreposição dos espectros MIR e gráfico de loadings para os extratos FB.                                                                                   | 79 |
| <b>Figura 2.8.</b> Análises PCA de extratos de metanol (FB) da espécie <i>Dendranthema x grandiflorum</i> Ramat submetidos ao FT-MIR.                                          | 79 |

|                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 2.9.</b> Espectro de MIR para avaliar o comportamento dos grupos GB1, GB2, GB3 e GB4. ....                                                            | 80  |
| <b>Figura 2.10.</b> Espectros ESI (-) FT-ICR MS com picos de carboidratos e flavonoides para os extratos FB de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....        | 81  |
| <b>Figura 2.11.</b> Sobreposição dos 27 espectros ESI (-) FT-ICR MS dos extratos FA e regiões aproximadas. ....                                                 | 84  |
| <b>Figura 2.12.</b> Sobreposição dos 27 espectros APCI (+) FT-ICR MS dos extratos FA e regiões aproximadas. ....                                                | 84  |
| <b>Figura 2.13.</b> Espectro APCI (+) FT-ICR MS da mistura FA antes e após saponificação/metilação. ....                                                        | 85  |
| <b>Figura 3.1.</b> Gráfico de loadings dos extratos de diclorometano (FA) de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> submetidos à análise cromatográfica GC-MS. .... | 102 |
| <b>Figura 3.2.</b> Gráfico de Scores dos extratos de diclorometano (FA) de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> submetidos à análise cromatográfica GC-MS. ....   | 103 |
| <b>Figura 3.3.</b> Abundância de ácido palmítico para os 27 extratos de resíduos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                                   | 105 |
| <b>Figura 3.4.</b> Gráfico de Scores das análises ESI (-) FT-ICR MS para os extratos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                               | 108 |
| <b>Figura 3.5.</b> Gráfico de loadings das análises ESI (-) FT-ICR MS para os extratos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                             | 108 |
| <b>Figura 3.6.</b> Gráfico de Scores das análises APCI (+) FT-ICR MS dos 27 extratos <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                                  | 111 |
| <b>Figura 3.7.</b> Gráfico de loadings das análises APCI (+) FT-ICR MS dos 27 extratos <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                                | 110 |
| <br><b>Figura 2.S. 1.</b> Análise cromatográfica de CG-MS da mistura dos extratos FA. ....                                                                      | 121 |
| <br><b>Figura 3.S. 1.</b> Sobreposição dos cromatogramas obtidos das análises de GC-MS a partir dos 27 extratos de diclorometano. ....                          | 121 |
| <b>Figura 3.S. 2.</b> Sobreposição dos espectros de 27 ESI (-) FT-ICR MS obtidos a partir da análise dos extratos de diclorometano 27 FA. ....                  | 122 |
| <b>Figura 3.S. 3.</b> Espectros de massas APCI (+) FT-ICR MS obtidos na análise dos 27 extratos FA de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                 | 122 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.1.</b> Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a esqueleto básico.<br>.....                                                                                                      | 29  |
| <b>Tabela 1.2.</b> Ácidos graxos comuns presentes no <i>Chrysanthemum morifolium</i> . ....                                                                                                              | 30  |
| <b>Tabela 1.3.</b> Potencial de algumas espécies apresentam frente as larvas do vetor <i>Aedes Aegypti</i> . ....                                                                                        | 36  |
| <b>Tabela 1.4.</b> Levantamento bibliográfico do primeiro ao mais atual estudo realizado envolvendo a aplicação de PCA na área de resíduo agrícola. Busca realizada na base de dados Web of Science..... | 42  |
| <b>Tabela 1.5.</b> Levantamento de artigos científicos publicados que relatam a aplicação de diferentes técnicas analíticas .....                                                                        | 52  |
| <b>Tabela 2.1.</b> Proposta de compostos presentes nas amostras de FB por ESI (-) FT-ICR MS.....                                                                                                         | 81  |
| <b>Tabela 2.2.</b> Compostos químicos presentes na mistura FA antes e após saponificação/metilação. ....                                                                                                 | 85  |
| <b>Tabela 3.1.</b> Atividade larvicida para o <i>Aedes aegypti</i> dos 27 extratos de diclorometano nas concentrações de 15 ppm e 5 ppm. ....                                                            | 98  |
| <b>Tabela 3.2.</b> Perfil químico por GC-MS dos 27 extratos de FA de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                                                                                           | 100 |
| <b>Tabela 3.3.</b> Concentração relativa (%) das variáveis mais relevantes para PC1 e PC2 - valores obtidos nas análises de GC-MS. ....                                                                  | 104 |
| <b>Tabela 3.4.</b> Soma das concentrações relativas de ácidos graxos e triterpenos presentes nos extratos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> .....                                                    | 106 |
| <br><b>Tabela 2.S. 1.</b> Amostragem dos resíduos (flores, caules e folhas) de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> . ....                                                                                 | 123 |
| <b>Tabela 2.S. 2.</b> Proposta dos compostos presentes nos extratos FA por análises ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS.....                                                                          | 125 |
| <b>Tabela 2.S. 3.</b> Identificação de ésteres metílicos de ácidos graxos e alguns triterpenos na amostra de mistura FA por análise CG-MS.....                                                           | 127 |
| <br><b>Tabela 3.S.1.</b> Configurações usadas no DropMS para processar as 27 amostras de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> por ESI (-) FT-ICR MS. ....                                                  | 128 |

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 3.S. 2.</b> Proposta de compostos presentes nos extratos FA pelas análises ESI<br>(-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS..... | 128 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica

APCI FT-ICR MS – Espectrometria de Massa com Ionização Química a Pressão Atmosférica e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

BF<sub>3</sub> – Trifluoreto de Boro

GC – Cromatografia Gasosa

GG-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CMC – Carboximetilcelulose

DBE – Número de Insaturações e Anéis (do inglês, *double bond Equivalent*)

DEET – N, N – dimetil-*m*-toluamida

EAD – Análise Exploratória de Dados

ESI – Ionização por Eletrospray

ESI FT-ICR MS – Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (do inglês, *Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

FA – Extrato de Diclorometano

FB – Extrato de Metanol

FT-ICR MS – Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)

FT-IR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HCA – Análise de Agrupamentos por métodos Hierárquicos

IBEX – Instituto de Biologia do Exército

ICR – Ressonância Ciclotrônica de Íons

IK – Índice de Kovats

KOH – Hidróxido de Potássio

LC – Concentração Letal

LC-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas

MEOH - Metanol

MEP – Rota do Metileritritol Fosfato

MEV – Rota do Ácido Mevalônico

MIR – Espectroscopia de Infravermelho Médio

MS – Espectrometria de Massas

$m/z$  – Razão Massa Carga

PC – Componente Principal

PCA – Análise de Componente Principais

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TR – Tempo de Retenção

UV-Vís – Espectroscopia de Ultravioleta na região do Visível

## LISTA DE SÍMBOLOS

bar – Unidade de medida de pressão equivalente a  $10^5$  pascais

cm – Centímetros

° C – Graus Celsius

eV – Elétron-volt

h – horas

L – litro

μL – Micro litros

m – metro

μm – Micro metro

nA – Nano ampère

MDa – Mega Dalton

mg – miligramas

ppm – parte por milhão

s – Segundos

v/v – Proporção volume por volume

% – Porcentagem

## RESUMO

*Chrysanthemum morifolium* é uma espécie perene da família da Asteraceae. No Brasil o seu cultivo tem como principal finalidade fornecer para a indústria ornamental. No processo agroindustrial da espécie, são gerados muitos resíduos que não apresentam destino adequado. O objetivo do trabalho foi determinar o perfil químico dos extratos obtidos a partir dos resíduos de *Chrysanthemum morifolium* coletados nos estabelecimentos comerciais da região metropolitana de Vitória – Espírito Santo e verificar se os mesmos apresentam atividade larvicida para *Aedes aegypti*, possibilitando a formulação de um produto larvicida natural. Para verificar essa hipótese, 27 resíduos de *Chrysanthemum morifolium* foram coletados e extraídos com solventes de diferentes polaridades, resultando em 27 extratos diclorometânicos (FA) e 27 extratos metanólicos (FB). Na determinação do perfil químico dos extratos as técnicas analíticas adotadas foram: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), aplicação inédita para essa espécie; Espectrometria de Massas por Ressonância Ciclôtrônica de Íons por Transformada de Fourier (FT-ICR MS), com dois diferentes tipos de fonte de ionização - Ionização por Eletrospray (ESI) e Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI) nos modos negativos e positivos respectivamente; e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS). Uma mistura dos extratos FA e outra dos extratos FB, nas concentrações de 15 ppm foram utilizadas para os testes iniciais dos ensaios larvicidas. Os extratos FB não apresentaram atividade, em contrapartida 100% de atividade foi observada para a mistura dos extratos FA. Posteriormente, ensaios larvicidas foram realizados nos 27 extratos FA – a 5 e 15 ppm. Para a concentração de 15 ppm, alta atividade larvicida (mortalidade  $\geq 80\%$ ) foi observada em 14 amostras, média atividade ( $80\% < \text{mortalidade} \leq 40\%$ ) em 4 amostras e 9 amostras desempenharam baixa atividade (mortalidade  $< 40\%$ ). Os ensaios a 5 ppm, uma alta atividade larvicida foi observada em 8 extratos FA, dados são inéditos para esta concentração na espécie *Chrysanthemum morifolium*. Os resultados foram convertidos em matrizes e usados como entrada para realização da Análise de Componentes Principais (PCA). As PCA's das análises GC-MS, ESI (-) FT-ICR MS e FT-IR, possibilitaram inferir as classes de substâncias inseticidas, atribuídas as estruturas de triterpenos, ácidos graxos e *n*-alcanos presentes nos extratos FA. A PCA com os dados de APCI (+) FT-ICR MS, não foi suficiente para a discriminação da atividade larvicida quanto a composição química dos extratos, o resultado foi atribuído a complexidade dos espectros. Os resultados mostram que resíduos de *Chrysanthemum morifolium* geraram extratos diclorometânicos quimicamente semelhantes, e a classe dos triterpenos e ácidos graxos foram as classes de substâncias que mais contribuíram para a discriminação das amostras. Os dados sugerem que os triterpenos são as moléculas larvicidas da planta e que os ácidos graxos atuam como agentes sinérgicos.

## ABSTRACT

*Chrysanthemum morifolium* is a perennial species of the Asteraceae family. In Brazil its cultivation has as its main purpose to provide for the ornamental industry. In the agroindustrial process of the species, many residues are generated that do not present an adequate destination. The objective of the work was to determine the chemical profile of the extracts obtained from the residues of *Chrysanthemum morifolium* collected in the commercial establishments of the metropolitan region of Vitória - Espírito Santo and to verify if they present larvicidal activity for *Aedes aegypti*, allowing the formulation of a larvicidal product natural. To verify this hypothesis, 27 residues of *Chrysanthemum morifolium* were collected and extracted with solvents of different polarities, resulting in 27 dichloromethane (FA) and 27 methanolic (FB) extracts. In determining the chemical profile of the extracts, the analytical techniques adopted were: Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), application an unpublished for this species; Mass Spectrometry by Cyclotronic Ion Resonance by Fourier Transform (FT-ICR MS), with two different types of ionization source - Electrospray Ionization (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) in negative and positive modes respectively; and Gas chromatography coupled to the mass spectrometer (GC-MS). A mixture of the FA extracts and another of the FB extracts, at concentrations of 15 ppm were used for the initial tests of the larvicidal assays. The FB extracts showed no activity, in contrast 100% of activity was observed for the mixture of the FA extracts. Subsequently, larvicidal tests were carried out on the 27 FA extracts - at 5 and 15 ppm. For the concentration of 15 ppm, high larvicidal activity (mortality  $\geq 80\%$ ) was observed in 14 samples, medium activity ( $80\% < \text{mortality} \leq 40\%$ ) in 4 samples and 9 samples performed low activity (mortality  $< 40\%$ ). The tests at 5 ppm, a high larvicidal activity was observed in 8 FA extracts, data are unpublished for this concentration in the species *Chrysanthemum morifolium*. The results were converted into matrices and used as input to perform the Principal Component Analysis (PCA). The PCA's of the GC-MS, ESI (-) FT-ICR MS and FT-IR analyzes made it possible to infer the classes of insecticidal substances, attributed to the structures of triterpenes, fatty acids and n-alkanes present in the FA extracts. The PCA with the data of APCI (+) FT-ICR MS, was not sufficient for the discrimination of the larvicidal activity as for the chemical composition of the extracts, the result was attributed to the complexity of the spectra. The results show that residues of *Chrysanthemum morifolium* generated chemically similar dichloromethane extracts, and the class of triterpenes and fatty acids were the classes of substances that most contributed to the discrimination of the samples. The data suggest that triterpenes are the plant's larvicidal molecules and that fatty acids act as synergistic agents.

## Sumário

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Capítulo 1 - INTRODUÇÃO .....                                                                                                             | 23 |
| 1.1. Agroindústria de flores ornamentais - <i>Chrysanthemum morifolium</i> .....                                                          | 24 |
| 1.2. Definição das classes de compostos químicos presentes na espécie <i>Chrysanthemum morifolium</i> .....                               | 26 |
| 1.2.1. <i>Chrysanthemum morifolium</i> – Perfil metabolômico e atividades biológicas .....                                                | 30 |
| 1.3. Histórico dos inseticidas naturais .....                                                                                             | 33 |
| 1.4. Fitoprodutos e atividade larvicida sobre <i>Aedes Aegypti</i> .....                                                                  | 34 |
| 1.5. Metodologias analíticas utilizadas para estudo metabolômico do Agrorresíduo de <i>Chrysanthemum morifolium</i> .....                 | 39 |
| 1.5.1. Quimiometria .....                                                                                                                 | 39 |
| 1.5.2. Cromatografia Gasosa .....                                                                                                         | 44 |
| 1.5.3. Espectrometria de massas .....                                                                                                     | 46 |
| 1.5.4. Espectrometria de Infravermelho .....                                                                                              | 48 |
| 1.6. Aplicações das técnicas analíticas na área de reaproveitamento de resíduos da agroindústria .....                                    | 50 |
| 1.7. Objetivo Geral .....                                                                                                                 | 54 |
| 1.7.1. Objetivos específicos .....                                                                                                        | 54 |
| 1.8. Referências .....                                                                                                                    | 55 |
| Capítulo 2 - Resíduos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> provenientes da agroindústria como matéria prima para produto larvicida ..... | 67 |
| 2.1. Destaques .....                                                                                                                      | 67 |
| 2.2. Resumo Gráfico .....                                                                                                                 | 67 |
| 2.3. Resumo .....                                                                                                                         | 68 |
| 2.4. Introdução .....                                                                                                                     | 69 |
| 2.5. Materiais e Métodos .....                                                                                                            | 70 |
| 2.5.1. Preparação dos extratos .....                                                                                                      | 71 |
| 2.5.2. Análises por espectrometria de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) .....                                       | 72 |
| 2.5.3. Análise de componentes principais (PCA) .....                                                                                      | 72 |
| 2.5.4. Análises por espectrometria de massas por ressonância de íon ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR MS) .....               | 72 |
| 2.5.5. Atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> .....                                                                                  | 73 |
| 2.5.6. Saponificação e metilação da mistura de extratos FA .....                                                                          | 74 |
| 2.5.7. Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS) ..                                                               | 74 |

|                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.6. Resultados e discussão .....                                                                                                                       | 75  |
| 2.6.1. Avaliação dos dados de amostragem e rendimento das extrações .....                                                                               | 75  |
| 2.6.2. Espectrometria de infravermelho médio (MIR) e Análise de componentes principais (PCA) .....                                                      | 75  |
| 2.6.3. Atividade larvícida em <i>Aedes aegypti</i> .....                                                                                                | 83  |
| 2.7. Conclusão .....                                                                                                                                    | 86  |
| 2.8. Referências .....                                                                                                                                  | 87  |
| Capítulo 3 - Métodos analíticos para investigar compostos larvicidas em extratos de resíduos de <i>Dendranthema x grandiflorum</i> (Ramat.) Kitam. .... | 91  |
| Resumo Gráfico .....                                                                                                                                    | 91  |
| 3.2. Resumo .....                                                                                                                                       | 91  |
| 3.3. Introdução .....                                                                                                                                   | 92  |
| 3.4. Materiais e métodos .....                                                                                                                          | 94  |
| 3.4.1. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS) .....                                                                                      | 94  |
| 3.4.2. Análises de espectrometria de massas de ressonância ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR) .....                                         | 95  |
| 3.4.3. Ensaio larvícida em <i>Aedes aegypti</i> .....                                                                                                   | 96  |
| 3.4.4. Análise de Componente Principal – PCA .....                                                                                                      | 97  |
| 3.5. Resultados e discussão .....                                                                                                                       | 98  |
| 3.5.1. Ensaio larvícida em <i>Aedes aegypti</i> .....                                                                                                   | 98  |
| 3.5.2. Análise de componente principal (PCA) para os dados de GC-MS .....                                                                               | 99  |
| 3.5.3. Análises de espectrometria de massas de ressonância ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR) .....                                         | 107 |
| 3.6. Conclusão .....                                                                                                                                    | 112 |
| 3.7. Referencias .....                                                                                                                                  | 113 |
| Capítulo 4 – Conclusão Geral .....                                                                                                                      | 120 |
| Capítulo 5 Material Suplementar .....                                                                                                                   | 121 |
| 5.1. Figuras .....                                                                                                                                      | 121 |
| 5.2. Tabelas .....                                                                                                                                      | 123 |
| 5.3. Referências .....                                                                                                                                  | 130 |
| Capítulo 6 – Curriculum Vitae .....                                                                                                                     | 132 |

## Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

As atividades da agroindústria são responsáveis por transformar a matéria-prima proveniente da agricultura, pecuária, aquicultura e silvicultura em produtos. Ou seja, consiste em todo seguimento industrial que transforma a matéria-prima em produtos alimentícios e não alimentícios (óleos vegetais, medicamentos e materiais de consumo) <sup>1</sup>.

A maior problemática dessas atividades se deve ao grande volume de resíduos gerados (sólidos ou líquidos) durante o processamento e beneficiamento das matérias-primas. Na maioria dos casos, esses resíduos não são tratados ou reaproveitados e apresentam uma disposição ambientalmente inadequada, com riscos potenciais de contaminação dos solos e águas <sup>1, 2</sup>.

A crescente demanda socioambiental dos últimos anos por produtos que contribuam com a melhoria da qualidade de vida, aliada a preocupação com o meio ambiente, impulsionou pesquisas que buscam novas metodologias e tecnologias visando o reaproveitamento dos resíduos agroindustriais ou uma disposição ambientalmente adequada. Assim, o reaproveitamento dos agrorresíduos pode dar origem a uma variedade de subprodutos importantes para a indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, tecnológica e energética <sup>2</sup>.

A exemplo, sementes e folhas de *Carica papaya*, resíduos gerados na indústria de alimentos, foram estudadas por Dwi Wahyuni (2015), com objetivo de oferecer tecnologia, dosagem, toxicidade para a formulação de um bioinseticida contra larvas de *Aedes aegypti*. Nos testes com os extratos de *Carica papaya*, em diferentes concentrações, pôde-se observar, que a maioria das larvas ficaram inquietas alguns minutos após a introdução. No período de 48 horas de exposição, observou-se uma concentração letal 107 ppm para a mortalidade de 50% das larvas (LC<sub>50</sub>) e uma concentração letal de 150 ppm para a mortalidade de 90% das larvas (LC<sub>90</sub>). O comportamento exibido foi atribuído à toxicidade de metabólitos secundários presentes nos extratos - saponinas, flavonoides e triterpenos <sup>3</sup>.

O reaproveitamento dos resíduos gerados na fabricação do óleo de neem (*Azadirachta indica*) também foi proposto por Chandramohan *et al.* (2016). O produto obtido do fracionamento do resíduo, utilizando solventes de diferentes polaridades, foi testado quanto a atividade larvicida sobre o vetor da malária *Anopheles culicifacies*,

obtendo-se resultados satisfatórios. A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi aplicada para caracterizar os principais constituintes responsáveis pela atividade biológica e identificou-se a presença de azadiractina A  $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ , nimbina  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  e salanina  $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$  que são limonóides quimicamente conhecidos no neem. De modo geral, os resultados deste estudo mostraram que o extrato do resíduo de neem possui efeitos larvicidas, adulticidas e ovicidas contra o vetor da malária <sup>4</sup>.

A romã (*Punica granatum L.*) é uma planta ornamental muito utilizada por suas características medicinais. Os frutos muitas vezes são empregados pela indústria para a produção de sucos gerando uma grande quantidade de resíduos. Nogueira *et al.* (2020) propuseram avaliar as características físico-química e a composição qualitativa das sementes de romã orgânica. As sementes foram secas e trituradas para a obtenção de farinha. O resultado físico-químico mostrou que a farinha apresenta uma boa durabilidade podendo ser utilizada a longo prazo, uma vez que os valores para teor de umidade e pH demonstraram um produto de difícil ataque microbiano. Quanto à caracterização da composição os principais constituintes da farinha foram os carboidratos (68,38%), lipídios (13,52%) e proteínas (11,08%). Diante dos resultados, os autores concluíram que o reaproveitamento deste resíduo pode ser uma excelente alternativa para compor formulações alimentícias com alto valor nutricional<sup>5</sup>.

Os resíduos verdes provenientes da indústria ornamental de flores, assim como os resíduos gerados nos processamento de frutos, grãos e hortaliças podem ser explorados como fonte de compostos químicos que apresentam aplicações biológicas <sup>6</sup>. Dentro desse contexto, diversas substâncias bioativas estão naturalmente presentes na grande maioria dos resíduos agroindustriais e seus benefícios estão cada vez mais elucidados e disseminados na literatura. Quando reaproveitados, podem ser convertidos em novos materiais, produtos e substâncias químicas, além de reduzir o impacto ambiental como visto nos exemplos citados anteriormente.

### **1.1. Agroindústria de flores ornamentais - *Chrysanthemum morifolium***

As flores e plantas ornamentais estão presentes em nosso cotidiano através das floriculturas, paisagismos de jardins, prédios residenciais e comerciais, decoração em eventos e casas. A produção de flores no Brasil, para a comercialização, foi

implementada na década de 1930 com a chegada dos japoneses que se instalaram na região conhecida por cinturão verde no estado de São Paulo<sup>7, 8</sup>.

As principais espécies de flores cultivadas no país, de acordo com o Instituto brasileiro de floricultura (Ibraflor, 2014), são as rosas e crisântemos para plantas de corte e as orquídeas e crisântemo para plantas nos vasos. Os índices elevados de consumo do crisântemo podem estar relacionados ao fato de ser uma planta híbrida que sofreu muitos melhoramentos genéticos em busca do aprimoramento ornamental, ou seja, melhoria na cor, diversidade de inflorescência, tamanho, forma, altura vegetativa e qualidade. Características que as tornam amplamente aceitas no comércio global e nacional de flores ornamentais<sup>7, 9</sup>.

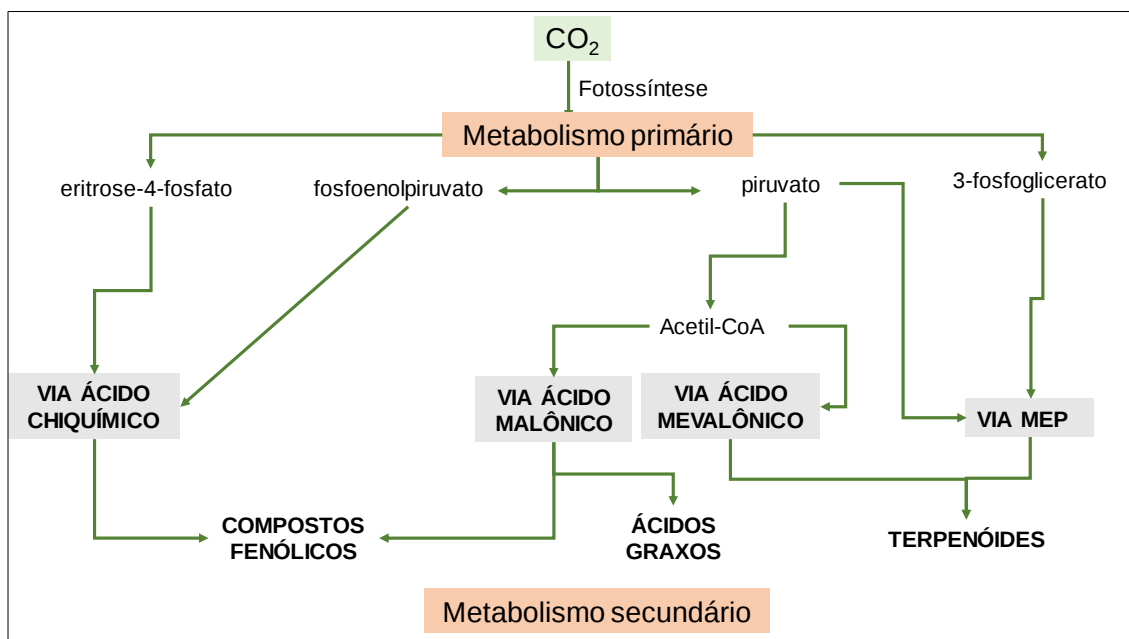
O *Chrysanthemum morifolium*, também conhecida como *Dendranthema x grandiflorum* Ramat, é uma espécie perene da família Asteraceae. Bastante conhecida nos países asiáticos e apresenta mais de 2000 anos de história, das quais pode-se citar o alto consumo na alimentação humana (chás, sopas, saladas), devido a eficácia no tratamento e prevenção de doenças renais, do baço, da visão, ação anti-inflamatória e antioxidante. Esses benefícios se dão por ser uma espécie rica em compostos químicos pertencentes às classes: terpenos, ácidos graxos, flavonoides, ácidos clorogênicos. Classes essas responsáveis por inúmeras funções biológicas, inclusive atividades inseticida e larvicida como mostrado em um estudo exploratório realizado por Spindola *et al.* (2016)<sup>10-12</sup>. O estudo pioneiro avaliou o potencial larvicida atribuído aos metabólitos secundários presentes nos resíduos da espécie *Dendranthema x grandiflorum* Ramat. O extrato com características apolares obtido a partir de flores dessa espécie foi testado nas larvas *Aedes aegypti* e obteve-se uma LC<sub>90</sub> a 15 ppm. A avaliação da composição química do extrato foi realizada por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS), tendo sido observada a presença de ácidos graxos e seus ésteres (ácido palmítico, palmitato de metila), esteroides (estigmasterol e sitosterol) e triterpenos ( $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\beta$ -amirina, acetato de  $\alpha$ -amirina e lupeol). Tais compostos são conhecidos por terem atividade larvicida. Esta atividade foi atribuída principalmente à presença dos triterpenos, conforme estudos anteriores realizados por Kuppussamy *et al.* (2009)<sup>12</sup>,<sup>13</sup>. Apesar de ser uma espécie rica em compostos químicos, não existem relatos que descrevam a reutilização ou descarte alternativo para os resíduos de *Chrysanthemum*

*morifolium*. Frequentemente, os resíduos gerados pela indústria ornamental de *Chrysanthemum morifolium* são descartados pelos estabelecimentos comerciais.

O estado do Espírito Santo encontra-se entre os polos de produção e comercialização de flores de crisântemo no país. A produção concentra-se nas regiões montanhosas do estado, favorecida pelo clima com temperaturas mais baixas. O polo de comercialização está distribuído pelas feiras livres que acontecem no estado, principalmente na região metropolitana de Vitória e em floriculturas<sup>8</sup>. O grande problema do comércio ornamental de flores é o volume de resíduos que são gerados - folhas, flores e caules - sem valor comercial devido a defeitos oriundos do calor, colheita ou transporte inadequado, além do mais durante a confecção dos arranjos decorativos muitos caules e folhas são descartados.

## **1.2. Definição das classes de compostos químicos presentes na espécie *Chrysanthemum morifolium***

As importantes moléculas presentes na espécie *Chrysanthemum morifolium* se deve a um conjunto de reações químicas também conhecidas como rotas metabólicas secundárias. A rota metabólica secundária sintetiza produtos que possuem uma distribuição limitada na natureza, normalmente são encontrados em organismos específicos ou grupos de organismos e expressam a individualidade da espécie<sup>14</sup>. São sintetizados a partir do metabolismo da glicose, que promove o surgimento de quatro importantes vias: Ácido Chiquímico, Ácido mevalônico (MEV), Ácido Malônico e Metileritritol Fosfato (MEP), Figura 1.1<sup>14, 15</sup>.



**Figura 1.1.** Esquema das rotas biosintéticas para a formação dos metabólitos secundários<sup>15</sup>.

Entre a variedade de moléculas formadas nas vias metabólicas secundárias, veremos de forma detalhada as classes dos terpenóides, compostos fenólicos e ácidos graxos que estão majoritariamente presentes na espécie *Chrysanthemum morifolium* e são classes que apresentam propriedades inseticida.

A via metabólica do mevalonato proporciona a formação dos terpenóides, esse processo ocorre através das unidades de isopreno (C<sub>5</sub> – cadeias com cinco átomos de carbono). Os terpenos são formados a partir da condensação dessas unidades dando origem a cadeias de diferentes tamanhos, tais como os monoterpenos (C<sub>10</sub> – cadeias com dez átomos de carbono), que constituem 90% dos óleos essenciais permitindo uma grande variedade de estruturas (acíclicas, monocíclicas, bicíclicas) e várias funções químicas (álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres, peróxidos, fenóis). A extensão da cadeia com mais unidades de terpenos pode dar origem aos componentes: sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>), que possibilita o aumento no número de ciclos permitindo uma grande variedade de estruturas e funções, semelhantes às dos monoterpenos. Um esquema de formação para tais estruturas encontra-se na Figura 1.2 e exemplo de triterpenos na Figuras 1.3<sup>15, 16</sup>.

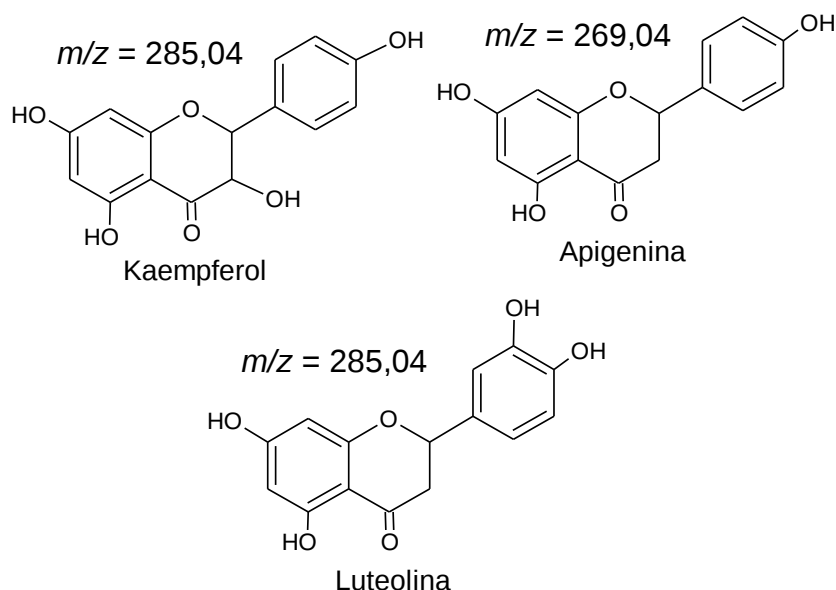


**Tabela 1.1.** Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a esqueleto básico.

| Esqueleto Básico | Classe de compostos fenólicos       |
|------------------|-------------------------------------|
| C6               | Fenóis simples, benzoquinonas       |
| C6-C1            | Ácidos Fenólicos                    |
| C6-C2            | Acetofenonas e ácidos fenilacéticos |
| C6-C3-C6         | Flavonoides e isoflavonoides        |

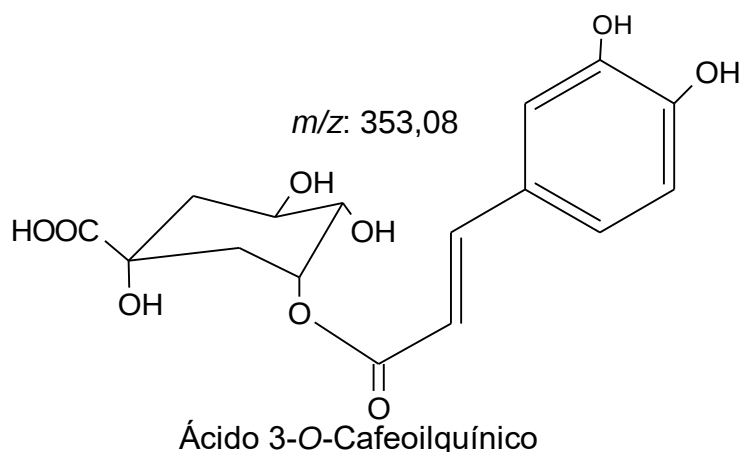
Dentro desta grande classe, conheceremos melhor os flavonoides e ácidos fenilpropanóicos, uma vez que estão presentes na matriz de estudo desta pesquisa - *Chrysanthemum morifolium* <sup>12, 16, 17</sup>.

Os flavonoides são sintetizados pela via metabólica dos fenilpropanóides e constituem uma importante classe de polifenóis, presentes com relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais. Podem ser encontrados de diversas formas estruturais, entretanto a maioria possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos de carbono entre elas, Figura 1.4 <sup>14, 17</sup>.



**Figura 1.4.** Estrutura de flavonoides comuns na espécie *Chrysanthemum morifolium*.

Os ácidos fenilpropanóicos, outra rica classe de compostos fenólicos, englobam um conjunto de substâncias formadas a partir da reação de esterificação entre o ácido *trans*-cinâmico ou derivado com o ácido quínico. Este último junto ao ácido caféico forma o éster representado na Figura 1.5. Os ácidos fenilpropanóicos estão presentes tanto na forma mono esterificada, como di e triesterificados <sup>17, 18</sup>.



**Figura 1.5.** Ácido fenilpropanóico.

Os ácidos graxos são sintetizados na via do ácido malônico, por uma sequência repetitiva de reações, catalisadas por um complexo enzimático. Na biossíntese, o acetil-CoA e o malonil-CoA são convertidos em tioésteres enzimáticos que sofrem uma sequência de reações. O comprimento das cadeias de ácidos graxos é controlado pela especificidade do complexo enzimático que adicionam unidades de átomos de carbono na cadeia linear, onde se processa uma série de reações de oxido-redução e transesterificação. Ao final do ciclo ocorre a formação do acil-CoA graxo ou ácido graxo livre. Os ácidos graxos palmítico, esteárico, oleico e linoleico formam 95% dos ácidos disponíveis na natureza. Na tabela 1.2, especifica-se alguns ácidos graxos comuns presentes no *Chrysanthemum morifolium*<sup>14, 15</sup>.

**Tabela 1.2.** Ácidos graxos comuns presentes no *Chrysanthemum morifolium*.

| Nome               | Fórmula Molecular                                                                                                               | Abreviação      |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>SATURADOS</b>   |                                                                                                                                 |                 |
| Mirístico          | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$                                                                              | 14:0            |
| Palmítico          | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$                                                                              | 16:0            |
| Esteárico          | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$                                                                              | 18:0            |
| <b>INSATURADOS</b> |                                                                                                                                 |                 |
| Oleico             | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$                                               | 18:1(9c)        |
| Linoleico          | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$                        | 18:2(9c,12c)    |
| Linolênico         | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$ | 18:3(6c,9c,12c) |

### 1.2.1. *Chrysanthemum morifolium* – Perfil metabolômico e atividades biológicas

As classes definidas no tópico anterior, além de apresentarem propriedade inseticida, são responsáveis por importantes atividades biológicas, conforme demonstrado em recentes estudos. As flores de *Chrysanthemum morifolium* fazem

parte da dieta de algumas civilizações orientais desde alguns séculos. No ano de 2010, diante das pesquisas que descreveram os benefícios do consumo do chá da flor de *Chrysanthemum morifolium* nos distúrbios cardíacos, Sun *et al.* tentaram relacionar esses efeitos com a presença dos componentes bioativos. Realizou-se a análise de HPLC no extrato que permitiu identificar oito tipos de flavonoides, dentre os quais, quatro eram flavonoides glicosilados (vitexina-2-O-ramnosídeo, quercetina-3-galactosídeo, luteolina-7-glucosídeo e quercetina-3- glucosídeo) e os demais eram agliconas, como quercetina, luteolina, apigenina, kaempferol e miricetina. Na análise GC-MS foi possível identificar cinquenta e oito compostos voláteis que se incluíram na classe dos monoterpenos, sesquiterpenos e triterpenos. Este estudo mostrou que a espécie *Chrysanthemum morifolium* é rica em flavonoides e terpenos e os benefícios à saúde relatados podem estar associados a esses compostos abundantes na planta<sup>19</sup>.

Ainda nesse contexto de avaliação do perfil metabolômico do *Chrysanthemum morifolium*, Lawal *et al.* (2014) utilizaram a técnica GC-MS para analisar os extratos de flores e folhas de crisântemo obtidos a partir de uma hidro destilação utilizando o aparelho de Clevenger. Treze compostos foram identificados nos extratos das flores correspondendo a 97,5% da composição do óleo. Vinte e uma substâncias foram encontradas nos extratos das folhas o que corresponde a 93,7% da composição do óleo. A composição química do óleo das flores consistiu basicamente de *cis*-crisantenina (21,6%), ácido octadecanóico (19,5%) e borneol (15,5%). Em contrapartida, o óleo das folhas foi caracterizado por borneol (20,5%), 1,8-cineol (15,2%), *trans*- $\alpha$ -bergamoteno (14,0%), cânfora (10,6%) e  $\alpha$ -pineno (9,3%)<sup>20</sup>.

Um estudo mais recente realizado por Zhang *et al.* (2019) avaliou a combinação no consumo humano de *Chrysanthemum morifolium* com o fruto mirtilo (*Lycium barbarum*) uma vez que ambos apresentam em sua composição química moléculas com potente propriedade antioxidantes e anti-inflamatórias. Realizou-se análises de determinação de fenol total, determinação de flavonoide total, teor de polissacarídeos e cromatografia líquida de alta performance-acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Como resultado, observou-se a presença de oito compostos fenólicos nas flores de crisântemo, enquanto os polissacarídeos foram determinados no mirtilo. Os testes de atividade antioxidante e anti-inflamatória da combinação das duas amostras foram extremamente eficientes devido a interação

sinérgica. Tais mecanismos, podem ser atribuídos ao acacetina-7-O-rotnídeo, luteolina-7-O- glucosídeo e ácido clorogênico da flor de crisântemo e polissacarídeo no mirtilo <sup>21</sup>.

Seis novos compostos foram isolados das flores de *Chrysanthemum morifolium*, por Yang *et al.* (2019). Em resumo, duas novas lignanas do tipo arilnaftaleno e quatro novos compostos foram isolados e caracterizados por metodologias espectroscópicas. A avaliação *in vitro* da atividade neuroprotetora sugeriu com os compostos (1 e 2 do tipo arilnaftaleno lignano de fórmulas moleculares C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>12</sub> e C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>13</sub> respectivamente. E o composto 3, também com fórmula molecular C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>12</sub>, porém os dados de ressonância magnética nuclear (RMN) estabeleceram a estrutura 2,6-dimetoxil-4-hidroximetil-fenol 1-O-(6-O-cafeoil)-p-d glucopiranosídeo) poderiam melhorar significativamente a viabilidade celular, funcionando como potenciais agentes neuroprotetores <sup>22</sup>.

Li *et al.* (2019), avaliaram 17 amostras de crisântemo extraídas com água quente e com metanol 75% (v/v), os extratos foram submetidos a análise de LC-MS. Identificou-se 34 compostos, que se distribuíram nas classes de ácidos fenólicos (ácidos clorogênicos, ácidos cafeoilquínico, dicafeoilquínicos e isômeros) e flavonoides. Os resultados biológicos do presente estudo, mostraram pela primeira vez que os extratos de crisântemo em água quente tiveram atividades comparáveis, se não maiores, quanto a capacidade anti-inflamatória e antioxidante, em relação aos equivalentes extratos de metanol a 75% (v/v)<sup>23</sup>.

