

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *Melia azedarach* L. POR PROCESSO SEQUENCIAL EM LEITO FIXO USANDO scCO_2 , ETANOL E ÁGUA COMO SOLVENTES

R. G. BITENCOURT¹, C. L. QUEIROGA² e F. A. CABRAL¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Alimentos

² Universidade Estadual de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas

E-mail para contato: raphaelagbitencourt@gmail.com

RESUMO – *Melia azedarach* L. é uma planta com ampla utilização popular e que possui diversos compostos de interesse. Extrações que utilizam dióxido de carbono supercrítico (scCO_2) destacam-se para obtenção de biocompostos por serem consideradas tecnologias limpas. Extratos de frutos de *M. azedarach* foram obtidos por um processo sequencial em leito fixo utilizando scCO_2 , etanol e água como solventes. As extrações foram realizadas em 4 etapas sequenciais a 50 °C e 300 bar e os extratos foram analisados: por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), quanto ao teor de compostos fenólicos e potencial de redução da tensão superficial. O rendimento de extração global atingiu 45 % e a CCD mostrou extratos enriquecidos em diferentes compostos. O maior teor de compostos fenólicos foi obtido no extrato hidroalcoólico (21,6 mg de EAG/g de extrato) e o extrato obtido pela mistura scCO_2 + etanol apresentou a maior redução da tensão superficial (26,9 mN.m^{-1}). Não foi verificada presença de óleos voláteis nos extratos, porém foram identificados ácidos graxos no extrato supercrítico. O processo proposto apresentou-se como uma boa alternativa para extrair compostos de interesse presentes em *M. azedarach*.

1. INTRODUÇÃO

A *Melia azedarach* L. é uma árvore pertencente à família *Meliaceae*, sub-espontânea na no Sul e Sudeste do Brasil e conhecida principalmente como cinamomo e chinaberry tree (Lorenzi, 2003). Esta planta apresenta atividade antiviral (Wachsman *et al.*, 1982; Andrei *et al.*, 1986; Wachsman *et al.*, 1998), antimicrobiana (Khan *et al.*, 2011; Orhan *et al.*, 2012a), inseticida (Carpinella *et al.*, 2007; Mckenna *et al.*, 2013; Scapinello *et al.*, 2013), citotóxica (Akihisa *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013) e anti-inflamatória (Aoudia *et al.*, 2013). Extrações envolvendo fluidos supercríticos para a obtenção de extratos naturais ricos em compostos bioativos têm sido amplamente exploradas por fornecer extratos limpos e enriquecidos em componentes de interesse. O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado no estado de fluido supercrítico pois, quando aplicado a alimentos e fármacos, não gera resíduos tóxicos. Além disso, técnicas de extração que envolvem diversas etapas sequenciais com scCO_2 e combinações entre scCO_2 , etanol e água têm obtido grande sucesso para extração e fracionamento de compostos fenólicos (Seabra *et al.*, 2010;

Paula *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2014; Garmus *et al.*, 2014). A água e o etanol possuem polaridades diferentes à do scCO₂ e não há restrições de órgãos governamentais e ambientais quanto ao seu uso. Neste contexto, este projeto visa verificar a viabilidade técnica do uso de scCO₂, etanol e água como solventes em processo sequencial em leito fixo para extrair compostos bioativos presentes em frutos de *Melia azedarach* L..

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização da Matéria-Prima

Foram utilizados frutos de *M. azedarach* coletados na cidade de Campinas-SP (Latitude: 23°32' S, Longitude: 47°08' W) em agosto de 2011. Após coleta, os frutos foram previamente picotados (TRAPP) e secos em estufa com circulação de ar a 40 °C por quatro dias. Em seguida, foram moídos (Moinho 114584, Ametek) com gelo seco e moinho de facas (Moinho MA 340, Marconi, Brasil). Por fim, os frutos secos e moídos de *M. azedarach* foram caracterizados de acordo com a Tabela 1 e armazenadas em frascos de vidro com tampa em freezer (Brastemp Flex, Brasil) a - 26 °C.

Tabela 1 – Caracterização dos frutos de *M. azedarach* secos e moídos.

