

TALAL SULEIMAN MAHMOUD

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE
GOMPHRENA ELEGANS MART. (AMARANTHACEAE)**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira

ARARAQUARA
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

M215e Mahmoud, Talal Suleiman
Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) / Talal Suleiman Mahmoud. – Araraquara : [s.n], 2010
246 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: José Eduardo de Oliveira

1. Química orgânica. 2. Fitoquímica. 3. Atividades biológicas. I. Título.

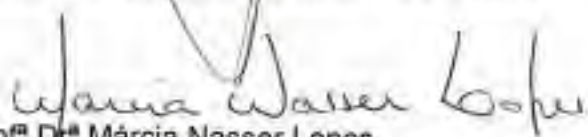
TALAL SULEIMAN MAHMOUD

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 29 de novembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof.ª Dr.ª Márcia Nasser Lopes
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara


Dr. Marcos Roberto Monteiro
Gerente da Fundação de Apoio Institucional ao Desenvolvimento Científico e
Tecnológico – CCDM, São Carlos


Prof.ª Dr.ª Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, Ribeirão Preto

DADOS CURRICULARES
TALAL SULEIMAN MAHMOUD

DADOS PESSOAIS

Nascimento 20/05/1966 - Maringá/PR - Brasil

Endereço eletrônico e-mail para contato : talalsuleiman@iq.unesp.br

e-mail alternativo : talalsuleiman1@hotmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Doutorado: Química, Área de concentração – Química orgânica

Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Química de Araraquara

Tese: Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Gomphrena elegans* Mart.
(Amaranthaceae)

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira

Bolsa: Fundect

Período: 05/03/2007

Mestrado: Química, Área de concentração – Química orgânica

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS. Departamento de Química

Dissertação: Estudos químicos da casca do caule de um espécime de *Tabebuia heptaphylla* (Bignoneaceae) que ocorre no Pantanal - MS, Ano de obtenção: 2005

Orientadora: Profa. Dr^a Fernanda Rodrigues Garcez

Bolsa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Período: 01/05/2003 – 01/04/2005

Graduação: Química - Licenciatura

Instituição: Universidade Estadual de Maringá, UEM

Período: 05/02/1997 – 15/12/ 2001

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

2005 - atual Vínculo: pesquisador colaborador, Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades:

11/2006 – 09/2007 Bolsista AT Capes

Participação em projetos:

03/2007 – 03/2010 Avaliação da Atividade Alelopática de *Gomphrena elegans* Mart (Amaranthaceae)– Uma Espécie Aquática Nativa de Mato Grosso do Sul Chamada FUNDECT/CAPES N° 05/2006.

03/2007 – 11/2010 Análise metabolômica e desreplicação de plantas nativas do Pantanal: Um estudo multidisciplinar visando a descoberta de novos fármacos e o uso racional de fitoterápicos Chamada FUNDECT/CAPES N° 07/2006.

05/2008 – 11/2010 Fitoquímica e ensaios de Atividade Antineoplásica, Prospecção Biomonitorada De Substâncias Ativas De Plantas Nativas De Mato Grosso Do Sul.

01/2005 – atual Bioprospecção de Substâncias Ativas de Plantas e Microrganismos Nativos de Mato Grosso do Sul – BIOPROSPECTAR.

2. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS

2005 - 2009 Vínculo: professor colaborador, Carga horária: 28

Atividades

Professor nas disciplinas de: Química Geral e inorgânica, Bioquímica, Química orgânica, Estágio Curricular Supervisionado I e Análise instrumental

2005 - 2009 Membro do conselho Comunitário Consultivo Ivinhema-MS

2005 - 2009 Membro do colegiado

Participação em projetos:

2009 - 2009 Semana de Ciência e Tecnologia: Espaços da Ciência.

2009 - 2009 Construção de Equipamentos de Laboratório com Materiais Alternativos.

2009 - 2009 Semana de Biologia: Conservar! Por quê?

2009 - 2009	Montagem de modelo tridimensional de células animal e vegetal, com material alternativo,
2009 - 2010	Conhecendo o mundo através da leitura
2008 - 2009	Estudo de extratos biomonitorado de <i>Gomphrena elegans</i> Mart. (Amaranthaceae) quanto ao efeito inseticida sobre <i>Aedes aegyptis</i>
2008 - 2008	Construção do Conhecimento Científicos e Reforço de Conteúdos que Envolvam Química.
2008 - 2008	Projeto de Ensino Manutenção do Horto de Plantas Medicinais de Ivinhema-MS
2008 - 2009	Horta escolar utilizada como laboratório vivo para a realização de aulas práticas
2007 - 2007	Horta escolar como um laboratório vivo e consorciamento de hortaliças com ervas medicinais.
2008 - 2009	Construção e Sociabilização do Conhecimento através de Formulação de Tensoativos
2007 - 2008	Construção de conceitos científicos, reforço e adequação do conteúdo para disciplinas que envolvam os conceitos de química junto aos discentes do curso de ciências biológicas.
2006 - 2007	Projeto: Socializando o conhecimento: Capacitação de monitores para as disciplinas que envolvem os conceitos de química junto ao curso de Ciências Biológicas.

3. Governo do Estado do Mato Grosso do Sul - GOVERNO/MS

2006 - 2007	Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: professor ensino médio, disciplina de química
-------------	---

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

1. SOUZA, A. P.; MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; CAPUTO, B. A.; CANHETE, G. M.; LEITE, C. B.; LIMA, D. P. Bioprospecting insecticidal compounds from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica.** , v.22, p.1136 - 1140, 2008.

2. GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MAHMOUD, T. S.; FIGUEIREDO, P. O.; RESENDE, U. M. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. **Química Nova**, v.30, p.1887 - 1891, 2007.
3. SCHUOFF, I. A., SANTOS, H. C. X. M., LIRANCO, E. S., MARTINS, O. L., MAHMOUD, T. S. MANDIOCULTURA: Atividade Fundamental Para os Produtores do Núcleo Lúcia Ivinhema-MS. RAT. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.3, p.1 - 2, 2007.
4. SOUZA, A. P.; MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; CANHETE, G. M., LEITE, C. B.; LIMA, D. P. Insecticidal Effect of Extracts from Native Plants of Mato Grosso do Sul State on *Sitophilus zeamais* Mots (Coleoptera: Curculionidae). **BioAssay**, v.5, p 1 -5, 2010.

Artigos aceitos para publicação

1. MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. O.; LOTUVO, L. V. C.; MAGUALHÃES, H. I. F.; MORAES M. O.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2011.

Livros publicados

1. MAHMOUD, T. S. Química Básica, Físico-química e orgânica, ed. UEMS, 2005, v. 1, 197 p.

Capítulos de livros publicados

1. MAHMOUD, T. S. Química In: Livro de Exercícios, ed. Campo Grande: Imprensa Oficial, 2003, v.1, p. 75-98.

Artigos em jornal de notícias online

1. MAHMOUD, T. S. Portal da Educação. SED-MS, www.sed.me.gov.br/index.php?templant=vic&site=98&id_comp=265&id_reg=152&voItar=lista&site_reg=98&id_comp_orig=265, 2006

Apresentação de Palestras e mini curso

1. MAHMOUD, T. S. Cromatografia básica, mini-curso, UEMS-Ivinhema, 2009
2. MAHMOUD, T. S. Cromatografia básica mini-curso, UEMS-Ivinhema, 2009
3. MAHMOUD, T. S. Poluição Ambiental através de Tensoativos, Palestra,

1ª.Semana do Meio Ambiente - Vivendo a diversidade na escola, Ivinhema, 2007

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

(PERÍODO: 2006/2010)

1. MAHMOUD, T. S.; SANTOS, A. H.; SCHUROFF, I. A.; SANTOS, H. C. X. M. Avaliação do efeito de hormônio natural, sintético e indutor no Desenvolvimento da primeira fase de brotação das estacas de *Manihot esculenta* Crantz In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2009, Botucatu. RAT - Revista Raizes e Amidos Tropicais. Botucatu-SP: CERAT/UNESP, 2009. p. 621– 25.
2. SCHUROFF, I. A.; LIRANCO, E. S.; SANTOS, H. C. X. M.; LIRANCO, E. S.; MAHMOUD, T. S. Identificação Dos Fatores Externos Que Ocasionam Ameaças No Setor Mandioquero No Município De Ivinhema-Ms In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, Botucatu. RAT - Revista de amidos Tropicais. Botucatu: CERAT/Unesp, 2009. p.1091-1095
3. MAHMOUD, T. S.; SOUZA, A. P.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; PESSOA, C. O.; BEATRIZ, A.; BOLZANI, V. S. Atividade Antineoplásica de Extratos de Plantas Nativas de Mato Grosso do Sul In: 10º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul, 2007, Dourados: UFGD, 2007. v.1. p.1.
4. MAHMOUD, T. S., SOUZA, A. P.; SANTOS, H. C. X. M.; FERMINO, H. B.; SOUZA, J. G. Consorciamento de hortaliça com erva medicinal e horta como laboratório vivo In: II Seminário Povos Indígenas e Sustentabilidade, 2007, Campo Grande: UCDB, 2007. v.1. p.2
5. SOUZA, A. P.; SANTOS, M. C.; AMARAL, P. P.; MAHMOUD, T. S.; SOUZA, J. G.; SANTOS, H. C. X. M. O Ecoturismo no Pantanal: Sustentabilidade Social e Ambiental In: II Seminário Povos Indígenas e Sustentabilidade, 2007, Campo Grande: UCDB, 2007. v.1. p.8

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

(PERÍODO: 2006/2010)

1. MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R. ; SOUZA, A. P.; LIMA, D. P.; PESSOA, C. O.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. Avaliação das atividades citotóxica, inseticida e fungicida de *Gomphrena elegans* Mart. Var. *elegans* (Amaranthaceae). In: 13º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul, Dourados: UFGD, 2010
2. MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. Análise química de frações apolares de *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae). In: 13º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul, Dourados : UFGD, 2010.
3. COSTA, D. M. B.; MORAIS, G. A.; MAHMOUD, T. S. A perspectiva da população de Ivinhema-MS em relação ao processo de compostagem. In: 13º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul, Dourados: UFGD, 2010
4. VERÇOSA, D.; SANTOS, H. C. X. M.; VIEIRA, L. B.; MAHMOUD, T. S. Avaliação da atuação de extrato do tubérculo de *Cyperus rotundus*; do ácido indol butírico, e

de adubo foliar na indução de raízes e abscisão foliar em *Plectranthus* sp In: 60ª Reunião Anual da SBPC, Campinas: SBPC/UNICAMP, 2008.

5. SANTOS, H. C. X. M.; VERÇOSA, D.; SCHUOFF, I. A.; MAHMOUD, T. S. Um Ambiente Equilibrado: Consequência da Percepção Ambiental na Escola In: 60ª Reunião Anual da SBPC, Campinas: SBPC/UNICAMP, 2008.