Um artigo de revisão publicado recentemente por Takahashi *et al.* (2020) teve como objetivo avaliar uma variedade de flores comestíveis visando relacioná-las com as propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais, discutindo os ativos biológicos de acordo com o perfil químico. Para as flores de *Chrysanthemum morifolium*, comumente utilizada nos países como China e Japão inseridas em saladas, sopas, bebidas e fitoterápicos, estudos mostram que possui propriedades medicinais, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, inseticida relacionadas a presença de flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos, triterpenos e polissacarídeos<sup>24</sup>.

Conforme mencionado, a espécie *Chrysanthemum morifolium* é uma matriz rica e bastante complexa quanto à composição química. As diversas aplicabilidades que podem ser destinadas a essas moléculas, torna um forte argumento para a iniciativa de reaproveitamento desse agrorresíduo. No entanto, testes de atividade para as

larvas do vetor *Aedes Aegypti* utilizando moléculas inseticidas extraídas especificamente das flores de *Chrysanthemum morifolium* foram poucos explorados, conforme revisão na literatura, os primeiros relatos foram realizados por Spindola *et al.* em 2016. Porém, existem muitas abordagens sobre a extração dessas moléculas (triterpenos, ácidos graxos, compostos fenólicos) em outras matrizes e elas apresentaram importantes propriedades inseticida quando testados contra as larvas de vetores de doenças endêmicas.

Diante disso, um pequeno histórico do uso dos inseticidas naturais e um apanhado recentes de publicações que mostram a potente atividade larvicida dessas moléculas, quando extraídas de outras espécies e testadas contra o vetor *Aedes Aegypti* encontram-se descritos abaixo.

### **1.3. Histórico dos inseticidas naturais**

A primeira geração dos inseticidas ocorreu nos primeiros 50 anos do século XX. Nesse período houve uma predominância no uso de inseticidas de origem natural inorgânica e orgânica. Os poucos produtos de origem inorgânica utilizados foram arseniatos de cálcio e chumbo, enxofre em pó, vários sulfatos, fluorsilicato de bário, óleos minerais. Os inseticidas orgânicos naturais mais usados naquele momento foram os alcaloides como nicotina, *nor*-nicotina, anabasina, piretróides e alguns poucos quasinóides. Esses, destacam-se como vantagem no mercado pelo alto potencial e seletividade, entretanto, apresentavam as desvantagens de serem caros, de pouca disponibilidade e sensíveis à luz<sup>25, 26</sup>.

Em 1930 foi realizada a primeira síntese de um inseticida orgânico. Em decorrência disso, nas décadas de 50 a 70 os métodos de controle biológico com produtos orgânicos naturais, até então amplamente utilizados, perderam espaço e foram rapidamente substituídos pela síntese orgânica, devido à rápida ação e eficiência. Esse período marcou o início da segunda geração de inseticidas. Os inseticidas sintéticos mais produzidos nesse período foram os organoclorados, os organofosforados, os carbamatos e os piretroides.

Com o uso indiscriminado dos inseticidas sintéticos, percebeu-se a necessidade de utilização de doses cada vez maiores, mais frequentes, gerando um grande gasto dos produtos e problemas com insetos tolerantes e resistentes, surtos populacionais

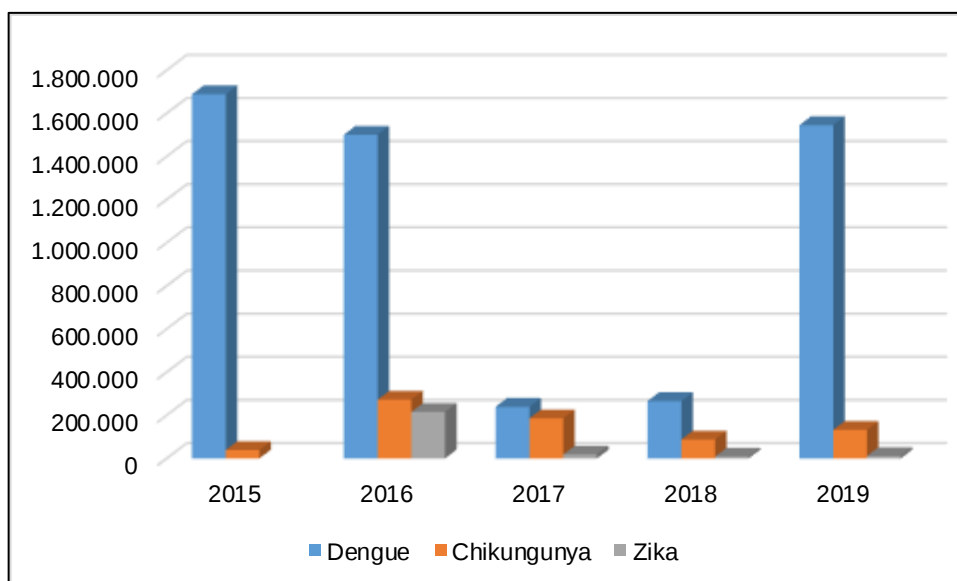
de pragas secundárias, resíduos tóxicos nos alimentos e contaminação do meio ambiente<sup>25, 26</sup>.

A partir dos anos 1990 deu-se início à terceira geração de inseticidas, com o desenvolvimento de moléculas mais específicas e menos agressivas ao meio ambiente. A biodegradabilidade dos produtos passou a ser um requisito importante, até fundamental, nas novas avaliações e planejamentos de inseticidas. Neste momento, os novos inseticidas deveriam oferecer maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e um efetivo controle contra as pragas. Inicia-se novamente buscas por modelos presentes na natureza – inseticidas naturais<sup>25, 26</sup>. Atualmente existem mais de 2000 espécies de plantas conhecidas pelas suas propriedades inseticidas. No entanto, comercialmente, poucas dessas plantas têm sido utilizadas por alguns países para a extração de piretrinas, rotenóides, alcaloides e outras classes que apresentam significativa propriedade inseticida.

#### **1.4. Fitoprodutos e atividade larvicida sobre *Aedes Aegypti***

Ensaio de atividade larvicida utilizando substâncias extraídas de produtos de origem natural e em alguns casos, resíduos oriundos da agroindústria tornaram-se prioridade para alguns pesquisadores, principalmente devido ao aumento da incidência de problemas ecológicos pelo uso exagerado de larvicidas e inseticidas sintéticos, principalmente os organofosforados <sup>27, 28</sup>.

A busca de por novas alternativas para amenizar os problemas com o elevado número de casos de dengue, chikungunya e zika emitidos pela Secretaria de Vigilância da Saúde nos anos de 2015 a 2019, conforme Figura 1.6 <sup>29, 30</sup>. Essas doenças são transmitidas principalmente pela espécie de mosquito *Aedes aegypti* e são responsáveis por uma alta carga de morbidade e mortalidade principalmente em países pobres <sup>31, 32</sup>.



**Figura 1.6.** Número de casos prováveis das doenças: Dengue, Chikungunya e Zika no Brasil - 2015 a 2019 <sup>33</sup>.

De acordo com gráfico, percebe-se uma redução significativa no número de casos de dengue nos anos de 2017 e 2018, que se deve a intensificação nas medidas de prevenção por parte do poder público, população e sociedade científica no combate aos focos do mosquito transmissor *Aedes Aegypti*. O relaxamento dessas medidas provocou uma elevação significativa nos números de casos em 2019, regredindo para valores próximos aos de 2016.

Nesse contexto, um artigo de revisão publicado em 2015, Pavela descreve diferentes espécies de plantas pertencentes a uma variedade de famílias (Lamiaceae, Cupressaceae, Rutaceae, Apiaceae, Myrtaceae e Asteraceae), que foram estudadas por pesquisadores e confirmaram a presença de componentes químicos com potencial propriedade larvicida para a formulação de um fitoproduto. Além disso, o autor destacou que os compostos de origem natural são facilmente biodegradados, causam menos danos ao meio ambiente, são localmente disponíveis em muitas partes do mundo e podem ser obtidos do reaproveitamento de resíduos agroindustriais <sup>34</sup>.

Um segundo artigo de revisão publicado por Pavela *et al.* (2019), relatou recentes publicações de diferentes espécies de plantas, abordando a eficácia dos extratos obtidos dessas espécies quanto a atividade larvicida. Das 429 espécies avaliadas, 29 delas apresentaram atividade larvicida notável, CL<sub>50</sub> com concentrações menores que 10 ppm. Os autores destacam que plantas com esta eficiência são promissoras para o desenvolvimento de novas formulações inseticidas que podem substituir os larvicidas sintéticos. Uma avaliação dos marcadores bioativos

pertencentes a estas espécies, pode-se concluir que a grande maioria pertence à classe dos triterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, alcanoides, alcaloides, cumarinas e esteróis. Os autores também avaliaram a importância do uso de misturas sinérgicas como estratégia para aumentar a eficiência dos inseticidas e larvicidas naturais<sup>17</sup>. Consiste no uso de uma outra substância ou mistura de substâncias, melhorando assim a toxicidade geral pelo aumento a biodisponibilidade da substância ativa ou permite a redução da concentração desta pelo uso de doses menores. Consequentemente a toxidez e os efeitos adversos diminuem<sup>35</sup>.

Diversos estudos, conforme Tabela 1.3, demonstram o potencial que algumas moléculas apresentam frente as larvas do vetor *Aedes Aegypti* e outros vetores.

**Tabela 1.3.** Potencial de algumas espécies apresentam frente as larvas do vetor *Aedes Aegypti*.

| Espécie                                                                               | Referência                               | Classe                                                  | Composto Majoritário no extrato                                         | Ativ. extrato (ppm)                                   | Ativ. composto isolado (ppm)                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1. <i>Hyptis fruticosa</i><br>2. <i>Hyptis pectinata</i><br>3. <i>Lippia gracilis</i> | Silva et al. (2008) <sup>28</sup>        | Monoterpenos<br>Sesquiterpenos                          | Carvacrol<br>Óxido de cariofileno                                       | CL <sub>100</sub><br>1: 2000<br>2: 1000<br>3: 300     | -                                                                            |
| <i>Coccinia indica</i>                                                                | Senthilkumar et al. (2012) <sup>36</sup> | Triterpenos                                             | Ácido oléico                                                            | CL <sub>50</sub> - 158                                | CL <sub>50</sub> - 5                                                         |
| <i>Platanus acerifolia</i><br><i>Malus domestica</i>                                  | Silva et al. (2016) <sup>37</sup>        | Triterpenos                                             | 1. Ácido betulínico<br>2. Ácido ursólico                                | -                                                     | CL <sub>50</sub><br>1. 142<br>2. 112<br>CL <sub>90</sub><br>1. 284<br>2. 221 |
| <i>Helicteres velutina</i>                                                            | Fernandes et al. (2018) <sup>38</sup>    | Ácido Graxo<br>Triterpenos<br>Esteroides<br>Flavonóides | Ácido palmítico;<br>Sitosterol;<br>Derivados oleanano                   | CL <sub>50</sub> - 3<br>CL <sub>100</sub> - 10        | -                                                                            |
| <i>Maerua siamensis</i>                                                               | Nobsathian et al. (2018) <sup>39</sup>   | Triterpeno                                              | Lupeol                                                                  | -                                                     | CL <sub>50</sub> - 133<br>CL <sub>90</sub> - 1340                            |
| <i>Waltheria viscosissima</i>                                                         | Ferreira et al. (2019) <sup>40</sup>     | Triterpenos<br>Esteroides<br>Flavonóides                | Ácidos betulônico e morônico;<br>β-sitosterol e estigmasterol           | CL <sub>100</sub><br>150 (parte aérea)<br>40 (raízes) | -                                                                            |
| 1. <i>Aloe perryi</i><br>2. <i>Saussurea lappa</i>                                    | Massarani et al. (2019) <sup>41</sup>    | Ácidos Clorogênicos<br>Flavonóides                      | Derivados dos ácidos cafeoilquínico; derivados de Luteolina e Apigenina | CL <sub>100</sub><br>1: 31<br>2: 125                  | -                                                                            |
| <i>Artocarpus</i>                                                                     | Pineda-Cortel et                         | Triterpenos                                             | -                                                                       | CL <sub>50</sub> - 80                                 | -                                                                            |

|                |                                 |                           |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|
| <i>blancoi</i> | <i>al.</i> (2019) <sup>42</sup> | Esteroides<br>Flavonóides |
|----------------|---------------------------------|---------------------------|

Em 2008, Silva *et al.* produziram óleos essenciais a partir das folhas das espécies de plantas das famílias Lamiaceae (*Hyptis fruticosa* e *H. pectinata*) e Verbenaceae (*Lippia gracilis*), tais extratos foram testados quanto a atividade larvicida para o *Aedes aegypti*, obtendo-se 100 % de mortalidade larval nas concentrações 2000 ppm, 1000 ppm e 300 ppm respectivamente. A caracterização química dos extratos foi realizada por GC-MS com predominância de 90% da composição química de compostos na classe dos monoterpenos e sesquiterpenos. A atividade foi relacionada à presença do carvacrol e óxido de cariofileno presentes em maiores concentrações nos extratos. Os demais compostos, com concentrações menores, provavelmente atuaram sinergicamente para alcançar a atividade inseticida <sup>28</sup>.

Em 2016, Silva *et al.*, isolaram ácidos triterpenóides betulínico e ursólico obtidos da casca de *Platanus acerifolia* e casca residual de maçã (*Malus domestica*), respectivamente, com o objetivo de avaliar se tais compostos apresentam atividade contra as larvas do *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram CL<sub>50</sub> nas concentrações de 112 ppm e 142 ppm e CL<sub>90</sub> nas concentrações de 284 ppm e 221 ppm para os ácidos betulínico e ursólico respectivamente. A atividade larvicida cresceu significativamente quando o tempo de exposição aumentou de 48 horas para 96 horas <sup>37</sup>.

As partes aéreas da espécie *Helicteres velutina* foram avaliadas por Fernandes *et al.* (2018). O estudo fitoquímico levou à identificação por RMN de 16 compostos isolados, dentre eles destacam-se um ácido graxo (ácido palmítico), um álcool alifático, quatro derivados de clorofila, um esterol (derivado do sitosterol), triterpenos (derivados do oleanano), uma lignana e flavonoides. O extrato etanólico bruto de *H. velutina* apresentou forte atividade larvicida em baixas concentrações para as larvas de *Aedes aegypti*, conforme dados Tabela 1.3. A ação sinérgica dos compostos encontrados no extrato podem determinar e justificar o interesse de aplicação como larvicida doméstico<sup>38</sup>.

Um riquíssimo estudo fitoquímico da espécie *Waltheria viscosíssima* foi executado por Ferreira *et al.* (2019), o trabalho tinha como objetivo realizar um estudo metabolômico, juntamente com uma avaliação da atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*. O estudo fitoquímico foi realizado com dois tipos de extratos, o da parte

aérea da planta e o extrato das raízes, o que levou à identificação de quatorze compostos incluindo uma mistura de esteroides ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol), dois triterpenos (ácido betulônico e ácido morônico), dois alcaloides derivados da quinolina e por fim oito flavonóides dentre eles pode-se destacar (acacetina, kaempferol, quercetina, luteolina 7-O-D-glucopiranosídeo). Nos testes com atividade larvívica foi possível obter uma mortalidade de 100% das larvas ( $CL_{100}$ ) nas concentrações de 150 ppm e 40 ppm dos extratos provenientes das partes aéreas da planta e raízes respectivamente. Avaliando-se a composição química pode-se perceber que este extrato apresenta predominância de compostos fenólicos <sup>40</sup>.

Um recente estudo que mostra o potencial dos ácidos clorogênicos e compostos fenólicos quanto a atividade inseticida sobre o mosquito *Aedes aegypti*. Massarani *et al.* (2019), realizaram uma avaliação de trinta e nove plantas medicinais obtidas em diversas áreas da Arábia Saudita e Iêmem. Os resultados mostraram que as espécies *Saussurea lappa*, *Ocimum tenuiflorum*, *Taraxacum officinale*, *Nigella sativa* e *Hyssopus officinalis* exibiram mais de 80% de mortalidade sobre as fêmeas adultas do mosquito. Nos testes com as larvas *Aedes Aegypti*, flores de *Aloe perryi* apresentaram  $CL_{100}$  a 31,25 ppm, os extratos de *Saussurea lappa* foi o segundo mais ativo apresentando  $CL_{100}$  a 125 ppm. Os extratos ativos polares foram processados usando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) e GC-MS para identificar compostos bioativos. Como resultado, observou-se a presença de vários metabólitos secundários, tais como o ácido caféico, quínico seus glicosídeos, ácidos cafeoilquínico, dicafeoilquínico. Além disso, a luteolina, o glucosídeo de luteolina, o glucuronídeo de luteolina e o diglucuronídeo também foram identificados. Com base nos dados, pode-se concluir que os ácidos fenólicos, clorogênicos e flavonoides presentes nos extratos vegetais proporcionam atividade inseticida diminuindo significativamente o número de *A. aegypti* adultos <sup>43</sup>.

Pineda-Cortel *et al.* (2019) avaliaram a atividade larvívica e ovívica contra *Aedes aegypti* em extratos das folhas da espécie *Artocarpus blancoi*. Uma triagem fitoquímica qualitativa foi realizada com os extratos (hexano, acetato de etila e frações aquosas) e revelou presença moderada de glicosídeos e esteróis e quantidades vestigiais de triterpenos, flavonóides, saponinas e taninos. Como resultado os autores concluíram que o extrato de *A. blancoi* possui atividades larvícidas e ovícidas contra *A. aegypti*. Quanto a eficiência, a fração de acetato de etila apresentou maior

toxicidade para as larvas e óvulos de *A. aegypti* (CL<sub>50</sub> 18,59 ppm e CL<sub>50</sub> 80 ppm respectivamente)<sup>42</sup>.

De acordo com os estudos apresentados, percebe-se que as classes dos terpenos, ácidos graxos e compostos fenólicos possuem uma potente propriedade inseticida, classes essas que também são encontradas na espécie do *Chrysanthemum morifolium*. Portanto, a pesquisa em questão pretende aliar a potencial atividade larvicida presente nas moléculas que se encontram na espécie em estudo, aos benefícios oferecido a sociedade e meio ambiente, quando realiza-se o reaproveitamento dos resíduos da agroindústria.

A proposta possui grande relevância, uma vez que a atividade larvicida atribuída nas moléculas extraídas do agrorresíduo de *Chrysanthemum morifolium* possibilita a elaboração de um fitoproduto para o combate das larvas do vetor *Aedes aegypti*, proposta inédita para a espécie em questão. Para a formulação de um fitoproduto sabe-se que a matéria-prima, de origem natural, deve apresentar uma boa qualidade e uma constante homogeneidade quanto a composição química. A quimiometria é um artifício matemático que pode ser adotado como forma de avaliar e monitorar a homogeneidade da composição química do agrorresíduo gerado pela indústria ao longo de todo o ano com o objetivo de garantir a qualidade do fitoproduto em qualquer momento que for produzido <sup>44, 45</sup>.

Além disso, pode-se notar que uma variedade de técnicas analíticas são importantes ferramentas que colaboram no estudo metabolômico dos agrorresíduos. Abordaremos uma breve definição sobre essas técnicas analíticas e publicações recentes, inovadoras que utilizam estas ferramentas para avaliar a composição química do agrorresíduo.

## **1.5. Metodologias analíticas utilizadas para estudo metabolômico do Agrorresíduo de *Chrysanthemum morifolium***

### **1.5.1. Quimiometria**

A quimiometria é “[...] uma disciplina da química que emprega métodos matemáticos e estatísticos para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informações químicas com a análise dos dados obtidos”. É uma área que trabalha com a análise de dados químicos de natureza multivariada, permitindo estudar mais de uma variável ao mesmo tempo <sup>46</sup>.

Os métodos quimiométricos podem ser divididos em três principais áreas, das quais podemos destacar planejamentos e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada. Na área de planejamento de experimentos busca-se encontrar quais as variáveis que mais afetam um determinado processo, assim como a interação entre elas <sup>47, 48</sup>.

O reconhecimento de padrões possibilita verificar se as amostras trabalhadas são similares entre si, formando grupamentos, detectando assim tendência nos dados. Para isso são divididos em dois grupos: método não supervisionado e método supervisionado<sup>48</sup>. Os métodos supervisionados, utiliza-se uma classe preestabelecida para a realização da análise dos dados e construção dos modelos. Os métodos não supervisionados, não requer nenhuma classificação prévia, os agrupamentos serão formados naturalmente com base na informação contida nos dados experimentais, sem a preocupação de construir uma regra preditiva, por isso também são conhecidos por métodos de análise exploratória de dados (EAD). Dois métodos matemáticos podem ser aplicados para a EAD: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos por Métodos Hierárquicos (HCA).

A PCA é a principal técnica adotada na quimiometria para realizar o reconhecimento de padrões e classificação de amostras. Este método realiza uma compressão dos dados projetando-os em um espaço de menor dimensão, reduzindo assim a dimensionalidade do conjunto de dados original, pois as variáveis que fornecem informações semelhantes são agrupadas, consequentemente as informações relevantes (máxima variância) serão separadas e ampliadas tornando-as mais evidentes à inspeção visual, além do mais as amostras anômalas (*outliers*) serão detectadas <sup>47</sup>.

Como resultado, um novo conjunto de variáveis com propriedades desejáveis e específicas é definido, conhecidos por componentes principais, PC. Matematicamente, o procedimento de análises de componentes principais é descrito com a decomposição da matriz  $X$  ( $I \times J$ ) em duas matrizes, denominadas escores ( $T$ ) e uma matriz ortogonal de pesos ( $P$ ), mais uma matriz de erros ( $E$ ), como mostrado na equação 1:

$$X = TP^T + E \quad (\text{eq. 1})$$

Merlin *et al.* (2014) avaliaram o teor de nutrientes e matéria orgânica presentes em uma amostra de esterco bovino e em quatro amostras de esterco de aves,

agrorresíduos gerados pela indústria de pecuária e avicultura respectivamente. As análises foram realizadas com espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, o teor de nutrientes foi realizado com a digestão da amostra utilizando peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico, o teor de carbono foi realizada com a combustão a seco usando um analisador elementar Eurovector 3000. Os resultados obtidos nas análises químicas e espectroscópicas foram submetidos à PCA. Com base na análise química, auxiliada ao tratamento estatístico, foi possível observar que as amostras provenientes do esterco de aves apresentaram maior teor de todos os nutrientes (N, P, K, Ca, Mg e C) quando comparadas à amostra de esterco bovino. Portanto, o esterco de aves pode ser considerado melhor do que o esterco bovino no aspecto nutricional. Ao empregar PCA, pode-se notar diferenças significativas nas características da matéria orgânica dos resíduos, indicadas pela clara separação entre os resíduos agroindustriais <sup>49</sup>.

Um estudo realizado por Lopez-Hidalgo *et al.* (2018), reaproveitou o soro do leite e a palha do trigo para geração de bio-hidrogênio através da digestão anaeróbica de múltiplos substratos. Nesse trabalho, a análise de PCA foi utilizada para avaliar a influência da temperatura, pH, concentração de substratos na produção de bio-hidrogênio. Através da análise quimiométrica, pode-se observar que a temperatura e pH são as variáveis mais importantes na produção de bio-hidrogênio. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que é possível utilizar misturas de resíduos agroindustriais para gerar biocombustíveis através de um processo barato que também pode ser aplicado em escala industrial <sup>50</sup>.

Xue *et al.* (2019) aplicaram a PCA para avaliar o perfil metabolômico dos metabólitos secundários apolares presentes nas folhas de treze diferentes cultivares de *Chrysanthemum morifolium* e a atividade antifúngica dos extratos. Os treze cultivares de crisântemo foram extraídos com acetato de etila, os extratos obtidos foram analisados quanto a composição química por GC-MS e quanto a atividade antifúngica. No total, 37 metabólitos secundários apolares pertencentes as classes dos terpenóides, derivados de ácidos graxos e benzenóides foram detectados nas amostras de *Chrysanthemum morifolium*. Pode-se observar que a classe dos terpenóides é a dominante nos treze cultivares, alguns compostos dessa classe estão presentes em todas as amostras, porém outros apresentam grandes variações na qualidade e quantidade. A análise de PCA mostra que as propriedades antifúngicas

dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *C. morifolium* podem ser atribuídas ao conteúdo de terpenóides, incluindo zingibereno,  $\beta$ -sesquifelandreno,  $\alpha$ -curcumeno, (*E*)- $\beta$ -farneseno,  $\alpha$ -farneseno e 1,8-cineol que estavam presentes nas amostras com resultados positivos para a atividade. Esta informação pode ser usada para facilitar a criação de novos cultivos de *C. morifolium* e estabelecer as bases para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos baseados na presença de alguns terpenóides que influenciam na melhoria e eficiência dos resultados<sup>11</sup>.

Um levantamento realizado na plataforma Web of Science (Tabela 1.4), descreve um histórico de artigos científicos publicados que relatam a aplicação PCA para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos na área de reaproveitamento de resíduos.

**Tabela 1.4.** Levantamento bibliográfico do primeiro ao mais atual estudo realizado envolvendo a aplicação de PCA na área de resíduo agrícola. Busca realizada na base de dados Web of Science.

| Ano  | Matriz                                                                                                                                                              | Aplicação                                                                                                                                                     | Metodologias analíticas                        | Referência                         |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|
| 2008 | Palha e bagaço de cana-de-açúcar                                                                                                                                    | Aproveitamento da lignina para tratamentos de efluentes para remoção de metais pesados.                                                                       | FT-IR<br>UV-Vís                                | Labat <i>et al.</i> <sup>51</sup>  |
| 2014 | Esterco bovino e aves                                                                                                                                               | Avaliar a qualidade dos estercos                                                                                                                              | FT-IR<br>Teor de carbono<br>Teor de Nutrientes | Merlin <i>et al.</i> <sup>49</sup> |
| 2015 | 14 tipos de resíduos lignocelulósicos: Palha de milho, bagaço de milho, palha de trigo, palha de cevada, bagaço de cana-de-açúcar, mix de resíduos de madeira, etc. | Avaliação das correlações entre a biodegradabilidade de matérias-primas lignocelulósicas no processo de digestão anaeróbia e suas características bioquímicas | UV-Vis<br>HPLC                                 | Liu <i>et al.</i> <sup>52</sup>    |
| 2018 | Resíduos do                                                                                                                                                         | Antioxidantes                                                                                                                                                 | UV-Vis                                         | Frasao <i>et al.</i> <sup>53</sup> |

|      |                                                                                                                         |                                                                                                               |                                                     |                                             |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|      | processamento de Pequi ( <i>Caryocar brasiliense</i> ) e Jucara ( <i>Euterpe edulis</i> )                               | naturais                                                                                                      |                                                     |                                             |
| 2018 | Soro do leite<br>Palha de trigo                                                                                         | Geração de bio-hidrogênio                                                                                     | Temperatura<br>pH                                   | Lopez-Hidalgo <i>et al.</i> <sup>50</sup>   |
| 2018 | Bagaço da azeitona                                                                                                      | Avaliação das características energéticas do bagaço de acordo com os diferentes métodos de extração de azeite | FT-IR                                               | Pizzi <i>et al.</i> <sup>54</sup>           |
| 2018 | Esterco, lodo ativado, bagaço de maçã, bagaço de vinho tinto, vinhaça de uísque e bagaço de azeite, restos de alimentos | Produção de carvão vegetal                                                                                    | FT-IR                                               | Cantero-Tubilla <i>et al.</i> <sup>55</sup> |
| 2019 | <i>Chrysanthemum morifolium</i>                                                                                         | Avaliação do perfil químico e atividade antifúngica                                                           | GC-MS                                               | Xue <i>et al.</i> <sup>11</sup>             |
| 2020 | <i>Chrysanthemum morifolium</i>                                                                                         | Avaliação do perfil químico e atividade Larvicida                                                             | FT-IR<br>ESI (-) FT ICR-MS<br>APCI (-) FT ICR-MS    | Lima <i>et al.</i> <sup>56*</sup>           |
| 2020 | Palha de milho                                                                                                          | Avaliação do retorna da palha de milho na qualidade do húmos do solo                                          | FT-IR<br>Espectroscopia de fluorescência            | Chen <i>et al.</i> <sup>57</sup>            |
| 2021 | <i>Chrysanthemum morifolium</i>                                                                                         | Avaliação do perfil químico e atividade Larvicida                                                             | GC-MS<br>ESI (-) FT ICR-MS<br>APCI (-) FT ICR-MS    | Lima <i>et al.</i> <sup>56*</sup>           |
| 2021 | Cavacos de madeira                                                                                                      | Comparação de três tipos de madeira e seu                                                                     | Avaliação dos compostos orgânicos totais e material | Proto <i>et al.</i> <sup>58</sup>           |

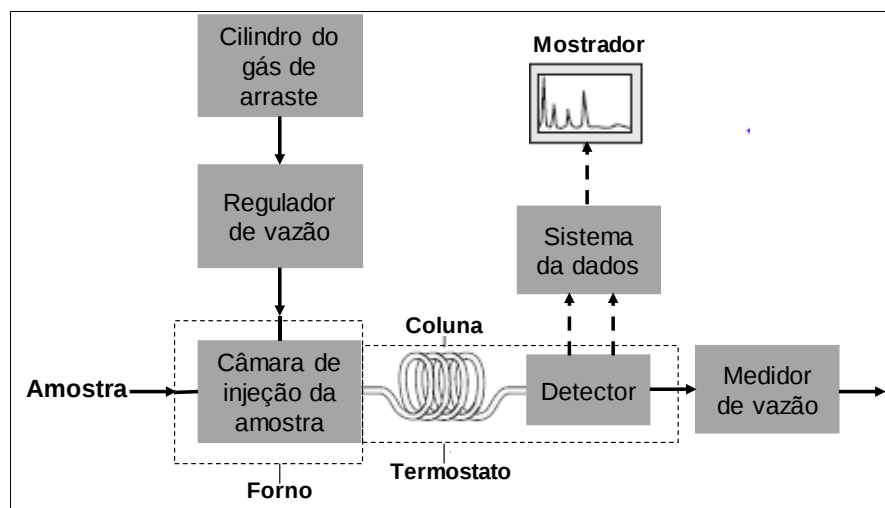
|      |                      |                                                                                               |                                                |                                    |
|------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|
|      |                      | comportamento<br>durante a<br>combustão                                                       | particulado                                    |                                    |
| 2021 | Resíduos de<br>milho | Avaliação da<br>influência da<br>diversidade<br>genética na<br>qualidade do<br>biocombustível | Teor de umidade<br>Rendimento material<br>seco | Munaiz <i>et al.</i> <sup>59</sup> |

\*Artigos publicados a partir da tese em questão.

Diante dos fatos descritos, percebe-se, que a quimiometria é uma importante ferramenta estatística que auxilia na interpretação dos dados analíticos e classificação das amostras. No entanto, a aplicação das práticas quimiométricas no campo de reaproveitamento de resíduos é uma prática recente existindo poucas publicações, conforme Tabela 1.4.

### 1.5.2. Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é um tipo de cromatografia em coluna, que proporciona a separação dos diferentes componentes químicos presentes em uma mistura (gasosa ou volátil) na qual podem se distribuir entre duas fases, móvel e estacionária. A fase estacionária é mantida dentro de uma coluna (vidro, alumínio, cobre ou aço inoxidável) e normalmente é constituída por uma camada microscópica de líquido ou de polímero sobre um suporte sólido inerte. A interação do analito com a fase estacionária irá ocorrer em diferentes graus de afinidade que dependerá das diferenças de polaridade ou de massa molecular dos componentes presentes na mistura, fazendo com que cada composto possua um tempo de retenção específico. A fase móvel, também denominado gás de arraste, deve ser inerte (hélio, argônio, nitrogênio, hidrogênio) e é responsável por transportar a amostra pela coluna de separação até chegar ao detector. O diagrama de blocos, Figura 1.7, foi adotado para representar um cromatógrafo gasoso <sup>60</sup>.



**Figura 1.7.** Diagrama de blocos para representar um cromatógrafo gasoso.

A cromatografia gasosa pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção: ionização em chama, espectrômetro de massas, fotoionização, infravermelho com transformada de Fourier. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas (GC-MS) combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). A combinação dos dois processos amplia a capacidade de identificação de diferentes estruturas químicas e reduz a possibilidade de erros nas análises <sup>60, 61</sup>.

Para a identificação das substâncias presentes em uma amostra, analisada por GC-MS, utiliza-se a comparação dos tempos de retenção e os espectros de massas delas com substâncias padrões. Entretanto, o número de compostos em uma amostra pode ser muito grande, o que em alguns casos torna-se economicamente limitante o uso de padrões para a identificação. A análise GC-MS também possibilita comparar espectros de massas obtidos experimentalmente com aqueles contidos em uma biblioteca de espectros de massas. Este processo de identificação, em alguns casos, pode gerar incerteza, quando os espectros obtidos são semelhantes para um grupo de moléculas e, especialmente, quando se trata de isômeros presentes na amostra. O índice de retenção pode auxiliar e aumentar a confiabilidade neste propósito, evitando-se assim uma identificação equivocada. O índice de retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse <sup>62</sup>.

Dentre os índices de retenção encontrados na literatura pode-se citar o índice Kovats (IK), calculado sob condições isotérmicas de temperatura o cálculo é feito segundo a equação 2:

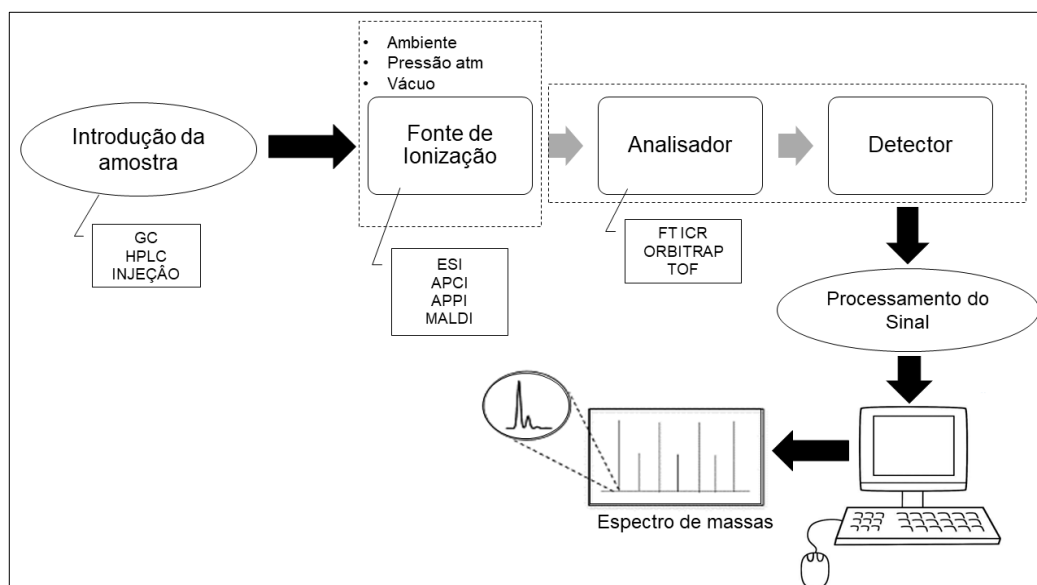
$$KI = 100n + \left( \frac{\log t'_{R(X)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \right) \quad (\text{eq. 2})$$

Onde:  $t'_{R(X)}$  é o tempo de retenção ajustado do composto desconhecido  $X$ ;  $t'_{R(n)}$  é o tempo de retenção ajustado do alcano linear menos retido na fase estacionária do que o composto  $X$ ;  $t'_{R(n+1)}$  é o tempo de retenção ajustado do alcano linear mais retido do que o composto  $X$ .

A utilização dos valores de índice de Kovats aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos em GC-MS, quando se utiliza apenas a interpretação de espectros de massas e a biblioteca NIST. Contribui de forma significativa para identificação e caracterização dos compostos voláteis<sup>62</sup>.

### 1.5.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas possibilita realizar a detecção de milhares de compostos em uma única análise. Dependendo da fonte de ionização utilizada, pouco ou nenhum preparo de amostra é requerido. Além disso, a técnica apresenta baixos limites de detecção e alta sensibilidade. O poder de resolução da técnica associa-se ao analisador. A Figura 1.8 mostra um diagrama esquemático dos componentes de um espectrômetro de massas.



**Figura 1.8.** Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

As fontes de ionização a pressão atmosférica, ESI (Electrospray), APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica), por exemplo. Tratam-se de técnicas brandas que possibilitam moléculas de alta polaridade, alto peso molecular, alta complexidade e termicamente lábeis serem ionizadas e analisadas por massas com pouca fragmentação do analito, preservando as características da amostra.

A técnica de eletrospray (ESI) é adequada para análises de moléculas com alta polaridade de baixo ou alto peso molecular e complexidade estrutural <sup>63</sup>. A formação de íons ocorre pela protonação de componentes básicos, gerando íons positivos, ou desprotonação de componentes ácidos, gerando íons negativos. No modo positivo são gerados íons  $[M+H]^+$ , enquanto que no modo negativo são formados íons  $[M-H]^-$ . Compostos heteroatômicos facilitam a formação de íons na fonte de ESI<sup>63, 64</sup>.

A técnica APCI é uma fonte indicada para compostos de polaridade intermediária e moléculas neutras, que não são facilmente ionizáveis em solução e pouco lábeis. A técnica APCI utiliza descarga corona para produzir reações íon molécula entre o analito, gás nebulizador e solvente. No processo de ionização pode ocorrer pelo mecanismo de ionização por Penning ( $M^{*+}$ ), transferência de prótons ( $[M + H]^+$  ou  $[M-H]^+$ ), abstração de hidretos ( $[M-H]^+$ ) e formação de adutos do gás reagente ( $[M + NH_4]^+$ ) <sup>64</sup>.

Os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de massa, que possui a função de separar tais íons de acordo com a sua relação massa-carga ( $m/z$ ). Os espectrômetros de massa podem ser classificados em várias categorias dependendo da natureza do analisador. A espectrometria de massas por Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (do inglês: *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry* - FT-ICR MS), possui uma ultra-alta resolução e exatidão que permite a atribuição da composição elementar dos milhares de compostos encontrados em amostras complexas, até mesmo para espécies que podem apresentar diferenças de massas uma da outra de até 3,4 mDa. O princípio de separação do analisador de massa com Ressonância Ciclotrônica de Íons (ICR) se baseia no movimento ciclotrônico do íon presente em um campo magnético uniforme. O campo magnético faz com que os íons tenham uma trajetória circular com diferentes frequências. A altíssima resolução, se deve a quantidade de ciclos que um determinado íon percorre ao ser excitado na presença de um campo

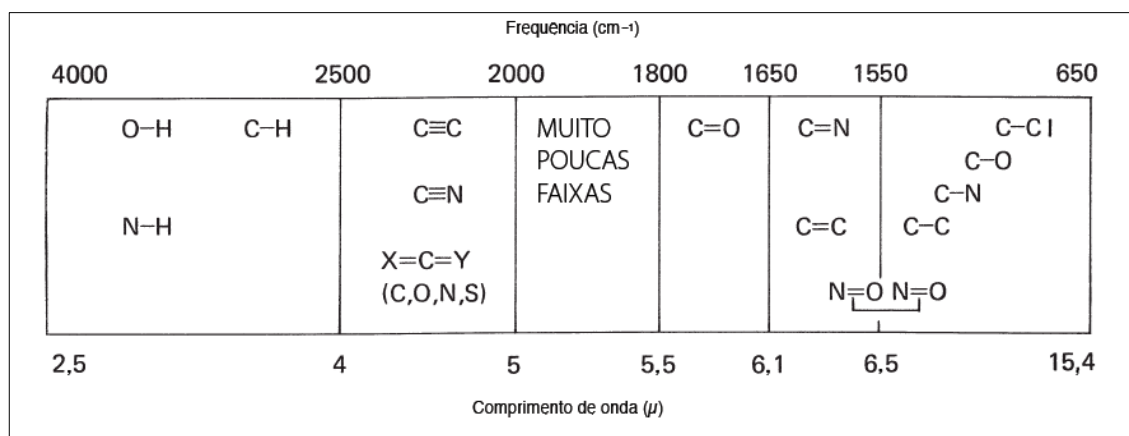
magnético. Quanto maior o campo magnético, menor o raio ciclotrônico que o íon percorre, portanto maior será o poder de resolução <sup>63, 65</sup>.