Propriedade	Metodologia	Amostra
Teor de Voláteis Totais (%)	AOAC 930.04 (1997)	10,89 ± 0,23
Umidade (%)	AOCS Ca 23-55 (1998)	9,50 ± 0,14
Diâmetro Médio das Partículas (mm)	ASAE (1997)	0,72 ± 0,04
Densidade Aparente (g.cm ⁻³)	Uquiche <i>et al.</i> (2004)	0,60 ± 0,01
Densidade Real (g.cm ⁻³)	Picnometria em gás hélio	1,46 ± 0,01
Porosidade do Leito	Rahman (1996)	0,59 ± 0,01

2.2. Metodologia de Extração

A extração foi realizada em quatro etapas sequencias a 300 bar e 50 °C, como apresentado na Figura 1, em uma unidade de extração descrita em diversos trabalhos (Paula *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2014; Garmus *et al.*, 2014). Além disso, uma armadilha “Porapak” foi conectada juntamente ao sistema de coleta de CO₂. A armadilha Porapak foi montada a partir de um tubo de vidro contendo Porapak-Q (80-100 Mesh, Supelco Analytical, EUA) e lã de vidro (Êxodo Científica, Brasil), formando um cartucho, para reter os compostos voláteis presentes na amostra. O extrato obtido a partir deste processo foi denominado SCE-V. Portanto, como resultado das quatro etapas de extração foram obtidos cinco tipos de extratos denominados: SCE (extrato supercrítico), SCE-V (fração volátil do extrato supercrítico), SCEE (extrato supercrítico + etanol), EE (extrato etanólico) e HE (extrato hidroalcoólico), respectivamente.

Os rendimentos de extração foram calculados pela razão entre a massa de extrato obtida e massa de matéria prima utilizada para montar o extrator, dada em porcentagem. A massa do extrato foi obtida após concentração em rotaevaporador (Evaporador rotativo Marconi, MA-120, Brasil) e secagem em estufa (Marconi, MA030/12, Brasil) sob vácuo (Bomba de vácuo Marconi, MA057/1, Brasil) a 50 °C até peso constante (Balança analítica, Precisa XT 220A). Curvas

cinéticas de extração (massa de extrato vs. tempo de extração) também foram construídas coletando-se, em intervalos de tempo pré-estabelecidos, amostras de extratos.

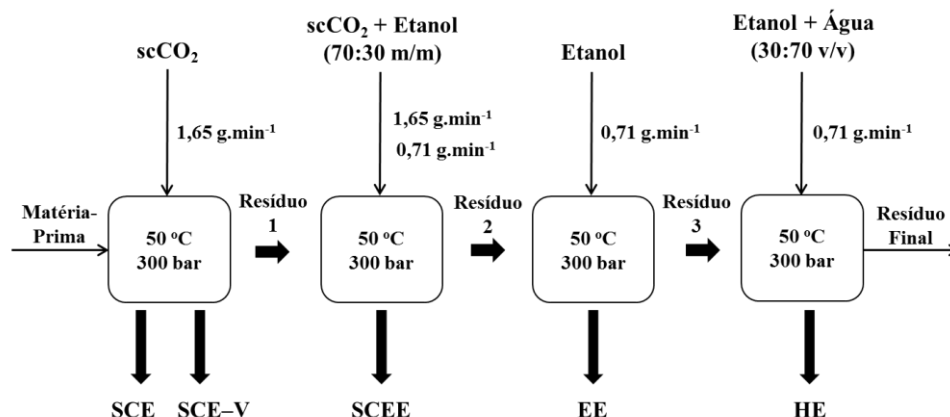


Figura 1 – Esquema representativo das quatro etapas de extração sequencial em leito fixo.

2.3. Cromatografia em Camada Delgada

O perfil cromatográfico dos extratos foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Placas de Sílica gel G60 F₂₅₄ foram utilizadas como fase estacionária (1.05554.0001, Merck, Germany) e uma solução de clorofórmio (Synth, Brazil): metanol (Synth, Brazil): ácido trifluoroacético 0,5 % (Vetec, Brazil) (60:40:5 v/v/v) foi usado como fase móvel. Uma solução de para-anisaldeído (revelador universal) foi usado para revelar os compostos. Como padrão foram utilizadas extratos obtidos por sistema Soxhlet, usando solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e metanol).

2.4. Tensão Superficial

Análises de tensão superficial foram realizadas para identificar a presença de saponinas nos extratos. Por serem surfactantes naturais, extratos contendo saponinas apresentam redução em sua tensão superficial. Amostras dos extratos de 20 e 40 g.L⁻¹ foram solubilizadas em água deionizada e a tensão superficial foi determinadas a 24 °C por um Tensiômetro Digital (K10ST, Kruss, Germany) usando um anel de Pt-Ir. A redução na tensão superficial dos extratos foi comparada à tensão superficial do dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante sintético.