6. SANTOS, H. C. X. M.; SÁ, V. A.; MORAIS, G. A.; MAHMOUD, T. S. A utilização de plantas medicinais por funcionários da Escola Municipal Professor Sideney Carlos Costa, Ivinhema – MS. In: 10º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. Dourados: UFGD, 2007. v.1. p.1

7. SANTOS, H. C. X. M.; SÁ, V. A.; MAHMOUD, T. S.; MARTOS, M. X. Horta escolar como Laboratório vivo e consorciamento de hortaliça com ervas medicinais na Escola Municipal Professor Sideney Carlos Costa de Ivinhema-MS In: 10º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. Dourados: UFGD, 2007. v.1. p.2

8. SÁ, V. A.; SANTOS, H. C. X. M.; MORAIS, G. A.; MAHMOUD, T. S. Plantas Medicinais utilizadas por alunos do 3ºano do ensino médio em Ivinhema-MS In: 10º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul. Dourados: UFGD, 2007. v.1. p.1

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

(PERÍODO: 2006/2010)

1. MAHMOUD, T. S.; SOUZA, D. T. F.; VERÇOSA, D.; SANTOS, H. C. X. M.; SAUDA NETO, P.; PEREIRA, L. A. Construção Do Conhecimento Científico E Reforço De Conteúdos Que Envolvam Química In: 19º Congresso de Biólogos do CRBio-01, São Pedro - SP 2009.

2. MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; SOUZA, A. P.; BEATRIZ, A.; LIMA, D. P.; MORAIS, G. A.; MORIYA, M. R.; GUILHERME, F. M.; VERÇOSA, D.; GOMES, L. S. M.; SANTOS, H. C. X. M.; GOMES, M. S. M. Efeito de extratos de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) e *Annona dioica* (annonaceae) sobre larvas de *aedes aegypti* In: 119º Congresso de Biólogos do CRBio-01, São Pedro - SP 2009.

3. SCHUOFF, I. A.; SANTOS, H. C. X. M.; SCHUOFF, E.; MIRANDA, D.; LIRANCO, E. S.; MAHMOUD, T. S. Produção de leite no Município de Ivinhema-MS. In: 4º congresso Brasileiro de Extensão Universitária, 2009, Dourados. Tecnologias sociais e inclusão: caminhos para a extensão universitária. Dourados: UFGD, 2009.

4. MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; LEITE, C. B.; EMERY, F. S.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.. Allelopathic Activity of extracts from Vegetal Species Native to Cerrado and Patanal of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - X Internacional Congress of Ethnopharmacology, São Paulo, 2008.

5. LEITE, C. B.; MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; EMERY, F. S. Atividade Antifúngica de extratos de *Annona dioica* St.Hil.- (ANNONACEAE) In: 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal, 2008.

6. MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; EMERY, F. S.; LIMA, D.

- P.; BEATRIZ, A.; PESSOA, C. O. Cytotoxic and antifungic activity of Extracts from Plants Native to Mato Grosso do Sul, Brazil In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - X Internacional Congress of Ethnopharmacology, São Paulo, 2008.
7. MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; EMERY, F. S.; MARQUES, M. R.; LEITE, C. B.; LIMA, D. P. Perfil Químico e Atividades Biológicas de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae). In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2008.
8. LEITE, C. B.; MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; EMERY, F. S. Potencial Alelopático de Diferentes Órgãos de *Annona dioica* St.Hil.-ANNONACEAE In: 59º Congresso Nacional de Botânica, 2008, Natal, 2008.
9. LEITE, C. B.; RESENDE, G. M.; MAHMOUD, T. S.; SOUZA, A. P.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A.; MARQUES, M. R. Atividade Alelopática de Plantas Nativas do Cerrado de Mato Grosso do Sul In: 58º Congresso Nacional de Botânica, São Paulo, 2007.
10. MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; EMERY, F. S.; MARQUES, M. R.; RESENDE, G. M.; LEITE, C. B.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A. Otimização das Técnicas de Extração de Metabólitos Secundários de Espécies Vegetais Nativas do Pantanal Sul-Matogrossense. Interbio - Faculdades de Ciências Biológicas e da Saúde. , v.1, p.87, 2007.
10. SANTOS, H. C. X. M.; SÁ, V. A.; SANTOS, S. A.; OLIVEIRA, C.; MAHMOUD, T. S. Avaliação da Utilização de Fitoterápicos por Indivíduos do Centro de Convivência do Idoso de Ivinhema – MS In: 18º Encontro De Biólogos do CRBio-01, Cuiaba, 2007.
11. PIMENTEL, A. A.; MAHMOUD, T. S.; VERÇOSA, D.; LEAL, F. C.; SILVA, L. A. P. Construção e Sociabilização do Conhecimento Através de Formulação de Tensoativos In: 18º Encontro De Biólogos do CRBio-01, Cuiaba, 2007.
12. MAHMOUD, T. S.; BOLZANI, V. S.; EMERY, F. S.; MARQUES, M. R.; RESENDE, G. M.; LEITE, C. B.; LIMA, D. P.; BEATRIZ, A. Otimização das Técnicas de Extração de Metabólitos Secundários de Espécies Vegetais Nativas do Pantanal Sul-Matogrossense In: CONFARMS, Livro de Resumos CONFARMS, Bonito-MS, 2007.
13. MORAIS, G. A.; SANTOS, H. C. X. M.; SCHUROFF, I. A.; MAGRI, M. G. S., MAHMOUD, T. S. 1ª. Semana do Meio Ambiente - Vivendo a diversidade na escola In: II Encontro de Extensão Universitária da UFMS e I Seminário de Extensão Universitária da Região Centro-Oeste, Campo Grande 2007.
14. LEITE, C. B.; MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; FRANCISCHINELLI, R. V.. Atividade Alelopática de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) – Uma Espécie Aquática Nativa da Região de Bonito (MS) In: 57º Congresso Brasileiro de Botânica, Gramado, 2006.
15. SOARES, M. A. A.; SORGATTO, M.; MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; FRANCISCHINELLI, R. V. Atividade Fungitóxica de Extratos de Espécies Nativas do Mato Grosso do Sul. In: 57º Congresso Brasileiro de Botânica, Gramado, 2006.
16. LEITE, C. B.; MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; FRANCISCHINELLI, R. V. Atividade Herbicida de Extratos de Casca do Caule e de Folhas de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) In: 57º Congresso Brasileiro de Botânica, Gramado, 2006.