Por fim, o detector recebe os íons que foram separados pelo analisador, transformando a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, armazenados na memória de um computador gerando o espectro de massas <sup>63</sup>.

#### 1.5.4. Espectrometria de Infravermelho

Importante técnica utilizada para dar suporte na identificação de compostos orgânicos ou inorgânicos. As moléculas são excitadas atingindo um estado de maior de energia quando absorvem radiação no infravermelho. Esta energia absorvida serve para aumentar a amplitude dos movimentos vibracionais das ligações na molécula. No entanto, destaca-se que nem todas ligações da molécula absorvem energia no infravermelho, somente moléculas que apresentam variações nas distâncias ou ângulos de ligação produzem variação no momento de dipolo elétrico <sup>63</sup>.

O espectro de infravermelho normalmente é aplicado quando deseja descobrir se duas moléculas são idênticas, pois quando positivo, tais espectros coincidem pico a pico. Um segundo uso, mais importante, é o fornecimento de informações estruturais da molécula, pois cada ligação apresenta uma faixa absorção, conforme identificado na Figura 1.9.

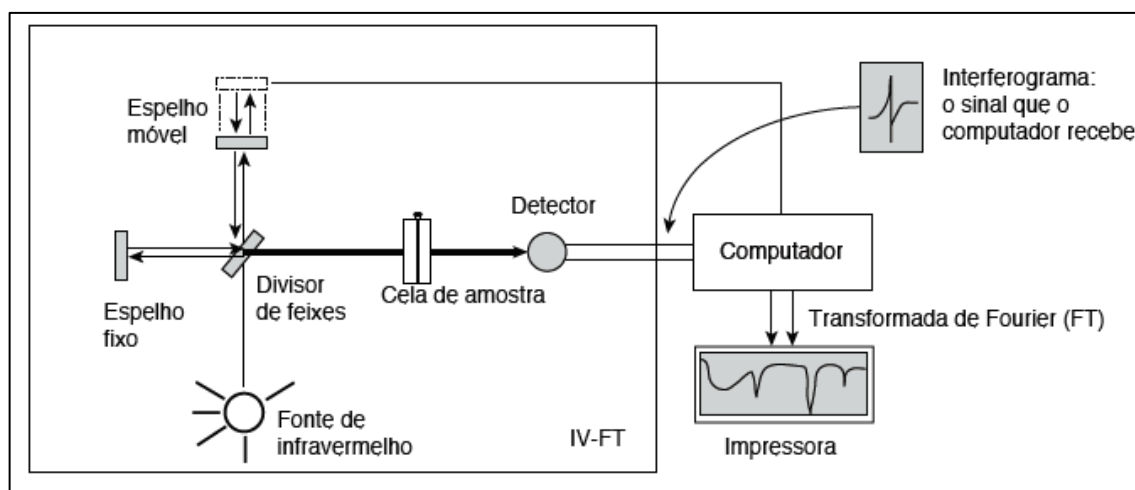


**Figura 1.9.** Regiões aproximadas em que alguns tipos comuns de ligação absorvem na região do infravermelho vibracional <sup>63</sup>.

Os movimentos vibracionais que dão origem as absorções fundamentais são os modos deformação axial ou estiramento e deformação angular ou dobramento. A vibração por estiramento pode ser do tipo simétrico ou assimétrico, este ocorre em frequências mais elevadas quando comparado ao estiramento simétrico. As vibrações

por dobramento podem ocorrer no plano (tesoura e balanço) ou fora do plano (torção e abano). As absorções por dobramento ocorrem em frequências mais baixas em relação as vibrações por estiramento <sup>63</sup>.

O instrumento responsável pela absorção na região do infravermelho é chamado de espectrômetro de infravermelho que podem ser classificados em dispersivos (feixe simples ou duplo) ou não dispersivos (FT-IR). O método FT-IR é considerado umas das variações mais modernas da técnica de infravermelho que utiliza a transformada de Fourier, Figura 1.10. Na qual, o traçado do caminho óptico produz um padrão de ondas complexo denominado interferograma, que consiste em um gráfico de intensidade *versus* tempo. Uma operação matemática conhecida como transformada de Fourier (FT), separa as frequências das absorções individuais contidas no interferograma, produzindo um espectro virtualmente idêntico ao obtido com um espectrômetro dispersivo. Esta técnica torna-se vantajosa pela elevada sensibilidade e resolução, rapidez no registro e melhora na razão sinal/ruído <sup>63</sup>.



**Figura 1.10.** Diagramas esquemáticos de espectrofotômetros com Transformada de Fourier <sup>63</sup>.

Na espectroscopia de infravermelho os espectros são normalmente representados como o inverso do comprimento de onda, expresso em  $\text{cm}^{-1}$ . Estes podem ser divididos em três regiões principais: infravermelho-distante ( $<400 \text{ cm}^{-1}$ ), de infravermelho-médio ( $400 < \text{cm}^{-1} < 4000$ ) e de infravermelho-próximo ( $4000 < \text{cm}^{-1} < 13000$ ). A região do infravermelho-médio, também conhecida como região da impressão digital, é considerada a mais importante para a identificação de um composto, pois o espectro obtido é único para cada composto, e poderá mesmo afirmar-se que não existem dois espectros idênticos quando os compostos são diferentes <sup>66</sup>.

## 1.6. Aplicações das técnicas analíticas na área de reaproveitamento de resíduos da agroindústria

A técnica GC-MS foi aplicada por Govindarajan *et al.* (2016) na definição das estruturas químicas presentes na amostra de óleo essencial obtida na extração de resíduos da espécie *Pinus kesiya*. Foi possível detectar 18 tipos diferentes de compostos dos quais quatro componentes apresentaram-se em maior concentração ( $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, myrcene e garmacrene), sendo eles os maiores contribuintes para o poder larvicida de tal extrato <sup>67</sup>.

A análise de GC-MS aliada com a técnica FT-IR foram importantes metodologias adotadas por Shamsul *et al.* (2018) para analisar e comparar a qualidade do bio-óleo gerado na produção do composto 5-hidroximetilfurfural (derivado de biomassa que se forma através da desidratação de carboidratos e geralmente aplicado na produção de plásticos, produtos farmacêuticos, produtos químicos finos e combustíveis líquidos). Os experimentos foram conduzidos com agrorresíduos simples e mistos, como bagaço de cana, folhas secas, estrume de cabra, lodo para substituir o uso de glicose, frutose ou hexose como matéria-prima. Os resultados de GC-MS mostraram que os compostos detectados podem ser explicados pela formação de produtos como ciclopentanona, fenol, benzeno e derivados de benzeno, ilustrando que esse processo é capaz de degradar a glicose em pequenas unidades de açúcar. O FT-IR determinou os grupos funcionais presentes na matéria-prima dos quais as bandas de maiores relevância nos espectros referem-se poliálcoois, ácidos carboxílicos, derivados de fenol, cetonas e álcoois secundários <sup>68</sup>.

Vidal *et al.* (2019) desenvolveram e caracterizaram filmes bioativos à base de carboximetilcelulose (CMC) incorporados com óleo de café verde (GCO) e extratos de resíduos de café verde, bolos e sedimentos. Os filmes baseados em CMC apresentam resistência moderada, transparência, boa solubilidade em água e são resistentes a óleos e gorduras. Tais filmes, podem ser utilizados como material alternativo para embalagens biodegradáveis. Foi investigado o efeito do bolo (CE) e dos extratos de sedimentos (SE) em diferentes proporções (20-40%) e GCO nas propriedades químicas, morfológicas, físicas, mecânicas, ópticas e antioxidantes dos filmes. Oito ácidos graxos e quatro compostos fenólicos principais foram identificados por ESI-FT-ICR MS no GCO e extratos de resíduos. O FT-IR indicou que os espectros dos filmes

com GCO apresentaram tendência semelhante à dos CMC quando analisados separadamente. No entanto, obteve-se o surgimento de um novo pico ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ) na incorporação do GCO ao CMC. Que pode estar relacionado à vibração de estiramento dos grupos funcionais éster carbonil dos triglicerídeos ( $\text{OC} = \text{O}$ )<sup>69</sup>.

Ducom *et al.* (2020) caracterizaram três resíduos sólidos coletados em instalações de produção de azeite localizadas em países diferentes, na qual cada resíduo agrícola passou por uma metodologia de extração. A biomassa é uma fonte promissora de energia renovável que pode contribuir de maneira significativa para a redução do consumo de combustíveis fósseis e os impactos ambientais associados. A qualidade dos resíduos pode variar conforme processo de extração do óleo, portanto as biomassas foram comparadas pela técnica FT-IR. E a composição química do gás gerado foi avaliada por GC-MS e verificou-se que contém vários produtos de degradação de material lignocelulósico e óleo de oliva e além disso foi demonstrada o processo de extração do azeite influencia na composição do gás <sup>70</sup>.

Além da descrição dos artigos na Tabela 1.4 que utilizaram diferentes técnicas analíticas (FT-IR, UV-Vis, FT ICR MS, GC-MS) hifenadas com o estudo de PCA para avaliar a qualidade dos resíduos ou dos produtos formados com a reutilização deles, a Tabela 1.5, relata um levantamento realizado na plataforma Web of Science de artigos que aplicaram técnicas analíticas para caracterizar resíduos provenientes da agroindústria. De maneira geral, percebe-se que nos estudos relatados as técnicas espectroscópicas (Espectrometria de Massas e Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier) e cromatográficas (Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e Cromatografia Líquida de alta eficiência) são predominantes para a caracterização dos resíduos, fornecendo dados essenciais para as conclusões dos estudos.

**Tabela 1.5.** Levantamento de artigos científicos publicados que relatam a aplicação de diferentes técnicas analíticas

| Ano  | Técnica analítica | Resíduo                                                                                                                                                                                                                             | Aplicação                                                | Referência                               |
|------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1997 | HPLC              | Farelo de trigo                                                                                                                                                                                                                     | Produção ácido ferúlico livre                            | Faulds <i>et al.</i> <sup>71</sup>       |
| 2003 | GC-MS             | Coproduto de Glicerol gerado na produção de biodiesel                                                                                                                                                                               | Síntese lipídica                                         | Papanikolaou <i>et al.</i> <sup>72</sup> |
| 2003 | HPLC              | Farelo de trigo e polpa de beterraba                                                                                                                                                                                                | Produção de ácidos ferúlico e p-cumárico                 | Bartolome <i>et al.</i> <sup>71</sup>    |
| 2005 | HPLC              | Bagaço de mandioca                                                                                                                                                                                                                  | Produção ácido cítrico                                   | Prado <i>et al.</i> <sup>73</sup>        |
| 2005 | GC-MS             | Casca de Café, Bagaço de cana Batatas                                                                                                                                                                                               | Produção esporos de <i>Beauveria bassiana</i>            | Stutz <i>et al.</i> <sup>74</sup>        |
| 2006 | HPLC              | Bagaço de cana-de açúcar, casca de arroz, casca de amendoim, caule de mandioca                                                                                                                                                      | Produção de etanol                                       | Martin <i>et al.</i> <sup>75</sup>       |
| 2006 | UV-Vis            | Suco de caju                                                                                                                                                                                                                        | Produção de biossurfactante                              | Rocha <i>et al.</i> <sup>76</sup>        |
| 2007 | GC-MS             | Resíduo de laranja                                                                                                                                                                                                                  | Obtenção de monoterpenos com atividade antifúngica       | Júnior <i>et al.</i> <sup>77</sup>       |
| 2008 | HPLC RMN          | Resíduo de coco verde                                                                                                                                                                                                               | Produção de Vanilina                                     | Barbosa <i>et al.</i> <sup>78</sup>      |
| 2008 | HPLC              | Resíduo de manga                                                                                                                                                                                                                    | Obtenção de compostos fenólicos e atividade antioxidante | Ribeiro <i>et al.</i> <sup>79</sup>      |
| 2009 | HPLC              | Polpa de azeitona                                                                                                                                                                                                                   | Produção de etanol                                       | Haagensen <i>et al.</i> <sup>80</sup>    |
| 2010 | HPLC-MS           | Bagaço do sabugueiro                                                                                                                                                                                                                | Obtenção de antocianinas de alto valor antioxidante      | Seabra <i>et al.</i> <sup>81</sup>       |
| 2010 | GC-MS             | Espigas e talos de milho, cascas de azeitona, palha de trigo, casca de avelã e amêndoa, cascas de laranja, resíduos de uva, hastes de alcachofra, cervejaria grãos gastos e cortes de poda de cerejeira, oliveira, videira e choupo | Produção de furfural                                     | Blasi <i>et al.</i> <sup>82</sup>        |
| 2011 | GC-MS             | Bagaço de uva                                                                                                                                                                                                                       | Compostos fenólicos e atividade antioxidante             | Melo <i>et al.</i> <sup>83</sup>         |

|      |                           |                                                  |                                                                           |                                          |
|------|---------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| 2012 | HPLC–ESI–MS               | Resíduo de Uva                                   | Obtenção de compostos fenólicos                                           | Gómez-García <i>et al.</i> <sup>84</sup> |
| 2012 | GC-MS                     | Resíduo de maracujá                              | Compostos voláteis                                                        | Oliveira <i>et al.</i> <sup>85</sup>     |
| 2013 | FT-IR<br>ESI-MS           | Farinha de madeira<br>Farelo de arroz            | Produção de plásticos                                                     | Azwar <i>et al.</i> <sup>86</sup>        |
| 2013 | ESI-MS                    | Resíduos de Uva e soro de queijo                 | Produção de metabólitos antimicrobianos                                   | Lopes <i>et al.</i> <sup>87</sup>        |
| 2016 | GC-MS                     | <i>Pinus kesiya</i>                              | Larvicida                                                                 | Govindarajan <i>et al.</i> <sup>67</sup> |
| 2017 | GC-MS<br>FT-IR            | Polpa de beterraba                               | Extração de pectina                                                       | Brachi <i>et al.</i> <sup>88</sup>       |
| 2017 | GC-MS                     | Torta de óleo de girassol                        | Produção de lipídios                                                      | Thanaa <i>et al.</i> <sup>89</sup>       |
| 2018 | GC-MS<br>FT-IR            | Bio-óleo                                         | Produção do 5-hidroximetilfurfural                                        | Shamsul <i>et al.</i> <sup>68</sup>      |
| 2019 | FT-IR                     | Café                                             | Filmes bioativos                                                          | Vidal <i>et al.</i> <sup>69</sup>        |
| 2020 | GC-MS<br>FT-IR            | Bagaço azeitona                                  | Geração de combustíveis                                                   | Ducom <i>et al.</i> <sup>70</sup>        |
| 2020 | HPLC                      | Polpa de café                                    | Fermentação para desintoxicação da polpa                                  | Silveira <i>et al.</i> <sup>90</sup>     |
| 2021 | UV-Vis<br>Raio X<br>FT-IR | Amora-preta e Café                               | Adsorção de Cromo                                                         | Rangel <i>et al.</i> <sup>91</sup>       |
| 2021 | FT-IR                     | Caules de tomate                                 | Produção de papeis que possibilitam melhor adesão do toner nas impressões | Karlovičs <i>et al.</i> <sup>92</sup>    |
| 2021 | FT-IR                     | Caules, cascas e espigas de milho                | Embalagens biodegradáveis                                                 | Lenhani <i>et al.</i> <sup>93</sup>      |
| 2021 | FT-IR<br>UV-Vis           | Cogumelo champignon ( <i>Agaricus bisporus</i> ) | Filmes bioativos                                                          | Lopusiewicz <i>et al.</i> <sup>94</sup>  |
| 2021 | RMN<br>FT-IR<br>GC-MS     | Alcachofra, pimenta e casca de café              | Atividades biológicas                                                     | Verrillo <i>et al.</i> <sup>95</sup>     |
| 2021 | FT-IR                     | Coroa de abacaxi                                 | Carvão ativado                                                            | Silva <i>et al.</i> <sup>96</sup>        |
| 2021 | FT-IR<br>RMN              | Bagaço de maçã                                   | Remoção de corante                                                        | Bonetto <i>et al.</i> <sup>97</sup>      |
| 2021 | HPLC                      | Casca de laranja                                 | Flavonóides bioativos                                                     | Zuin <i>et al.</i> <sup>98</sup>         |

## 1.7. Objetivo Geral

Determinar o perfil químico por diferentes técnicas analíticas dos resíduos de *Chrysanthemum morifolium* provenientes da agricultura capixaba e verificar a homogeneidade desta matéria-prima quanto à geração de extratos com atividade sobre as larvas de *Aedes aegypti*.

### 1.7.1. Objetivos específicos

- Coletar resíduos de *Chrysanthemum morifolium* provenientes da agroindústria capixaba por um período de 12 meses.
- Produzir extratos diclorometânicos e metanólicos mensais, a partir de resíduos de *Chrysanthemum morifolium*.
- Analisar os 27 extratos diclorometânicos e os 27 extratos metanólicos por espectrometria de infravermelho médio (MIR).
- Analisar por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas GC/MS os extratos diclorometânicos.
- Analisar por espectrometria de massas, técnica FT-ICR-MS, nos modos de ionização ESI (-) para os extratos diclorometânicos e metanólicos e APCI (+) para extratos diclorometânicos.
- Determinar o potencial larvicida em larvas *Aedes aegypti* dos extratos diclorometânicos e metanólicos.
- Realizar Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros de infravermelho, massas e cromatogramas obtidos visando estudar as variações químicas existentes no período anual.
- Correlacionar as análises quimiométricas (PCA) com os resultados dos ensaios larvicidas.

## 1.8. Referências

1. ARAÚJO, J. M. Fundamentos de Agronegócios. 2005.
2. RICCIARDI, P.; CILLARI, G.; CARNEVALE MIINO, M.; COLLIVIGNARELLI, M. C. Valorization of agro-industry residues in the building and environmental sector: A review. *Waste Management and Research*. 2020.
3. WAHYUNI, D. New Bioinsecticide Granules Toxin from Ectract of Papaya (Carica Papaya) Seed and Leaf Modified Against Aedes Aegypti Larvae. *Procedia Environmental Sciences*. vol. **23**, no. Ictcred 2014. 2015.
4. CHANDRAMOHAN, B.; MURUGAN, K.; MADHIYAZHAGAN, P.; KOVENDAN, K.; KUMAR, P. M.; PANNEERSELVAM, C.; DINESH, D.; SUBRAMANIAM, J.; RAJAGANESH, R.; NICOLETTI, M.; CANALE, A.; BENELLI, G. Neem by-products in the fight against mosquito-borne diseases: Biotoxicity of neem cake fractions towards the rural malaria vector Anopheles culicifacies (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. vol. **6**, no. 6. Jun. 2016.
5. NOGUEIRA, L. P. da S.; CALVACANTI, M. T.; SOUZA, P. A. de; FONSECA, J. V. dos S.; ANDRADE, M. de L. Beneficiamento e caracterização de resíduos da romã orgânica para aproveitamento agroindustrial Processing and characterization of organic pomegranate residues for agroindustrial use. vol. **14**, no. 01. 2020.
6. KUPPUSAMY, S.; THAVAMANI, P.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Environmental Technology & Innovation Bioremediation potential of natural polyphenol rich green wastes: A review of current research and recommendations for future directions. *Environmental Technology & Innovation*. vol. **4**. 2015.
7. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. e A. (MAPA); ORGANIZAÇÃO DAS COOPERATIVAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (OCESP); CÂMARA SETORIAL FEDERAL DE FLORES E PLANTAS ORNAMENTAIS, I. B. de F. (IBRAFLOR). Mapeamento e Quantificação da Cadeia de Flores e Plantas Ornamentais do Brasi. 1ª. 2015.
8. BRITO, A.; LIMA, P.; KHAN, A.; ALMEIDA, J. a Comercialização Do Crisântemo De Corte E Em Vaso: Um Estudo De Caso Para a Região Metropolitana De Fortaleza E Maciço De Baturité. *Revista Economia e Desenvolvimento*. vol. **4**, no. 2. 2005.

9. SILVA, J. A. T. da. Ornamental chrysanthemums: Improvement by biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. vol. **79**, no. 1. 2004.
10. CHEN, M.; WANG, K.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; MA, Y.; SUN, H.; JIN, Z.; ZHENG, H.; JIANG, H.; YU, P.; ZHANG, Y.; SUN, H. New insights into the biological activities of *Chrysanthemum morifolium*: Natural flavonoids alleviate diabetes by targeting  $\alpha$ -glucosidase and the PTP-1B signaling pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*. vol. **178**. 2019.
11. XUE, H.; JIANG, Y.; ZHAO, H.; KÖLLNER, T. G.; CHEN, S.; CHEN, F.; CHEN, F. Characterization of composition and antifungal properties of leaf secondary metabolites from thirteen cultivars of *chrysanthemum morifolium* ramat. *Molecules*. vol. **24**, no. 23. 2019.
12. SPINDOLA, K. C. V. W.; SIMAS, N. K.; DOS SANTOS, C. E.; DA SILVA, A. G.; ROMÃO, W.; VANINI, G.; DA SILVA, S. R. C.; BORGES, G. R.; DE SOUZA, F. G.; KUSTER, R. M. *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. vol. **26**, no. 3. 2016.
13. KUPPUSAMY, C.; MURUGAN, K.; ARUL, N.; YASODHA, P. Larvicidal and insect growth regulator effect of  $\alpha$ -amyrin acetate from *Catharanthus roseus* Linn against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Entomological Research*. vol. **39**, no. 1. 2009.
14. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ª Edição. .
15. DEWICK, P. M. A Biosynthetic Approach. 2nd ed., no. 1. Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
16. BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. vol. **46**, no. 2. 2008.
17. PAVELA, R.; MAGGI, F.; IANNARELLI, R.; BENELLI, G. Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta Tropica*. vol. **193**, no. December 2018. 2019.

18. MARIA, D. E. S. DERIVADOS DOS ÁCIDOS CLOROGÊNICO , CAFEICO E CINÂMICO : OBTENÇÃO , AVALIAÇÃO. Universidade Federal de Santa Maria. 2012.
19. SUN, Q.-L.; HUA, S.; YE, J.-H.; ZHENG, X.-Q.; LIANG, Y.-R. Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from Tongxiang County in China. *African Journal of Biotechnology*. vol. **9**, no. 25. 2010.
20. LAWAL, O. A.; OGUNWANDE, I. A.; OLORUNLOBA, O. F.; OPOKU, A. R. The essential oils of *Chrysanthemum morifolium* Ramat . from Nigeria. vol. **2**, no. 1. 2014.
21. ZHANG, N.; HE, Z.; HE, S.; JING, P. Insights into the importance of dietary chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* cv. Hangju)-wolfberry (*Lycium barbarum* fruit) combination in antioxidant and anti-inflammatory properties. *Food Research International*. vol. **116**, no. September 2018. 2019.
22. YANG, P. F.; YANG, Y. N.; FENG, Z. M.; JIANG, J. S.; ZHANG, P. C. Six new compounds from the flowers of *Chrysanthemum morifolium* and their biological activities. *Bioorganic Chemistry*. vol. **82**, no. October 2018. 2019.
23. LI, Y.; YANG, P.; LUO, Y.; GAO, B.; SUN, J.; LU, W.; LIU, J.; CHEN, P.; ZHANG, Y.; YU, L. (Lucy). Chemical compositions of chrysanthemum teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Food Chemistry*. vol. **286**, no. October 2018. 2019.
24. TAKAHASHI, J. A.; REZENDE, F. A. G. G.; MOURA, M. A. F.; DOMINGUETE, L. C. B.; SANDE, D. Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development. *Food Research International*. vol. **129**, no. April 2019. 2020.
25. SALGADO DE MORAIS, L. A.; SCARDINI, J.; PRADO, M.-. Plantas com Atividade Inseticida.
26. VIEGAS, C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quimica Nova*. vol. **26**, no. 3. 2003.
27. RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K.; GOPALAKRISHNAN, G.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C. Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenes derived from *Ficus racemosa* Linn. *Parasitology Research*. vol. **103**, no. 2. 2008.

28. SILVA, W. J.; DÓRIA, G. A. A.; MAIA, R. T.; NUNES, R. S.; CARVALHO, G. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; MARÇAL, R. M.; CAVALCANTI, S. C. H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology*. vol. **99**, no. 8. 2008.
29. SAÚDE, S. de V. em S. – M. da. Boletim Epidemiológico. vol. **49**, no. 2358–9450. 2018.
30. OLIVEIRA, W. K. de; BRITO, S. M. F.; PEREIRA, G. F. M.; ABREU, A. L. de; ROHLFS, D. B.; FÁTIMA, E. M. de; DUARTE, M. de S. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. vol. **50**, no. 9352–7864. 2019.
31. FIOCRUZ. OMS alerta para doenças transmitidas por vetores e Ensp lista as mais comuns no Brasil. 2014. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/oms-alerta-para-doencas-transmitidas-por-vetores-e-ensp-lista-mais-comuns-no-brasil>>. Acesso: 10-Jan-2018.
32. BRASIL. OPAS/OMS Brasil - Dia Mundial da Saúde 2014: Pequenas picadas, grandes ameaças. 2014. Disponível em: <[http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4611:dia-mundial-da-saude-2014-pequenas-picadas-grandes-ameacas&Itemid=812](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4611:dia-mundial-da-saude-2014-pequenas-picadas-grandes-ameacas&Itemid=812)>. Acesso: 10-Jan-2018.
33. SAÚDE, M. da. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. *Boletim Epidemiológico*. 2020. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>.
34. PAVELA, R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*. vol. **76**. 2015.
35. CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Synergistic interactions in natural products: Therapeutic potential and challenges. *Revista Virtual de Química*. vol. **9**, no. 2. 2017.
36. SENTHILKUMAR, A.; TIKAR, S. N.; GOPALAN, N.; SUNDARAMOORTHY, P.; VENKATESALU, V. Larvicidal potential of different solvent extracts and oleanolic acid

derivative from *Coccinia indica* against vector mosquitoes. *Toxicological and Environmental Chemistry*. vol. **94**, no. 7. Aug. 2012.

37. SILVA, G. N. da; TRINDADE, F. T.; SANTOS, F. dos; GOSMANN, G.; SILVA, A. A. e; GNOATTO, S. C. Larvicidal activity of natural and modified triterpenoids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest management science*. vol. **72**, no. 10. 2016.

38. FERNANDES, D. A.; SOUZA, M. S. R.; TELES, Y. C. F.; OLIVEIRA, L. H. G.; LIMA, J. B.; CONCEIÇÃO, A. S.; NUNES, F. C.; SILVA, T. M. S.; DE FÁTIMA VANDERLEI DE SOUZA, M. New sulphated flavonoids and larvicidal activity of *helicteres velutina* K. Schum (sterculiaceae). *Molecules*. vol. **23**, no. 11. 2018.

39. NOBSATHIAN, S.; BULLANGPOTI, V.; KUMRUNGSEE, N.; WONGSA, N.; RUTTANAKUM, D. Larvicidal effect of compounds isolated from *Maerua siamensis* (Capparidaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae Open Access. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. vol. **5**. 2018.

40. FERREIRA, M. D. L.; FERNANDES, D. A.; NUNES, F. C.; TELES, Y. C. F.; ROLIM, Y. M.; SILVA, C. M. da; DE ALBUQUERQUE, J. B. L.; AGRA, M. de F.; DE SOUZA, M. de F. V. Phytochemical study of *Waltheria viscosissima* and evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019.

41. AL-MASSARANI, S.; EL-SHAIBANY, A.; TABANCA, N.; ALI, A.; ESTEP, A. S.; BECNEL, J. J.; GOGER, F.; DEMIRCI, B.; EL-GAMAL, A.; BASER, K. H. C. Assessment of selected Saudi and Yemeni plants for mosquitocidal activities against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. vol. **27**. 2019.

42. PINEDA-CORTEZ, M. R. B.; CABANTOG, R. J. R.; CAASI, P. M.; CHING, C. A. D.; PEREZ, J. B. S.; GODISAN, P. G. M.; LATORRE, C. M. G.; LUCERO, D. R.; SALONGA, R. B. Larvicidal and ovicidal activities of *Artocarpus blancoi* extracts against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutical Biology*. vol. **57**, no. 1. 2019.

43. AL-MASSARANI, S.; EL-SHAIBANY, A.; TABANCA, N.; ALI, A.; ESTEP, A. S.; BECNEL, J. J.; GOGER, F.; DEMIRCI, B.; EL-GAMAL, A.; BASER, K. H. C. Assessment of selected Saudi and Yemeni plants for mosquitocidal activities against

the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. no. xxxx. 2019.

44. FARIA, A. F.; PINTO, A. C. de A.; RIBEIRO, M. N.; CARDOSO, T. S.; RIBEIRO, J. P. C. Processo de desenvolvimento de novos produtos: uma experiência didática. *XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção*. 2008.

45. ZANJANI, M. K.; NOURELFATH, M.; AIT-KADI, D. A multi-stage stochastic programming approach for production planning with uncertainty in the quality of raw materials and demand. *International Journal of Production Research*. vol. **48**, no. 16. 2010.

46. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*. vol. **22**, no. 5. Sep. 1999.

47. DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: UM tutorial, parte I. *Química Nova*. vol. **35**, no. 1. 2012.

48. BRERETON, R. G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. University of Bristol, UK, 2003.

49. MERLIN, N.; NOGUEIRA, B. A.; DE LIMA, V. A.; DOS SANTOS, L. M. Application of fourier transform infrared spectroscopy, chemical and chemometrics analyses to the characterization of agro-industrial waste. *Química Nova*. vol. **37**, no. 10. 2014.

50. LOPEZ-HIDALGO, A. M.; ALVARADO-CUEVAS, Z. D.; DE LEON-RODRIGUEZ, A. Biohydrogen production from mixtures of agro-industrial wastes: Chemometric analysis, optimization and scaling up. *Energy*. vol. **159**. 2018.

51. LABAT, G. A. A.; GONÇALVES, A. R. Oxidation in acidic medium of lignins from agricultural residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. **148**, no. 1–3. Mar. 2008.

52. LI, W.; LIU, X.; YANG, Q.; ZHANG, N.; DU, Y.; ZHU, H. Preparation and characterization of inclusion complex of benzyl isothiocyanate extracted from papaya

seed with  $\beta$ -cyclodextrin. *Food Chemistry*. vol. **184**. 2015.

53. FRASAO, B.; COSTA, M.; SILVA, F.; RODRIGUES, B.; BALTAR, J.; ARAUJO, J.; MOREIRA, D.; TORREZAN, R.; CONTE, C. Effect of pequi (*Caryocar brasiliense*) and juçara (*Euterpe edulis*) waste extract on oxidation process stability in broiler meat treated by UV-C. *PLoS ONE*. vol. **13**, no. 12. Dec. 2018.

54. PIZZI, A.; TOSCANO, G.; FOPPA PEDRETTI, E.; DUCA, D.; ROSSINI, G.; MENGARELLI, C.; ILARI, A.; RENZI, A.; MANCINI, M. Energy characteristics assessment of olive pomace by means of FT-NIR spectroscopy. *Energy*. vol. **147**. Mar. 2018.

55. CANTERO-TUBILLA, B.; CANTERO, D. A.; MARTINEZ, C. M.; TESTER, J. W.; WALKER, L. P.; POSMANIK, R. Characterization of the solid products from hydrothermal liquefaction of waste feedstocks from food and agricultural industries. *Journal of Supercritical Fluids*. vol. **133**. Mar. 2018.

56. LIMA, T. A.; MANHÃES, L. R.; HAYASHIDE, I.; GOMES, A. C. C.; LOVATTI, B. P.; SIMAS, N. K.; FILGUEIRAS, P. R.; KUSTER, R. M. Agro Residues of *Dendranthema x grandiflorum* as Raw Material for a Potential Larvicidal Product. *Waste and Biomass Valorization*. Mar. 2020.

57. CHEN, X.; WU, J.; OPOKU-KWANOWAA, Y. Effects of returning granular corn straw on soil humus composition and humic acid structure characteristics in saline-alkali soil. *Sustainability (Switzerland)*. vol. **12**, no. 3. Feb. 2020.

58. PROTO, A. R.; PALMA, A.; PARIS, E.; PAPANDREA, S. F.; VINCENTI, B.; CARNEVALE, M.; GUERRIERO, E.; BONOFILIO, R.; GALLUCCI, F. Assessment of wood chip combustion and emission behavior of different agricultural biomasses. *Fuel*. vol. **289**. Apr. 2021.

59. MUNAIZ, E. D.; ALBRECHT, K. A.; ORDAS, B. Genetic Diversity for Dual Use Maize: Grain and Second-Generation Biofuel. *Agronomy*. vol. **11**, no. 2. Jan. 2021.

60. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1st ed. Editora Unicamp, 2006.

61. CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; ESTADUAL, U. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de

massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Química Nova*. 2008.

62. TÉCNICA, N.; VIEGAS, M. C.; DENISLEY, E.; BASSOLI, G. UTILIZAÇÃO DO ÍNDICE DE RETENÇÃO LINEAR PARA CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM CAFÉ SOLÚVEL UTILIZANDO GC-MS E COLUNA HP-INNOWAX. *Quim. Nova*. vol. **30**, no. 8. 2007.

63. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à Espectroscopia. 5th ed. 2015.

64. SOUZA, L. M. de. Estudo da ionização de hidrocarbonetos do petróleo por APCI(+)FT-ICR MS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. 2018.

65. NACHTIGALL, F. M. Uso de Técnicas de Espectrometria de Massas com Ionização à Pressão Atmosférica no Estudo de Propriedades Intrínsecas de Líquidos Iônicos Imidazólios. Universidade Estadual de Campinas. 2009.

66. JOANA GONÇALVES LEITE. Aplicação das Técnicas de Espectroscopia FTIR e de Micro Espectroscopia Confocal Raman à Preservação do Património. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. 2008.

67. GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; BENELLI, G. Chemical composition, toxicity and non-target effects of Pinus kesiya essential oil: An eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. vol. **129**. 2016.

68. SHAMSUL, N. S.; KAMARUDIN, S. K.; RAHMAN, N. A. Study on the physical and chemical composition of agro wastes for the production of 5-hydroxymethylfurfural. *Bioresource Technology*. vol. **247**, no. July 2017. 2018.

69. VIDAL, O. L.; TSUKUI, A.; GARRETT, R.; ROCHA-LEÃO, M. H. M.; CARVALHO, C. W. P.; FREITAS, S. P.; REZENDE, C. M. de; FERREIRA, M. S. L. Produção de filmes bioativos de carboximetilcelulose enriquecida com óleo de café verde e seus resíduos \_ Leitor aprimorado Elsevier.pdf. 2019.

70. DUCOM, G.; GAUTIER, M.; PIETRACCINI, M.; TAGUTCHOU, J. P.; LEBOUIL, D.; GOURDON, R. Comparative analyses of three olive mill solid residues from different countries and processes for energy recovery by gasification. *Renewable Energy*. vol. **145**. 2020.

71. FAULDS, C. B.; BARTOLOMÉ, B.; WILLIAMSON, G. Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Industrial Crops and Products*. vol. **6**, no. 3–4. Aug. 1997.
72. PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. Accumulation of a Cocoa-Butter-Like Lipid by *Yarrowia lipolytica* Cultivated on Agro-Industrial Residues.
73. PRADO, F. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; RODRÍGUES-LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R. Citric Acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. vol. **22**, no. 04.
74. STUTZ, H.; SANTA, D.; ROBERTO, O.; BRAND, D.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; SOCCOL, C. R. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Spore Production of *Beauveria bassiana* From Agro-Industrial Residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. vol. **48**. 2005.
75. MARTÍN, C.; LÓPEZ, Y.; PLASENCIA, Y.; HERNÁNDEZ, E. Characterisation of Agricultural and Agro-Industrial Residues as Raw Materials for Ethanol Production, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Dec. 2006.
76. ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R. B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. vol. **22**, no. 12. Dec. 2006.
77. JUNIOR, M. R. M.; MOTA, N. O.; BAUDET, N.; PASTORE, G. M. Fungal Biotransformation of Monoterpenes Found in Agro-Industrial Residues from Orange and Pulp Industries into Aroma Compounds: Screening Using Solid Phase Microextraction. *Food Science and Biotechnology*. vol. **16**. 2007.
78. BARBOSA, E. dos S.; PERRONE, D.; VENDRAMINI, A. L. do A.; LEITE, S. G. F. Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation. *Bioresources*. vol. **3**. 2008.
79. RIBEIRO, S. M. R.; BARBOSA, L. C. A.; QUEIROZ, J. H.; KNÖDLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango

(Mangifera indica L.) varieties. *Food Chemistry*. vol. **110**, no. 3. Oct. 2008.

80. HAAGENSEN, F.; SKIADAS, I. V.; GAVALA, H. N.; AHRING, B. K. Pre-treatment and ethanol fermentation potential of olive pulp at different dry matter concentrations. *Biomass and Bioenergy*. vol. **33**, no. 11. Nov. 2009.

81. SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BATISTA, M. T.; DE SOUSA, H. C. Effect of solvent (CO<sub>2</sub>/ethanol/H<sub>2</sub>O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *Journal of Supercritical Fluids*. vol. **54**, no. 2. Aug. 2010.

82. DI BLASI, C.; BRANCA, C.; GALGANO, A. Biomass screening for the production of furfural via thermal decomposition. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. vol. **49**, no. 6. Mar. 2010.

83. MELOI, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; DE ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciencia Rural*. vol. **41**, no. 6. 2011.

84. GÓMEZ-GARCÍA, R.; MARTÍNEZ-A ´ VILA •, G. C. G.; AGUILAR, C. N. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenolics from grape (*Vitis vinifera* L.) residues.

85. CALHEIROS DE OLIVEIRA, L.; ANTÔNIO, J.; DOS, B.; NARENDRA, S. I.; ANDERSON, N. I.; FONTES, S.; SANTIAGO, R.; CAMPOS, S.; LIMA DE SOUZA, T. Caracterização e extração de compostos voláteis de resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência Rural*. vol. **42**. 2012.

86. AZWAR, E.; YIN, B.; HAKKARAINEN, M. Liquefied biomass derived plasticizer for polylactide. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. vol. **88**, no. 5. May 2013.

87. LOPES, F. C.; TICHOTA, D. M.; SAUTER, I. P.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.; ROTT, M. B.; RIOS, A. O.; BRANDELLI, A. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues. *Annals of Microbiology*. vol. **63**, no. 2. Jun. 2013.

88. BRACHI, P.; RIIANOVA, E.; MICCIO, M.; MICCIO, F.; RUOPPOLO, G.;

CHIRONE, R. Valorization of Sugar Beet Pulp via Torrefaction with a Focus on the Effect of the Preliminary Extraction of Pectins. 2017.

89. ALI, T. H.; EL-GAMAL, M. S.; EL-GHONEMY, D. H.; AWAD, G. E.; TANTAWY, A. E. Improvement of lipid production from an oil-producing filamentous fungus, *Penicillium brevicompactum* NRC 829, through central composite statistical design. *Annals of Microbiology*. vol. **67**, no. 9. Sep. 2017.

90. DA SILVEIRA, J. S.; MERTZ, C.; MOREL, G.; LACOUR, S.; BELLEVILLE, M. P.; DURAND, N.; DORNIER, M. Alcoholic fermentation as a potential tool for coffee pulp detoxification and reuse: Analysis of phenolic composition and caffeine content by HPLC-DAD-MS/MS. *Food Chemistry*. vol. **319**. Jul. 2020.