2.5. Fenóis e Flavonoides

O teor de fenóis totais foi determinado através do método de Folin-Ciocalteu, segundo procedimento de Singleton *et al.* (1999) e expresso em equivalente de ácido gálico (mg EAG/g extrato). Para a quantificação dos flavonoides totais foi empregado o método desenvolvido por Zhishen *et al.* (1999), no qual os resultados são expressos em equivalente de catequina (mg EC/g extrato). Totais as análises forma realizadas em triplicata.

2.6. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

As análises por CG-MS foram conduzidas em cromatógrafo a gás Agilent Technologies 6890 com detector seletivo de massas 5975. Foi utilizada uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e injeção do modo split com razão 1:30. Hélio foi usado como gás de arraste na vazão de 1 mL.min⁻¹ e o sistema de ionização de elétrons foi de 70 eV. Injetou-se 1,0 μL de solução de extrato no equipamento e a identificação dos constituintes químicos foi realizada a partir de seus respectivos espectros de massas, por comparação com os espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimentos e Cinética de Extração

Extratos de frutos de *M. azedarach* apresentaram diferenças significativas quanto ao rendimento de extração, conforme apresentado na Tabela 2. O maior rendimento de extração foi obtido para o extrato etanólico (EE), seguido do extrato hidroalcoólico (HE). Os extratos supercríticos (SCE e SCEE) apresentaram médias (rendimento) estatisticamente iguais, e a fração volátil (SCE-V) foi a obtida em menor quantidade. O extrato supercríticos (SCE) de *M. azedarach* apresentou rendimento de extração de 7,6 %, valor superior ao encontrado por Scapinello *et al.* (2013) a 250 bar e 60 °C (5,2 %). O rendimento em compostos voláteis (SCE-V) foi 0,63 %. Não há na literatura resultados quantitativos sobre compostos voláteis em frutos de *M. azedarach*.

Tabela 2 – Resultados das análises de rendimento, tensão superficial e teor de fenóis e flavonoides totais nos extratos de *M. azedarach*.

Extrato	Rendimento (%)	Tensão Superficial (mN.m ⁻¹)		Teor de Fenóis (mg EAG/g extrato)	Teor de Flavonoides (mg EC/g extrato)
		20 g.L ⁻¹	40 g.L ⁻¹		
SCE	7,6 \pm 1,3 ^d	-	-	-	-
SCEE	6,4 \pm 1,1 ^d	42,1 \pm 0,6 ^a	26,9 \pm 0,4 ^c	20,59 \pm 1,17 ^a	35,35 \pm 1,39 ^a
EE	19 \pm 2 ^b	43,5 \pm 0,2 ^a	30,7 \pm 0,6 ^b	5,69 \pm 0,32 ^b	1,99 \pm 0,38 ^c
HE	12,3 \pm 0,4 ^c	43,1 \pm 0,4 ^a	37,7 \pm 0,5 ^a	21,6 \pm 1,57 ^a	5,74 \pm 1,17 ^b
Global	46 \pm 2 ^a	-	-	-	-

Tensão superficial da água deionizada = 72,4 \pm 0,4 mN.m⁻¹; Tensão superficial do SDS (acima do CMC) = 36,3 \pm 1,3 mN.m⁻¹.

Letras iguais equivalem a médias estatisticamente iguais (p < 0,05).

Na Figura 2 está representada a curva global (cinética) das quatro etapas de extração. A etapa 1 (SCE) foi realizada durante 5 horas e as demais em 6 horas cada. Observou-se que as etapas 1 e 4 atingiram o período no qual a difusão controlou o processo de extração e a quantidade de extrato obtida foi muito pequena, sugerindo que o leito de partículas tendia para seu esgotamento. Com 3 horas de extração supercrítica, quantidade maior que 90 % do total de extrato SCE obtido havia sido extraída e, da mesma forma, mais de 80 % do extrato hidroalcoólico (HE)

total foi extraído com o mesmo tempo de extração. Isto indica que é mais viável realizar estas etapas durante 3 horas pois, após esse período, a quantidade de extrato obtida é muito pequena comparado a quantidade de solvente utilizado. Por outro lado, para as etapas 2 e 3, a queda da taxa de extração não foi tão acentuada e após 3 horas de extração aproximadamente 68 e 74 % do total de extrato SCEE e EE, respectivamente, haviam sido extraídos, indicando que o processo de extração provavelmente se apresentava na etapa de taxa de extração decrescente.