17. SOUZA, A. P.; MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; CAPUTO, B. A.; MARCARI, G.; LEITE, C. B. Bioprospecção de Substâncias Inseticidas de Plantas Nativas de Mato Grosso do Sul Sobre o Gorgulho-do-Milho(*Sitophilus zeamais*) Mots In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, Recife, 2006.

Participação em eventos

1. Apresentação de Paineis no 4º Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, Produção De Leite No Município De Ivinhema - Ms. 2009
2. Apresentação de Paineis no XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil - X International Congress of Ethnopharmacology, Allelopathic Activity of Extracts from Vegetal Species Native to Cerrado and Pantanal of State of Mato Grosso do Sul, Brazil. 2008
3. Apresentação de Paineis na 60ª Reunião Anual da SBPC, Avaliação da atuação de extrato do tubérculo de *Cyperus rotundus*; do ácido indol butírico, e de adubo foliar na indução de raízes em *Plectranthus* sp., 2008.
4. Apresentação de Paineis na 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Perfil Químico e Atividades Biológicas de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae), 2008.
5. Apresentação de Paineis no 59º Congresso Nacional de Botânica, Potencial Alelopático de diferentes órgãos de *Annona dioica* ST. Hil – Annonaceae, 2008.
6. VIII Semana de Biologia de Ivinhema, 2008.(Seminário)
7. Apresentação de Paineis na 58º Congresso Nacional de Botânica, Atividade Alelopática de Plantas Nativas do Cerrado de Mato Grosso do Sul, 2007.
8. Apresentação de Paineis no 10º Workshop de Plantas Medicinais de Mato Grosso do Sul, Atividade antineoplásica de Extratos de Plantas Nativas de Mato Grosso do Sul, 2007.
9. Apresentação na Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, Combustão em recipientes fechados, UEMS-Ivinhema, 2007.
10. Apresentação de Paineis na CONFARMS, Otimização das Técnicas de Extração de Metabólitos Secundários de Espécies Vegetais Nativas do Pantanal Sul-Matogrossense 2007.
11. Apresentação de Paineis no II Encontro de Extensão Universitária da UFMS, 1ª Semana do Meio Ambiente - Vivendo a diversidade na escola, 2007.
12. Apresentação do Projeto de Informação e Integração do Calouro UEMS – PROINCA. Projeto de Informação e Integração do Calouro UEMS - PROINCA UEMS-Ivinhema, 2006.
13. 9º Encontro de Professores da UEMS - Um Salto Para a Pós Graduação Stricto Sensu, UEMS-Dourados, 2006.

Orientações concluídas

Dissertação de mestrado : co-orientador

1. Carla Braga Leite. Avaliação Do Potencial Alelopático De Gomphrena Elegans Mart (Amaranthaceae) - Uma Espécie Aquática Nativa De Mato Grosso Do Sul.. Dissertação (Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2009

Trabalhos de conclusão de curso de graduação: orientador

1. Onofra Maria Breguedo. Análise dos tratamentos das águas residuais de um frigorífico de abate de bovinos na cidade de Batayporã - MS. Biologia-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008
2. Diomar Verçosa. Avaliação da atuação de extrato do tubérculo de *Cyperus rotundus*; do ácido indol butírico, e do fertilizante foliar na indução de raízes e brotos em *Plectranthus* sp. MS. Biologia-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008
3. Heloisa Carla Xavier Marthos dos Santos. Avaliação da percepção ambiental de alunos do ensino fundamental em Ivinhema-MS. MS. MS. Biologia-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008
4. Rafael José Serraglio. Levantamento de dados sobre a infestação da broca *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1874(Lepidóptera) nas variedades de cana-de-açúcar SP-801842 e RB 867515 DE CANA DE AÇUCAR e seu método de controle biológico por *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891)(Hymenoptera MS. Biologia-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008
5. Alessandro Hidalgo Santos. Aplicação do extrato do tubérculo de tiririca (CYPERUS ROTUNDUS) em manivas de mandioca (MANIHOT ESCULENTA), na influencia do crescimento de raízes adventícias na 1.^a fase de vida. MS. Biologia-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007.
6. Adriane Araújo Pimentel. Avaliação da metodologia de tratamento de água da Estação de Tratamento de Água (E.T.A) Cecília Leite, no Município de Dourados-MS e sua influência no Impacto Ambiental. Biologia-Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007.

Orientação de outra natureza

1. Claudia Macedo Nazaro. monitoria na disciplina de Química Geral e Inorgânica. (Biologia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
2. Paulo Sauda Neto. monitoria na disciplina de Química Geral e Inorgânica, (Biologia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
3. Fábio Ederson Lopes Correa. monitoria disciplina química orgânica. (Biologia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007.
4. Diogo Freitas Souza. monitoria na disciplina de química geral e inorgânica. (Biologia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007.