91. RANGEL, A. V.; BECERRA, M. G.; GUERRERO-AMAYA, H.; BALLESTEROS, L. M.; MERCADO, D. F. Sulfate radical anion activated agro-industrial residues for Cr(VI) adsorption: is this activation process technically and economically feasible? *Journal of Cleaner Production*. vol. **289**. Mar. 2021.

92. KARLOVITS, I.; LAVRIČ, G.; KAVČIČ, U.; ZORIĆ, V. Electrophotography toner adhesion on agro-industrial residue and invasive plant papers. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 2021.

93. CAROLINE LENHANI, G.; FERNANDO DOS SANTOS, D.; LUIS KOESTER, D.; BIDUSKI, B.; GONÇALVES DEON, V.; MACHADO JUNIOR, M.; ZANELLA PINTO, V. Application of Corn Fibers from Harvest Residues in Biocomposite Films. *Journal of Polymers and the Environment*. 2078.

94. ŁOPUSIEWICZ, Ł.; KWIATKOWSKI, P.; DROŻŁOWSKA, E.; TROCER, P.; KOSTEK, M.; ŚLIWIŃSKI, M.; POLAK-ŚLIWIŃSKA, M.; KOWALCZYK, E.; SIENKIEWICZ, M. Preparation and Characterization of Carboxymethyl Cellulose-Based Bioactive Composite Films Modified with Fungal Melanin and Carvacrol. *Polymers*. vol. **13**, no. 4. 2021.

95. VERRILLO, M.; SALZANO, M.; COZZOLINO, V.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Bioactivity and antimicrobial properties of chemically characterized compost teas from different green composts. *Waste Management*. vol. **120**. Feb. 2021.

96. DA SILVA, A. I. C.; PARANHA, G.; MAIA, L. S.; MULINARI, D. R. Development

of Activated Carbon from Pineapple Crown Wastes and Its Potential Use for Removal of Methylene Blue. *Journal of Natural Fibers*. 2021.

97. BONETTO, L. R.; CRESPO, J. S.; GUÉGAN, R.; ESTEVES, V. I.; GIOVANELA, M. Removal of methylene blue from aqueous solutions using a solid residue of the apple juice industry: Full factorial design, equilibrium, thermodynamics and kinetics aspects. *Journal of Molecular Structure*. vol. **1224**. Jan. 2021.

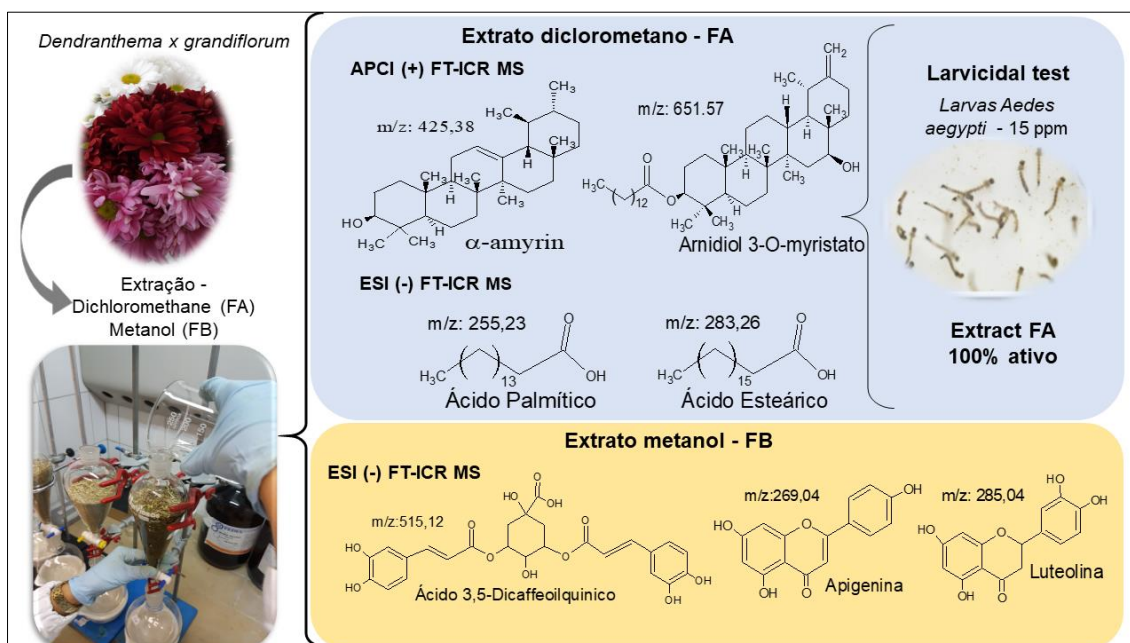
98. ZUIN, V. G.; RAMIN, L. Z.; SEGATTO, M. L.; STAHL, A. M.; ZANOTTI, K.; FORIM, M. R.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; FERNANDES, J. B. To separate or not to separate: What is necessary and enough for a green and sustainable extraction of bioactive compounds from Brazilian citrus waste. in *Pure and Applied Chemistry*. 2021. vol. **93**, no. 1.

## Capítulo 2 - Resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* provenientes da agroindústria como matéria-prima para produto larvicida

### 2.1. Destaques

- Resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* gerados na agroindústria capixaba coletados no período de um ano, resultando em 27 amostragens.
- Os resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* foram extraídos com solventes de diferentes polaridades (diclorometano e metanol).
- Os extratos de diclorometano são constituídos por ácidos graxos, triterpenos e esteroides.
- Os extratos metanólicos são constituídos por flavonoides, carboidratos e ácidos fenólicos.
- Os extratos de diclorometano apresentaram 100% de mortalidade nos testes com larvas *Aedes aegypti*.

### 2.2. Resumo Gráfico



### 2.3. Resumo

Resíduos da agroindústria de crisântemo de diferentes cultivares de *Dendranthema x grandiflorum* são gerados nas feiras livres e supermercados de Vitória e cidades vizinhas (Espírito Santo, Brasil). A espécie apresenta muitas flores de diferentes cores e tamanhos. Devido à grande variedade dessa espécie híbrida, este estudo teve como objetivo confirmar a similaridade química do material residual coletado no período de um ano nos estabelecimentos comerciais dos bairros de Vitória, Serra e Vila Velha. A partir das 27 amostras de resíduos coletados, foi possível produzir extratos diclorometânicos e metanólicos, resultando em 54 extratos. Para a caracterização do perfil químico, espectros de infravermelho médio (MIR) obtidos a partir dos 54 extratos, análises de massas ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS também foram realizados. Os dados de MIR foram analisados por análise de componentes principais (PCA), que dividiu as amostras em dois grupos (GA1 e GA2) para extratos de diclorometânico e em quatro grupos (GB1, GB2, GB3 e GB4) para extratos de metanólico. Os extratos de metanólicos, observou-se uma separação clara entre os grupos com base nas classes de substâncias. Para os diclorometânicos, foi possível identificar claramente a separação entre GA1 e GA2 através das classes de ésteres triterpênicos e diacilgliceróis com base na intensidade dos picos no espectro de massa. As misturas obtidas dos extratos de diclorometânicos (FA) e extratos de metanólicos (FB) foram analisadas em larvas do *Aedes aegypti* na concentração de 15 ppm. A mistura dos extratos FB mostrou-se inativa, na qual nenhuma mortalidade larval foi observada, em contrapartida, a mistura dos extratos FA foram 100% ativas, possivelmente pela presença de ácidos graxos, triterpenos, esteroides e alcaloides nas amostras desse grupo confirmadas pelas técnicas analíticas ESI (+) FT-ICR MS, APCI (+) FT-ICR MS e CG-MS. Estes resultados mostram que resíduos de diferentes variedades da espécie híbrida *Dendranthema x grandiflorum* geram extratos quimicamente semelhantes, principalmente para os lipofílicos (FA), que podem ser utilizados como matéria-prima homogênea para obter produtos biologicamente ativos, principalmente produtos larvicidas.

## 2.4. Introdução

*Dendranthema x grandiflorum*, conhecida comercialmente como crisântemo, é uma espécie híbrida que engloba inúmeras variedades cultivadas em vários países e é amplamente aceita no comércio de flores brasileiro<sup>1</sup>. Na região montanhosa do estado do Espírito Santo, assim como em outras terras altas do Brasil, os crisântemos são cultivados como plantas ornamentais e comercializados nos grandes centros comerciais como flores cortadas e em vasos. Na confecção dos arranjos, parte desse produto torna-se lixo<sup>2</sup>. Anteriormente descrevemos atividade larvívica de um cultivo do estado do Rio de Janeiro<sup>3</sup>. Portanto, este trabalho investiga a composição química de materiais residuais coletados durante um ano em locais comerciais das cidades da grande Vitória e sua atividade larvívica em larvas de *Aedes aegypti*. Quimicamente, as espécies de crisântemo são fontes conhecidas de flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos graxos, triterpenos, triterpenos ésteres e alcanoides<sup>3-6</sup>. Destes os triterpenos e as alcanoides são as classes de produtos naturais com atividade inseticida bem conhecida.

O Brasil é um país onde as doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti* são um grave problema de saúde pública<sup>7</sup>. No passado, o crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) era usado como fonte para obter piretrinas, composto que apresenta atividade no controle dos mosquitos adultos<sup>8</sup>. Em 2016, Spindola *et al.* descreveram a presença de triterpenóides com potencial larvívica para os mosquitos *Aedes aegypti* (CL<sub>99</sub> de 15 ppm). As estruturas químicas foram caracterizadas a partir da análise da espécie *Dendranthema x grandiflorum* por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Até então, nenhum estudo havia descrito o potencial larvívica de espécies de crisântemo não produtoras de piretrinas. No momento, temos uma situação em que novos inseticidas são necessários para combater insetos resistentes a compostos larvicidas mais antigos, como organofosforados, carbamatos e organoclorados. O controle de larvas por produtos naturais é altamente desejável, pois são ambientalmente seguros comparado aos inseticidas sintéticos usados no passado<sup>9</sup>.

<sup>10</sup>.

## 2.5. Materiais e Métodos

Vinte e sete amostras de resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* foram obtidas em feiras livres ou supermercados nas cidades de Vitória, Vila Velha e Serra - Espírito Santo, Brasil, Figura 2.1. As características dos resíduos estão descritas na Tabela 2.S.1 (Capítulo 5 - Material suplementar – pag.123).

Apesar das coletas dos resíduos terem sido realizadas em diferentes pontos comerciais da grande vitória, o cultivo da espécie concentrou-se na cidade de Venda Nova do Imigrante – Espírito Santo, salvo algumas variedades de cores que esporadicamente precisavam vir de Holambra – São Paulo.



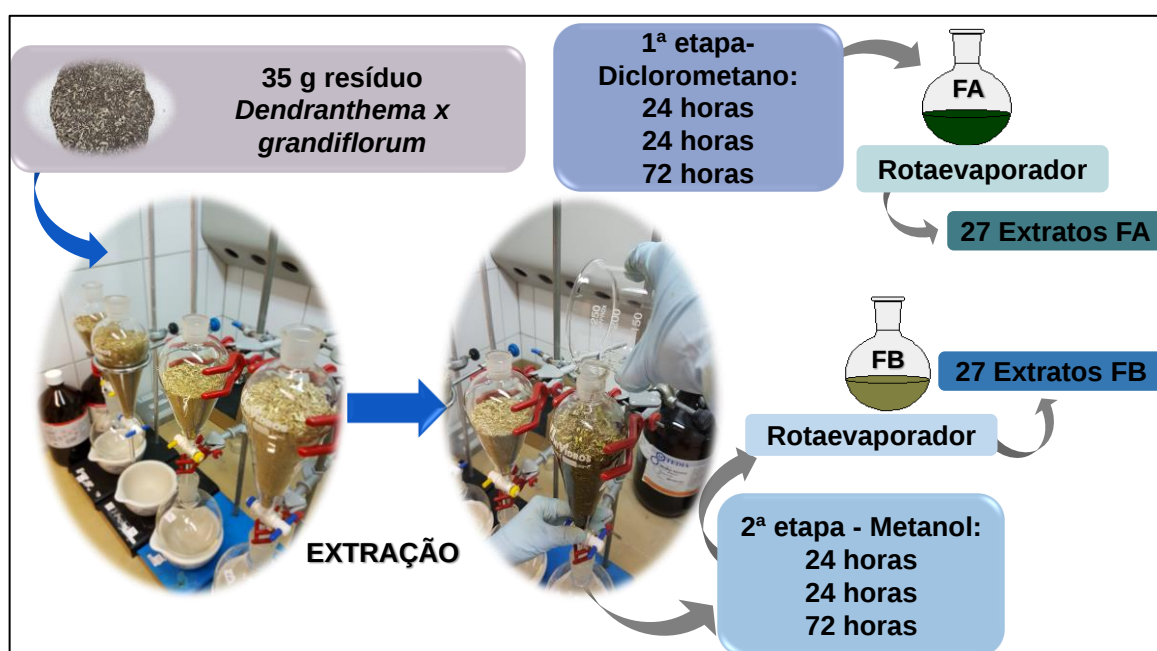
**Figura 2.1.** (a) Coleta de resíduos de *Dendranthema x grandiflorum*; (b) resíduo de *Dendranthema x grandiflorum*; (c) resíduo seco; (d) resíduo triturado.

### 2.5.1. Preparação dos extratos

Os resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* (crisântemo) listados na Tabela 2.S.1, foram secos ao ar livre até a obter de peso constante (Figura 2.1-2 e Figura 2.1-3) e depois triturados em um liquidificador (Figura 2.1-4).

Para cada amostra de resíduo triturado pesou-se uma massa de 35 g. Essa massa foi acondicionada em um funil de separação e os 27 resíduos foram extraídos em um esquema que simula um percolador, a Figura 2.2 ilustra detalhadamente como ocorreu o processo de extração. Realizado com o solvente diclorometano nos intervalos regulares de tempo (24h, 24h e 72h), em seguida extraídos novamente com solvente metanol adotando o mesmo procedimento.

Após cada intervalo de tempo, os extratos foram percolados pelo funil de separação e coletados em um balão. Por fim, com todos os extratos gerados do mesmo solvente foram concentrados em um evaporador rotativo e pesados. Portanto, o processo de extração de cada resíduo durou 10 dias e resultou um total de 54 extratos (27 extratos de diclorometano e 27 extratos de metanol) que foram caracterizados por métodos espectroscópicos (massas e infravermelho médio) e cromatográfico. As amostras extraídas com diclorometano foram denominadas FA e as extraídas com metanol foram denominadas FB.



**Figura 2.2.** Esquema resumido do processo de extração dos 27 resíduos de *Dendranthema x grandiflorum*.

### **2.5.2. Análises por espectrometria de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR)**

Os espectros de infravermelho médio (MIR) foram obtidos para os 54 extratos em triplicata em um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 400, usando um acessório HATR com cristal ZnSe de 45 graus no compartimento de amostras (Pike Technologies). Foram coletadas 32 varreduras para cada extrato com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e faixa de leitura de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . O tempo para analisar as triplicatas foi de aproximadamente 10 minutos e utilizou-se uma massa de aproximadamente 1 mg de amostra.

### **2.5.3. Análise de componentes principais (PCA)**

Neste trabalho, dois modelos de análise de componentes principais (PCA) foram construídos a partir de vinte e sete amostras de *Dendranthema x grandiflorum* (27 extratos FA e 27 extratos FB), as análises realizadas em triplicatas, resultando em 81 dados do espectro MIR (3351 variáveis) para cada extrato. Para trabalhar com esses dados utilizou-se o software MATLAB versão 7.12. A PCA foi aplicada para reter a maioria das informações do espectro MIR em poucos componentes e para permitir a visualização de clusters naturais por similaridade química. Os dados do primeiro modelo, realizado com o extrato de FA, foram pré-processados com MSC (*Multiplicative Scatter Correction*) para correção da dispersão da luz e centrados na média <sup>11</sup>. O segundo modelo, realizado com o extrato FB, foi pré-processado com Air-PLS (correção da linha de base usando mínimos quadrados penalizados com correção iterativa adaptativa) para correção espectral da linha de base e centrado na média <sup>12</sup>.

### **2.5.4. Análises por espectrometria de massas por ressonância de íon ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR MS)**

As análises de FT-ICR MS foram realizadas usando um *Solarix* de 9,4 T (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Uma mistura dos 27 extratos FA e as 27 amostras FB nas concentrações de 1  $\text{mg.L}^{-1}$  foram solubilizadas em acetonitrila:água (1:1) e infundida na fonte de eletropulverização (ESI) a uma taxa de 5  $\mu\text{L/min}$  e operada em modo negativo. Alternativamente, a mistura do extrato FA foi solubilizada em tolueno e infundida na fonte de ionização química por pressão atmosférica (APCI), operada

em modo positivo para ionização de moléculas em uma faixa de massa entre  $m/z$  150-1500. As condições da fonte ESI foram as seguintes: i) pressão do gás do nebulizador 0,5-1,0 bar; ii) tensão capilar: 3,0 a 3,5 kV; iii) temperatura capilar: 250°C. Os parâmetros para APCI foram: i) tensão capilar: 2100 V; ii) deslocamento da placa final: - 500 V; iii) temperatura e vazão do gás de secagem: 180°C e 4,0 mL/min; iv) pressão e temperatura do gás nebulizador: 1,0 bar e 350°C; v) skimmer: 25,0 V; vi) tensão de colisão: -2,0 V; vii) descarga de coroa: 4000 nA; e viii) TOF: 0,750 s. O grau de insaturação de cada molécula foi determinado pelo seu valor DBE (Equação de dupla ligação) da equação  $DBE = C - H/2 + N/2 + 1$ , onde C, H e N são os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o pacote de software *Compass Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

#### **2.5.5. Atividade larvícida em *Aedes aegypti***

Alíquotas dos 27 extratos FA e 27 extratos FB foram misturadas aleatoriamente para gerar uma mistura FA e uma mistura FB. Os ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos no Instituto de Biologia do Exército (IBEX), no Rio de Janeiro. Foram mantidos em uma bandeja contendo água potável sem adição de cloro em condições ideais ( $28 \pm 1$ ) °C. Após 48 horas de incubação, as larvas eclodidas foram utilizadas quando atingiram o 4º estágio de crescimento. A metodologia foi adaptada da Organização Mundial da Saúde (*Technical Report Series*, 1970).

Os testes foram realizados nas misturas dos extratos FA e FB, resumidamente, 100 µL de soluções de FA (solúvel em acetona) e FB (solúvel em etanol) na concentração de 15 mg.L<sup>-1</sup> (15 ppm) foram adicionados em recipientes de teste contendo 15 mL de água. Um controle negativo para solvente também foi realizado utilizando 15 mL de água potável sem adição de cloro e 100 µL de solvente (acetona e etanol separadamente). No controle da água potável sem adição de cloro, foram adicionados 15 mL de água no vaso de teste e 5,0 mL de água contendo as 5 larvas do mosquito. Para o controle positivo, foi utilizado o larvícida organofosforado Temefos na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> (1 ppm) <sup>13, 14</sup>. As soluções foram misturadas com um bastão de vidro por 30 minutos, seguido pela adição de 4,9 mL de água contendo 5 larvas do quarto estágio. Os testes foram realizados em cinco repetições. Após 24 horas, o número de larvas vivas e mortas foi observado e registrado.

#### 2.5.6. Saponificação e metilação da mistura de extratos FA

A mistura de FA foi submetida à reação de saponificação de KOH/MeOH, seguida de metilação com BF<sub>3</sub>/MeOH. Resumidamente, a amostra (0,49 g) foi solubilizada em 10 mL de 0,5 mol·L<sup>-1</sup> KOH e a solução foi refluxada por 10 minutos, agitando ocasionalmente. Depois disso, foi resfriado e adicionado 5 mL de BF<sub>3</sub>, a mistura foi refluxada por mais 10 minutos. A solução foi arrefecida novamente e transferida para um funil de separação ao qual foram adicionados 10 mL de uma solução saturada de cloreto de sódio, juntamente com 20 mL de hexano sob agitação. A fase hexana foi separada, filtrada sobre algodão e preparada para análises por APCI (+) FT-ICR MS de acordo com a metodologia descrita no tópico 2.5.4. Análises de GC-MS também foram adotadas para a amostra saponificada de acordo com tópico a seguir.

#### 2.5.7. Análise por cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS)

A mistura dos extratos FA submetida à saponificação e metilação foi analisada por GC-MS no equipamento Shimadzu QP5050. As substâncias foram separadas em uma coluna Agilent 19091S-433 UI de fase estacionária HP-5MS Ultra Inert (30 m x 250 µm x 0,25 µm) e ionizadas sob impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV. Adotou-se uma programação de gradiente de temperatura, a temperatura inicial do forno foi ajustada em 40 °C e mantida por 1 min. Depois disso, a temperatura foi aumentada para 240 °C a uma taxa de 5 °C/min e novamente aumentada para 310 °C a 30 °C.min<sup>-1</sup>. Uma isoterma por 20 minutos foi realizada a esta temperatura final. O tempo total de análise foi de 63 min. As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram mantidas em 290 °C e 310 °C, respectivamente. O hélio foi utilizado como gás portador, com fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram diluídas em diclorometano (10 mg.mL<sup>-1</sup>) e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor em modo split 1:10. Uma série de *n*-alcanos foi analisada nas mesmas condições cromatográficas para calcular o Índice de Kovats das substâncias. Os espectros de massa dos compostos separados foram comparados com o *NIST Mass Spectral Database* e com dados da literatura.

## 2.6. Resultados e discussão

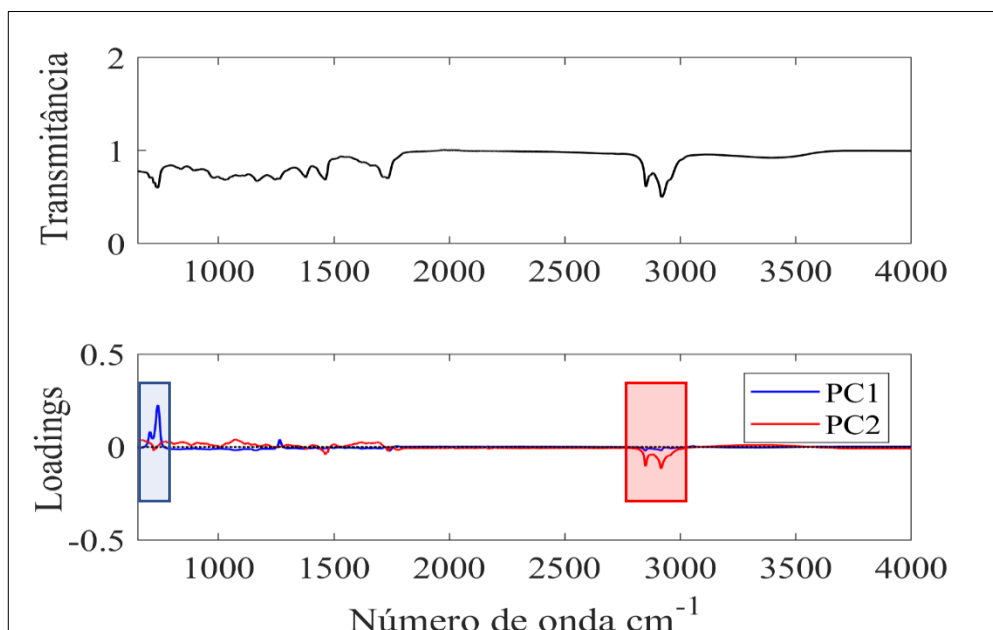
### 2.6.1. Avaliação dos dados de amostragem e rendimento das extrações

A Tabela 2.S.1, além de descrever as características das amostragens, também relata os rendimentos obtidos nas extrações (27 extratos FA e 27 extratos FB). Foi escolhido um procedimento extrativo baseado na solubilidade de compostos em solventes lipofílicos e hidrofílicos, uma vez que, quimicamente, as moléculas lipofílicas do crisântemo são estruturalmente diferentes das moléculas hidrofílicas<sup>15</sup>. Enquanto os primeiros são terpenos, *n*-alcanos e ácidos graxos<sup>16</sup>, os últimos são compostos fenólicos<sup>17, 18</sup>. Além disso, a partir da Tabela 2.S.1, pode-se ver uma quantidade maior nas massas dos extratos FB em relação aos FA para todas as amostras. Portanto, os compostos de natureza hidrofílica são mais abundantes que os lipofílicos quando se trata da espécie *Chrysanthemum morifolium*. Avaliando o rendimento de todos os extratos obtidos, pode-se observar vantagens no processo de extração adotado e na espécie trabalhada (*Chrysanthemum morifolium*). De maneira geral, ao consultar os dados da literatura de estudos realizados em outras matrizes, ou com diferentes métodos de extração, umas das dificuldades encontradas é o baixo rendimento dos extratos, que dificulta no trabalho de caracterização e formulação de um produto<sup>15, 19–21</sup>. No caso da espécie *Chrysanthemum morifolium*, o bom rendimento obtido nas extrações conta como um ponto positivo para valorizar a proposta de formulação de um fito produto.

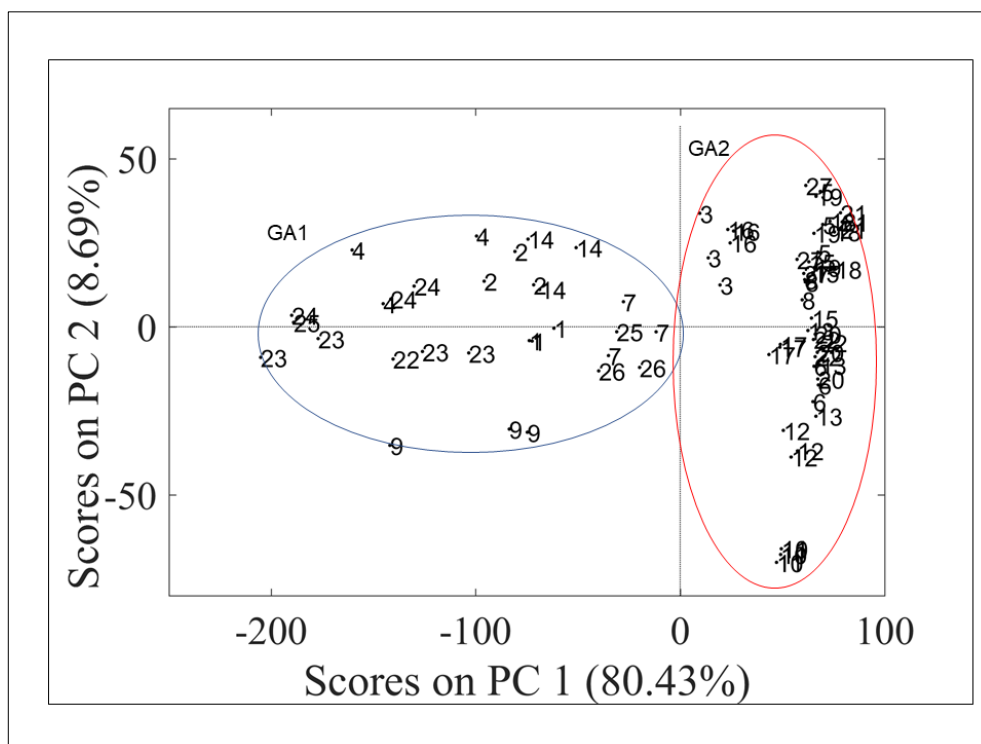
### 2.6.2. Espectrometria de infravermelho médio (MIR) e Análise de componentes principais (PCA)

#### 2.6.2.1. Extratos FA

A Figura 2.3 mostra a sobreposição dos espectros obtidos nas análises de infravermelho, seguido do gráfico de loadings. Avaliando de maneira detalhada o gráfico de loadings, observa-se que a região na faixa de 700 a 800  $\text{cm}^{-1}$  apresenta as variáveis de maior contribuição para o modelo quimiométrico na PC1. Enquanto na PC2, as variáveis mais importantes estão na região de 2700 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 2.3.** Sobreposição dos espectros MIR e gráfico de loadings para os extratos FA.



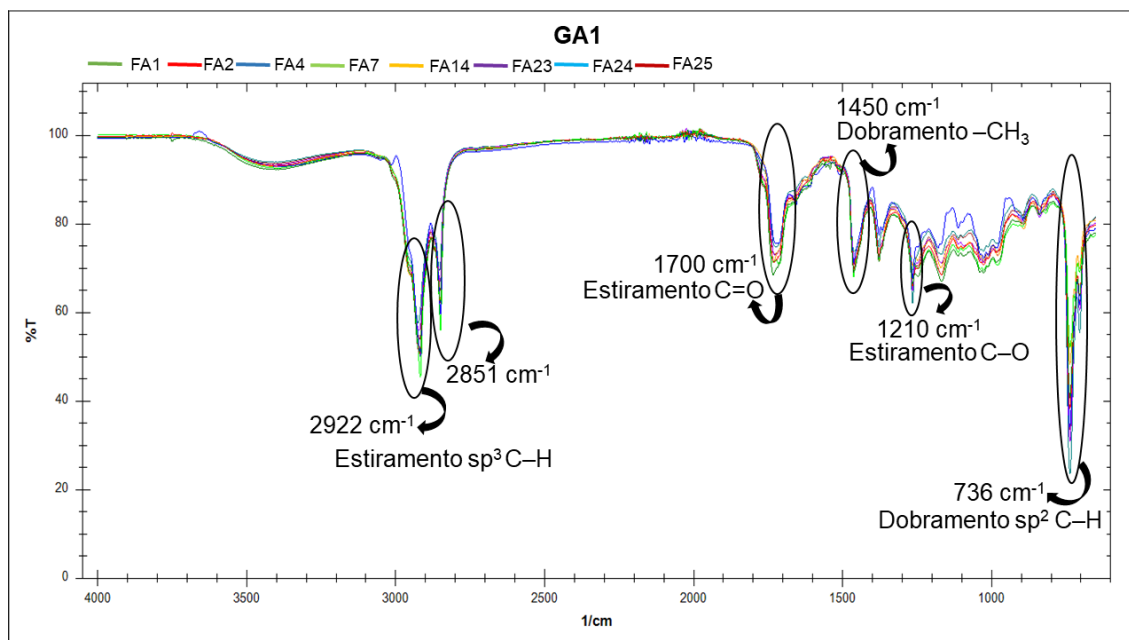
**Figura 2.4.** Análises PCA de extratos de diclorometano (FA) da espécie *Dendranthema x grandiflorum* Ramat submetidos ao FT-MIR.

O gráfico de Scores (Figura 2.4), representado pelas duas componentes de maiores contribuições em termo de variância, PC1 (80,43%) e PC2 (8,69%), no qual a PC1, concentra um número de informações suficientes (80,43%) para explicar o modelo obtido. De acordo com a Figura 2.4, observa-se a formação de dois distintos

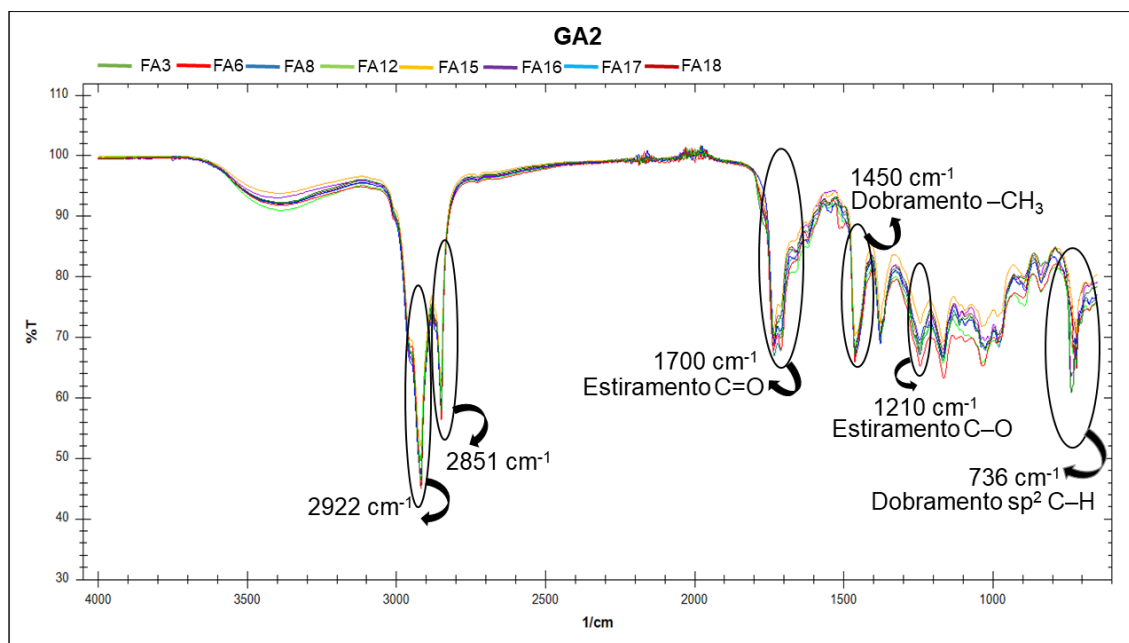
grupos que foram classificados como GA1 localizado na PC1 negativa e GA2 segregado na PC1 positiva.

As regiões de maiores contribuições, observadas no gráfico de loadings, foram avaliadas detalhadamente nos espectros de MIR. A presença de bandas intensas em 2851 e 2922  $\text{cm}^{-1}$  para as amostras FA em GA1 e GA2 referem-se ao movimento vibracional de estiramento  $\text{sp}^3$  CH, conforme Figura 2.5 e Figura 2.6. A banda diferencial para os espectros dessas amostras é a 736  $\text{cm}^{-1}$ , que aparece com maior intensidade para as amostras do grupo GA1 em relação as amostras do grupo GA2. Tal banda, pode ser indicativa de alcenos trissubstituídos (absorção de dobramento  $\text{sp}^2$  CH). De fato, as plantas de crisântemo são fonte de vários triterpenos e ésteres de triterpenos com uma ligação dupla trissubstituída<sup>3, 22, 23</sup>.

Bandas de menores intensidades nas regiões 1210  $\text{cm}^{-1}$ , 1450  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , são observadas em todas as 27 amostras segregadas em GA1 e GA2. Tais bandas, são atribuídas ao estiramento C-O (1210  $\text{cm}^{-1}$ ), estiramento C=O (1700  $\text{cm}^{-1}$ ) que podem estar relacionados a moléculas de ácidos carboxílicos e ésteres. De fato, a literatura relata a presença de ácidos graxos e triterpenos ésteres na espécie de crisântemo<sup>3, 23, 24</sup>.



**Figura 2.5.** Amostras FA do grupo GA1 - banda intensa em 736  $\text{cm}^{-1}$  e bandas de média intensidade em 2851 e 2922  $\text{cm}^{-1}$ .

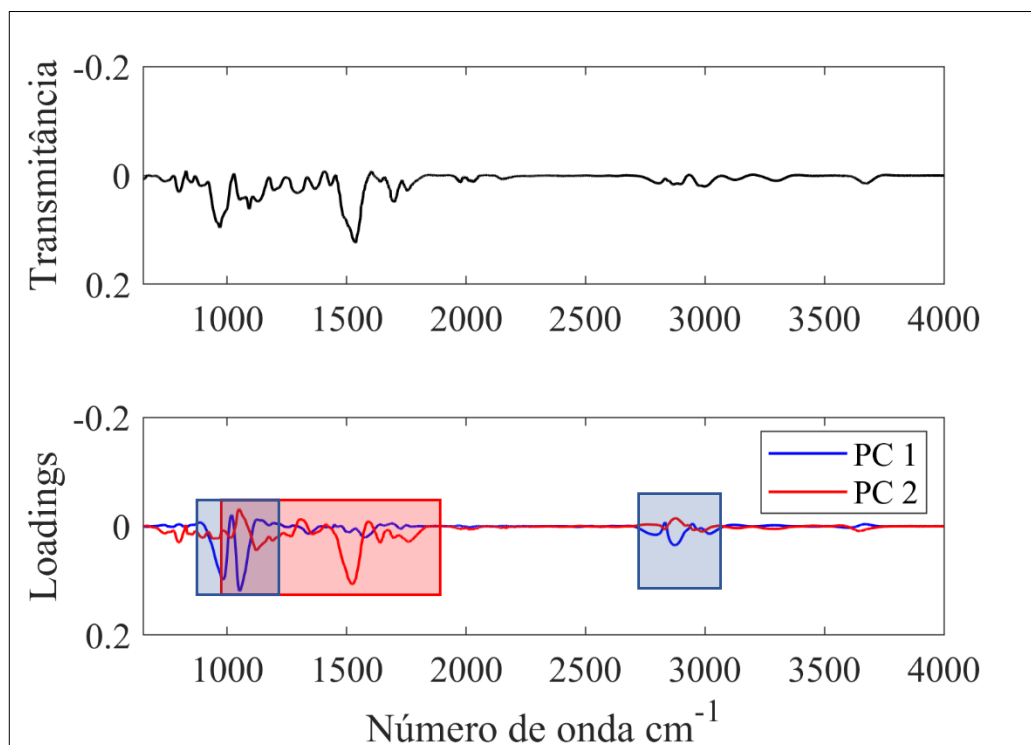


**Figura 2.6.** Amostras FA do grupo GA-2 - banda intensa em 2851 e 2922  $\text{cm}^{-1}$  e baixa intensidade em 736  $\text{cm}^{-1}$ .

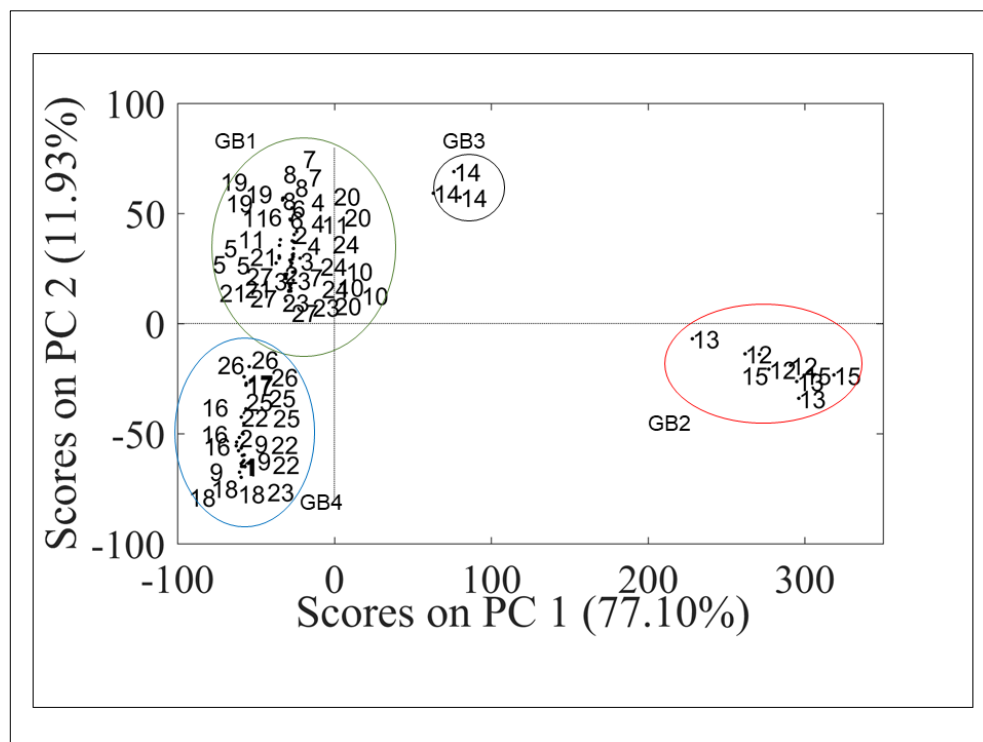
#### 2.6.2.2. Extratos FB

Da mesma forma, a Figura 2.7 mostra a sobreposição dos espectros obtidos nas análises de infravermelho dos extratos FB. O gráfico de loadings nos possibilita reconhecer as regiões de maiores importância para o modelo em termo de variância, contida numa faixa extensa de 1000 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  para a PC2 e 900 a 1100  $\text{cm}^{-1}$ , 2600 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  para PC1.