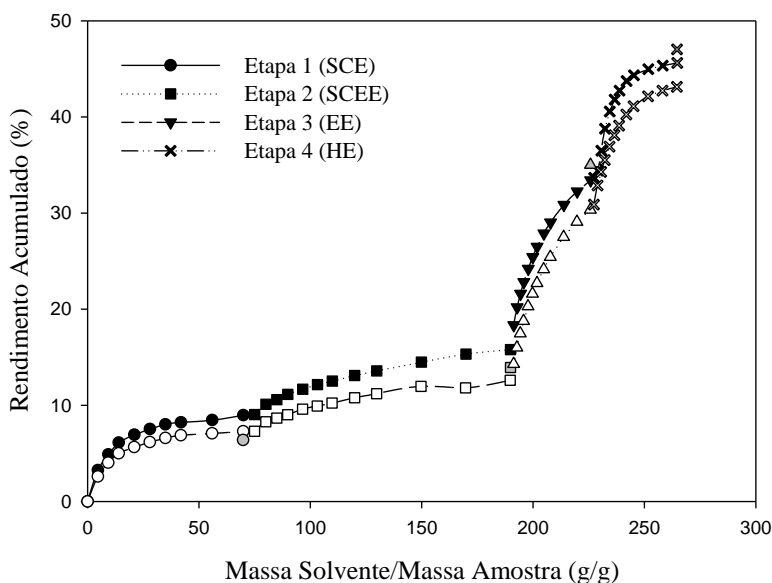


Figura 2 – Cinética de extração para frutos de *M. azedarach* em leito fixo a 300 bar e 50 °C.

3.2. Cromatografia em Camada Delgada

Os extratos obtidos foram caracterizados quanto ao perfil químico por CCD para verificar a seletividade dos solventes usados. Como referência foram utilizados extratos obtidos em sistema Soxhlet com acetato de etila e metanol (Figura 3, aplicações 1 e 2). As aplicações das referências indicam presença de quatro manchas (grupos de compostos) em frutos de *M. azedarach*, sendo elas I, II, III e IV. Conforme dados de tensão superficial (Tabela 2) pode-se observar que os menores valores de tensão superficial foram dos extratos SCEE e EE (26,9 e 30,7 mN.m⁻¹, respectivamente), indicando os compostos III e IV como possíveis saponinas.

Verificou-se um fracionamento parcial dos compostos presentes em *M. azedarach* através do processo sequencial em leito fixo proposto neste trabalho. No extrato supercrítico (SCE) foi observada presença de compostos apolares. Os extratos SCEE, EE e HE (Figura 3, aplicações 4, 5 e 6) apresentaram manchas codificadas por III e IV sendo que o extrato SCEE ainda continha compostos graxos (I). Os extratos EE e HE apresentaram composição química similar, porém no extrato EE verificou-se predominância da mancha codificada III.

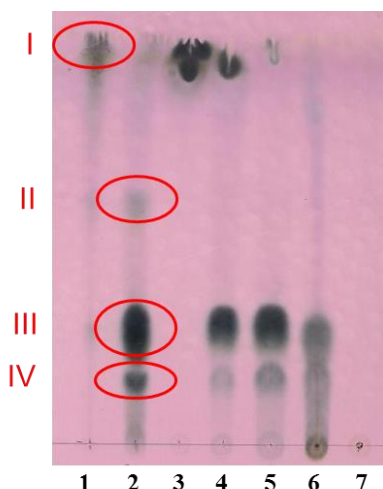


Figura 3 - Cromatograma (CCD) dos extratos de *M. azedarach*. Aplicação: 1: extrato acetato de etila por Soxhlet (referência); 2: extrato metanólico por Soxhlet (referência); 3: SCE; 4: SCEE; 5: EE; 6: HE; 7: resíduo final. Eluente: clorofórmio:metanol:ácido trifluoracético 0,5% (60:40:5). Detecção: solução de p-anisaldeído.