5. Paulo Sauda Neto. monitoria na disciplina de química geral e inorgânica. (Biologia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007.
6. Heloisa Carla Xavier Marthos dos Santos. Projeto de extensão: Horta escolar como um laboratório vivo e consorciamento de hortaliças com ervas medicinais. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007.
7. Heloisa Carla Xavier Marthos dos Santos. Projeto de extensão: Horta escolar utilizada como laboratório vivo para a realização de aulas práticas. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006
8. Magali Goreti da Silva Magri. Projeto de extensão: Construção e Sociabilização do Conhecimento através de Formulação de Tensoativos. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006
9. Lucilene Anita Pereira silva. Projeto de extensão: Construção e Sociabilização do Conhecimento através de Formulação de Tensoativos. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006
10. Heloisa Carla Xavier Marthos dos Santos. Monitoria de Química Orgânica. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
11. Camila Fernanda da Silva. Monitoria: orientação de química geral. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
12. Diomar Verçosa. Monitoria: Química Geral e Inorgânica. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
13. Adriane Araújo Pimentel. Projeto de extensão: Construção e Sociabilização do Conhecimento através de Formulação de Tensoativos. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
14. Diomar Verçosa. Projeto de extensão: Construção e Sociabilização do Conhecimento através de Formulação de Tensoativos Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
15. Fabio César Leal. Projeto de extensão: Construção e Sociabilização do Conhecimento através de Formulação de Tensoativos. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
16. Carlos Remy Leite Walker. Projeto de pesquisa: Prospecção Biomonitorada de Substâncias Ativas de Plantas Nativas de Mato Grosso do Sul. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.
17. Rosa Valeria Francischinelli. Projeto de pesquisa: Prospecção Biomonitorada de Substâncias Ativas de Plantas Nativas de Mato Grosso do Sul. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006

Orientações e Supervisões em andamento

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Deisiany Mayara Betineli da Costa. Compostagem como forma de minimizar os problemas ambientais. Curso (Biologia) - Universidade Estadual de Mato Grosso do

Sul, 2009

Participação em banca de trabalhos de conclusão de curso (Graduação)

1. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; VIEIRA, L. B. Participação em banca de Onofra Maria Bregueto. Análise dos tratamentos das águas residuárias de um frigorífico de abate de bovinos na cidade de Batayporã-MS, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
2. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; VIEIRA, L. B.. Participação em banca de Diomar Verçosa. Avaliação da atuação de extrato do tubérculo de *Cyperus rotundus*; do ácido indol butírico, e do fertilizante foliar na indução de raízes e brotos em *Plectranthus* sp, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
3. MAHMOUD, T. S.; MORIYA, M. R.; MORAIS, G. A. Participação em banca de Heloisa Carla Xavier Marthos dos Santos. Avaliação da percepção ambiental de alunos do Ensino Fundamental em Ivinhema-MS, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
4. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; MORIYA, M. R. Participação em banca de Rafael José Serraglio. Levantamento de dados sobre a infestação da broca *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1874(Lepidóptera) nas variedades de cana-de-açúcar SP-801842 e RB 867515 de cana-de-açúcar e seu método de controle biológico por *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891)(Hymenoptera), Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
5. MORAIS, G. A.; VIEIRA, L. B., MAHMOUD, T. S. Participação em banca de Maria do Carmo Silva. Percepção dos trabalhadores rurais da Gleba Ubiratã em relação à utilização de produtos químicos de origem industrial, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2008.
6. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; VIEIRA, L. B. Participação em banca de Adriane Araújo Pimentel. Avaliação da metodologia de tratamento de água da estação de tratamento de água(ETA) Cecília Leite Kirchener no Município de Dourados, MS, e sua influência no impacto ambiental, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007
7. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; VIEIRA, L. B. Participação em banca de Alessandro Hidalgo Santos. Efeito da auxina natural e sintética (*Cyperus rotundus* e ácido indol butírico) e do fertilizante foliar (Nitrogênio e Zinco) na primeira fase de brotação das estacas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2007
8. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; SANTIAGO, E. F. Participação em banca de Antonio Carlos Polatto. Efeito do sombreamento sobre a emergência e desenvolvimento inicial do Cupuazeiro, *Theobroma grandiflorum* (Willd), Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
9. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; SANTIAGO, E. F Participação em banca de Ana Paula Gomes Polatto. Efeito do sombreamento sobre emergência e desenvolvimento inicial do Cedro rosa, *Cedrela fissilis* Vellozo (Meliaceae), Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.
10. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; SANTIAGO, E. F Participação em banca de

Rosângela Andreu Barbi. Germinação de sementes de *Cassia leiandra*, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.

11. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; SANTIAGO, E. F Participação em banca de Juvenal Sorana Gomes. Germinação, emergência e desenvolvimento inicial de *Pterogyne nitens*, Biologia Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2006.

Revisor

1. UEMS Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação divisão de pesquisa

Organização de evento

1. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; MAGRI, M. S.; CARDOSO, A. C. Semana de Biologia: Conservar! Por quê?,UEMS-Ivinhema, 2009

2. MAHMOUD, T. S.; MORAIS, G. A.; MAGRI, M. S.; CARDOSO, A. C. Semana de Ciência e Tecnologia: Espaços da Ciência, UEMS-Ivinhema, 2009.

3. SANTOS, H. C. X. M., MAGRI, M. G. S.; MAHMOUD, T. S. 1a.Semana do Meio Ambiente - Vivendo a diversidade na escola, UEMS-Ivinhema, 2007.

Prêmios e títulos

2010	Homenagem da Câmara Municipal de Campo Grande-MS.
2009	Homenagem dos formandos de 2009. Ciências Biológicas, UEMS-Ivinhema, Paraninfo.
2007	Homenagem dos formandos de 2006. Ciências Biológicas, UEMS-Ivinhema.