As componentes principais PC1 e PC2 foram utilizadas para plotar o gráfico de Scores, Figura 2.8, das quais concentraram 77,10% e 11,93% respectivamente das informações em termos de variância para o modelo de PCA. Percebe-se que houve maior discriminação de grupos para os extratos FB, que foram classificados como GB1, GB2, GB3 e GB4. Portanto, os dados do MIR foram capazes de verificar maiores diferenças nos extratos polares (FB) do que os não polares (FA).

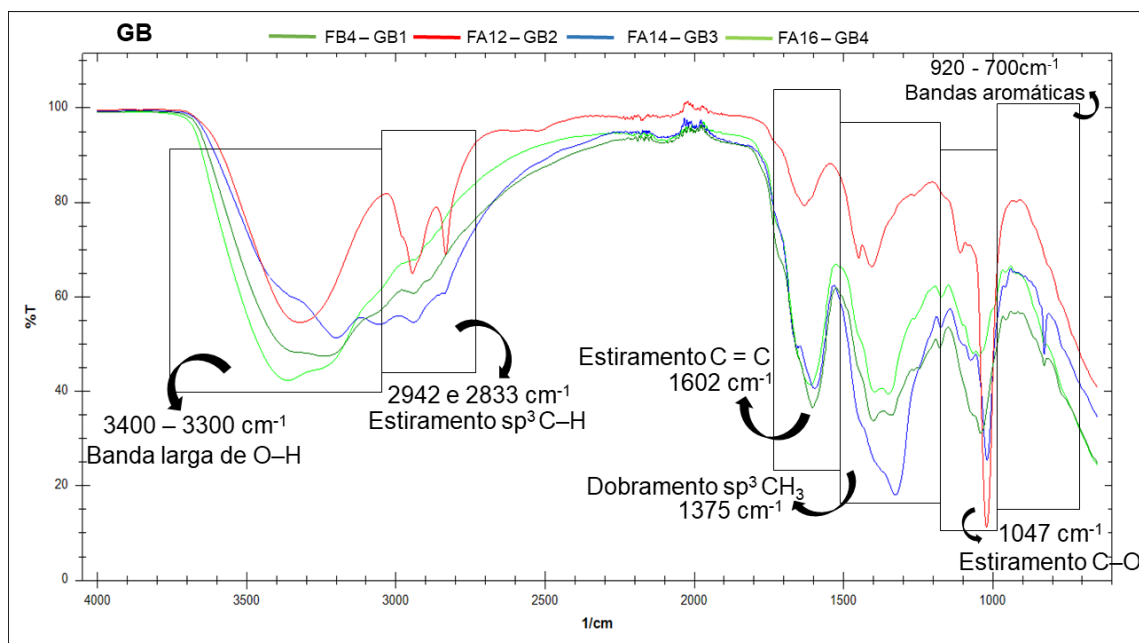


**Figura 2.7.** Sobreposição dos espectros MIR e gráfico de loadings para os extratos FB.



**Figura 2.8.** Análises PCA de extratos de metanol (FB) da espécie *Dendranthema x grandiflorum* Ramat submetidos ao FT-MIR.

Avaliando as regiões que se destacaram no gráfico de loadings diretamente nos espectros de MIR, observa-se que as bandas dentro de cada grupo exibem várias características específicas conforme Figura 2.9.



**Figura 2.9.** Espectro de MIR para avaliar o comportamento dos grupos GB1, GB2, GB3 e GB4.

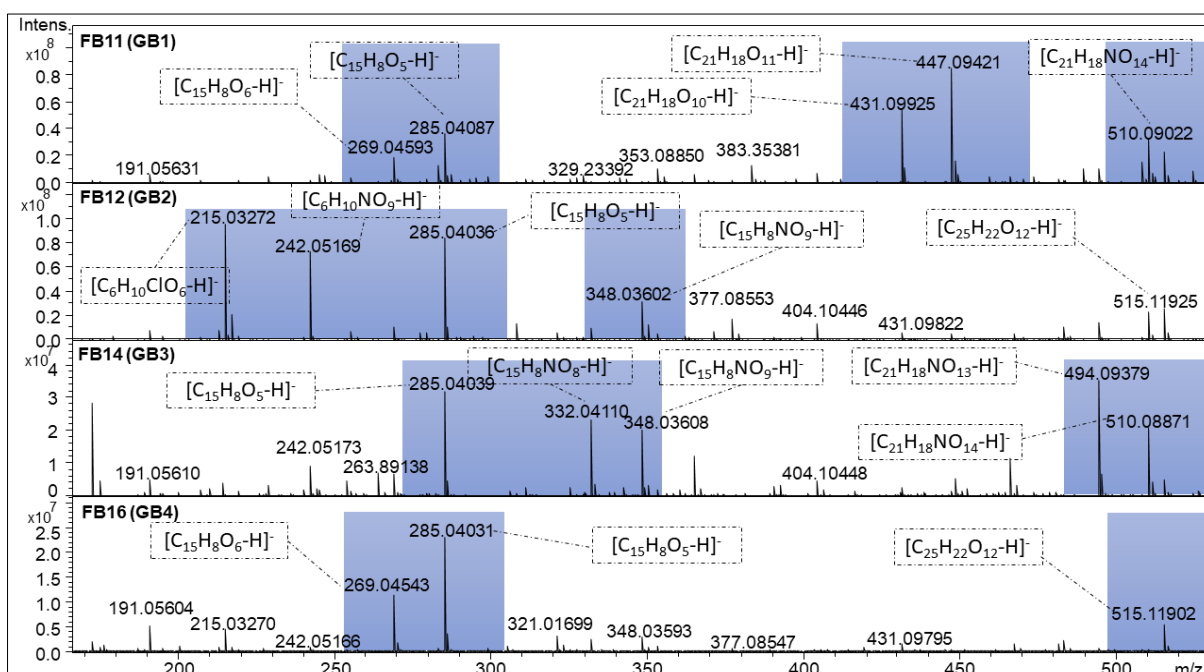
GB1: Presença de faixas de alongamento OH complexas e sobrepostas. Observa-se a ausência de banda em  $2833\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{sp}^3\text{ C-H}$ ), ou uma baixa intensidade e sobreposição pela banda OH; banda intensa em  $1602\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{C}=\text{C}$ ) e uma de intensidade média a  $1375$  (dobramento  $\text{sp}^3\text{ CH}_3$ ). Na região de  $1047\text{ cm}^{-1}$  percebe-se uma banda referente ao grupo alcoxi em compostos aromáticos. As bandas aromáticas de curvatura  $\text{C}=\text{C}$  podem ser observadas em  $920$ ,  $860$ ,  $818$  e  $777\text{ cm}^{-1}$ .

GB2: Banda de estiramento OH centrada em  $3316\text{ cm}^{-1}$  e bandas bem definidas de estiramento de CH, centrada em  $2942\text{ cm}^{-1}$  e  $2833\text{ cm}^{-1}$  (ambas para estiramento  $\text{sp}^3\text{ C-H}$ ). Observamos uma banda de deformação C-O de alta intensidade (grupo alcoxi) centrada em  $1020\text{ cm}^{-1}$  e bandas de curvatura  $\text{C}=\text{C}$  aromáticas, mas não estão bem definidas.

GB3: Faixa de alongamento OH que se sobrepõe as bandas de estiramento  $\text{sp}^3\text{ CH}$  ( $2942$  e  $2833\text{ cm}^{-1}$ ). Observa-se bandas intensas em  $1602\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{C}=\text{C}$ ),  $1369\text{ cm}^{-1}$  (dobramento  $\text{sp}^3\text{ C-H}$ ) e  $1047\text{ cm}^{-1}$  (grupo alcoxi em compostos aromáticos); banda de deformação C-O de intensidade média (grupo alcoxi) centrada em  $1020\text{ cm}^{-1}$ ; e uma banda aromática curta ( $\text{C}=\text{C}$ ) a  $827\text{ cm}^{-1}$ . As outras bandas aromáticas dessa região não estão bem definidas.

GB4: O grupo GB4 é muito semelhante ao GB1, exceto pelas bandas de dobramento C=C aromáticas mal definidas.

Com base nas análises PCA dos espectros MIR, as amostras do grupo FB, ricas em compostos fenólicos, foram analisadas por ESI (-) FT-ICR MS. Com a sobreposição dos espectros foi observado um perfil químico semelhante, assim foi selecionado algumas amostras de cada grupo para a discussão: GB1 (amostras 7, 11 e 24), GB2 (amostra 12), GB3 (amostra 14) e GB4 (amostras 16, 18 e 26). Na Figura 2.10, estão destacados alguns compostos interessantes que podem ser vistos detalhadamente na Tabela 2.1 para FB-11 (GB1), FB-12 (GB2), FB-14 (GB3) e FB-16 (GB4).



**Figura 2.10.** Espectros ESI (-) FT-ICR MS com picos de carboidratos e flavonoides para os extratos FB de *Dendranthema x grandiflorum*.

**Tabela 2.1.** Proposta de compostos presentes nas amostras de FB por ESI (-) FT-ICR MS.

| GB1                             |                                                                  |                                                 |                    |                  |            |                    |               |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|------------------|------------|--------------------|---------------|
| <i>m/z</i> <sub>mensurado</sub> | Compostos Identificados                                          | [M-H] <sup>-</sup>                              | MS/MS <sup>a</sup> | DBE <sup>b</sup> | Erro (ppm) | IS(%) <sup>c</sup> | Ref           |
| 269,04543                       | Apigenina                                                        | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>   | -                  | 11               |            |                    |               |
| 285,04036                       | Luteolina                                                        | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>   | -                  | 11               |            |                    |               |
| 431,09837                       | Apigenina-7-O-glucosídeo                                         | C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> | 269                | 12               | 1,07       | 58,60              |               |
| 447,09329                       | Luteolina-7-O-glucosídeo                                         | C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> | 285                | 12               | 0,93       | 100,00             | 3, 18, 25, 26 |
| 510,09022                       | Luteolina-7-O-glucosídeo (cluster NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> | 269                | 12               | -1,29      | 37,90              |               |
| 515,33578                       | Ácidos                                                           | C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> | 353                | 14               | -1,32      | 27,39              |               |

| dicafeoilquínicos |                                                                         |                                                 |     |    |       |        |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----|----|-------|--------|
| GB2               |                                                                         |                                                 |     |    |       |        |
| 215,03269         | Hexose<br>(cluster cloreto)                                             | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>   | -   | 1  | -0,43 | 100,00 |
| 242,05165         | Hexose nitrato (cluster<br>NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )               | C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>   | -   | 1  | 0,29  | 76,68  |
| 285,04036         | Luteolina                                                               | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>   | -   | 11 | 0,35  | 86,50  |
| 348,03602         | Luteolina<br>(cluster NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )                    | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>   | -   | 11 | 0,23  | 28,20  |
| 515,33578         | Ácidos<br>dicafeoilquínicos                                             | C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> | 353 | 14 | 0,48  | 27,65  |
| GB3               |                                                                         |                                                 |     |    |       |        |
| 285,04039         | Luteolina                                                               | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>   | -   | 11 | 0,25  | 91,00  |
| 332,04110         | Apigenina<br>(cluster NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )                    | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>   | -   | 11 | 0,26  | 66,45  |
| 348,03602         | Luteolina<br>(cluster NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )                    | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>   | 269 | 11 | 0,17  | 57,07  |
| 494,09379         | Apigenin-7-O-<br>glucoside<br>(cluster NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )   | C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> | 285 | 12 | 0,45  | 100,00 |
| 510,08871         | Luteolina-7-O-<br>glucosideo<br>(cluster NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) | C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> | 285 | 12 | 0,43  | 59,03  |
| 515,33578         | Ácidos<br>dicafeoilquínicos                                             | C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> | 353 | 14 | 0,28  | 14,15  |
| GB4               |                                                                         |                                                 |     |    |       |        |
| 269,04543         | Apigenina                                                               | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>   | -   | 11 | 0,28  | 49,10  |
| 285,04036         | Luteolina                                                               | C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>   | -   | 11 | 0,41  | 100,00 |
| 515,33578         | Ácidos<br>dicafeoilquínicos                                             | C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> | 353 | 14 | 0,57  | 24,74  |

<sup>a</sup>MS/MS = Valores retirados do artigo Spindola *et al.* (2016)<sup>3</sup>; <sup>b</sup>DBE= Equivalente de ligação dupla;

<sup>c</sup>IS= Intensidade do sinal

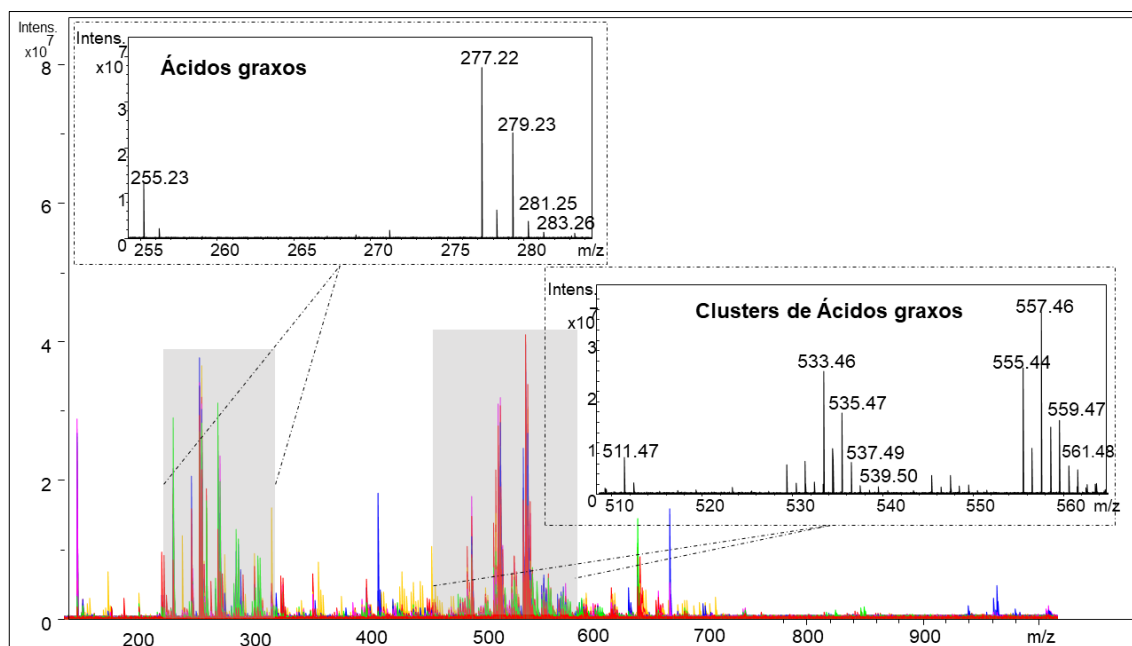
Como verificado na Tabela 2.1, os erros foram inferiores a 1 ppm. Os valores de DBE 1 para a hexose referente a dupla ligação C=O presente na molécula; DBE 11 e 12 são característicos de estruturas pertencentes as classes de flavonóides e flavonóides monoglicosilados respectivamente; DBE 14 caracterizam-se pela presença dos ácidos dicafeoilquínicos. Como essas classes de compostos naturais contêm grupos OH abundantes, as diferenças na intensidade dos seus picos levaram à discriminação dos quatro grupos na PCA (Figura 2.8). Além disso, a melhor resolução das bandas de absorção (região O-H e C-H) entre 2800 e 3400 cm<sup>-1</sup> em GB2 parece surgir do maior teor de carboidratos livres nas amostras desse grupo. Conforme relatado por vários autores que mostram os flavonóides e os ácidos fenólicos como classes representativas das espécies de crisântemo <sup>17, 27, 28</sup>.

### 2.6.3. Atividade larvicida em *Aedes aegypti*

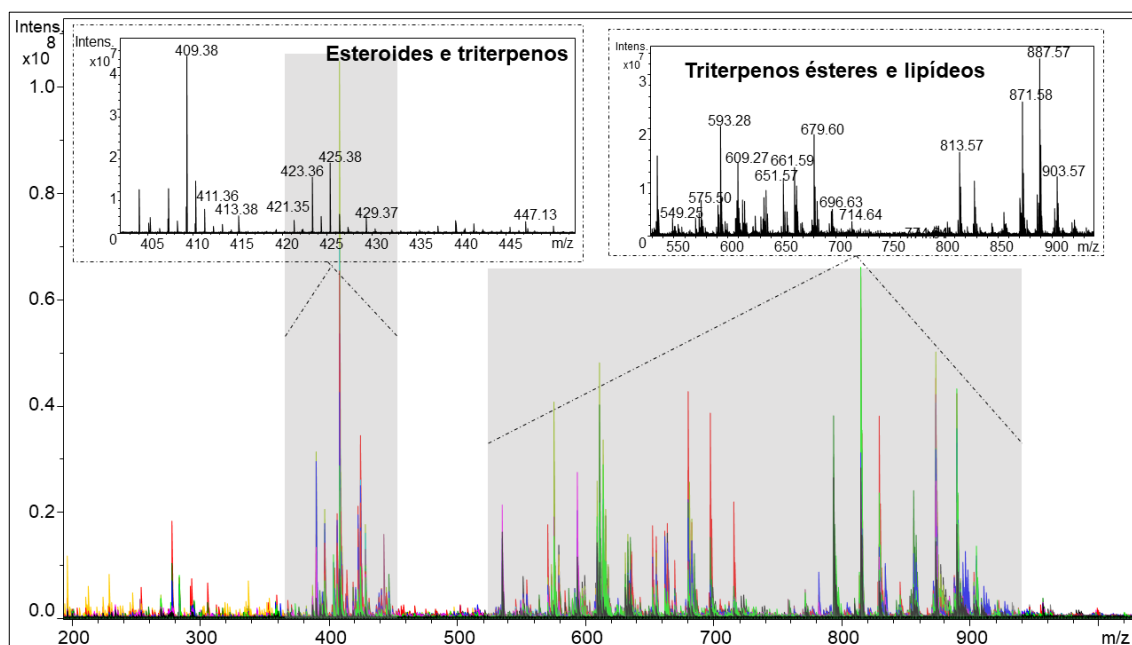
Amostras representativas obtidas pela mistura de vários extratos de FA e FB foram analisadas em larvas de *Aedes aegypti* na concentração de 15 ppm. A mistura dos extratos FB não foi ativa, ou seja, nenhuma mortalidade larval foi observada. No entanto, a mistura de FA foi ativa, mostrando 100% da mortalidade larval. Em um estudo anterior, foi descrito a atividade larvicida de uma única amostra de *Dendranthema x grandiflorum* e encontramos um LC<sub>99</sub> de 15 ppm<sup>3</sup>.

Como a atividade larvicida estava presente na mistura de FA, pode-se afirmar que existe uma homogeneidade nos 27 extratos FA quanto a composição química, conforme demonstrado pela análise da PCA, na qual as amostras ficaram segregadas em dois grandes grupos, fato que pode ter garantido a atividade larvicida. A homogeneidade é uma característica importante quando se deseja transformar uma matéria-prima em um produto com aplicação tecnológica<sup>29–31</sup>. Por esse motivo, uma mistura das amostras FA foi submetida à análise de FT-ICR MS em duas fontes de ionização (ESI e APCI). Em seguida esta mistura FA foi saponificada/metilada na qual realizou-se as análises de APCI (+) FT-ICR MS e GC-MS, a fim de obter um perfil químico detalhado da espécie.

As análises de FT-ICR MS da mistura dos extratos FA na fonte ESI negativa, adequada para ácidos carboxílicos e compostos fenólicos, mostrou íons [M-H]<sup>-</sup> intensos de ácidos graxos e seus aglomerados (Figura 2.11). Na fonte APCI positiva (Figura 2.12), no entanto, foram obtidas fórmulas moleculares exatas de triterpenos, triterpenos ésteres, esteróides e lipídios (diacilgliceróis e triacilgliceróis, entre outros) (Tabela 2.S.2 – pag. 125).

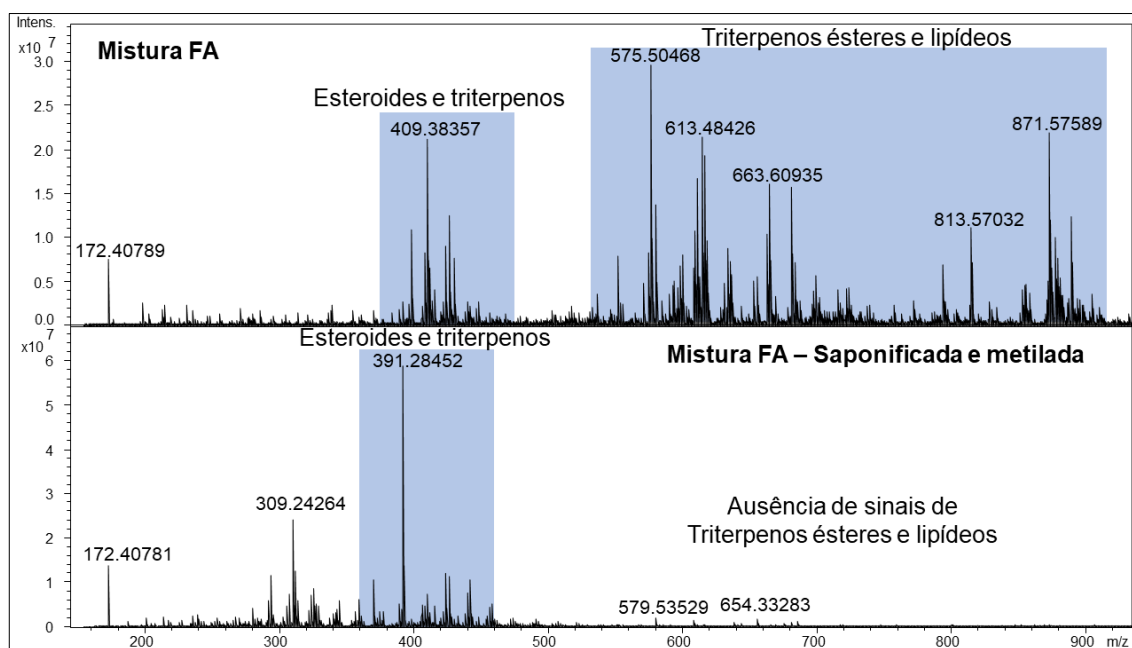


**Figura 2.11.** Sobreposição dos 27 espectros ESI (-) FT-ICR MS dos extratos FA e regiões aproximadas.



**Figura 2.12.** Sobreposição dos 27 espectros APCI (+) FT-ICR MS dos extratos FA e regiões aproximadas.

Após a saponificação/metilação, muitos sinais desaparecem (Figura 2.13) como resultado da metanólise das ligações ésteres de triterpenos e lipídios de acordo com a Tabela 2.2. Além disso, por GC-MS, vários ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados (Tabela 2.S.3 – pag. 127, Figura 2.S.1 – pag. 121).



**Figura 2.13.** Espectro APCI (+) FT-ICR MS da mistura FA antes e após saponificação/metilação.

**Tabela 2.2.** Compostos químicos presentes na mistura FA antes e após saponificação/metilação.

| APCI (+) FT-ICR MS da mistura       |                                                                             |                          |     |      |                                    |                          |     |     |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----|------|------------------------------------|--------------------------|-----|-----|
| Substância                          | Mistura FA                                                                  |                          |     |      | Mistura FA – Saponificada/Metilada |                          |     |     |
|                                     | [M-H] <sup>-</sup>                                                          | m/z <sub>mensurado</sub> | DBE | SI%  | [M-H] <sup>-</sup>                 | m/z <sub>mensurado</sub> | DBE | SI% |
| <b>Éster Triterpênico</b>           |                                                                             |                          |     |      |                                    |                          |     |     |
| Maniladiol 3-O-myristato ou isômero | C <sub>44</sub> H <sub>75</sub> O <sub>3</sub>                              | 651,57281                | 7,5 | 17,0 | -                                  | -                        | -   | -   |
|                                     | C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> O <sub>2</sub>                              | 661,59371                | 8,5 | 35,0 | -                                  | -                        | -   | -   |
| α-Amirina palmitato ou isômero      | C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> O <sub>2</sub>                              | 663,60935                | 7,5 | 54,2 | -                                  | -                        | -   | -   |
|                                     | C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> O <sub>3</sub>                              | 677,58854                | 8,5 | 7,3  | -                                  | -                        | -   | -   |
| Maniladiol 3-O-palmitato ou isômero | C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> O <sub>3</sub>                              | 679,60433                | 7,5 | 52,5 | -                                  | -                        | -   | -   |
| Faradiol 3-O-palmitato ou isômero   | C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> NO <sub>3</sub><br>(aduto NH <sub>3</sub> ) | 696,63084                | 6,5 | 11,9 | -                                  | -                        | -   | -   |
|                                     | C <sub>44</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>5</sub><br>(aduto NH <sub>3</sub> ) | 698,57382                | 7,5 | 19,7 | -                                  | -                        | -   | -   |
|                                     | C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>5</sub><br>(aduto NH <sub>3</sub> ) | 700,58946                | 6,5 | 10,1 | -                                  | -                        | -   | -   |
|                                     | C <sub>44</sub> H <sub>76</sub> NO <sub>6</sub><br>(aduto NH <sub>3</sub> ) | 714,56881                | 7,5 | 14,1 | -                                  | -                        | -   | -   |
|                                     | C <sub>44</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>6</sub><br>(aduto NH <sub>3</sub> ) | 716,58451                | 6,5 | 9,3  | -                                  | -                        | -   | -   |

Muitos estudos na literatura relataram a atividade larvica de compostos lipofílicos de plantas como triterpenos e ácidos graxos. O ácidos oleico e linoleico

foram bastante potentes contra as larvas *Aedes aegypti* do quarto estagio (LC<sub>50</sub> 8,80; 18,20 e LC<sub>90</sub> 35,39; 96,33 ppm), bem como as larvas de outros mosquitos <sup>10</sup>. O potencial larvicida dos ácidos graxos também foi evidenciado nos testes de *Culex quinquefasciatus*. A maior atividade larvicida foi observada com o extrato de *Vitex trifolia* (LC<sub>50</sub> = 9,26 e LC<sub>90</sub> = 21,28 ppm) <sup>32</sup>. Triterpenos, como o acetato de  $\alpha$ -amirina, também podem ser utilizados como um composto ativo no desenvolvimento de novos inseticidas, apresentando, por exemplo, uma alta porcentagem de mortalidade de larvas e pupas de *Anopheles stephensi* do quarto estágio após 48 h de exposição (0,100 ppm, 96.6  $\pm$  3.2 e 97.7  $\pm$  3.7) <sup>33</sup>.

## 2.7. Conclusão

Resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* de diferentes amostragens podem ser utilizados como matéria-prima para obter produtos larvicidas. A homogeneidade química dos extratos FA foi demonstrada por análise quimiométrica a partir dos dados da espectrometria de infravermelho. O produto larvicida obtido da mistura dos diversos extratos apresentou potente atividade para as larvas do vetor *Aedes aegypti*, abrindo caminho para a inovação tecnológica utilizando um resíduo agrícola.

## 2.8. Referências

1. SILVA, J. A. T. da. Ornamental chrysanthemums: Improvement by biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. vol. **79**, no. 1. 2004.
2. BRITO, A. R. B.; LIMA, P. V. P. S.; KHAN, A. S.; DE ALMEIDA, J. B. S. A. A comercialização do Crisântemo de corte e em vaso: um estudo de caso para a região metropolitana de Fortaleza e Maciço de Baturité. *Revista Economia e Desenvolvimento*. vol. **4**, no. 2. 2005.
3. SPINDOLA, K. C. V. W.; SIMAS, N. K.; DOS SANTOS, C. E.; DA SILVA, A. G.; ROMÃO, W.; VANINI, G.; DA SILVA, S. R. C.; BORGES, G. R.; DE SOUZA, F. G.; KUSTER, R. M. Dendranthema grandiflorum, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against Aedes aegypti larvae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. vol. **26**, no. 3. 2016.
4. WANG, T.; ZHU, Z.; GUO, Q.; MAO, P. Variation in major flavonoids glycosides and caffeoylquinic acids during florescence of three Chrysanthemum morifolium Ramat cv. "Hangju" genotypes. *Biochemical Systematics and Ecology*. vol. **47**. 2013.
5. UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; TAKIDO, M. Constituents of Compositae Plants. 2. Triterpene Diols, Triols, and Their 3-O-Fatty Acid Esters from Edible Chrysanthemum Flower Extract and Their Anti-inflammatory Effects. *J. Agric. Food Chem.* 2001,. vol. **49**. 2001.
6. TSAO, R.; ATTYGALLE, A. B.; SCHROEDER, F. C.; MARVIN, C. H.; MCGARVEY, B. D. Isobutylamides of Unsaturated Fatty Acids from Chrysanthemum m orifolium Associated with Host-Plant Resistance against the Western Flower Thrips . *Journal of Natural Products*. vol. **66**, no. 9. 2007.
7. W. K. OLIVEIRA, S. M. F. BRITO, G. F. M. PEREIRA, A. L. ABREU, D. B. ROHLFS, M. F. M. S. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50 de 2018, in *Boletim Epidemiológico*, vol. **50**, 2019.
8. NAGAR, A.; CHATTERJEE, A.; UR REHMAN, L.; AHMAD, A.; TANDON, S. Comparative extraction and enrichment techniques for pyrethrins from flowers of Chrysanthemum cinerariaefolium. *Industrial Crops and Products*. vol. **76**. 2015.

9. SILVA, G. N. da; TRINDADE, F. T.; SANTOS, F. dos; GOSMANN, G.; SILVA, A. A. e; GNOATTO, S. C. Larvicidal activity of natural and modified triterpenoids against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest management science*. vol. **72**, no. 10. 2016.
10. RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K.; GOPALAKRISHNAN, G.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C. Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenes derived from *Ficus racemosa* Linn. *Parasitology Research*. vol. **103**, no. 2. 2008.
11. FEARN, T.; RICCIOLI, C.; GARRIDO-VARO, A.; GUERRERO-GINEL, J. E. On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. vol. **96**. 2009.
12. ZHANG, Z.; CHEN, S.; LIANG, Y. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Royal Society of Chemistry*. vol. **13**, no. 2. 2010.
13. CARVALHO, M. do S.; CALDAS, L. de; YOSHIZAWA, E. D.; DEGALLIER, M. A.; OLIVEIRA, N. C. de; KNOX, C.; BRITTO, M. Susceptibilidade do *aedes aegypti* ao inseticida temephos no distrito federal, em 2000. *Informe Epidemiológico do Sus*. vol. **10**. 2001.
14. PINHEIRO, V. C. S.; PEDROTADEI, W. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*. vol. **18**, no. 6. 2002.
15. CHASSAGNE, F.; SAMARAKOON, T.; PORRAS, G.; LYLES, J. T.; DETTWEILER, M.; MARQUEZ, L.; SALAM, A. M.; SHABIH, S.; FARROKHI, D. R.; QUAVE, C. L. A Systematic Review of Plants With Antibacterial Activities: A Taxonomic and Phylogenetic Perspective, *Frontiers in Pharmacology*, vol. **11**. Frontiers Media S.A., 08-Jan-2021.
16. RAGASSA, C. Y.; TIU, F.; RIDEOOUT, J. A. Triterpenoids from *Chrysanthemum morifolium*. *ACGC Chem. Res. Comm*. vol. **18**, no. June. 2005.
17. LIN, L.-Z.; HARNLY, J. M. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*. vol.

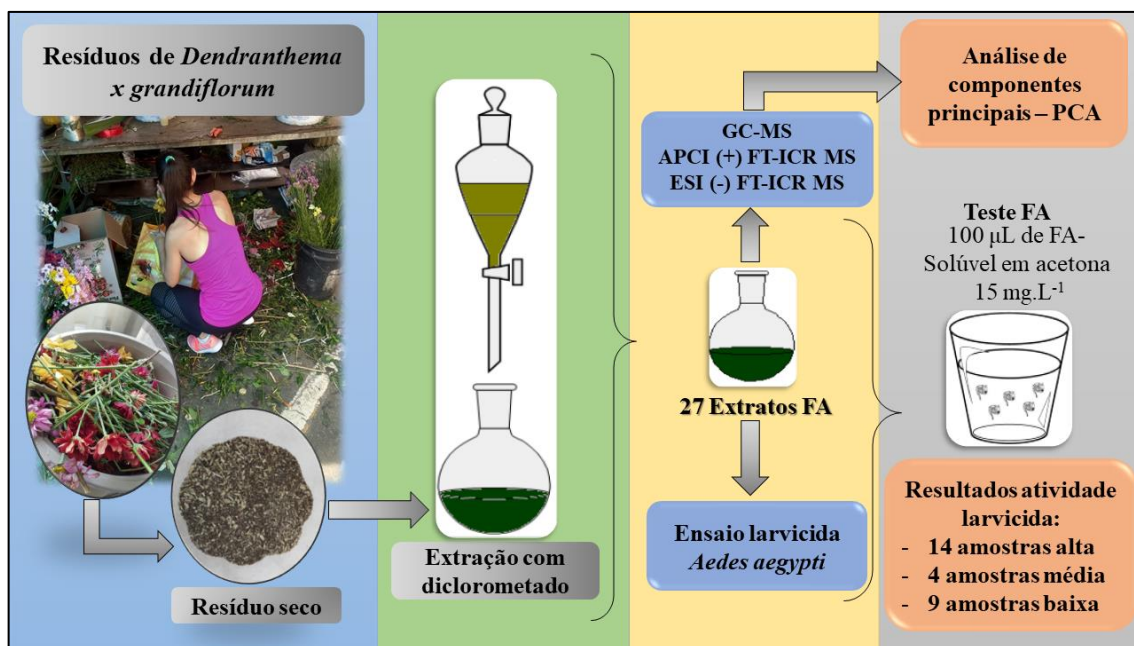
**120**, no. 1. May 2010.

18. LI, Y.; YANG, P.; LUO, Y.; GAO, B.; SUN, J.; LU, W.; LIU, J.; CHEN, P.; ZHANG, Y.; YU, L. (Lucy). Chemical compositions of chrysanthemum teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Food Chemistry*. vol. **286**, no. October 2018. 2019.
19. ALLAHYARI, A.; MASOUM, S.; AKHBARI, M.; HAMED, S.; MAZOOCHI, A. Experimental design approach in optimization of some effective variables on quantity and quality extraction of essential oil from *Rosa damascena* Mill. *Journal of the Iranian Chemical Society*. Feb. 2021.
20. SANTANA DE OLIVEIRA, M.; PEREIRA DA SILVA, V. M.; CANTÃO FREITAS, L.; GOMES SILVA, S.; NEVEZ CRUZ, J.; AGUIAR ANDRADE, E. H. Extraction Yield, Chemical Composition, Preliminary Toxicity of *Bignonia nocturna* (Bignoniaceae) Essential Oil and in Silico Evaluation of the Interaction. *Chemistry & Biodiversity*. Mar. 2021.
21. ROJO-GUTIÉRREZ, E.; CARRASCO-MOLINAR, O.; TIRADO-GALLEGOS, J. M.; LEVARIO-GÓMEZ, A.; CHÁVEZ-GONZÁLEZ, M. L.; BAEZA-JIMÉNEZ, R.; BUENROSTRO-FIGUEROA, J. J. Evaluation of green extraction processes, lipid composition and antioxidant activity of pomegranate seed oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*. vol. **15**, no. 2. Apr. 2021.
22. AKIHISA, T.; FRANZBLAU, S. G.; UKIYA, M.; OKUDA, H.; ZHANG, F.; YASUKAWA, K.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Antitubercular Activity of Triterpenoids from Asteraceae Flowers. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. vol. **28**, no. 1. 2005.
23. UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; KOIKE, K.; NIKAI, T.; TAKIDO, M. Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible *Chrysanthemum* flower extract and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. **49**, no. 7. 2001.
24. AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*. vol. **43**, no. 6. 1996.

25. WANG, Y.; XU, Z.; HUANG, Y.; WEN, X.; WU, Y.; ZHAO, Y.; NI, Y. Extraction, Purification, and Hydrolysis Behavior of Apigenin-7-O-Glucoside from Chrysanthemum Morifolium Tea. *Molecules*. vol. **23**, no. 11. 2018.
26. ZHAO, F.; ZHANG, Q.; YAN, Y.; JIA, H.; ZHAO, X.; LI, X.; ZHENG, L.; HAN, G. Antioxidant constituents of chrysanthemum “jinsidaju” cultivated in Kaifeng. *Fitoterapia*. vol. **134**, no. December 2018. 2019.
27. YANG, Y.; SUN, X.; LIU, J.; KANG, L.; CHEN, S.; MA, B.; GUO, B. Quantitative and qualitative analysis of flavonoids and phenolic acids in snow chrysanthemum (*Coreopsis tinctoria* Nutt.) by HPLC-DAD and UPLC-ESI-QTOF-MS. *Molecules*. vol. **21**, no. 10. 2016.
28. LAI, J. P.; LIM, Y. H.; SU, J.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. vol. **848**, no. 2. 2007.
29. ZANJANI, M. K.; NOURELFATH, M.; AIT-KADI, D. A multi-stage stochastic programming approach for production planning with uncertainty in the quality of raw materials and demand. *International Journal of Production Research*. vol. **48**, no. 16. 2010.
30. BRASIL, M. da S. Resolução RDC 17. *Diário Oficial da União*. 2010.
31. FARIA, A. F.; PINTO, A. C. de A.; RIBEIRO, M. N.; CARDOSO, T. S.; RIBEIRO, J. P. C. Processo de desenvolvimento de novos produtos: uma experiência didática. *XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção*. 2008.
32. KANNATHASAN, K.; SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V.; CHANDRASEKARAN, M. Larvicidal activity of fatty acid methyl esters of Vitex species against Culex quinquefasciatus. *Parasitology Research*. vol. **103**, no. 4. Sep. 2008.
33. KUPPUSAMY, C.; MURUGAN, K.; ARUL, N.; YASODHA, P. Larvicidal and insect growth regulator effect of  $\alpha$ -amyrin acetate from Catharanthus roseus Linn against the malaria vector Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae). *Entomological Research*. vol. **39**, no. 1. 2009.

## Capítulo 3 - Métodos analíticos para investigar compostos larvicidas em extratos de resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitam.

### Resumo Gráfico



### 3.2. Resumo

Flores de *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitam. são cultivadas no Brasil para comercialização, no processo agroindustrial são gerados um volume significativo de resíduos contendo partes da espécie sem valor comercial (flores, folhas e caules). Esses resíduos podem ser usados para produção de larvicidas naturais. Com isso, para confirmar a hipótese, vinte e sete extratos de diclorometano foram gerados a partir de resíduos agrícolas de *Dendranthema x grandiflorum*. Todos foram analisados por GC-MS e FT-ICR MS com duas fontes de ionização diferentes APCI (+) e ESI (-). Os espectros e cromatogramas foram convertidos em matrizes e usados como entrada para análises de PCA. Simultaneamente, os extratos nas concentrações de 5 e 15 ppm foram submetidos a ensaios larvicidas em larvas de *Aedes aegypti*, vetor das doenças da dengue, chikungunya e zika. Alta atividade larvicida (mortalidade larvicida  $\geq 80\%$ ) foi encontrada para 14 amostras, atividade larvicida média ( $80\% < \text{mortalidade larvicida} \leq 40\%$ ) para 4 amostras e baixa atividade larvicida (mortalidade larvicida  $< 40\%$ ) para 9 amostras. O gráfico PCA para cromatogramas GC-MS

forneceu três grupos (GC1, GC2 e GC3). O Grupo GC2 incluiu nove das amostras altamente ativas e o Grupo GC3 incluiu sete das menos ativas. A PCA para os dados ESI (-) FT-ICR MS não se observa segregação de grupos como a que ocorreu no modelo construído com dados de CG-MS. Porém, ao avaliar a disposição das amostras no gráfico em relação ao eixo do PC1, a maioria das amostras com maior atividade larvicida se localizaram na região negativa em relação a PC1. Os dados APCI (+) FT-ICR MS, no entanto, não discriminaram os grupos por atividade biológica. Esses dados mostram os triterpenos e os ácidos graxos como as classes de substâncias naturais que mais contribuíram para a discriminação das amostras. As amostras altamente ativas tinham uma razão ácido graxo/triterpeno entre 1 e 4 (a maioria) ou tinham uma alta concentração de triterpenos. Os dados sugerem que os triterpenos são as moléculas larvicidas da planta e que os ácidos graxos atuam como agentes sinérgicos.