3.3. Tensão Superficial

Observou-se influência da concentração de todos os extratos na tensão superficial da solução (Tabela 2), sugerindo que a superfície das soluções a 20 g.L^{-1} ainda não se encontravam saturadas em saponinas (surfactantes naturais). Esta influência foi mais significativa no extrato SCEE, pois verificou-se variação da tensão superficial de 42 mN.m^{-1} para 27 mN.m^{-1} ao aumentar-se a concentração do extrato de 20 g.L^{-1} para 40 g.L^{-1} . Na concentração de 20 g.L^{-1} não foi verificada diferença nos valores de tensão superficial entre os extratos etanólicos e hidroalcoólicos (EE e HE), sendo estes capazes de reduzir a tensão superficial da água de aproximadamente 72 mN.m^{-1} para 43 mN.m^{-1} . Nas concentrações testadas o extrato supercrítico com etanol (SCEE) de *M. azedarach* mostrou melhor capacidade de redução da tensão superficial, sugerindo este extrato está enriquecidos em saponinas. Além disso, observou-se que, na concentração de 40 g.L^{-1} os extratos SCEE e EE apresentaram melhor capacidade de redução da tensão superficial, quando comparados ao dodecil sulfato de sódio, surfactante sintético utilizado como referência.

3.4. Fenóis e Flavonoides

A Tabela 2 apresenta os resultados referente ao teor de fenóis e flavonoides totais nos extratos de *M. azedarach*. Análises com o extrato supercrítico (SCE) não puderam ser realizadas devido à baixa solubilidade dos extratos em água. Nota-se que o comportamento dos extratos não se mostrou similar para as duas análises realizadas (fenóis e flavonoides totais). Além disso, os resultados indicam que a fração que apresentou maior teor de fenóis totais expressos em mg EAG/g extrato foi o extrato hidroalcoólico (HE), sendo este considerado com o teor de fenóis totais estatisticamente igual ao extrato obtido com scCO_2 + etanol (SCEE). Para a análise de teor de flavonoides totais, verifica-se que todos os extratos apresentaram médias diferentes, sendo

SCEE > HE > EE. Orhan *et al.* (2012a) verificaram a concentração de flavonoides totais em extratos convencionais de frutos de *M. azedarach*, expressos em equivalente de quercetina, e estes variaram de 20 a 75 mg EQ/g de extrato. Estes resultados são superiores aos encontrados nos extratos EE e HE, obtidos neste trabalho. De forma geral, a solução etanol/água (70:30 v/v) destacou-se em extrair compostos fenólicos de frutos de *M. azedarach* (maior rendimento) e obtendo extratos com elevada concentração de fenóis totais expressos em equivalente de ácido gálico.

3.5. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

Não foi detectada presença significativa de compostos voláteis nos extratos dos frutos de *M. azedarach*. Foi verificada, apenas, presença de ácidos graxos no extrato SCE-V, assim como no extrato SCE. No SCE-V, os ésteres derivados do ácido linoleico identificados corresponderam a aproximadamente 47 %, em área relativa, do total de extrato. Este resultado é coerente com dados encontrados na literatura, onde há relatos que o óleo proveniente de frutos de *M. azedarach* é constituído majoritariamente por ácido linoleico, representando 62,8 % da composição deste óleo (Orhan *et al.*, 2012b).

4. CONCLUSÕES

O extrato etanólico (EE) apresentou o maior rendimento de extração seguido de HE, SCE e SCEE. As análises por CCD mostraram que o processo de extração foi seletivo de acordo com a polaridade do solvente utilizado. Não foi detectada presença significativa de compostos voláteis em frutos de *M. azedarach*. SCEE apresentou maior redução da tensão superficial indicando presença de saponinas, e o extrato hidroalcoólico apresentou maior teor de compostos fenólicos. Resumidamente, o processo de extração sequencial em leito fixo utilizando solventes “verdes” mostrou ser uma boa alternativa ao uso de solventes orgânicos para extrair compostos de interesse presentes em *M. azedarach*.

5. REFERÊNCIAS

- AKIHISA, T.; PAN, X.; NAKAMURA, Y.; KIKUCHI, T.; TAKAHASHI, N.; MATSUMOTO, M.; OGIHARA, E.; FUKATSU, M.; KOIKE, K.; TOKUDA, H. Limonoids from the fruits of *Melia azedarach* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, v. 89, p. 59-70, 2013.
- ANDREI, G. M.; LAMPURI, J. S.; COTO, C. E.; DE TORRES, R. A. An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents Tacaribe virus encephalitis in mice. *Experientia*, v. 42, p. 843-845, 1986.
- AOAC. Official Methods Of Analysis. Washington, DC: Association Of Official Analytical Chemists, 1997.
- AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 6 ed. (Ca 23-55). AOCS Press Champaign, IL, 1998.
- AOUDIA, H.; OOMAH, B. D.; ZAIDI, F.; ZAIDI-YAHIAOUI, R.; DROVER, J. C. G.; HARRISON, J. E. Phenolics, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Melia azedarach* extracts. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, v. 6, p. 19-29, 2013.
- ASAE. Method of Determining and Expressing Fineness of Feed Materials by Sieving. American Society of Agricultural and Biological Engineers, 1997.