*Dedico este trabalho a minha família
pela paciência e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo incentivo, companheirismo, amor e amizade dedicados a mim antes e durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira, por me aceitar como seu orientado, por acreditar em minha pessoa, por sua paciência e ensinamentos.

À Fazenda São Geraldo pela autorização e apoio logístico fornecido para a realização das coletas.

Ao Prof. Dr. Aristeu Gomes Tininis pela ajuda dispensada.

Ao Prof. Dr. Danilo Luiz Flumignan pelo auxílio fornecido no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Ali Suleiman Mahmoud pelo auxílio nas correções das traduções dos textos dos artigos para o idioma inglês.

À Prof^a. Dr^a. Maria Rita Marques e ao Prof. Dr. Dênis Pires de Lima, pelos ensinamentos dispensados, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Ma. Leila Carvalho da Costa, pela identificação e depósito em herbário da espécie vegetal apresentada neste trabalho.

Aos colegas e amigos da república IQ-Zueira, João Batista, Luciano, Juliano, Magno, Emerson e Jorge, que me receberam de braços abertos, e que dentro de suas áreas de conhecimento me auxiliaram nas dúvidas por vezes surgidas neste trabalho.

Aos colegas e colaboradores Heloisa Carla, Diomar, Magno, Carla, Glenda e Carlos, pelo auxílio no desenvolvimento dos projetos relacionados a este trabalho.

Aos funcionários e técnicos do DQI-UFMS e IQ/Araraquara, pelos serviços disponibilizados.

À equipe da biblioteca do Instituto de Química de Araraquara, e a equipe de funcionários da seção de pós-graduação pelo excelente trabalho que desenvolvem e pelo suporte técnico fornecido a esse trabalho.

Ao Centro de Monitoramento e Pesquisa da Qualidade de Combustíveis, Petróleo e Derivados (CEMPEQC), pelo suporte financeiro.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pela bolsa concedida.

“Posso duvidar às vezes de minha capacidade, mas
isso não me faz desistir de meus objetivos”

Talal Suleiman Mahmoud

“Nenhum homem realmente produtivo pensa
como se estivesse escrevendo
uma dissertação.”

Albert Einstein
1879 - 1955

“A ciência de vencer é, contudo, fácilima de expor; em aplicá-la, ou não, é que está o segredo do êxito ou a explicação da falta dele. Para vencer - material ou imaterialmente - três coisas definíveis são precisas: saber trabalhar, aproveitar oportunidades, e criar relações. O resto pertence ao elemento indefinível, mas real, a que, à falta de melhor nome, se chama sorte. Não é o trabalho, mas o saber trabalhar, que é o segredo do êxito no trabalho. Saber trabalhar quer dizer: não fazer um esforço inútil, persistir no esforço até o fim, e saber reconstruir uma orientação quando se verificou que ela era, ou se tornou, errada. Aproveitar oportunidades quer dizer não só não as perder, mas também achá-las. Criar relações tem dois sentidos - um para a vida material, outro para a vida mental. Na vida material a expressão tem o seu sentido direto. Na vida mental significa criar cultura. A história não registra um grande triunfador material isolado, nem um grande triunfador mental inculto. Da simples "vontade" vivem só os pequenos comerciantes; da simples "inspiração" vivem só os pequenos poetas. A lei é uma para todos.”

Fernando Pessoa

1888-1935

RESUMO

O trabalho descreve a identificação, isolamento, elucidação estrutural de constituintes químicos de *Gomphrena elegans*, bem como a avaliação do perfil químico e a avaliação das potenciais atividades antineoplásica, alelopática, inseticida e antifúngica dos extratos dessa espécie provenientes de coleta realizada em março de 2007. As extrações das substâncias orgânicas foram feitas por sonicação durante 120 minutos e o sistema de solvente mais favorável foi hexano, clorofórmio, metanol e água. Os estudos fitoquímicos dos extratos das folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia resultaram na identificação de 54 substâncias naturais pertencentes a classes distintas e o sal KNO_3 . A cromatografia CG-EM dos extratos hexânicos permitiu identificar 37 substâncias sendo: 14 alcanos (pentadecano, hexadecano, heptadecano, octadecano, nonadecano, 3-etil-5-(2-etilbutil)-octadecano, eicosano, docosano, tricosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano e nonacosano); 7 alcenos (1-hexadeceno, 1-octadeceno, 3-eicoseno, 8-metil-1-deceno, 9-eicoseno, docoseno e 1-hexacoseno); 8 ésteres (palmitato de metila, palmitato de etila, linoleato de metila, linolenato de metila, 6-octadecenoato de metila, linoleolato de etila, linolenato de etila e 9-octadecenoato de etila); 1 aromático (diisobutil ftalato); 4 terpenos (dihidroactinidiolide, 7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadec-1-eno, laurenan-2-ona e esqualeno); 1 álcool (1-hexadecanol) e 2 cetona (6,10,14-trimetil-2-pentadecanona e 7,9-di-ter-butyl-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-2,8-diona). Os extratos clorofórmicos, metanólico e aquoso possibilitaram o isolamento de 20 substâncias sendo: 3 esteróides (β -sitostenona, β -sitosterol e 5α -estigmasta-7,22-dien-3 β -ol); 2 terpenos (jatrofona e esqualeno); 6 ésteres (9-octadecenoato de etila, hexadecanoato de etila, hexadecanoato de metila, hexadecanoato de butila, octadecanoato de metila e 8-octadecenoato de metila); 1 ácido (ácido hexadecanóico); 2 alcalóides (uridina e pirimidina-2,4(1H,3H)-diona); 5 derivados de $\text{C}_6\text{-C}_1$ (ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-metoxibenzóico, ácido 3,4-dimetoxibenzóico e di-(2-etil)-hexil ftalato) e 1 derivado de $\text{C}_6\text{-C}_3$ (3-(4-hidróxi-3-metóxfenil)propenóico). Os extratos aquosos do caule aéreo, caule emerso, raiz adventícia e folha exibiram forte atividade antifúngica para *Cladosporium sphaerospermum* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos hexânicos do caule aéreo e da folha apresentaram inibição moderada e o sal KNO_3 apresentou forte inibição na germinação de sementes de *Lactuca sativa*.