### 3.3. Introdução

Inúmeras espécies de plantas são dotadas de propriedades inseticidas, antifúngicas e antimicrobianas devido à sua composição química. Na verdade, esses metabólitos secundários favorecem a adaptação dessas espécies ao seu habitat. Por isso, os pesquisadores buscam moléculas com atividade biológica no reino vegetal. Rahuman *et al.* (2008), por exemplo, identificou triterpenos tetracíclicos de *Ficus racemosa* (Moraceae), que eram tóxicos para larvas *Aedes aegypti* em LC<sub>50</sub> 14,55 e LC<sub>90</sub> 64,99 ppm <sup>1</sup>. Em relação às espécies *Dendranthema x grandiflorum* (sin. *Chrysanthemum morifolium*), Takahashi *et al.* (2020) mostraram importantes propriedades biológicas (antimicrobiana, antioxidante, inseticida e larvicida) relacionadas à presença de flavonóides, alcaloides, compostos fenólicos, triterpenos e polissacarídeos <sup>2</sup>.

Em trabalho anterior, mostramos que uma mistura de extratos, na concentração de 15 ppm, produzidos a partir de resíduos comerciais de *Dendranthema x grandiflorum* deu origem a um produto que matou todas as larvas *Aedes aegypti* do quarto estágio. No entanto, os componentes químicos com propriedades larvicidas não foram determinados por fracionamento guiado seguido de ensaio larvicida, por ser um processo demorado <sup>3</sup>.

Alvarez-Zapata *et al.* (2015), usou Análise de Componentes Principais (PCA) e Projeções Ortogonais à Estrutura Latente (O-PLS) para detectar compostos biologicamente ativos em extratos e frações de plantas fitoquímicas desconhecidas. Para isso, combinaram perfis cromatográficos de HPLC com dados de ensaios leishmanicidas <sup>4</sup>. Drevinskas *et al.* (2018) estudaram plantas antivirais e descobriram que os compostos fenólicos fornecem alta atividade de eliminação de radicais e as frações contendo alto teor de compostos fenólicos foram positivamente relacionados à atividade antiviral em extratos de plantas. As análises fitoquímicas, testes antivirais e métodos quimiométricos foram utilizados de forma combinada para chegar a essa conclusão <sup>5</sup>. A atividade antiinflamatória de amostras sazonalmente diferentes de *Rhizoma coptidis* foi comparada aos perfis cromatográficos de HPLC de seus extratos usando métodos quimiométricos. O conteúdo de alcaloides foi positivamente correlacionado com a atividade biológica quando aplicadas as técnicas de coeficiente de correlação e classificação Spearman, análise de agrupamento hierárquico (HCA) e análise de componente principal <sup>6</sup>.

Uma variedade de técnicas pode ser usada para obter o perfil químico de extratos de plantas. As melhores escolhas são aquelas que ligam a separação cromatográfica à determinação espectroscópica. As técnicas comumente usadas são: Espectrometria de massa (MS) para determinação estrutural; e cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida (LC) para a separação dos compostos <sup>7</sup>. No entanto, nem sempre é trivial escolher uma técnica de análise fitoquímica para perfis químicos em combinação com análises quimiométricas ou ensaio biológico para identificar classes de substâncias ativas. Isto é especialmente verdadeiro quando a natureza química das substâncias ativas é desconhecida. Nesse caso, é útil diversificar as técnicas. Os compostos voláteis são frequentemente analisados por GC-MS e os compostos não voláteis por LC-MS. No entanto, algumas variáveis, como tipo de detector, tipo de coluna cromatográfica e programação de execução cromatográfica, requerem diversificação de técnicas e dependem do tipo de composto analisado. Compostos fenólicos e alcaloides, dentre as classes de substâncias não voláteis, podem ser analisados por ESI (-) LC-MS e ESI (+) LC-MS, respectivamente. Os terpenos neutros não voláteis, por outro lado, precisam de um método de ionização diferente, como APCI (+) LC-MS. Os ácidos graxos podem ser analisados por ESI (-) LC-MS ou derivatizados para análise por GC-MS <sup>8, 9</sup>. Portanto, o objetivo principal do presente

trabalho é usar três diferentes técnicas analíticas, incluindo espectrometria de massas ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS e a cromatografia gasosa GC-MS, para obter perfis químicos dos 27 extratos de diclorometano e correlacioná-los com os resultados larvicidas *Aedes aegypti* para encontrar possíveis moléculas ativas.

### **3.4. Materiais e métodos**

*Coleta do Material vegetal* - A amostragem dos 27 resíduos de *Dendranthema grandiflorum* foi descrita com detalhes no Capítulo 2 – Tópico 2.5 - página 69. Os dados da coleta das amostras de resíduos e suas características estão na Tabela 2.S.1(pag. 123).

*Preparação dos Extratos de Diclorometano* -. As metodologias de maceração/percolação de todos os 27 extratos de diclorometano são detalhadas no Capítulo 2 – Tópico 2.5.1 – pag 70.

As metodologias analíticas adotadas para a caracterização química dos extratos foram cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC-MS) e espectrometria de massa de alta resolução com duas fontes de ionização diferentes (ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS) <sup>3</sup>.

#### **3.4.1. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS)**

##### **3.4.1.1. Programação de análise cromatográfica para extratos de diclorometano**

Vinte e sete extratos de diclorometano (FA) foram analisados por GC-MS em um equipamento da Agilent 19091S-433 IU, coluna HP-5MS Ultra Inert (30 m x 250 µm x 0,25 µm) e os compostos separados foram ionizados sob impacto de elétrons (70 eV). A temperatura inicial do forno foi fixada em 40 °C e mantida por 1 min. Depois disso, a temperatura foi elevada para 240 °C a uma taxa de 5 °C.min<sup>-1</sup> e novamente aumentada para 310 °C a 30 °C.min<sup>-1</sup>. Uma isotérmica por 20 min foi realizada nesta temperatura final. O tempo total de análise foi de 63 min. As temperaturas do injetor e da linha de transferência MS foram mantidas a 290 °C e 310 °C, respectivamente. O hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo constante de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As amostras foram diluídas em diclorometano (10 mg.mL<sup>-1</sup>) antes da injeção, e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor em modo split 1:10. Uma série de *n*-alcanos foi analisada nas mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção das

substâncias. Os espectros de massa dos compostos separados foram comparados com o *NIST Mass Spectral Database* e com dados da literatura.

#### **3.4.1.2. Programação de análise cromatográfica para triterpenos**

Para determinar e confirmar os triterpenos previamente observados nos 27 extratos de *Dendranthema x grandiflorum*, uma metodologia específica foi desenvolvida. Os extratos foram analisados por GC-MS em um Agilent 19091S-433 IU equipado com uma coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). A temperatura inicial da coluna foi fixada em 180 °C, aumentada para 310 °C a 5 °C.min<sup>-1</sup> e mantida por 20 min. O tempo total de análise foi de 46 min. O gás de arraste foi o hélio a uma taxa de fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e da linha de transferência MS foram estabelecidas em 290 °C e 310 °C, respectivamente. O MS foi operado no modo de ionização por impacto eletrônico (70 eV). Um volume de 1,0  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas em diclorometano (10 mg.mL<sup>-1</sup>) foi injetado em modo split (1:5). Alguns triterpenos, caracterizados pelo Laboratório de Farmacognosia - Universidade Federal do Espírito Santo, foram utilizados como padrões e uma série de *n*-alcanos foi analisada nas mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção das substâncias presentes nas amostras e nos padrões.

#### **3.4.2. Análises de espectrometria de massas de ressonância ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR)**

Vinte e sete extratos (FA) foram analisados com um espectrômetro FT-ICR MS (9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em duas fontes de ionização diferentes, APCI e ESI. As amostras (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foram solubilizadas em acetonitrila:água (1:1), infundidas na fonte de eletrospray (ESI) a uma taxa de 5  $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$  e operadas no modo negativo. Alternativamente, as amostras foram solubilizadas em tolueno, infundidas na fonte de Ionização Química de Pressão Atmosférica (APCI) e operadas em modo positivo para ionização de moléculas em uma faixa de massa entre *m/z* 150 e 1500. As condições da fonte ESI foram as seguintes: i) nebulizador GCs pressão 0,5-1,0 bar; ii) tensão capilar: 3,0–3,5 kV; iii) temperatura capilar: 250 °C. Os parâmetros para APCI foram os seguintes: i) tensão capilar: 2100 V; ii) deslocamento da placa final: -500 V; iii) temperatura e vazão do gás de secagem: 180 °C e 4,0 mL.min<sup>-1</sup>; iv) pressão e temperatura do gás nebulizador: 1,0 bar e 350 °C; v) skimmer: 25,0 V; vi) tensão de colisão: -2,0 V; vii) descarga corona:

4000 nA; e viii) TOF: 0,750 s. O grau de insaturação de cada molécula foi determinado por seu valor DBE (*Double Bond Equivalent*) da equação  $DBE = C - H/2 + N/2 + 1$ , onde C, H e N são os números de átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, respectivamente. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o pacote de software *Compass Data Analysis* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

### 3.4.3. Ensaio larvicida em *Aedes aegypti*

A metodologia de teste da atividade larvicida foi adaptada da Organização Mundial da Saúde (BRASIL 2010). Ovos de *Aedes aegypti* foram obtidos no Instituto de Biologia do Exército (IBEX), Rio de Janeiro. Eles foram mantidos em uma bandeja contendo água potável sem cloro em condições ideais ( $28 \pm 1$ ) °C. Após 48 horas de incubação, as larvas eclodidas foram utilizadas quando atingiram o 4º estágio de crescimento.

Os testes larvicidas no *Aedes aegypti* foram realizados com todos os 27 extratos de diclorometano. Para todos os extratos, as amostras foram solubilizadas em acetona (100 µL) para obter concentrações de 15 mg.L<sup>-1</sup> (LC<sub>99</sub>) e 5 mg.L<sup>-1</sup> (LC<sub>50</sub>) (15 ppm e 5 ppm), respectivamente, as quais foram adicionadas a recipientes de teste contendo 15 mL de água, de acordo com estudos anteriores de Spindola *et al.* (2016). Para o controle do solvente, foi adicionado o mesmo volume de acetona. As soluções foram misturadas com um bastão de vidro por 30 minutos, seguido da adição de 4,9 mL de água contendo 5 larvas de quarto estágio. Para o controle sem tratamento (água potável sem cloro), foram adicionados 15 mL de água no recipiente de teste e 5,0 mL de água contendo as 5 larvas de mosquito. Para o controle positivo, utilizou-se Temefos na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup>. O temefos é um larvicida organofosforado usado para tratar água infestada por insetos transmissores de doenças, incluindo mosquitos, mosquitos e larvas de mosca negra<sup>10</sup>. Os testes foram realizados em cinco repetições. Após 24 horas, o número de larvas vivas e mortas foi observado e registrado.

Os valores de mortalidade percentual por atividade larvicida, como critério para classificar as amostras em alta, média e baixa atividade, foram adotados por nosso grupo, conforme segue: mortalidade larval  $\geq 80\%$  (alta atividade),  $79\% >$  mortalidade larval  $\geq 40\%$  (atividade média) e mortalidade larval  $< 39\%$  (atividade baixa).

#### 3.4.4. Análise de Componente Principal – PCA

O tratamento quimiométrico dos dados foi realizado por análise de componentes principais (PCA) usando os cromatogramas GC-MS e os espectros de ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS das 27 amostras de *Dendranthema x grandiflorum*. O PCA foi aplicado para reter a maioria das informações dos dados CG-MS e FT-CR MS em alguns componentes e permitir a visualização de agrupamentos naturais por similaridade química. Em outras palavras, o uso de dados de PCA em dimensionalidade reduzida facilita a observação do agrupamento de amostras por similaridade por meio do gráfico de pontuação. Amostras estreitamente orientadas no espaço gráfico do PCA tendem a ter características semelhantes <sup>11, 12</sup>.

Neste trabalho, três modelos de PCA foram construídos a partir da análise de 27 amostras. O primeiro utilizou dados cromatográficos (variáveis 88314) pré-processados com variação normal padrão (SNV - Variável normal padrão) e centrado na média. O segundo usou dados de espectrometria de massa de APCI-MS (562167 variáveis) <sup>13</sup>. Ambos foram processados com o software MATLAB, versão 7.12. O terceiro modelo usou espectros ESI brutos, que foram processados usando a plataforma DropMS disponível em <http://www.dropms.online/>. As configurações adotadas estão disponíveis na Tabela 3.S.1 (pag 128 – Capítulo 5) <sup>14</sup>. A plataforma permite o processamento de espectros de espectrômetros de massa com altíssima resolução e precisão para uma abordagem focada em classes heteroatômicas, que são mais adequadas para comparações de grupos funcionais, bem como o grau de insaturação de espécies ionizadas. Dessa forma, as 27 amostras produziram 48 classes heteroatômicas distintas (O<sub>2</sub>, O<sub>4</sub>, O<sub>3</sub>S, entre outras). Todas essas classes foram utilizadas para resumir as colunas de uma matriz numérica X (27, 48) em relação a cada uma das amostras. Em geral, a matriz foi preenchida com o número de compostos atribuídos da mesma classe (coluna) em relação a cada amostra (linha). Quando necessário, o valor zero foi atribuído à ausência da turma na amostra. Os dados foram centrados na média e foram escolhidos 2 primeiros componentes principais (89% da variância explicada).

### 3.5. Resultados e discussão

#### 3.5.1. Ensaio larvicida em *Aedes aegypti*

Os dados de atividade larvicida para as larvas do mosquito *Aedes aegypti* utilizando extratos de *Dendranthema x grandiflorum* foram inéditos, não existem relatos na literatura que avaliam esta espécie quanto ao seu potencial larvicida. Um estudo prévio realizado pelo grupo de estudo em 2016, Spindola *et al.*<sup>15</sup>, demonstrou o potencial da espécie em uma única amostragem com testes na concentração de 15 ppm. Este trabalho possibilitou validar os resultados iniciais obtidos por Spindola *et al.*<sup>15</sup>, com um maior o número de amostragens e testes biológicos em concentrações de 15 ppm e 5 ppm, conforme resultados da Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Atividade larvicida para o *Aedes aegypti* dos 27 extratos de diclorometano nas concentrações de 15 ppm e 5 ppm.

| Amostra | % Mortalidade |       | Amostra | % Mortalidade |       |
|---------|---------------|-------|---------|---------------|-------|
|         | 15 ppm        | 5 ppm |         | 15 ppm        | 5 ppm |
| FA1     | 0             | 0     | FA15    | 100,0         | 96,6  |
| FA2     | 100,0         | 100,0 | FA16    | 96,6          | 73,3  |
| FA3     | 95,0          | 56,7  | FA17    | 43,0          | 0     |
| FA4     | 64,4          | 29,37 | FA18    | 10,4          | 0,5   |
| FA5     | 31,3          | 3,9   | FA19    | 70,0          | 5,5   |
| FA6     | 100,0         | 98,9  | FA20    | 17,2          | 0     |
| FA7     | 100,0         | 100,0 | FA21    | 0             | 0     |
| FA8     | 100,0         | 100,0 | FA22    | 0             | 0     |
| FA9     | 0             | 0     | FA23    | 100,0         | 87,8  |
| FA10    | 100,0         | 54,2  | FA24    | 84,4          | 7,8   |
| FA11    | 100,0         | 100,0 | FA25    | 65,5          | 1,1   |
| FA12    | 100,0         | 93,2  | FA26    | 31,1          | 0     |
| FA13    | 100,0         | 72,2  | FA27    | 5,5           | 0     |
| FA14    | 82,1          | 17,8  |         |               |       |

Avaliando estudos com atividade larvicida para *Aedes aegypti* relatados no Capítulo 1 – Tópico 1.4 – Tabela 1.3 – pag. 35, nos possibilita observar o quão valioso e promissor são os resultados obtidos nesta pesquisa. Como descrito na Tabela 1.3, os resultados de atividade larvicida para *Aedes aegypti* em extratos de outras espécies são em concentrações relativamente mais altas que 15 e 5 ppm. A exemplo, Massarani *et al.* (2019), avaliaram as espécies *Aloe perryi* e *Saussurea lappa* quanto atividades para as larvas *Aedes aegypti* e obteve CL<sub>100</sub> nas concentrações de 31 e 125 ppm respectivamente. Pineda-Cortel *et al.* (2019), avaliaram os extratos da espécie *Artocarpus blancoi* e obtiveram CL<sub>50</sub> na concentração de 80 ppm. Os

resultados analíticos para ambos estudos demonstraram que a atividade larvícida está relacionada a estruturas de triterpenos, esteroides e flavonóides<sup>16, 17</sup>.

Consultando dos dados da Tabela 3.1, nota-se que mais de 50% das amostras (14 amostras) de resíduos de *Dendranthema x grandiflorum* testadas apresentaram alta atividade larvícida (mortalidade larval  $\geq 80\%$ ), atividade larvícida média ( $80\% < \text{mortalidade larval} \leq 40\%$ ) para 4 amostras e baixa atividade larvícida (mortalidade larval  $< 40\%$ ) para 9 amostras. Nos testes com concentração de 5 ppm, houve um aumento no número de amostras classificadas como baixa atividade larvícida, no entanto 12 dos 27 extratos testados alcançaram de 50% a 100% de mortalidade das larvas, em uma concentração bastante promissora quando o objetivo é obter um produto larvícida<sup>18, 19</sup>.

No Capítulo 2 – tópico 2.6.3 – pag 82, uma mistura dos 27 extratos FA foi testada nas larvas de *Aedes aegypti* (15 ppm), obtendo-se resultados com 100% de mortalidade. Um estudo metabolômico inicial permitiu atribuir a atividade à presença de ésteres lipídicos nos extratos de *Dendranthema x grandiflorum*. Que após a saponificação/metilação da mistura, houve um aumento das estruturas de ácidos graxos, triterpenos e esteroides que são compostos conhecidos por sua atividade larvícida<sup>3, 15</sup>.

### **3.5.2. Análise de componente principal (PCA) para os dados de GC-MS**

Os cromatogramas obtidos na análise dos 27 extratos FA foram sobrepostos, conforme mostrado na Figura 3.S.1 (pag. 121). Embora as amostras tenham sido coletadas ao longo de 12 meses (Tabela 2.S.1 – pag 123), um perfil químico semelhante pode ser observado entre os extratos com apenas variação na intensidade do pico. Os compostos químicos presentes em todas as amostras de *Dendranthema x grandiflorum* estão listados na Tabela 3.2. Uma maior variedade de moléculas de origem terpênica pode ser observada.

**Tabela 3.2.** Perfil químico por GC-MS dos 27 extratos de FA de *Dendranthema x grandiflorum*.

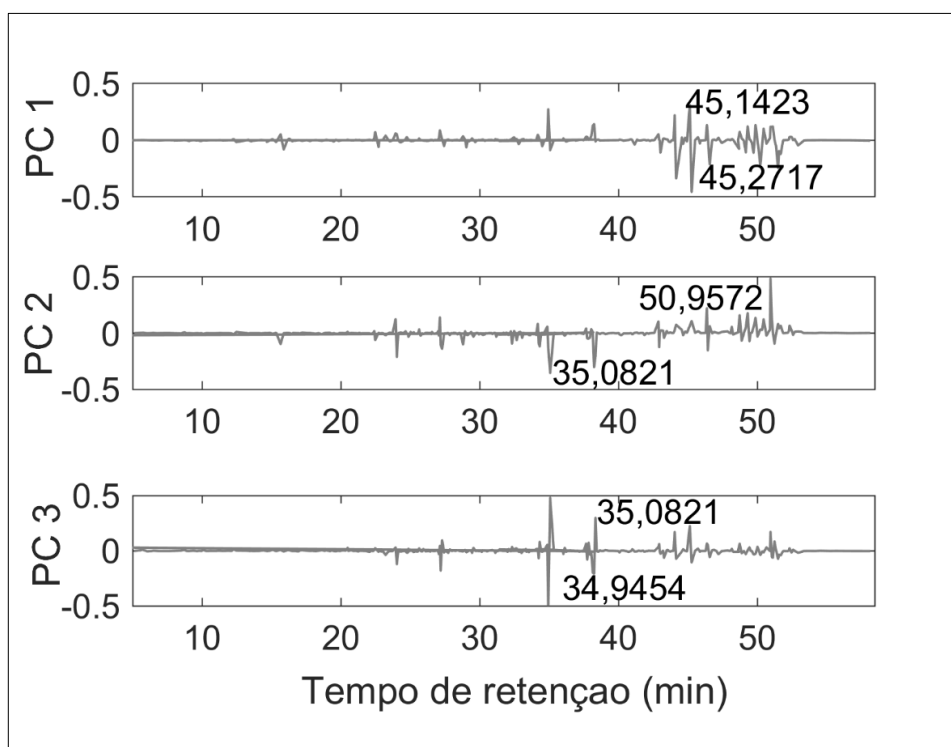
| Classe de compostos       | TR <sup>a</sup> | IK <sub>Calc</sub> <sup>b</sup> | IK <sub>Lit</sub> <sup>c</sup> | Compostos                     | FM <sup>d</sup>                                | Referência |
|---------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------------------------|------------|
| Monoterpenos              | 9,8407          | 945                             | 947                            | Canfeno                       | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 20–22      |
|                           | 10,6340         | 971                             | 974                            | β-pineno                      | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                | 20, 23     |
|                           | 11,1075         | 987                             | 975                            | Sabineno                      | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub>                | 20, 21     |
|                           | 12,1220         | 1020                            | 1023                           | m-Cimeno                      | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>                | 20         |
|                           | 12,2810         | 1033                            | 1031                           | Eucaliptol                    | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 23, 24     |
|                           | 15,0816         | 1113                            | 1123                           | Crisantenona                  | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O              | 22, 25     |
|                           | 15,3440         | 1129                            | 1133                           | cis-p-Menta-2,8-dien-1-ol     | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 20, 21     |
|                           | 15,6614         | 1140                            | 1141                           | (-) -Cânfora                  | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O              | 20–23      |
|                           | 16,4979         | 1169                            | 1165                           | Borneol                       | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 20–23      |
|                           | 16,9580         | 1185                            | 1195                           | α-Terpineol                   | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O              | 20–22      |
| Monoterpenos Oxigenados   | 18,1979         | 1228                            | 1233                           | trans-Acetato de Crisantenil  | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 20, 21     |
|                           | 18,1979         | 1268                            | 1263                           | cis-Acetato de Crisantenil    | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 20–22      |
|                           | 19,2770         | 1288                            | 1284                           | Acetato de Bornil             | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 20–23      |
|                           | 19,8710         | 1321                            | 1329                           | Acetato de Mirtênila          | C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 20         |
|                           | 20,7389         | 1348                            | 1350                           | α-Acetato de Terpinila        | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> | 20         |
| Sesquiterpenos            | 21,3465         | 1378                            | 1379                           | α-Copaeno                     | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 22         |
|                           | 22,1814         | 1383                            | 1388                           | β-Elemeno                     | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20–23      |
|                           | 22,4804         | 1389                            | 1388                           | β-Elemeno                     | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20–23      |
|                           | 23,2258         | 1418                            | 1416                           | Cariofileno                   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20–23      |
|                           | 23,9495         | 1447                            | 1436                           | Trans-α-Bergamoteno           | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 21         |
|                           | 24,2971         | 1461                            | 1469                           | α-Humuleno                    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 23, 26     |
|                           | 24,8399         | 1483                            | 1483                           | (E)-β-Farneseno               | C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>                | 26         |
|                           | 24,8762         | 1485                            | 1479                           | D-Germacreno                  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20         |
|                           | 24,9509         | 1487                            | 1496                           | (E,E)-α-Farneseno             | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20–22      |
|                           | 25,0310         | 1491                            | 1492                           | cis-Chrysanthenyl isovalerate | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> | 22         |
|                           | 25,2551         | 1495                            | 1502                           | (E,E)-α-Farneseno             | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20–22      |
|                           | 25,3453         | 1504                            | 1508                           | α-Farneseno                   | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 22         |
|                           | 25,5540         | 1514                            | 1511                           | β - Bisaboleno                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 22         |
|                           | 25,8714         | 1524                            | 1524                           | β-Sesquifelandreno            | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 20, 21     |
|                           | 25,9425         | 1530                            | 1527                           | δ-Cadineno                    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 22, 23     |
| Sesquiterpenos Oxigenados | 27,1448         | 1580                            | 1585                           | Espathulenol                  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O              | 20–22      |
|                           | 27,2998         | 1587                            | 1587                           | Óxido de Cariofileno          | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O              | 20, 21     |
|                           | 27,7451         | 1606                            | 1607                           | Epóxido de Humuleno I         | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O              | 22, 27     |
|                           | 29,0482         | 1665                            | 1661                           | α-Cadinol                     | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 22         |
| Aldeídos Graxos           | 30,1523         | 1717                            | 1711                           | Pentadecanal                  | C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O              | 22         |
|                           | 32,0991         | 1807                            | 1808                           | Hexadecanal                   | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O              | 22         |
| Ácidos Graxos             | 31,1404         | 1762                            | 1765                           | Ácido Mirístico               | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> | 22         |
|                           | 34,9454         | 1952                            | 1959                           | Ácido Palmítico               | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 15, 21, 22 |
|                           | 35,0821         | 1959                            | 1959                           | Ácido Palmítico               | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 15, 21, 22 |
|                           | 38,1527         | 2122                            | 2138                           | Ácido Linoleico               | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 15, 22     |
|                           | 38,5547         | 2147                            | 2148                           | Ácido Linolênico              | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> | 22         |
|                           | 38,6647         | 2153                            | 2158                           | Ácido Esteárico               | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> | 22, 28     |
|                           | 44,8694         | 2800                            | -                              | Esqualeno                     | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>                | 29         |
| n-alcanos                 | 44,0511         | 2680                            | -                              | n-alcano                      | NI <sup>f</sup>                                | 22         |
|                           | 44,1564         | 2699                            | -                              | n-alcano                      | NI <sup>f</sup>                                | 22         |
|                           | 44,6562         | 2790                            | -                              | n-alcano                      | NI <sup>f</sup>                                | 22         |
|                           | 45,1423         | 2874                            | -                              | n-alcano                      | NI <sup>f</sup>                                | 22         |
|                           | 45,2717         | 2896                            | -                              | n-alcano                      | NI <sup>f</sup>                                | 22         |
|                           | 45,7331         | 2974                            | -                              | n-alcano                      | NI <sup>f</sup>                                | 22         |

|              |         |      |      |                      |                                                |        |
|--------------|---------|------|------|----------------------|------------------------------------------------|--------|
|              | 45,8762 | 3000 | -    | <i>n</i> -alcano     | NI <sup>f</sup>                                | 22     |
|              | 46,4348 | 3075 | -    | <i>n</i> -alcano     | NI <sup>f</sup>                                | 22     |
|              | 46,5737 | 3094 | -    | <i>n</i> -alcano     | NI <sup>f</sup>                                | 22     |
| Esteróis     | 48,7348 | 3291 | 3286 | Estigmasterol        | C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O              | 15, 30 |
|              | 49,3074 | 3393 | 3360 | β-Sitosterol         | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub> | 15, 31 |
|              | 22,8660 | 3300 | 3300 | β-Amirina            | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O              | 15, 32 |
| Triterpenos* | 23,4070 | 3400 | 3400 | α-Amirina            | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O              | 15, 32 |
|              | 24,1080 | 3500 | 3500 | Acetato de β-Amirina | C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> | 15     |
|              | 24,4430 | 3500 | 3500 | NI <sup>f</sup>      | C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> | 15, 32 |
|              | 24,5860 | 3500 | 3500 | Acetato de α-Amirina | C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> | 15     |
|              |         |      |      |                      |                                                |        |

<sup>a</sup>TR – Tempo de Retenção; <sup>b</sup>IK<sub>Calc</sub> – Índice Kovats Calculado; <sup>c</sup>IK<sub>Lit</sub> - Kovats Literatura; <sup>d</sup>FM – Fórmula Molecular; <sup>f</sup>NI – Não Identificado, \*Os valores de TR listados para os triterpenos não podem ser comparados com os das outras classes, pois foram obtidos em diferentes programações cromatográficas e confirmados com o uso de padrões secundários.

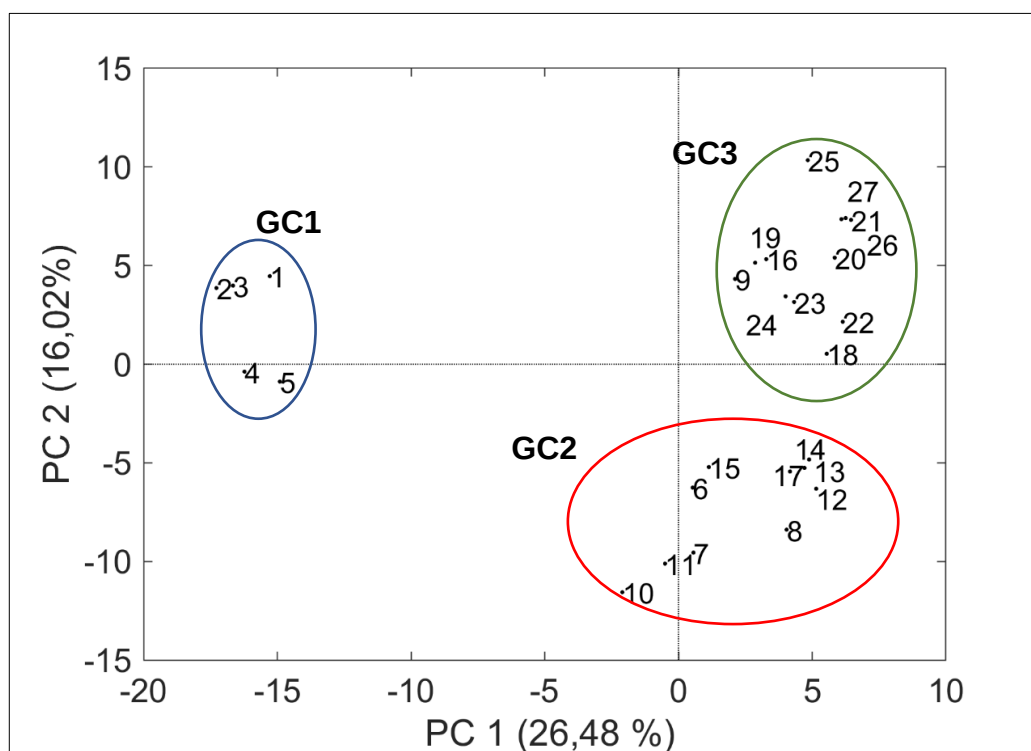
Conforme mostrado na Tabela 3.2, os extratos FA consistem em compostos das classes de monoterpenos, sesquiterpenos e suas respectivas classes oxigenadas, ácidos graxos, *n*-alcanos, esteróides e triterpenos<sup>15, 22, 23</sup>. O ácido palmítico (C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) foi observado em todas as amostras de resíduos de *Dendranthema x grandiflorum*, no entanto o tempo de retenção variou entre 34,9454 minutos e 35,0821 minutos, conforme detalhado na Tabela 3.3. Os Índices de Kovats (IK) calculados para os diferentes tempos de retenção foram comparados com os valores encontrados na literatura, auxiliando na identificação dos compostos presentes nas amostras de resíduos. Os triterpenos observados nos extratos, foram identificados e confirmados pela similaridade de seus IK com os respectivos padrões secundários, conforme Tabela 3.2, vale destacar que todos eles são amplamente encontrados na família Asteraceae<sup>33</sup>.

Para a construção do modelo quimiométrico (PCA) a partir dos dados de GC-MS, foram usadas três componentes principais (PC1, PC2 e PC3). A Figura 3.1, temos o gráfico de loadings, de forma que quanto maior o valor do sinal, maior a importância da variável naquela componente. As variáveis de maior contribuição para o modelo ocorreram após 30 minutos, na qual incluem regiões com predominância de ácidos graxos (35 a 45 min) e esteroides e triterpenos (48 a 52 min), conforme listado na Tabela 3.2. Na PC1, essas variáveis estão na região entre 44 e 52 min. Na PC2, eles estão em duas regiões, entre 35 a 40 min e 45 a 52 min. Na PC3, na região entre 34 e 40 min.



**Figura 3.1.** Gráfico de loadings dos extratos de diclorometano (FA) de *Dendranthema x grandiflorum* submetidos à análise cromatográfica GC-MS.

O gráfico Scores, Figura 3.2, mostra as duas componentes de maiores contribuições em termos de variância, PC1 (26,66%) e PC2 (15,98%). Três grupos foram formados, classificados como GC1, GC2 e GC3. Ao avaliar a Tabela 2.S.1, verifica-se que a segregação dos grupos ocorreu em relação à cronologia de amostragem, exceto para as amostras FA9 e FA17. Portanto, a sazonalidade parece ser um dos fatores que influencia nas características químicas dos extratos de *Dendranthema x grandiflorum* <sup>34</sup>. Também parece influenciar a atividade larvídica, determinada pelo grupo GC2, do qual todas as amostras apresentaram alta atividade. Embora as estações do ano no Brasil não sejam bem definidas, por se tratar de um país tropical, as amostras mais ativas tendem a se originar de resíduos obtidos em meses com temperaturas mais elevadas, como setembro, outubro, novembro, dezembro e janeiro.



**Figura 3.2.** Gráfico de Scores dos extratos de diclorometano (FA) de *Dendranthema x grandiflorum* submetidos à análise cromatográfica GC-MS.

A Tabela 3.3 correlaciona os resultados do gráfico de loadings (Figura 3.1) com os resultados do gráfico de escores (Figura 3.2), fornecendo uma visão sobre o efeito da variação na intensidade dos picos cromatográficos na formação dos grupos.

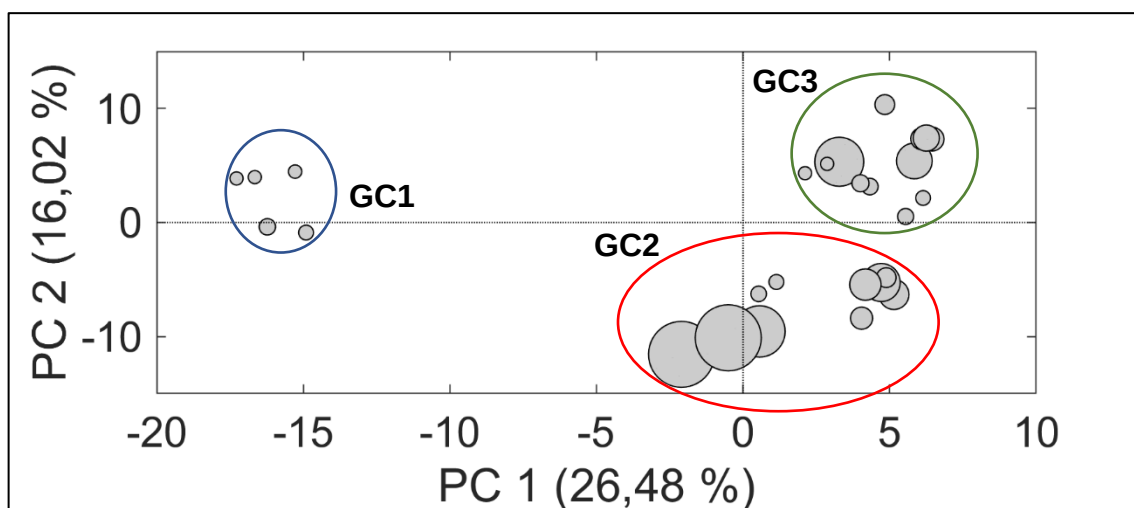
Por exemplo, as amostras do grupo GC1 (FA1, 2, 3, 4 e 5) estão localizadas na região negativa do eixo PC1 (Figura 3.2), sendo que a substância com maior influência na sua formação foi o *n*-alcano de TR = 45,2717 min, conforme mostrado na Figura 3.1. Ao avaliar as variáveis mais relevantes no eixo PC2 para a formação deste grupo, verifica-se que o composto TR = 50,9572 minutos, referente ao acetato de  $\beta$ -amirina ( $C_{32}H_{52}O_2$ ), apresentou contribuição positiva para as amostras FA1, FA2 e FA3. No entanto, as amostras FA4 e FA5, localizadas no eixo PC2 negativo, não foi detectado acetato de  $\beta$ -amirina, neste caso a presença do ácido palmítico ( $C_{16}H_{32}O_2$  - TR = 35,0821 min.), conforme demonstrado na Tabela 3.3, influenciou na localização dessas amostras na região negativa do eixo PC2.

**Tabela 3.3.** Concentração relativa (%) das variáveis mais relevantes para PC1 e PC2 - valores obtidos nas análises de GC-MS.

|     | TR (min) | GC1     |         | GC2     |         | GC3     |         |
|-----|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     |          | PC1 (-) | PC2 (+) | PC1 (+) | PC2 (-) | PC3(-)  | PC2 (+) |
|     |          | 45,2717 | 50,9572 | 45,1423 | 35,0821 | 34,9454 | 45,1423 |
|     |          |         | 50,9572 |         |         |         | 50,9572 |
| GC1 | FA1      | 7,82    | 4,00    | 0       | 0,24    | 0       | 4,00    |
|     | FA2      | 19,36   | 3,50    | 0       | 0       | 0       | 3,50    |
|     | FA3      | 15,56   | 3,55    | 0       | 0       | 0       | 3,55    |
|     | FA4      | 14,94   | 0       | 0       | 7,65    | 0       | 0       |
|     | FA5      | 8,43    | 0       | 0       | 3,72    | 0       | 0       |
| GC2 | FA6      | 0       | 0       | 7,58    | 5,51    | 0       | 0       |
|     | FA7      | 0       | 0       | 7,71    | 9,70    | 0       | 0       |
|     | FA8      | 0       | 0       | 6,37    |         | 9,48    | 0       |
|     | FA10     | 0       | 0       | 3,53    | 16,13   | 0       | 0       |
|     | FA11     | 0       | 0       | 6,24    | 13,37   | 0       | 0       |
|     | FA12     | 0       | 0       | 3,39    | 0       | 10,98   | 0       |
|     | FA13     | 0       | 0       | 4,96    | 0       | 17,18   | 0       |
|     | FA14     | 0       | 0       | 7,99    | 0       | 7,52    | 0       |
|     | FA15     | 0       | 0       | 2,40    | 0       | 3,70    | 0       |
|     | FA17     | 0       | 0       | 4,67    | 0       | 22,94   | 0       |
| GC3 | FA9      | 0       | 3,48    | 9,09    | 0       | 0       | 3,48    |
|     | FA16     | 0       | 13,60   | 9,66    | 7,55    | 0       | 13,60   |
|     | FA18     | 0       | 0       | 5,30    | 0       | 4,76    | 0       |
|     | FA19     | 0       | 3,24    | 4,46    | 0       | 0       | 3,24    |
|     | FA20     | 0       | 12,50   | 6,25    | 0       | 9,35    | 12,50   |
|     | FA21     | 0       | 8,42    | 13,41   | 0       | 6,72    | 8,42    |
|     | FA22     | 0       | 0       | 17,37   | 0       | 8,53    | 0       |
|     | FA23     | 0       | 2,27    | 4,91    | 0       | 7,36    | 2,27    |
|     | FA24     | 0       | 0       | 4,79    | 0       | 5,17    | 0       |
|     | FA25     | 0       | 14,92   | 6,40    | 0       | 3,38    | 14,92   |
|     | FA26     | 0       | 9,80    | 9,67    | 0       | 2,39    | 9,80    |
|     | FA27     | 0       | 10,23   | 7,39    | 0       | 3,00    | 10,23   |

Da mesma forma, todas as amostras do grupo GC2 são segregadas na região negativa em relação ao eixo PC2. Para justificar a formação do GC2, observou-se que o ácido palmítico foi o composto responsável pela contribuição negativa. Em alguns cromatogramas, essa substância foi detectada no tempo de retenção de 35,0821 min, enquanto em outros foi de 34,9454 min. O primeiro valor apresenta significativa importância na PC2, enquanto o segundo valor é importante na PC3, conforme gráfico de loadings (Figura 3.1). Portanto, todas as amostras do grupo GC2, apresentam o ácido palmítico em sua composição. Os espectros de massa para todos os picos, nestes tempos de retenção, apresentaram índices de similaridade próximos, comprovando a identidade da substância. A Figura 3.3 complementa a discussão sobre a contribuição do ácido palmítico na formação do grupo GC2. Cada amostra é representada por um círculo, que varia em tamanho de acordo com a abundância de ácido palmítico. De acordo com a figura, pode-se observar que os círculos maiores estão presentes nas amostras do grupo GC2. O composto correspondente ao tempo

de retenção de 45,1423 minutos (*n*-alcano, Tabela 3.2), conforme observado em todas as amostras deste grupo, foi o que contribuiu para o GC2 estar localizado no lado positivo do PC1. O mesmo pode ser observado para a formação do grupo GC3. A distinção entre os dois grupos (GC2 e GC3), entretanto, é a contribuição positiva do acetato de  $\beta$ -amirina em TR = 50,9572 minutos na PC2 para o grupo GC3.