- CARPINELLA, M. C.; MIRANDA, M.; ALMIRÓN, W. R.; FERRAYOLI, C. G.; ALMEIDA, F. L.; PALACIOS, S. M. In vitro pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. J Am. Acad. Dermatol., v. 56, p. 250-256, 2007.
- GARMUS, T. T.; PAVIANI, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. J. Superc. Fluids, v. 86, p. 4-14, 2014.
- KHAN, A. V.; AHMED, Q. U.; MIR, M. R.; SHUKLA, I.; KHAN, A. A. Antibacterial efficacy of the seed extracts of *Melia azedarach* against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains. Asian Pac. J. Trop. Biomed., v. 1, p. 452-455, 2011.
- LORENZI, H. Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas. Inst. Plantarum de Estudos da Flora, 2003.
- MCKENNA, M. M.; ABOU-FAKHR HAMMAD, E. M.; FARRAN, M. T. Effect of *Melia azedarach* (Sapindales: *Meliaceae*) fruit extracts on Citrus Leafminer Phyllocnistis citrella (Lepidoptera: Gracillariidae). SpringerPlus, v. 2, 2013.
- ORHAN, I. E.; GUNER, E.; OZCELIK, B.; SENOL, F. S.; CAGLAR, S. S.; EMECEN, G.; KOCAK, O.; SENER, B. Assessment of antimicrobial, insecticidal and genotoxic effects of *Melia azedarach* L. (chinaberry) naturalized in Anatolia. Int. J. Food Sci. Nutr., v. 63, p. 560-565, 2012a.
- ORHAN, I. E.; GUNER, E.; OZTURK, N.; SENOL, F. S.; ERDEM, S. A.; KARTAL, M.; SENER, B. Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. Ind. Crop. Prod., v. 37, p. 213-218, 2012b.
- PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂ and CO₂/ethanol/water mixtures as solvents. J. Superc. Fluids, v. 81, p. 33-41, 2013.
- PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M.; DUARTE, G. H.; JORGE, M. P.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. J. Superc. Fluids, v. 86, p. 100-107, 2014.
- RAHMAN, M. S.; PERERA, C. O.; CHEN, X. D.; DRISCOLL, R. H.; POTLURI, P. L. Density, shrinkage and porosity of calamari mantle meat during air drying in a cabinet dryer as a function of water content. J. Food Eng., v. 30, p. 135-145, 1996.
- SCAPINELLO, J.; RIBEIROS, M. L.; TOMAZELLI JR, O.; CHIARADIA, L. A.; VLADIMIR, J.; OLIVEIRA, J. D. M. Effects of SFE *Melia azedarach* on the control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). III Iberoamerican Conf. Superc. Fluids, Cartagena de Indias, 2013.
- SEABRA, I. J.; BRAGA, M. E. M.; BATISTA, M. T.; DE SOUSA, H. C. Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. J. Superc. Fluids, v. 54, p. 145-152, 2010.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: (Ed.). Methods in Enzymology: Academic Press, v. 299, p.152-178, 1999.
- UQUICHE, E.; DEL VALLE, J. M.; ORTIZ, J. Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annuum* L.) oleoresin. J. Food Eng., v. 65, p. 55-66, 2004.
- ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem., v. 64, p. 555-559, 1999.
- YUAN, C. M.; ZHANG, Y.; TANG, G. H.; LI, Y.; HE, H. P.; LI, S. F.; HOU, L.; LI, X. Y.; DI, Y. T.; LI, S. L.; HUA, H. M.; HAO, X. J. Cytotoxic limonoids from *Melia azedarach*. Planta Med., v. 79, p. 163-168, 2013.

- WACHSMAN, M.; MARTINO, V.; GUTKIND, G. O.; COUSSIO, J. D.; COTO, C. E.; DE TORRES, R. A. Antiviral activity of a *Melia azedarach* plant extract. *Fitoterapia*, v. 53, p. 167-170, 1982.
- WACHSMAN, M. B.; CASTILLA, V.; COTO, C. E. Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. *Arch. Virol.*, v. 143, p. 581-590, 1998.