Somente os extratos hexânico e aquoso da folha apresentaram citotoxicidade *in vitro* nas linhagens, HCT-8, SF-295 e MDA-MB-435 pelo método MTT. Todos os extratos foram inativos sobre larvas de *Aedes aegypti*, já sobre adultos de *Sitophilus zeamais*, os extratos clorofórmico do caule aéreo e raiz adventícia e aquosa do caule aéreo e folha apresentaram atividade moderada após o décimo dia. As análises dos componentes em diferentes estações, depois de realizadas três coletas (março e agosto de 2007 e fevereiro de 2008), demonstraram variação significativa nos rendimentos dos extratos. Os perfis químicos, obtidos por CG-EM, dos extratos hexânicos das três coletas indicaram que as coletas 2 e 3 resultaram em extratos mais ricos em esteróides e triterpenos. Os perfis químicos, obtidos por CLAE-AFD, dos extratos de clorofórmio, metanol e água apresentaram diferença apenas entre as intensidades dos sinais cromatográficos. Apesar das substâncias identificadas e isoladas serem conhecidas, nenhuma havia ainda sido descrita na espécie *G. elegans*. Portanto, os estudos desse trabalho são um ponto de partida para outros, que poderão auxiliar na compreensão sobre a ocorrência, distribuição, regulação da biossíntese, bem como em estudos quimiosistemáticos da espécie *Gomphrena elegans*.

Palavras-chave: *Gomphrena elegans*. Amaranthaceae. Alcano. Alceno. Ésteres. Terpeno. Álcool. Cetona. Esteróide. Ácido. Alcalóide. C₆-C₁. C₆-C₃. *Aedes aegypti*. *Sitophilus zeamais*. *Cladosporium sphaerospermum*. Carcinoma de cólon humano. Glioblastoma. Melanoma.

Abstract

This work describes the identification, isolation and the structure of *Gomphrena elegans* chemical components. It also assesses the chemical profile and potential anticancer, allelopathic, insecticidal and antifungal activity of extracts from this species, collected in March 2007. Organic compounds were extracted through sonication during 120 minutes. The most favorable solvent system was: hexane, chloroform, methanol and water. The extracts phytochemical studies (from leaves, aerial stem, submerge stem and adventitious root) identified 54 natural substances from different classes and the KNO_3 salt. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) of hexane extracts identified 37 substances: 14 alkanes (pentadecane, hexadecane, heptadecane, octadecane, nonadecane, 3-ethyl-5-(2-ethyl-butyl)-octadecane, eicosane, docosane, tricosane, tetracosane, pentacosane, hexacosane, heptacosane and nonacosane); 7 alkenes (1-hexadecene, 1-octadecene, 3-eicosene, 8-methyl-1-decene, 9-eicosene, docosene and 1-hexacosene); 8 esters (methyl palmitate, ethyl palmitate, methyl linoleate, methyl linolenate, 6-octadecenoate methyl, ethyl linoleolate, ethyl linolenate and 9-octadecenoate ethyl); 1 aromatic (diisobutyl phthalate); 4 terpenes (dihydroactinidiolide, 7,11,15-trimethyl-3-methylene-hexadeca-1-ene, laurenan-2-one and squalene); 1 alcohol (1-hexadecanol) and 2 ketones (6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone and 7,9-di-tert-butyl-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-2,8-dione). The chloroform, methanol and water extracts allowed the isolation of 20 substances, as follows: 3 steroids (β -sitostenone, β -sitosterol and 5α -Stigmasta-7,22-dien-3 β -ol); 2 terpenes (jatrophone and squalene); 6 esters (ethyl 9-octadecenoate, ethyl hexadecanoate, methyl hexadecanoate, butyl hexadecanoate, methyl octadecanoate and methyl 8-octadecenoate); 1 acid (hexadecanoic acid), 2 alkaloids (uridine and pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione), 5 derived $\text{C}_6\text{-C}_1$ (3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-methoxybenzoic acid, 3,4-dimethoxybenzoic and di-(2-ethylhexyl) phthalate, and 1 derived $\text{C}_6\text{-C}_3$ (3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propenoic). The water extracts (aerial stem, submerged stem, adventitious root and leaf) showed strong antifungal activity to *Cladosporium sphaerospermum* at 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration. Hexane extracts (aerial stem and leaf) showed moderate inhibition; KNO_3 salt showed strong inhibition on *Lactuca sativa* germination. The hexane and aqueous extracts of leaves were the only to show *in vitro* cytotoxic

against HCT-8, SF-295 and MDA-MB-435 lineages by MTT assay. All extracts were inactive on *Aedes aegypti* larvae; however, on *Sitophilus zeamais* adults, the chloroform (aerial stem and adventitious root) and water extracts (aerial stems and leaves) showed a moderate activity after the tenth day. The compounds analysis in different seasons, collected three times (March and August 2007 and February 2008), showed a significant variation in the extracts yields. The chemical profiles (GC-MS) of 03 hexane extracts samples indicated that samples 2 and 3 were richer in steroids and triterpenes. The HPLC-PDA chemical profiles of chloroform, methanol and water extracts just showed a difference on the chromatographic signals intensity. Although the isolated and identified substances are already known, no one had yet been reported for the *G. elegans species*. Therefore, this is a starting point for further studies, which may assist in understanding the occurrence, distribution, biosynthesis regulation, as well as in chemosystematic studies of the *Gomphrena elegans species*.