**Figura 3.3.** Abundância de ácido palmítico para os 27 extratos de resíduos de *Dendranthema x grandiflorum*.

As amostras FA17 e FA9, atípicas quanto a sua localização nos grupos pela classificação cronológica de coleta. A primeira, não possui o acetato de  $\beta$ -amirina, mas apresentava ácido palmítico em alta concentração relativa (22,94%), por isso ficou segregada no grupo GC2. A segunda, por sua vez, localizada no grupo GC3 por não apresentar ácido palmítico e apresentar baixa concentração relativa de acetato de  $\beta$ -amirina.

Ao analisar os espectros de massa e os índices de similaridade espectral dos compostos com tempos de retenção de 45,1423 e 45,2717 min encontrados em todas as 27 amostras de *Dendranthema x grandiflorum* (Tabela 3.2), verificou-se a presença de *n*-alcanos. Esta classe de substância natural é amplamente encontrada na superfície das flores ou folhas, onde previnem a desidratação rápida das plantas <sup>35</sup>. Do que foi discutido acima, podemos concluir que as amostras foram agrupadas no gráfico de Scores - PCA com base na variação das concentrações de ácidos graxos, triterpenos e *n*-alcanos.

A Tabela 3.4 mostra a soma das concentrações relativas de ácidos graxos (ácido mirístico, ácido palmítico, ácido linolênico, ácido linoléico e ácido esteárico) e

triterpenos ( $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\alpha$ -amirina e um não identificado com TR = 24,443 min), bem como a relação entre esses valores. Isso porque essas classes foram as que mais contribuíram para a discriminação das amostras em grupos no gráfico da PCA.

**Tabela 3.4.** Soma das concentrações relativas de ácidos graxos e triterpenos presentes nos extratos de *Dendranthema x grandiflorum*.

| Grupos | Amostras | Soma ácidos graxos (%) | Soma triterpenos (%) | Soma <i>n</i> -alcanos (%) | Soma ácidos graxos (%) / Soma triterpenos (%) | Atividade Larvívica (15ppm) |
|--------|----------|------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|
| GC1    | FA1      | 0,93                   | 22,46                | 19,86                      | 0,04                                          | baixa                       |
|        | FA2      | 0,10                   | 20,44                | 44,85                      | 0,00                                          | alta                        |
|        | FA3      | 0,19                   | 24,72                | 35,89                      | 0,01                                          | alta                        |
|        | FA4      | 7,65                   | 20,52                | 13,91                      | 0,37                                          | média                       |
|        | FA5      | 4,25                   | 4,95                 | 20,04                      | 0,86                                          | baixa                       |
| GC2    | FA6      | 6,81                   | 6,48                 | 19,76                      | 1,05                                          | alta                        |
|        | FA7      | 10,58                  | 6,42                 | 18,53                      | 1,65                                          | alta                        |
|        | FA8      | 10,79                  | 6,96                 | 14,01                      | 1,55                                          | alta                        |
|        | FA10     | 16,69                  | 4,43                 | 8,75                       | 3,77                                          | alta                        |
|        | FA11     | 14,20                  | 6,35                 | 16,38                      | 2,24                                          | alta                        |
|        | FA12     | 5,62                   | 5,51                 | 8,38                       | 1,02                                          | alta                        |
|        | FA13     | 28,90                  | 7,06                 | 11,70                      | 4,09                                          | alta                        |
|        | FA14     | 8,86                   | 7,75                 | 18,14                      | 1,14                                          | alta                        |
|        | FA15     | 5,81                   | 3,41                 | 4,48                       | 1,70                                          | alta                        |
|        | FA17     | 35,22                  | 3,07                 | 10,10                      | 11,47                                         | média                       |
| GC3    | FA9      | 2,49                   | 1,77                 | 18,95                      | 1,41                                          | baixa                       |
|        | FA16     | 14,62                  | 11,50                | 21,61                      | 1,27                                          | alta                        |
|        | FA18     | 10,39                  | 18,48                | 9,65                       | 0,56                                          | baixa                       |
|        | FA19     | 2,95                   | 4,56                 | 11,64                      | 0,65                                          | média                       |
|        | FA20     | 11,96                  | 12,78                | 12,76                      | 0,94                                          | baixa                       |
|        | FA21     | 8,47                   | 11,02                | 22,95                      | 0,77                                          | baixa                       |
|        | FA22     | 8,96                   | 21,26                | 27,12                      | 0,42                                          | baixa                       |
|        | FA23     | 10,57                  | 2,17                 | 10,32                      | 4,87                                          | alta                        |
|        | FA24     | 7,18                   | 7,43                 | 9,40                       | 0,97                                          | alta                        |
|        | FA25     | 5,55                   | 14,63                | 11,82                      | 0,38                                          | média                       |
|        | FA27     | 5,01                   | 16,07                | 20,59                      | 0,31                                          | baixa                       |
|        | FA27     | 5,49                   | 13,22                | 15,68                      | 0,42                                          | baixa                       |

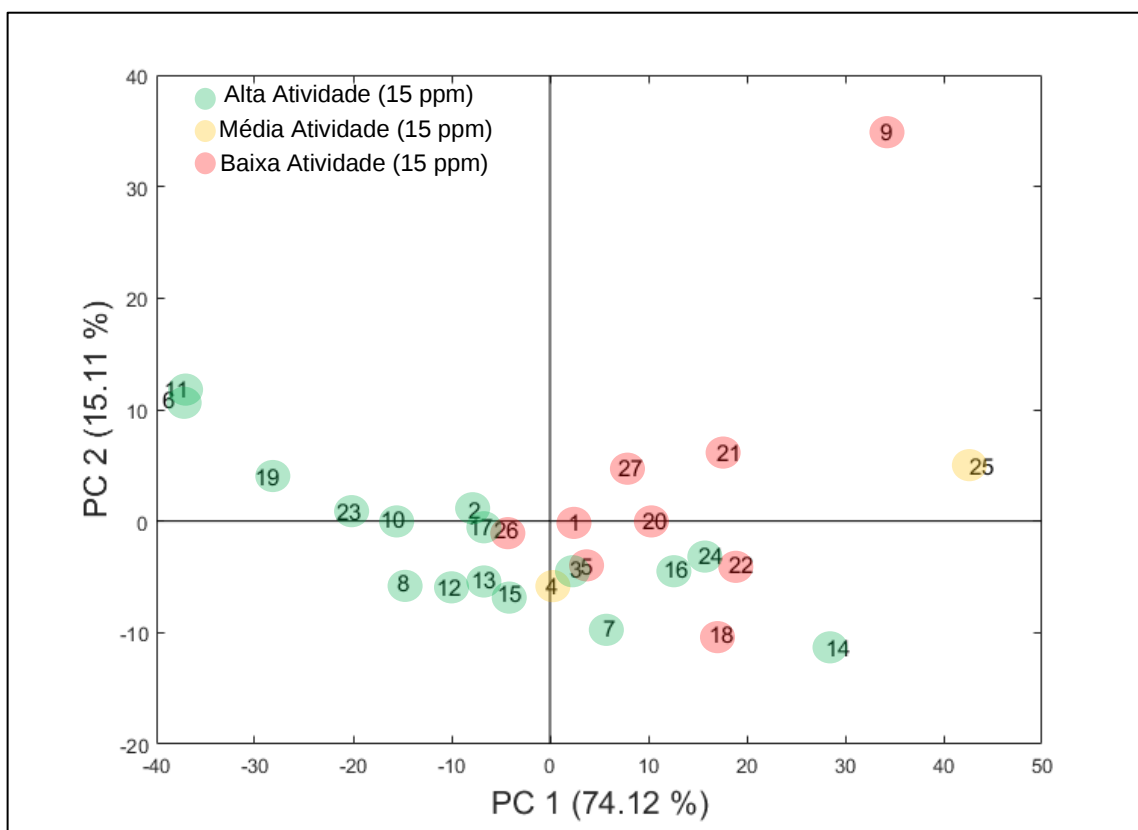
Correlacionando a atividade larvívica a 15 ppm (Tabela 3.1) com os dados da Tabela 3.4, pode-se observar que o grupo GC2, apresentou atividades acima de 80%, com exceção da amostra FA17, classificada com atividade larvívica média. Nos demais grupos, GC1 e GC3, foi observada uma mistura de baixa, média e alta atividade larvívica. As amostras altamente ativas apresentaram uma relação ácido graxo/triterpeno entre 1 e 4 (a maioria) ou uma alta concentração de triterpenos. Os dados sugerem, pelo menos parcialmente, que os triterpenos estão envolvidos na atividade larvívica da planta e que os ácidos graxos parecem agir como agentes

sinérgicos. Um estudo publicado por Thomas R. Corner (1981), sugere uma possível ação sinérgica dos ácidos graxos quando misturados com álcoois para a atividade antibacteriana sobre *Bacillus subtilis*. Segundo Corner, os agregados de álcool são dispersos pelas moléculas de ácidos graxos, favorecendo um melhor contato com as células. Neste artigo, também foi relatado que a eficiência no sinergismo depende das concentrações dos substratos utilizados<sup>36</sup>. Com as conclusões obtidas por Corner, é possível que exista uma relação de dependência entre as concentrações de ácidos graxos e triterpenos no contexto da atividade larvívora em nosso estudo.

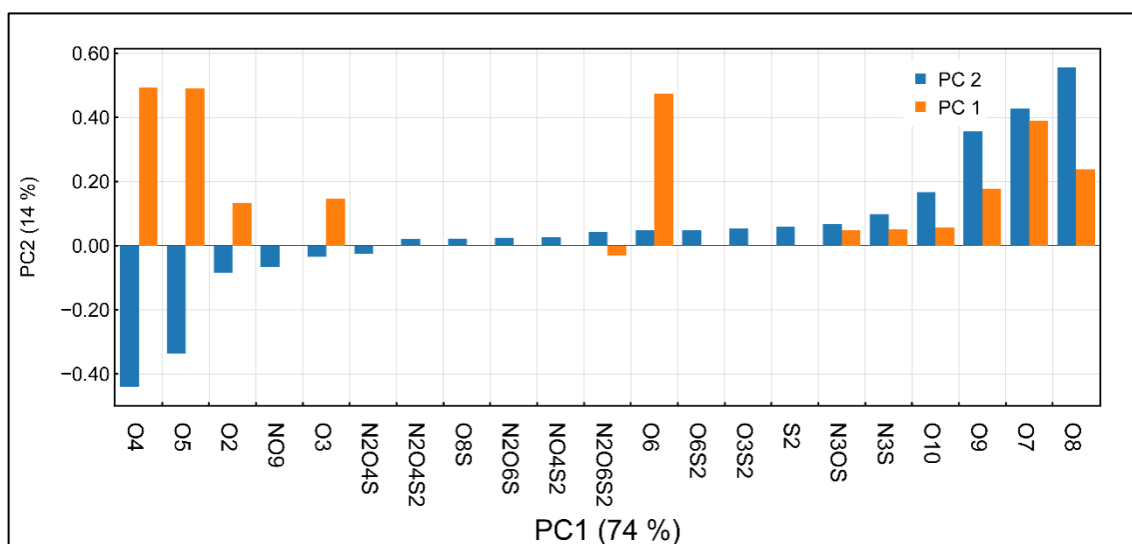
### **3.5.3. Análises de espectrometria de massas de ressonância ciclotron com transformada de Fourier (FT-ICR)**

Para complementar o estudo do perfil químico da espécie *Dendranthema x grandiflorum*, foi realizada a análise de espectrometria de massas para os 27 extratos de diclorometano. A técnica ESI (-) FT-ICR MS, adequada para a análise de biomoléculas ionizáveis ácidas, mostrou-se útil para confirmar a presença de ácidos graxos em todas as amostras. Os 27 espectros estão sobrepostos na Figura 3.S.2 (pag. 122), onde observa-se uma similaridade no perfil químico.

O gráfico de scores (Figura 3.4), obtido a partir de dados ESI (-) FT-ICR MS, mostra as duas componentes mais relevantes, PC1 (74,12%) e PC2 (15,11%), para o modelo quimiométrico - PCA. O gráfico de loadings (Figura 3.5) mostra as classes de substâncias que mais contribuíram para a formação do modelo.



**Figura 3.4.** Gráfico de Scores das análises ESI (-) FT-ICR MS para os extratos de *Dendranthema x grandiflorum*.



**Figura 3.5.** Gráfico de loadings das análises ESI (-) FT-ICR MS para os extratos de *Dendranthema x grandiflorum*.

De acordo com a Figura 3.4, não se observa segregação de grupos como a que ocorreu no modelo construído com dados de CG-MS. Porém, ao avaliar a disposição das amostras no gráfico em relação ao eixo do PC1, a maioria das amostras com maior atividade larvicida tende a se localizar na região negativa, enquanto as amostras

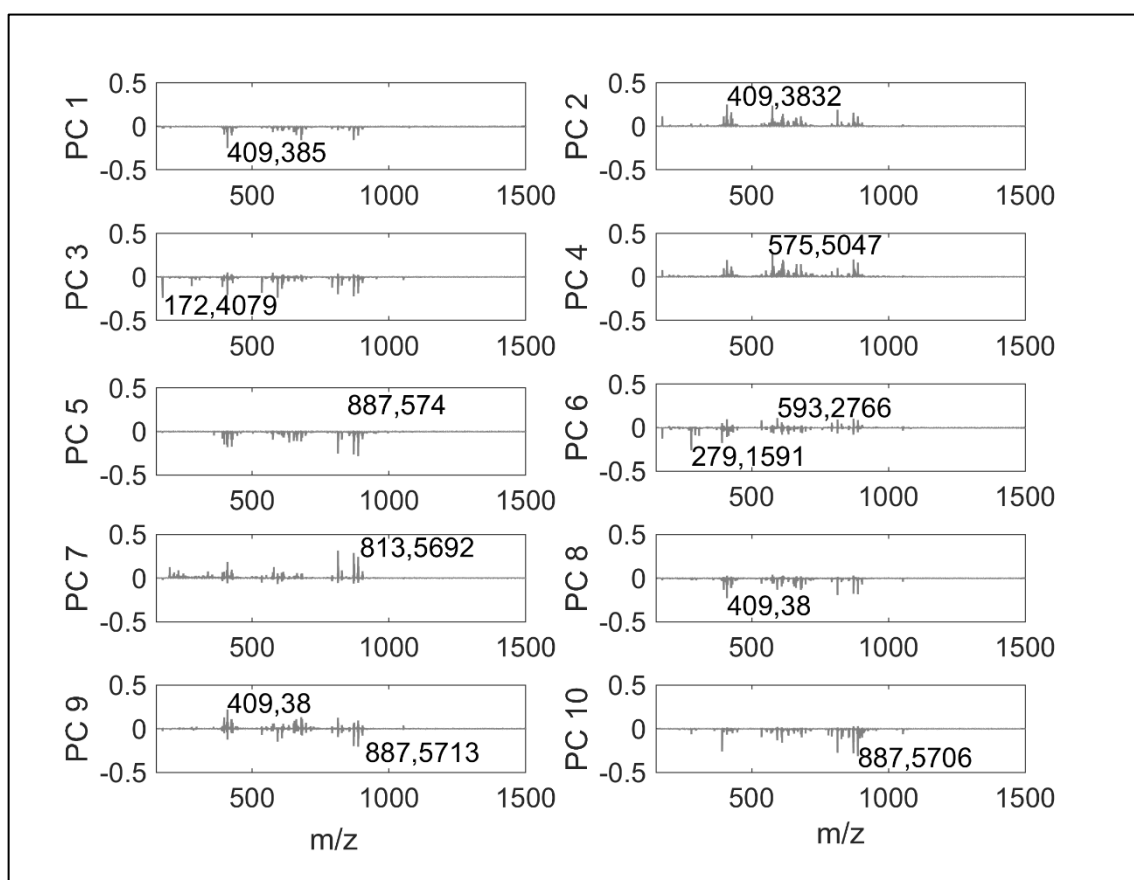
com baixa e média atividade se concentraram em a região positiva, ou seja, a PC1 concentra 74,12% das variáveis sendo o suficiente para explicar o modelo quanto a atividade larvicida. No gráfico de loadings, Figura 3.5, pode-se notar que as classes oxigenadas foram as mais assimiladas pela fonte ESI (-), nesta classe inclui as estruturas de O<sub>2</sub> referente as diferentes ácidos graxos e grupos de ácidos graxos (O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>6</sub>,...), das quais contribuíram para a formação do modelo quimiométrico<sup>14</sup>, conforme mostrado na Tabela 3.S.2 (pag. 128).

Portanto, o modelo quimiométrico (PCA) construído a partir de dados ESI (-) FT-ICR MS também mostrou que os ácidos graxos desempenharam um papel importante na classificação das amostras quanto à atividade larvicida. No entanto, essa técnica não forneceu informações sobre os triterpenos, uma vez que tais moléculas, quando possuem baixa capacidade de ionização, são detectadas apenas fracamente, ou não são detectadas no espectro de massa. Por esse motivo, as amostras foram analisadas por APCI (+) FT-ICR MS, que ioniza moléculas neutras. Na verdade, conforme mostrado na Tabela 3.S.2, muitos triterpenos e esteroides foram detectados, entre eles os ésteres de triterpenos, que são muito comuns nesta espécie de planta<sup>33, 37</sup>. No entanto, com seu alto peso molecular, eles não são voláteis o suficiente para serem analisados por GC-MS.

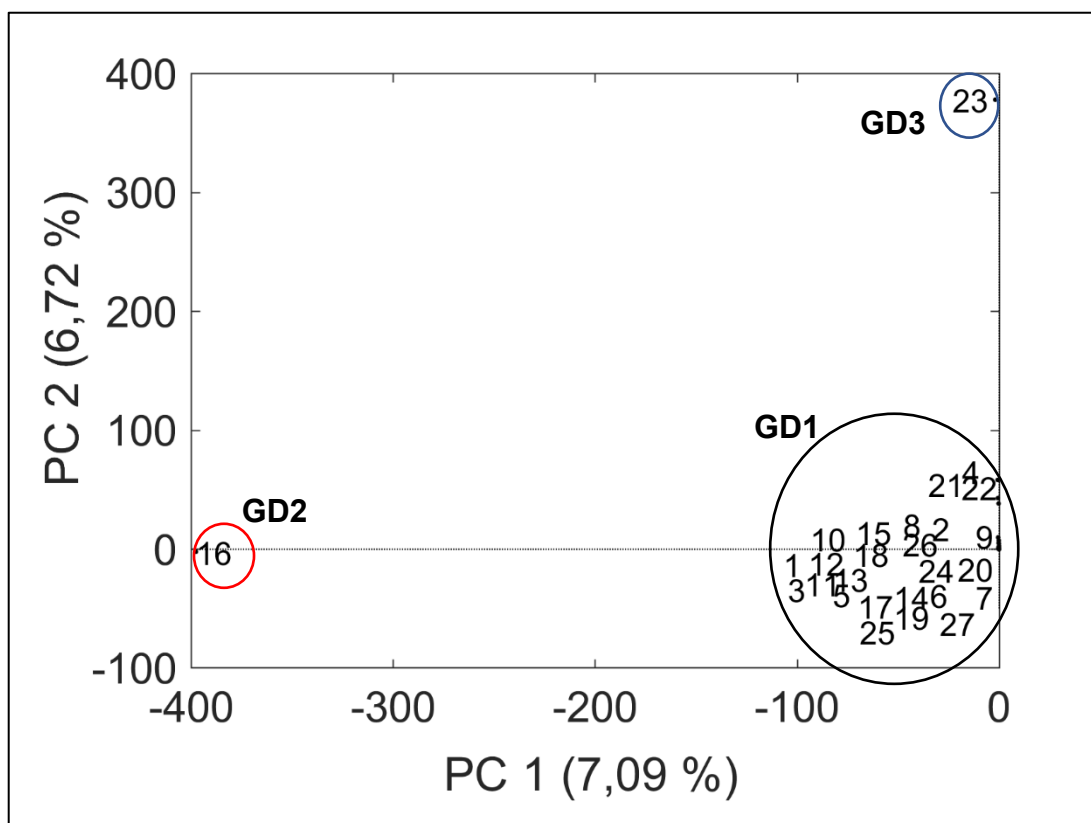
A Figura 3.S.3 (pag. 122) mostra a sobreposição dos 27 espectros obtidos nas análises APCI (+) FT-ICR MS. Observamos, como nas técnicas anteriores, um perfil químico semelhante para todas as amostras, com variação na intensidade do pico. Para a construção do modelo quimiométrico, foram utilizados 10 componentes principais, conforme gráfico de loadings (Figura 3.6). As variáveis que mais contribuíram para a construção do modelo estão na faixa *m/z* entre 400 a 900, região onde estão presentes triterpenos, ésteres de triterpenos, esteroides, triglicerídeos e outros lipídeos (Tabela 3.S.2)<sup>15, 37</sup>. O composto com *m/z* 409.385, referente ao esqualeno (C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>), apresentou contribuição para os componentes principais PC1, PC2, PC8 e PC9.

Embora tenha sido necessário usar 10 PC para a construção do modelo quimiométrico (Figura 3.7), os dois componentes mais relevantes em termos de variância estão representados, ou seja, PC1 (7,09%) e PC2 (6,72%). De acordo com o gráfico, podemos ver um grande grupo (GD1) contendo a maioria das amostras.

Então temos GD2 composto apenas pela amostra FA16 e GD3 composto apenas pela amostra FA23. A formação desses três grupos foi baseada principalmente na variação da intensidade do sinal mostrada no gráfico de loadings (Figura 3.6) para o composto em  $m/z$  593,27671 ( $C_{34}H_{41}O_9$ , relativo a  $[M-H]^+$ ). Para o grupo GD1, a intensidade do sinal sempre apresentou valores abaixo de 12%. Para o grupo GD2, esse valor subiu para 66% (amostra FA16) e 20% para o grupo GD3 (amostra FA23). Esse composto ainda não foi identificado em *D. grandiflorum*.



**Figura 3.6.** Gráfico de loadings das análises APCI (+) FT-ICR MS dos 27 extratos *Dendranthema x grandiflorum*.



**Figura 3.7.** Gráfico de Scores das análises APCI (+) FT-ICR MS dos 27 extratos *Dendranthema x grandiflorum*.

Portanto, o modelo quimiométrico utilizando a técnica APCI (+) FT-ICR MS não possibilitou explicar a problemática do estudo quanto a atividade larvica e composição química, quando comparado aos bons resultados obtidos com os modelos GC-MS e ESI (-) FT ICR MS.

Duas justificativas podem ser avaliadas para a obtenção deste perfil quimiométrico para os dados de APCI (+). A primeira delas é que cada pico no espectro de massa pode representar vários isômeros; na verdade, o íon  $m/z$  425, por exemplo, pode representar vários triterpenos isoméricos. Portanto, um processo cromatográfico prévio, como LC-MS (cromatografia líquida/espectrometria de massa), seria necessário para obter informações sobre a variância de moléculas específicas. Assim como, estudo realizado por Ryu *et al.* (2019), amostras de *Chrysanthemum morifolium* que foram submetidas a testes de hibridização para melhorar as características agronômicas. A análise fitoquímica das cultivares foi realizada por CG-MS, o que possibilitou verificar a presença de compostos voláteis pertencentes às classes dos hidrocarbonetos, terpenóides, álcoois e ésteres. Esses dados

cromatográficos foram utilizados para uma análise quimiométrica baseada em agrupamentos hierárquicos (HCA), que segmentou as amostras em 4 grupos distintos e revelou que os cultivares originais estavam intimamente agrupados com os híbridos. O mesmo grupo de pesquisa complementou o estudo com análises de LC-MS, por meio das quais verificaram maior quantidade de flavonóides, ácidos fenólicos, antocianinas e carotenoides em cultivares híbridas, quando comparados aos originais.

Uma segunda possível justificativa para este comportamento de disposição das amostras na PCA, seria a complexidade dos espectros quanto ao grande número de picos  $m/z$  próximos, por isso foi necessário 10 PC's para resolver o modelo. Uma maneira para reduzir o número de variáveis seria realizar um pré-processamento dos sinais, ao invés de trabalhar com as  $m/z$  para montar o modelo, o número de variáveis seria reduzido trabalhando-se com classes, assim como foi feito com os dados de ESI (-). Enquanto os dados de APCI (+) foram processados por  $m/z$  no software Matlab, os dados das análises ESI (-) foram resolvidos na plataforma DropMS segregando em classes mais assimiladas, reduzindo assim o número de variáveis. Infelizmente a plataforma DropMS ainda não consegue resolver os dados de APCI por falta de banco de dados<sup>14</sup>.

### **3.6. Conclusão**

Para diferentes amostragens de resíduos de crisântemo, os resultados deste trabalho mostram que resíduos da indústria da floricultura podem ser utilizados como matéria-prima para a obtenção de agentes larvicidas naturais presentes entre substâncias lipofílicas. Também foi demonstrado que as técnicas analíticas hifenadas, que separam os extratos em suas moléculas constituintes, quando analisadas em conjunto com métodos quimiométricos e ensaios biológicos, fornecem dados adicionais sobre moléculas biologicamente ativas, como demonstrado aqui com triterpenos e ácidos graxos.

### 3.7. Referencias

1. RAHUMAN, A. A.; VENKATESAN, P.; GEETHA, K.; GOPALAKRISHNAN, G.; BAGAVAN, A.; KAMARAJ, C. Mosquito larvicidal activity of gluanol acetate, a tetracyclic triterpenes derived from *Ficus racemosa* Linn. *Parasitology Research*. vol. **103**, no. 2. 2008.
2. TAKAHASHI, J. A.; REZENDE, F. A. G. G.; MOURA, M. A. F.; DOMINGUETE, L. C. B.; SANDE, D. Edible flowers: Bioactive profile and its potential to be used in food development. *Food Research International*. vol. **129**, no. April 2019. 2020.
3. LIMA, T. A.; MANHÃES, L. R.; HAYASHIDE, I.; GOMES, A. C. C.; LOVATTI, B. P.; SIMAS, N. K.; FILGUEIRAS, P. R.; KUSTER, R. M. Agro Residues of *Dendranthema x grandiflorum* as Raw Material for a Potential Larvicidal Product. *Waste and Biomass Valorization*. Mar. 2020.
4. ALVAREZ-ZAPATA, R.; SÁNCHEZ-MEDINA, A.; CHAN-BACAB, M.; GARCÍA-SOSA, K.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, R. V.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants. *Journal of Chromatography A*. vol. **1422**. 2015.
5. DREVINSKAS, T.; MICKIENE, R.; MARUŠKA, A.; STANKEVIČIUS, M.; TISO, N.; ŠALOMSKAS, A.; LELEŠIUS, R.; KARPOVAITE, A.; RAGAŽINSKIENE, O. Confirmation of the antiviral properties of medicinal plants via chemical analysis, machine learning methods and antiviral tests: A methodological approach. *Analytical Methods*. vol. **10**, no. 16. 2018.
6. LI, J. Y.; WANG, X. B.; LUO, J. G.; KONG, L. Y. Seasonal variation of alkaloid contents and anti-inflammatory activity of rhizoma coptidis based on fingerprints combined with chemometrics methods. *Journal of Chromatographic Science*. vol. **53**, no. 7. 2015.
7. BANSAL, A.; CHHABRA, V.; RAWAL, R. K.; SHARMA, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. vol. **4**, no. 4. 2014.
8. LAI, J. P.; LIM, Y. H.; SU, J.; SHEN, H. M.; ONG, C. N. Identification and

characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. vol. **848**, no. 2. 2007.

9. RHOURLI-FRIH, B.; CHAIMBAULT, P.; CLAUDE, B.; LAMY, C.; ANDRÉ, P.; LAFOSSE, M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. *Journal of Mass Spectrometry*. vol. **44**, no. 1. 2009.

10. PINHEIRO, V. C. S.; PEDROTADEI, W. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública*. vol. **18**, no. 6. 2002.

11. BRERETON, R. G. Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. University of Bristol, UK, 2003.

12. BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. *Analytical Methods*. vol. **6**, no. 9. 2014.

13. FEARN, T.; RICCIOLI, C.; GARRIDO-VARO, A.; GUERRERO-GINEL, J. E. On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. vol. **96**. 2009.

14. ROSA, T. R.; FOLLI, G. S.; PACHECO, W. L. S.; CASTRO, M. P.; ROMÃO, W.; FILGUEIRAS, P. R. DropMS: Petroleomics Data Treatment Based in Web Server for High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. vol. **31**, no. 7. Jul. 2020.

15. SPINDOLA, K. C. V. W.; SIMAS, N. K.; DOS SANTOS, C. E.; DA SILVA, A. G.; ROMÃO, W.; VANINI, G.; DA SILVA, S. R. C.; BORGES, G. R.; DE SOUZA, F. G.; KUSTER, R. M. *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. vol. **26**, no. 3. 2016.

16. AL-MASSARANI, S.; EL-SHAIBANY, A.; TABANCA, N.; ALI, A.; ESTEP, A. S.; BECNEL, J. J.; GOGER, F.; DEMIRCI, B.; EL-GAMAL, A.; BASER, K. H. C. Assessment of selected Saudi and Yemeni plants for mosquitocidal activities against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Saudi Pharmaceutical Journal*. no. xxxx.

2019.

17. PINEDA-CORTEZ, M. R. B.; CABANTOG, R. J. R.; CAASI, P. M.; CHING, C. A. D.; PEREZ, J. B. S.; GODISAN, P. G. M.; LATORRE, C. M. G.; LUCERO, D. R.; SALONGA, R. B. Larvicidal and ovicidal activities of *Artocarpus blancoi* extracts against *Aedes aegypti*. *Pharmaceutical Biology*. vol. **57**, no. 1. 2019.
18. FARIA, A. F.; PINTO, A. C. de A.; RIBEIRO, M. N.; CARDOSO, T. S.; RIBEIRO, J. P. C. Processo de desenvolvimento de novos produtos: uma experiência didática. *XXVIII Encontro Nacional de Engenharia de Produção*. 2008.
19. ZANJANI, M. K.; NOURELFATH, M.; AIT-KADI, D. A multi-stage stochastic programming approach for production planning with uncertainty in the quality of raw materials and demand. *International Journal of Production Research*. vol. **48**, no. 16. 2010.
20. SHUNYING, Z.; YANG, Y.; HUAIDONG, Y.; YUE, Y.; GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology*. vol. **96**. 2005.
21. LAWAL, O. A.; OGUNWANDE, I. A.; OLORUNLOBA, O. F.; OPOKU, A. R. The essential oils of *Chrysanthemum morifolium* Ramat . from Nigeria. vol. **2**, no. 1. 2014.
22. WESOLOWSKA, A.; GRZESZCZUK, M.; KULPA, D. GC-MS Analysis of the Essential Oil from Flowers of *Chrysanthemum coronarium* L. Propagated Conventionally and Derived from In Vitro Cultures. *Acta Chromatographica*. vol. **27**, no. 3. 2015.
23. XUE, H.; JIANG, Y.; ZHAO, H.; KÖLLNER, T. G.; CHEN, S.; CHEN, F.; CHEN, F. Characterization of composition and antifungal properties of leaf secondary metabolites from thirteen cultivars of *chrysanthemum morifolium ramat*. *Molecules*. vol. **24**, no. 23. 2019.
24. ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and Flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. **54**, no. 12. Jun. 2006.
25. ESMAEILI, A.; NEMATOLLAHI, F.; RUSTAIYAN, A.; MOAZAMI, N.; MASOUDI,

- S.; BAMASIAN, S. Volatile constituents of *Achillea pachycephala*, *A. oxyodonta* and *A. biebersteinii* from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*. vol. **21**, no. 2. Mar. 2006.
26. CHANG, K. M.; KIM, G. H. Volatile aroma constituents of gukhwa (*Chrysanthemum morifolium* R.). *Food Science and Biotechnology*. vol. **22**, no. 3. 2013.
27. SHRESTHA, S.; SATYAL, P.; PANDIT, G.; SETZER, W. N. C Chemical composition of the essential oil from the aerial parts of *Chrysanthemum cinerariifolium* growing in Nepal. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*. vol. **2**, no. 22. 2014.
28. REZAZADEH, S.; HAMEDANI, M. P.; DOWLATABADI, R.; YAZDANI, D.; SHAFIEE, A. Chemical composition of the essential oils of *Stachys schtschegleevii* Sosn. and *Stachys balansae* Boiss & Kotschy from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*. vol. **21**, no. 2. Mar. 2006.
29. RYU, J.; NAM, B.; KIM, B. R.; KIM, S. H.; JO, Y. D.; AHN, J. W.; KIM, J. B.; JIN, C. H.; HAN, A. R. Comparative Analysis of Phytochemical Composition of Gamma-Irradiated Mutant Cultivars of *Chrysanthemum morifolium*. *Molecules*. vol. **24**, no. 16. 2019.
30. ISIDOROV, V. A.; LECH, P.; ŻÓŁCIAK, A.; RUSAK, M.; SZCZEPANIAK, L. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. *Trees - Structure and Function*. vol. **22**, no. 4. 2008.
31. THI, H. T.; LE, B. A.; LE, H. N. T.; OKITSU, K.; IMAMURA, K.; TAKENAKA, N.; LUU, B. Van; MAEDA, Y. Screening of fatty acids, saccharides, and phytochemicals in *Jatropha curcas* seed kernel as their trimethylsilyl derivatives using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. vol. **1102–1103**, no. October. 2018.
32. AKIHISA, T.; FRANZBLAU, S. G.; UKIYA, M.; OKUDA, H.; ZHANG, F.; YASUKAWA, K.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Antitubercular Activity of Triterpenoids from Asteraceae Flowers. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. vol. **28**, no. 1. 2005.
33. AKIHISA, T.; FRANZBLAU, S. G.; UKIYA, M.; OKUDA, H.; ZHANG, F.;

YASUKAWA, K.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Antitubercular Activity of Triterpenoids from Asteraceae Flowers. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005.

34. ZHANG, W.; WANG, T.; GUO, Q.; ZOU, Q.; YANG, F.; LU, D.; LIU, J. Effect of soil moisture regimes in the early flowering stage on inflorescence morphology and medicinal ingredients of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cv. "Hangju." *Scientia Horticulturae*. vol. **260**, no. August 2019. 2020.

35. FERREIRA, E. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B.; VENTRELLA, M. C.; MARQUES, A. E.; PROCÓPIO, S. O. Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*. vol. **23**, no. 4. 2005.

36. CORNER, T. R. Synergism in the inhibition of *Bacillus subtilis* by combinations of lipophilic weak acids and fatty alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. vol. **19**, no. 6. 1981.

37. UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; TAKIDO, M. Constituents of Compositae Plants. 2. Triterpene Diols, Triols, and Their 3-O-Fatty Acid Esters from Edible *Chrysanthemum* Flower Extract and Their Anti-inflammatory Effects. *J. Agric. Food Chem.* 2001,. vol. **49**. 2001.

38. TSEVEGSUREN, N.; FUJIMOTO, K.; CHRISTIE, W. W.; ENDO, Y. Occurrence of a novel cis,cis,cis-octadeca-3,9,12-trienoic (Z,Z,Z-octadeca-3,9,12-trienoic) acid in *Chrysanthemum* (Tanacetum) *zawadskii* Herb. (Compositae) seed oil. *Lipids*. vol. **38**, no. 5. 2003.

39. CHANG, K. M.; KIM, G. H. Volatile aroma constituents of gukhwa (*Chrysanthemum morifolium* R.). *Food Science and Biotechnology*. vol. **22**, no. 3. 2013.

40. ZACHARIA, J. T.; HAYASHI, M. Facile synthesis of acacetin-7-O- $\beta$ -d-galactopyranoside. *Carbohydrate Research*. vol. **348**. 2012.

41. ZHAO, F.; ZHANG, Q.; YAN, Y.; JIA, H.; ZHAO, X.; LI, X.; ZHENG, L.; HAN, G. Antioxidant constituents of chrysanthemum "jinsidaju" cultivated in Kaifeng. *Fitoterapia*. vol. **134**, no. December 2018. 2019.

42. OSAWA, T.; SUZUKI, A.; TAMURA, S. Isolation of chrysartemins a and b as

rooting cofactors in chrysanthemum morifolium. *Agricultural and Biological Chemistry*. vol. **35**, no. 12. 1971.

43. TSAO, R.; ATTYGALLE, A. B.; SCHROEDER, F. C.; MARVIN, C. H.; MCGARVEY, B. D. Isobutylamides of Unsaturated Fatty Acids from Chrysanthemum m orifolium Associated with Host-Plant Resistance against the Western Flower Thrips . *Journal of Natural Products*. vol. **66**, no. 9. 2007.

44. UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; KOIKE, K.; NIKAIIDO, T.; TAKIDO, M. Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible Chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. **49**, no. 7. 2001.

45. TELLEZ, M. R.; KHAN, I. A.; KOBALSY, M.; SCHRADER, K. K.; DAYAN, F. E.; OSBRINK, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry*. vol. **61**, no. 2. 2002.

46. BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; ORTIZ M. MARQUES, M.; FERNANDO FERRI, A.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. vol. **19**, no. 6–7. 2006.

47. MERLE, H.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOIRA, H. Chemical composition of the essential oil of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. flowers in the western Mediterranean area [2003]. *Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterranee*. 2002.

48. ROUTE, P. K.; RAO, Y. R.; SREE, A.; NAIK, N. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraria paniculata* (Linn.) Jack flower. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*. no. February. 2007.

49. KOWALSKI, R. Analysis of lipophilic fraction from leaves, inflorescences and rhizomes of *Silphium perfoliatum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. vol. **74**, no. 1. 2005.

50. ASGARPANA, J.; DAKHILI, N.; MIRZAEI, F.; SALEHI, M.; JANIPOUR, M.; RANGRIZ, E. Seed oil chemical composition of *Platychaete aucheri* (Boiss.) Boiss.

*Pharmacognosy Journal*. vol. **8**, no. 1. 2015.

## Capítulo 4 – Conclusão Geral

As diferentes técnicas analíticas adotadas para caracterizar as 27 amostras de resíduos de *Chrysanthemum morifolium* possibilitaram a obtenção do perfil metabolômico da espécie, constituída principalmente de moléculas de terpenos, *n*-alcanos, ácidos graxos e compostos fenólicos. Os testes biológicos para as larvas *Aedes aegypti* demonstraram que os extratos diclorometânicos FA contém substâncias larvicidas.

As análises quimiométricas (PCA) realizadas a partir dos dados analíticos, associadas aos ensaios biológicos, foram importantes para obter informações quanto as características dos extratos. A maior homogeneidade dos extratos FA, quando comparados aos FB, foi demonstrada pela PCA de dados de infravermelho (MIR), sendo uma característica importante quando se deseja transformar uma matéria-prima em um produto com aplicação tecnológica. A PCA das análises GC-MS segregou as amostras em três distintos grupos de acordo com a cronologia de amostragem, demonstrando que a sazonalidade pode ser um dos fatores que influencia nas características químicas dos extratos. A análise quimiométrica com os dados ESI (-) FT-ICR MS não evidenciou segregação de grupos como a que ocorreu no modelo de dados de CG-MS. Porém, ao avaliar a disposição das amostras no gráfico em relação ao eixo PC1, a maioria com maior atividade larvicida se localizaram na região negativa em relação a PC1. Os dados APCI (+) FT-ICR MS, no entanto, não discriminaram os grupos por atividade biológica. Esses resultados indicam a importância da junção cromatografia x espectrometria para a análise de dados a partir de perfis químicos.

Os resultados deste trabalho mostram que resíduos da agroindústria de flores podem ser utilizados como matéria-prima para a obtenção de agentes larvicidas naturais. Os dados sugerem que os triterpenos são as moléculas larvicidas da planta e que os ácidos graxos atuam como agentes sinérgicos.

## Capítulo 5 Material Suplementar

### 5.1. Figuras

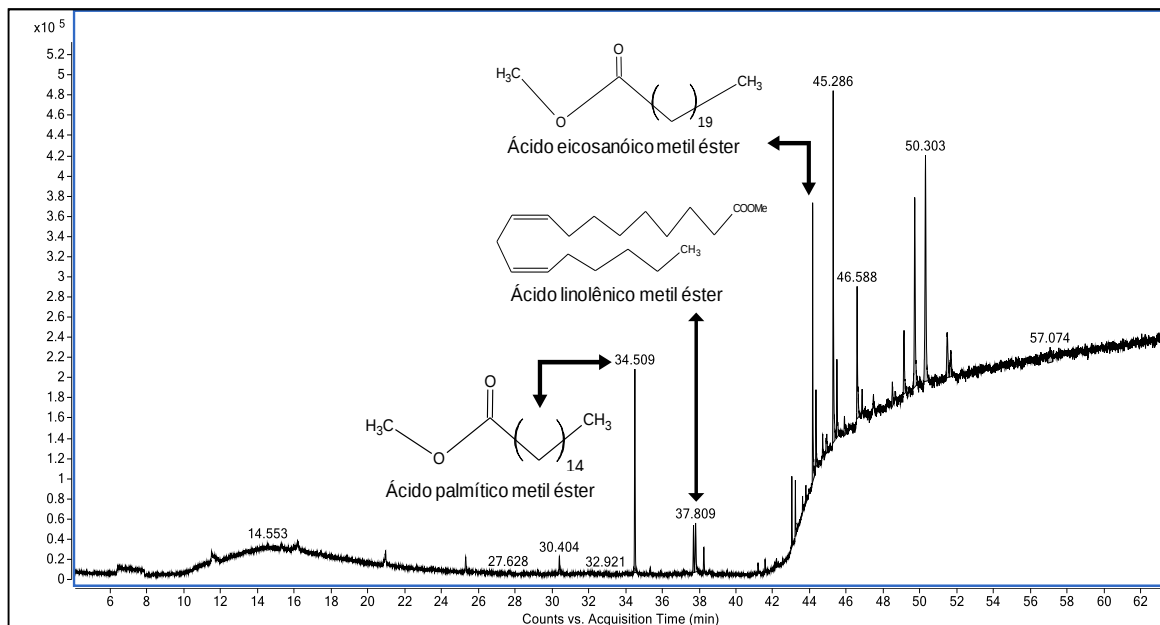


Figura 2.S. 1. Análise cromatográfica de CG-MS da mistura dos extratos FA.

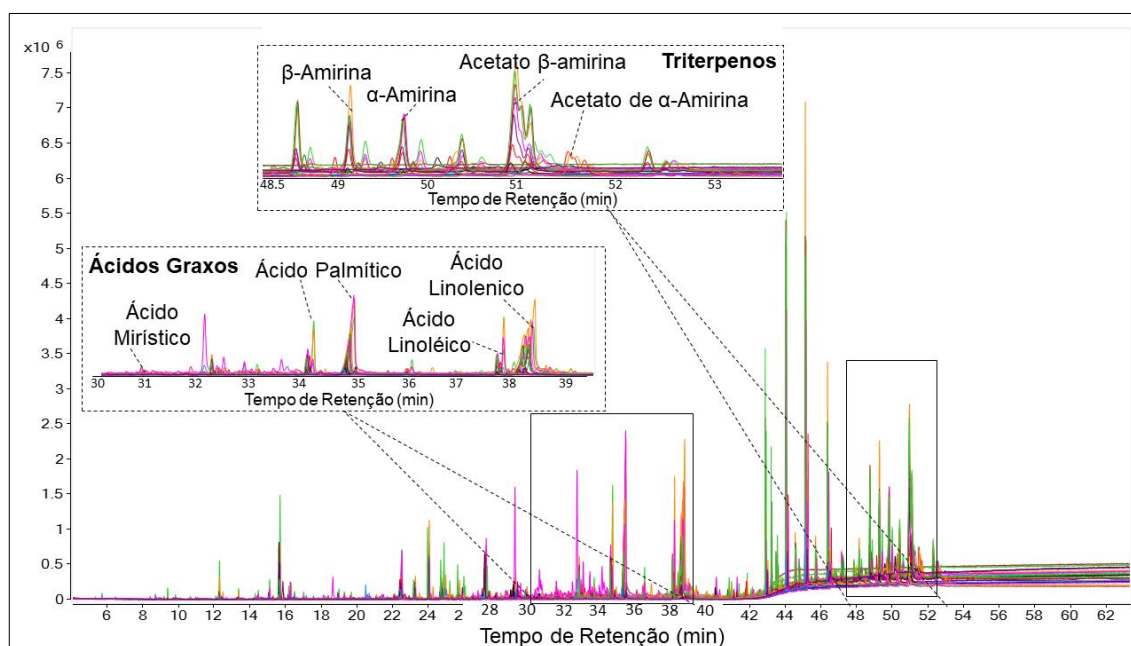
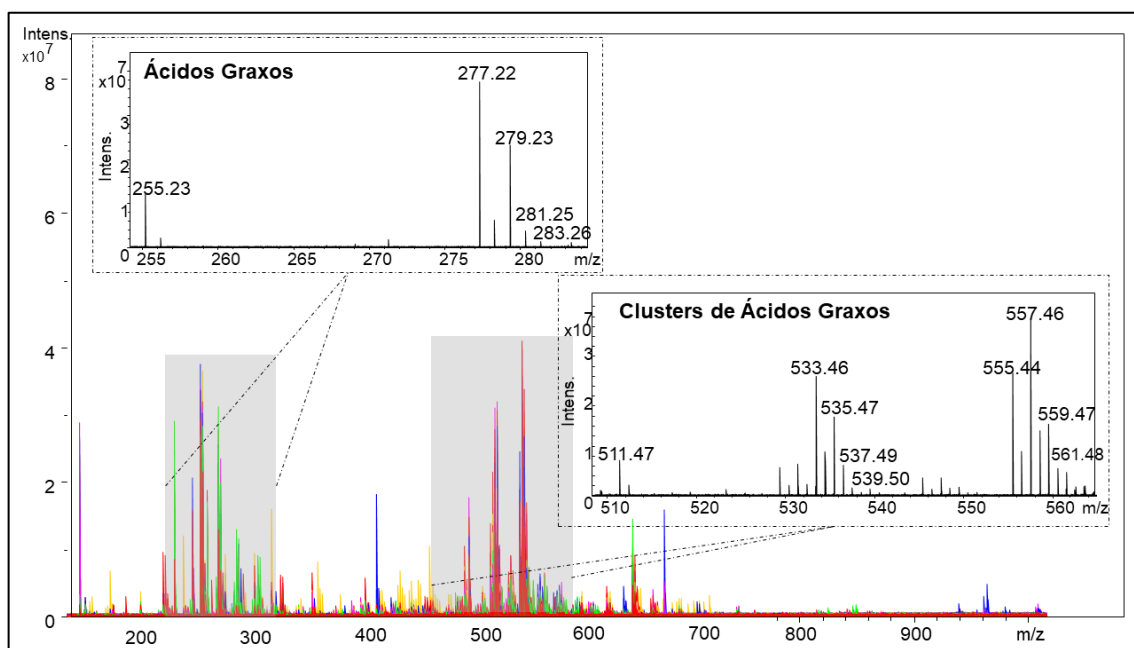
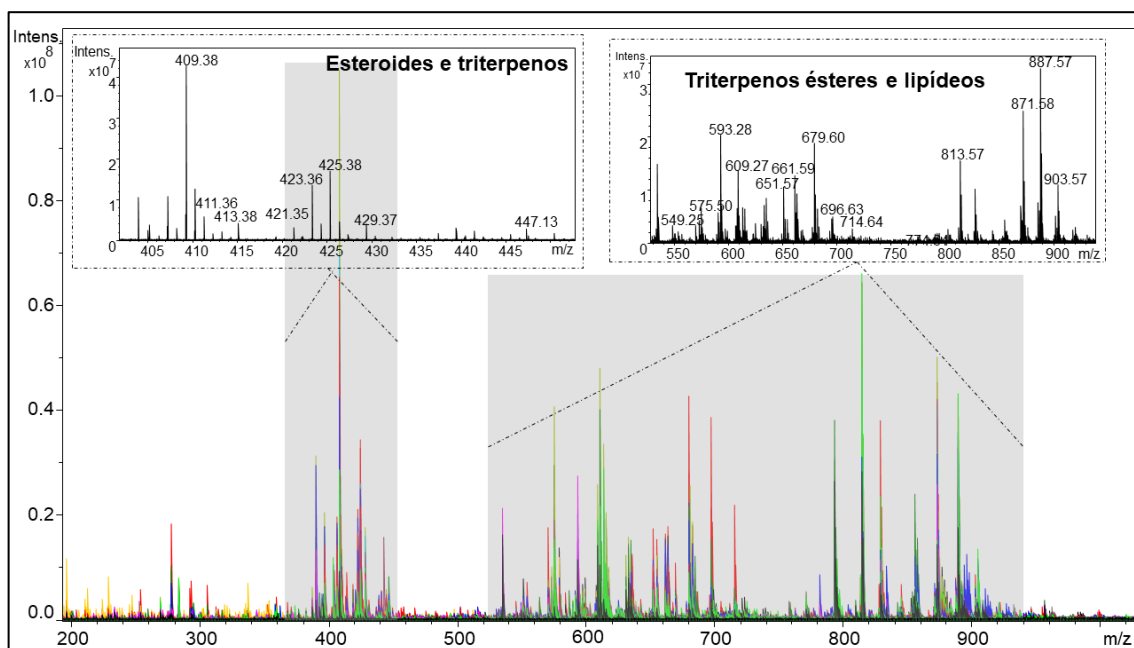


Figura 3.S. 1. Sobreposição dos cromatogramas obtidos das análises de GC-MS a partir dos 27 extratos de diclorometano.



**Figura 3.S. 2.** Sobreposição dos espectros de 27 ESI (-) FT-ICR MS obtidos a partir da análise dos extratos de diclorometano 27 FA



**Figura 3.S. 3.** Espectros de massas APCI (+) FT-ICR MS obtidos na análise dos 27 extratos FA de *Dendranthema x grandiflorum*.

## 5.2. Tabelas

**Tabela 2.S. 1.** Amostragem dos resíduos (flores, caules e folhas) de *Dendranthema x grandiflorum*.

| Data       | Coleta/Cultivo | Nome | Características                                                                             | Massa (g)<br>FA/FB |
|------------|----------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 03/06/2017 | JP/VNI         | F1   | Flores com cores diversificadas                                                             | 2,5427/ 8,2519     |
| 08/07/2017 | JP/VNI         | F2   | Amostragem com muitas folhas. Flores com cores diversificadas.                              | 1,8059/2,8365      |
| 21/07/2017 | JP/VNI         | F3   | Flores com cores diversificadas                                                             | 2,1927/1,7965      |
| 11/08/2017 | JP/VNI         | F4   | Flores brancas                                                                              | 1,6348/4,6730      |
| 19/08/2017 | JP/VNI         | F5   | Flores com cores diversificadas                                                             | 0,6786/2,7327      |
| 23/08/2017 | VF/H           | F6   | Amostragem com bastante caule e folhas. Flores amarelas e vermelhas                         | 0,9023/3,9767      |
| 02/09/2017 | JP/VNI         | F7   | Amostragem com bastante caule e folhas. Flores amarelas                                     | 1,6446/3,5773      |
| 16/09/2017 | JP/VNI         | F8   | Flores com cores diversificadas                                                             | 1,8772/3.4443      |
| 16/09/2017 | VV/VNI         | F9   | Flores amarelas                                                                             | 1,3422/5,7501      |
| 07/10/2017 | JP/VNI         | F10  | Amostragem com muitas folhas. Flores roxas e brancas                                        | 1,4968/3,1200      |
| 13/10/2017 | CL/H           | F11  | Flores bancas                                                                               | 1,6897/3,2116      |
| 11/11/2017 | JP/VNI         | F12  | Flores brancas de holambra-SP. Flores vermelhas e roxas colhidas em Venda nova do Imigrante | 0,8804/3,6929      |
| 18/11/2017 | JP/VNI         | F13  | Amostragem com muito caule e folhas. Poucas flores                                          | 0,4906/3,6386      |
| 06/12/2017 | CL/H           | F14  | Flores vinho                                                                                | 1,5993/3,5099      |
| 16/12/2017 | JP/VNI         | F15  | Amostragem com poucas folhas. Flores de cores muito variadas                                | 0,8124/2,9961      |
| 06/01/2018 | JP/VNI         | F16  | Amostragem com poucas folhas. Flores lilás e brancas                                        | 2,6098/3,2237      |
| 17/01/2018 | CL/H           | F17  | Flores brancas                                                                              | 2,5232/3,0726      |

|            |        |     |                                                                              |               |
|------------|--------|-----|------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 17/02/2018 | JP/H   | F18 | Flores amarelas, roxas e brancas                                             | 1,7193/3,0790 |
| 24/02/2018 | JP/H   | F19 | Flores lilás                                                                 | 2,2608/3,7275 |
| 10/03/2018 | JP/H   | F20 | Flores vinho e amarelas                                                      | 1,2444/3,1615 |
| 24/03/2018 | JP/VNI | F21 | Flores mostarda e brancas                                                    | 1,2926/3,7627 |
| 07/04/2018 | JP/VNI | F22 | Grande quantidade de caules e folhas. Flores amarelas com centro avermelhado | 1,7268/3,1455 |
| 28/04/2018 | JP/VNI | F23 | Amostragem grande de flores lilás e roxas                                    | 1,6044/3,9623 |
| 12/05/2018 | JP/VNI | F24 | Flores lilás, vinho e amarelas                                               | 1,1511/3,3589 |
| 26/05/2018 | JP/VNI | F25 | Flores lilás e amarelas                                                      | 1,7156/2,7011 |
| 23/06/2018 | JP/H   | F26 | Flores lilás e amarelas                                                      | 0,8519/3,0411 |
| 29/06/2018 | JP/VNI | F27 | Flores brancas                                                               | 1,0498/4,4493 |

\*JP = Feira Jardim da Penha; VNI = Venda nova do Imigrante; VF = Floricultura Vix Flores; VV = Feira Vila Velha; CL = Supermercado Carone – Laranjeiras/Serra; H = Holambra-São Paulo

**Tabela 2.S. 2.** Proposta dos compostos presentes nos extratos FA por análises ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS

| Classes                                       | [M-H] <sup>+</sup>                                                       | m/z       | DBE | Referências | Intensidade do Sinal (%) |       |       |       |                 |       |       |       |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|-----|-------------|--------------------------|-------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|
| Ácidos graxos                                 |                                                                          |           |     |             | Amostras do GA1          |       |       |       | Amostras do GA2 |       |       |       |
|                                               |                                                                          |           |     |             | 2                        | 4     | 7     | 23    | 3               | 10    | 12    | 17    |
| Ácido Palmítico                               | C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                           | 255,23295 | 1   | 1           | 45,09                    | 64,84 | 63,63 | 91,77 | 64,97           | 20,74 | 50,42 | 38,38 |
| Ácido Linolênico                              | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>                           | 277,21730 | 4   | 1, 2        | 60,33                    | 75,34 | 100   | 65,47 | 99,47           | 70,71 | 86,10 | 84,72 |
| Ácido Linoleico                               | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub>                           | 279,23295 | 3   | 3           | 100                      | 100   | 91,62 | 86,24 | 100             | 54,64 | 77,02 | 76,37 |
| Ácido Oleico                                  | C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub>                           | 281,24860 | 2   | 3           | 6,94                     | 8,95  | 23,34 | 10,02 | 13,97           | 2,01  | 8,77  | 8,60  |
| Ácido Esteárico                               | C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub>                           | 283,26425 | 1   | 1           | 3,45                     | 6,20  | 5,77  | 8,62  | 6,37            | 1,88  | 2,69  | 4,02  |
| Ácidos graxos cluster                         |                                                                          |           |     |             |                          |       |       |       |                 |       |       |       |
| Ácido Palmítico cluster                       | C <sub>32</sub> H <sub>63</sub> O <sub>4</sub>                           | 511,47318 | 1   |             | 28,20                    | 32,70 | 51,74 | 53,46 | 30,13           | 22,94 | 28,65 | 20,57 |
| Ácido Palmítico /Ácido oleico cluster         | C <sub>34</sub> H <sub>65</sub> O <sub>4</sub>                           | 537,48895 | 2   |             | 7,38                     | 9,79  | 31,11 | 12,22 | 13,86           | 5,00  | 8,24  | 7,05  |
| Ácido Palmitico /Ácido esteárico cluster      | C <sub>34</sub> H <sub>67</sub> O <sub>4</sub>                           | 539,50449 | 1   |             | 4,65                     | 8,19  | 12,64 | 10,91 | 7,67            | 4,20  | 6,23  | 3,88  |
| Ácido Linolênico cluster                      | C <sub>36</sub> H <sub>59</sub> O <sub>4</sub>                           | 555,44207 | 7   |             | 20,68                    | 22,82 | 49,40 | 16,23 | 31,36           | 41,91 | 38,38 | 47,58 |
| Ácido Linoleico cluster                       | C <sub>36</sub> H <sub>63</sub> O <sub>4</sub>                           | 559,47452 | 5   |             | 82,92                    | 49,37 | 82,28 | 43,36 | 59,13           | 40,03 | 46,39 | 56,08 |
| Ácido Oleico cluster                          | C <sub>36</sub> H <sub>65</sub> O <sub>4</sub>                           | 561,48883 | 4   |             | 20,82                    | 15,86 | 44,69 | 23,49 | 27,90           | 10,88 | 13,87 | 17,51 |
| Flavonoide                                    |                                                                          |           |     |             |                          |       |       |       |                 |       |       |       |
| Acacetina                                     | C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>                           | 283,06120 | 11  | 44          | 12,38                    | 54,77 | 5,94  | 14,35 | 9,04            | 2,10  | 10,08 | 21,05 |
| (+) -APCI-FT-ICR MS of FA Samples             |                                                                          |           |     |             |                          |       |       |       |                 |       |       |       |
| Classes                                       | [M-H] <sup>+</sup>                                                       | m/z       | DBE | Referências | Intensidade do Sinal (%) |       |       |       |                 |       |       |       |
| Sesquiterpenos                                |                                                                          |           |     |             | Amostras do GA1          |       |       |       | Amostras do GA1 |       |       |       |
|                                               |                                                                          |           |     |             | 2                        | 4     | 7     | 23    | 3               | 10    | 12    | 17    |
| Óxido Cariofileno                             | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O                                        | 219,17452 | 4   | 5           | 3,66                     | 1,77  | 2,11  | 2,14  | 4,73            | 2,75  | 4,85  | 0,94  |
| (6R,7R)-7-hidroxisababol-2,9E,11-triene-4-one | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub>                           | 235,16942 | 4   | 6           | 5,24                     | 3,75  | 4,37  | 2,54  | 6,44            | 5,72  | 9,37  | 1,11  |
| (Jinsidajuol A)                               |                                                                          |           |     |             |                          |       |       |       |                 |       |       |       |
| Óxido Bisabolol                               | C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub>                           | 237,18498 | 3   | 5           | 2,87                     | 1,79  | 3,19  | 2,84  | 3,82            | 2,50  | 5,76  | 1,28  |
| Chrisandiol                                   | C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>                           | 251,16431 | 4   | 7           | 1,16                     | 1,38  | 1,59  | 1,73  |                 | 1,96  | 4,44  | 0,98  |
| Cromenos                                      |                                                                          |           |     |             |                          |       |       |       |                 |       |       |       |
| Encecalinol                                   | C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>3</sub> (NH <sub>3</sub> adduct) | 248,12821 | 6   |             | 4,01                     | 1,12  | 5,54  | 2,35  | 5,30            | 1,51  | 1,19  | 1,42  |
|                                               | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>3</sub>                          | 250,14391 | 5   |             | 1,27                     | 1,54  | 3,42  | 1,74  | 4,99            | 1,14  | 2,92  | 0,71  |

|                                                      |                                                                             |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                                      | (NH <sub>3</sub> adduct)                                                    |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
| <b>Alcamida</b>                                      |                                                                             |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
| N-Isobutil 2E,4E,12Z-tetradecatrien-8,10-diinamida   | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> NO                                          | 268,16978 | 8 | 8 | 2,35  | 2,47  | 0,99  | 1,27  | 4,15  | 1,99  | 3,01  | 0,49  |
|                                                      | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> NO                                          | 270,18524 | 7 |   | 7,17  | 2,39  | 1,78  | 3,71  | 13,18 | 6,47  | 7,48  | 1,24  |
| <b>Triterpeno e esteróides</b>                       |                                                                             |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Esqualeno                                            | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub>                                             | 409,38288 | 6 |   | 71,38 | 95,79 | 46,75 | 100   | 41,49 | 9,85  | 55,87 | 100   |
| Stigmasterol                                         | C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O                                           | 411,36248 | 6 | 1 | 22,55 | 11,12 | 11,09 | 21,68 | 8,39  | 2,74  | 11,71 | 13,82 |
| β-Sitosterol                                         | C <sub>29</sub> H <sub>49</sub> O                                           | 413,37820 | 5 | 1 | 26,28 | 19,13 | 6,93  | 22,82 | 15,19 | 7,83  | 30,31 | 9,72  |
|                                                      | C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O                                           | 421,34684 | 8 |   | 9,66  | 6,90  | 4,60  | 8,24  | 3,50  | 2,31  | 5,61  | 7,53  |
| Lupenone/<br>Taraxerone/β-Amirone                    | C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O                                           | 423,36246 | 7 |   | 29,54 | 49,42 | 18,14 | 29,98 | 10,76 | 3,24  | 12,80 | 31,63 |
| α-Amirina/<br>Taraxasterol                           | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O                                           | 425,37779 | 6 | 1 | 42,61 | 76,65 | 33,26 | 41,06 | 18,47 | 4,55  | 16,86 | 39,86 |
| (3,β-,7β,22E)-<br>Stigmasta-5,22-dien-<br>3β,7β-diol | C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub>                              | 427,35745 | 6 |   | 6,79  | 7,17  | 3,57  | 6,59  | 3,89  | 2,49  | 7,58  | 3,54  |
| Stigmasta-5,22-diene-<br>3,7-diol                    |                                                                             |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 7α-Hidroxisitosterol/ α-Tocoferol                    | C <sub>29</sub> H <sub>49</sub> O <sub>2</sub>                              | 429,37271 | 5 |   | 26,28 | 19,13 | 11,53 | 24,72 | 15,19 | 7,83  | 30,31 | 9,54  |
|                                                      | C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>2</sub>                              | 437,34177 | 8 |   | 5,67  | 3,72  | 2,78  | 6,59  | 4,27  | 1,44  | 3,75  | 4,25  |
|                                                      | C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub>                              | 439,35747 | 7 |   | 9,72  | 8,87  | 4,48  | 8,96  | 3,26  | 2,37  | 5,20  | 7,27  |
| Maniladiol                                           | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O <sub>2</sub>                              | 441,37280 | 6 |   | 7,76  | 13,22 | 3,90  | 9,71  | 3,55  | 1,09  | 4,82  | 5,62  |
|                                                      | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O <sub>3</sub>                              | 445,36838 | 5 |   | 7,24  | 4,25  | 3,34  | 7,14  | 3,55  | 2,68  | 6,66  | 3,60  |
|                                                      | C <sub>28</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub>                              | 447,34731 | 5 |   | 9,74  | 9,13  | 7,64  | 2,47  | 12,58 | 6,04  | 10,28 | 2,91  |
| <b>Diacilglicerol</b>                                |                                                                             |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                                                      | C <sub>34</sub> H <sub>68</sub> NO <sub>5</sub><br>(NH <sub>3</sub> adduct) | 570,51055 | 1 |   | 16,66 | 40,76 | 11,02 | 9,16  | 21,11 | 4,70  | 16,44 | 7,88  |
|                                                      | C <sub>37</sub> H <sub>65</sub> O <sub>4</sub>                              | 573,48918 | 5 |   | 28,16 | 7,35  | 3,78  | 10,05 | 6,74  | 4,68  | 13,22 | 10,12 |
|                                                      | C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> O <sub>4</sub>                              | 575,50468 | 4 |   | 100   | 21,02 | 8,34  | 13,09 | 19,67 | 9,26  | 27,85 | 13,56 |
|                                                      | C <sub>37</sub> H <sub>71</sub> O <sub>4</sub>                              | 579,53610 | 2 |   | 46,69 | 5,18  | 15,88 | 8,67  | 25,05 | 2,23  | 11,96 | 3,68  |
|                                                      | C <sub>37</sub> H <sub>70</sub> NO <sub>5</sub><br>(NH <sub>3</sub> adduct) | 608,52562 | 3 |   | 22,56 | 2,11  | 9,79  | 17,88 | 19,85 | 24,02 | 29,80 | 15,55 |
|                                                      | C <sub>37</sub> H <sub>72</sub> NO <sub>5</sub><br>(NH <sub>3</sub> adduct) | 610,54125 | 2 |   | 56,35 | 26,64 | 15,35 | 21,58 | 37,40 | 50,65 | 38,10 | 9,20  |

|                                     |                                                |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                                     | C <sub>39</sub> H <sub>65</sub> O <sub>5</sub> | 613,48352 | 7 |   | 72,16 | 3,32  | 10,69 | 19,02 | 15,34 | 14,53 | 29,03 | 15,82 |
|                                     | C <sub>39</sub> H <sub>67</sub> O <sub>5</sub> | 615,49915 | 6 |   | 61,24 | 7,64  | 4,56  | 11,86 | 8,84  | 7,65  | 13,09 | 15,15 |
| <b>Triterpene esters</b>            |                                                |           |   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Maniladiol 3-O-myristate ou isômero | C <sub>44</sub> H <sub>75</sub> O <sub>3</sub> | 651,57107 | 7 | 9 | 15,67 | 40,94 | 18,93 | 26,83 | 8,20  | 5,51  | 7,55  | 24,94 |
| α-Amirina palmitato ou isômero      | C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> O <sub>2</sub> | 663,60796 | 7 | 9 | 54,38 | 20,20 | 26,72 | 8,79  | 5,39  | 2,82  | 6,68  | 21,97 |
| Maniladiol 3-O-palmitate ou isômero | C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> O <sub>3</sub> | 679,60237 | 7 | 9 | 53,07 | 100   | 56,77 | 63,90 | 21,82 | 11,28 | 17,66 | 44,25 |

**Tabela 2.S. 3.** Identificação de ésteres metílicos de ácidos graxos e alguns triterpenos na amostra de mistura FA por análise CG-MS.

| Tempo de retenção | Concentração relativa (%) | Composto                       | Fórmula molecular                              | Índice de kovats (calculado) | Índice de kovats (literatura) | Referências |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------|
| 30,404            | 0,82                      | Ácido Mirístico, metil éster   | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> | 1727                         | 1725                          | 10          |
| 34,509            | 8,57                      | Ácido Palmítico, metil éster   | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | 1930                         | 1927                          | 11          |
| 37,700            | 2,02                      | Ácido Linoleico, metil éster   | C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> | 2100                         | 2096                          | 12          |
| 37,809            | 2,92                      | Ácido Linolênico, metil éster  | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> | 2106                         | 2108                          | 13          |
| 38,260            | 1,16                      | Ácido Esteárico, metil éster   | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> | 2131                         | 2135                          | 13          |
| 43,231            | 1,45                      | Ácido Docosanoico, metil éster | C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub> | 2542                         | 2531                          | 14          |
| 49,717            | 12,01                     | β-Amirina                      | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O              | 3426                         | 3420                          | 15          |

**Tabela 3.S.1.** Configurações usadas no DropMS para processar as 27 amostras de *Dendranthema x grandiflorum* por ESI (-) FT-ICR MS.

| Propriedades                  | Valores Atribuídos                                                                                  |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Faixa m/z (mínimo e máximo)   | 100 e 1000                                                                                          |
| Prioridade de assimilação     | Intensidade                                                                                         |
| Limite mínimo de S/N (\$\%\$) | 0                                                                                                   |
| DBE (mínimo e máximo)         | 0 e 50                                                                                              |
| Equação de recalibração       | Polinômio de Segunda Ordem                                                                          |
| Lista de Recalibração         | Série homóloga de classe O <sub>2</sub>                                                             |
| Composição do Banco de Dados  | C <sub>(0-100)</sub> H <sub>(0-200)</sub> N <sub>(0-3)</sub> O <sub>(0-10)</sub> S <sub>(0-4)</sub> |
| Tolerância de assimilação     | 1 ppm                                                                                               |

**Tabela 3.S. 2.** Proposta de compostos presentes nos extratos FA pelas análises ESI (-) FT-ICR MS e APCI (+) FT-ICR MS

| ESI (-) FT-ICR MS                                 |                                                |                         |     |            |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------|-----|------------|
| Class                                             | [M-H] <sup>-</sup>                             | m/z <sub>measured</sub> | DBE | References |
| FATTY ACIDS                                       |                                                |                         |     |            |
| Ácido Palmítico                                   | C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> | 255.23295               | 1   | 1          |
| Ácido Linoleico                                   | C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub> | 277.21730               | 4   | 2          |
| Ácido Linolênico                                  | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> | 279.23295               | 3   | 1, 3       |
| Ácido Oleico                                      | C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> O <sub>2</sub> | 281.24860               | 2   | 3          |
| Ácido Esteárico                                   | C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub> | 283.26425               | 1   | 1          |
| CLUSTER FATTY ACIDS                               |                                                |                         |     |            |
| Ácido Palmítico cluster                           | C <sub>32</sub> H <sub>63</sub> O <sub>4</sub> | 511.47318               | 1   |            |
| Ácido Palmítico/Ácido Oléico cluster              | C <sub>34</sub> H <sub>65</sub> O <sub>4</sub> | 537.48895               | 2   |            |
| Ácido Palmítico/Ácido Esteárico cluster           | C <sub>34</sub> H <sub>67</sub> O <sub>4</sub> | 539.50449               | 1   |            |
| Ácido Linoleico cluster                           | C <sub>36</sub> H <sub>59</sub> O <sub>4</sub> | 555.44207               | 7   |            |
| Ácido Linolênico cluster                          | C <sub>36</sub> H <sub>63</sub> O <sub>4</sub> | 559.47452               | 5   |            |
| Ácido Oleico cluster                              | C <sub>36</sub> H <sub>65</sub> O <sub>4</sub> | 561.48883               | 4   |            |
| APCI (+) FT-ICR MS                                |                                                |                         |     |            |
| Classes                                           | [M-H] <sup>-</sup>                             | m/z <sub>measured</sub> | DBE | References |
| TRITERPENE AND STEROIDS                           |                                                |                         |     |            |
| Esqualeno                                         | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub>                | 409.38502               | 6   |            |
| Stigmasterol                                      | C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O              | 411.36248               | 6   | 1          |
| β-Sitosterol                                      | C <sub>29</sub> H <sub>49</sub> O              | 413.3782                | 5   | 1          |
|                                                   | C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O              | 421.34684               | 8   |            |
| Lupenone/ Taraxerone/ beta-Amirone                | C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O              | 423.36246               | 7   |            |
| α-Amirina/ Taraxasterol                           | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O              | 425.37779               | 6   | 1          |
| (3.β., 7.β., 22E)-Stigmasta-5,22-dien-3β, 7β-diol | C <sub>29</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub> | 427.35745               | 6   |            |
| Stigmasta-5,22-diene-3,7-diol                     |                                                |                         |     |            |
| 7 α -Hydroxysitosterol/ α -Tocoferol              | C <sub>29</sub> H <sub>49</sub> O <sub>2</sub> | 429.37271               | 5   |            |

|                                     |                                                |           |   |    |
|-------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|---|----|
| Maniladiol                          | C <sub>30</sub> H <sub>45</sub> O <sub>2</sub> | 437.34177 | 8 |    |
|                                     | C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>2</sub> | 439.35747 | 7 |    |
|                                     | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O <sub>2</sub> | 441.3728  | 6 |    |
|                                     | C <sub>30</sub> H <sub>49</sub> O <sub>3</sub> | 445.36838 | 5 |    |
|                                     | C <sub>28</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub> | 447.34731 | 5 |    |
|                                     | C <sub>30</sub> H <sub>47</sub> O <sub>3</sub> | 455.35241 | 7 |    |
| <b>TRITERPENE ESTERS</b>            |                                                |           |   |    |
| Maniladiol 3-O-miristato ou isômero | C <sub>44</sub> H <sub>75</sub> O <sub>3</sub> | 651.57107 | 7 | 16 |
| α -Amirina palmitato ou isômero     | C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> O <sub>2</sub> | 663.60796 | 7 | 16 |
| Maniladiol 3-O-palmitato ou isômero | C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> O <sub>3</sub> | 679.60237 | 7 | 16 |

### 5.3. Referências

1. SPINDOLA, K. C. V. W.; SIMAS, N. K.; DOS SANTOS, C. E.; DA SILVA, A. G.; ROMÃO, W.; VANINI, G.; DA SILVA, S. R. C.; BORGES, G. R.; DE SOUZA, F. G.; KUSTER, R. M. *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. vol. **26**, no. 3. 2016.
2. TSEVEGSUREN, N.; FUJIMOTO, K.; CHRISTIE, W. W.; ENDO, Y. Occurrence of a novel cis,cis,cis-octadeca-3,9,12-trienoic (Z,Z,Z-octadeca-3,9,12-trienoic) acid in *Chrysanthemum* (*Tanacetum*) *zawadskii* Herb. (*Compositae*) seed oil. *Lipids*. vol. **38**, no. 5. 2003.
3. CHANG, K. M.; KIM, G. H. Volatile aroma constituents of gukhwa (*Chrysanthemum morifolium* R.). *Food Science and Biotechnology*. vol. **22**, no. 3. 2013.
4. ZACHARIA, J. T.; HAYASHI, M. Facile synthesis of acacetin-7-O- $\beta$ -D-galactopyranoside. *Carbohydrate Research*. vol. **348**. 2012.
5. LAWAL, O. A.; OGUNWANDE, I. A.; OLORUNLOBA, O. F.; OPOKU, A. R. The essential oils of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. from Nigeria. vol. **2**, no. 1. 2014.
6. ZHAO, F.; ZHANG, Q.; YAN, Y.; JIA, H.; ZHAO, X.; LI, X.; ZHENG, L.; HAN, G. Antioxidant constituents of chrysanthemum "jinsidaju" cultivated in Kaifeng. *Fitoterapia*. vol. **134**, no. December 2018. 2019.
7. OSAWA, T.; SUZUKI, A.; TAMURA, S. Isolation of chrysartemins a and b as rooting cofactors in *chrysanthemum morifolium*. *Agricultural and Biological Chemistry*. vol. **35**, no. 12. 1971.
8. TSAO, R.; ATTYGALLE, A. B.; SCHROEDER, F. C.; MARVIN, C. H.; MCGARVEY, B. D. Isobutylamides of Unsaturated Fatty Acids from *Chrysanthemum morifolium* Associated with Host-Plant Resistance against the Western Flower Thrips. *Journal of Natural Products*. vol. **66**, no. 9. 2007.
9. UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; KOIKE, K.; NIKAIDO, T.; TAKIDO, M. Constituents of *Compositae* plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible *Chrysanthemum* flower extract

and their anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. **49**, no. 7. 2001.

10. TELLEZ, M. R.; KHAN, I. A.; KOBALSY, M.; SCHRADER, K. K.; DAYAN, F. E.; OSBRINK, W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry*. vol. **61**, no. 2. 2002.

11. BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; ORTIZ M. MARQUES, M.; FERNANDO FERRI, A.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*. vol. **19**, no. 6–7. 2006.

12. MERLE, H.; BLÁZQUEZ, M. A.; BOIRA, H. Chemical composition of the essential oil of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. flowers in the western Mediterranean area [2003]. *Centre International de Hautes Etudes Agronomiques Mediterranean*. 2002.

13. ROUTE, P. K.; RAO, Y. R.; SREE, A.; NAIK, N. Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraya paniculata* (Linn.) Jack flower. *FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL*. no. February. 2007.

14. KOWALSKI, R. Analysis of lipophilic fraction from leaves, inflorescences and rhizomes of *Silphium perfoliatum* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. vol. **74**, no. 1. 2005.

15. ASGARPANA, J.; DAKHILI, N.; MIRZAEI, F.; SALEHI, M.; JANIPOUR, M.; RANGRIZ, E. Seed oil chemical composition of *Platycheilus aucheri* (Boiss.) Boiss. *Pharmacognosy Journal*. vol. **8**, no. 1. 2015.

16. UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; KOIKE, K.; NIKAI, T.; TAKIDO, M. Constituents of Compositae Plants. 2. Triterpene Diols, Triols, and Their 3-O-Fatty Acid Esters from Edible *Chrysanthemum* Flower Extract and Their Anti-inflammatory Effects. *J. Agric. Food Chem.* 2001., vol. **49**. 2001.

## Capítulo 6 – Curriculum Vitae

### Formação Acadêmica

Doutoranda em Química – área Química de Produtos Naturais, 2021. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória – ES.

Mestre em Química – área Química do Petróleo e Biocombustíveis, 2017. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória – ES.

Licenciada em Química, 2017. Universidade de Uberaba – UNIUBE, Uberaba – MG.

Bacharel em Química, 2014. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória – ES.

### Atividades Acadêmicas

- Artigos publicados durante o Doutorado

Tamires A. Lima, Larissa R. Manhães, Ingrid M. Hayashide, Anne C. C. Gomes, Betina P. Lovatti, Naomi K. Simas, Paulo R. Filgueiras, Ricardo M. Kuster. Agro Residues of *Dendranthema x grandiflorum* as Raw Material for a Potential Larvicidal Product. *Waste and Biomass Valorization*, 2020, 12, 725–734. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01030-4>.

Tamires A. Lima, Cristina L. Tosta, Larissa S. de Souza, Betina P. Lovatti, Thalles R. Rosa, Ingrid M. Hayashide, Naomi K. Simas, Paulo R. Filgueiras, Ricardo M. Kuster. Analytical Methods to Assess Larvicidal Compounds in Extracts from *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitam. Residues. *Chemical Papers*, 2021. DOI: 10.1007/s11696-021-01552-8