Keywords: *Gomphrena elegans*. Amaranthaceae. Alkane. Alkene. Esters. Terpene. Alcohol. Ketone. Steroid. Acid. Alkali. C₆-C₁.C₆-C₃. *Aedes aegypti*. *Sitophilus zeamais*. *Cladosporium sphaerospermum*. Human colon carcinoma. Glioblastoma. Melanoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Substâncias isoladas da espécie <i>G. macrocephala</i>	41
Figura 2.	Fitoecdisteróides encontrados em várias espécies do gênero <i>Gomphrena</i> ssp.....	42
Figura 3.	Betalaínas isoladas da espécie <i>G. globosa</i>	42
Figura 4.	Alcalóides poliamídicos obtidos em espécies do gênero <i>G. globosa</i>	43
Figura 5.	Substâncias isoladas da espécie <i>G. clausenii</i> Moq.	44
Figura 6.	A - Detalhe da folha e caule emerso de <i>G. elegans</i> . B - Detalhe do caule submerso e raiz adventícia de <i>Gomphrena elegans</i> . C - Banco de macrófitas aquáticas, com predomínio de <i>G. elegans</i> no leito do rio sucúri (Foto: Paulo Robson de Souza).....	46
Figura 7.	Fluxograma dos procedimentos para obtenção dos extratos.	55
Figura 8.	Obtenção dos extratos a partir dos tratamentos nos extratos brutos das folhas, caule aéreo e caule submerso da espécie <i>G. elegans</i>	60
Figura 9.	Fracionamento dos extratos da folha da espécie <i>G. elegans</i> (Col1).....	62
Figura 10.	Fracionamento dos extratos do caule aéreo da espécie <i>G. elegans</i> (Col1).....	62
Figura 11.	Fracionamento dos extratos do caule submerso da espécie <i>G. elegans</i> (Col1).....	63
Figura 12.	Extratos da raiz adventícia da espécie <i>G. elegans</i> (Col1).....	63
Figura 13.	Fracionamento do extrato hexânico obtido do extrato GF2 da Folha de <i>G. elegans</i>	66
Figura 14.	Fracionamento do extrato acetato de etila obtido do extrato bruto clorofórmico da Folha de <i>G. elegans</i>	68
Figura 15.	Fracionamento do extrato <i>n</i> -butanol obtido do extrato GF3 de <i>G. elegans</i>	72
Figura 16.	Fracionamento do extrato acetato de etila obtido do extrato GF4 de <i>G. elegans</i>	73
Figura 17.	Fracionamento do extrato <i>n</i> -butanol obtido do extrato GF4 de <i>G. elegans</i>	73
Figura 18.	Fracionamento dos extratos obtidos dos extratos bruto do Caule aéreo de <i>G. elegans</i>	74
Figura 19.	Fracionamento dos extratos obtidos dos extratos bruto do Caule submerso de <i>G. elegans</i>	76
Figura 20.	Fracionamento dos extratos brutos obtidos da Raiz adventícia de <i>G. elegans</i>	78
Figura 21.	Análise por CCD dos extratos oriundos dos órgãos de <i>G. elegans</i> 1.Extrato etanólico; 2.Extrato etanol/água; 3.Extrato clorofórmico; 4.Extrato metanol/água; 5. Extrato hexânico; 6.Extrato clorofórmico; 7.Extrato metanólico; 8.Extrato	90

	aquoso.....	
Figura 22.	Substâncias identificadas nas frações hexânicas de <i>G. elegans</i>	92
Figura 23:	Substâncias identificadas nas frações hexânicas de <i>G. elegans</i>	93
Figura 24:	Cromatogramas totais das frações hexânicas obtidos a partir de folhas (GF1), caule aéreo (GA1), caule submerso (GS1) e raiz adventícia (GR1) de <i>G. elegans</i> (Col 1).....	95
Figura 25:	Ampliação do cromatograma do extrato hexânico da folha (GF1) de <i>G. elegans</i> (Col 1).....	96
Figura 26:	Ampliação do cromatograma do extrato hexânico da caule aéreo (GA1)de <i>G. elegans</i> (Col 1).....	96
Figura 27:	Ampliação do cromatograma do extrato hexânico da raiz adventícia (GR1) de <i>G. elegans</i> (Col 1).....	97
Figura 28:	Ampliação do cromatograma do extrato hexânico do caule submerso (GS1) de <i>G. elegans</i> (Col1).....	97
Figura 29:	Substâncias isoladas das folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia de <i>G. elegans</i>	99
Figura 30.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de <u>38</u>	102
Figura 31.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de <u>38</u>	102
Figura 32	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de <u>38</u>	103
Figura 33.	Fragmentograma experimental da substância <u>38</u>	103
Figura 34.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de <u>39</u>	105
Figura 35.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de <u>39</u>	106
Figura 36.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de <u>39</u>	106
Figura 37.	Fragmentograma experimental da substância <u>39</u>	107
Figura 38.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de <u>40</u>	108
Figura 39.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de <u>40</u>	109
Figura 40	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de <u>40</u>	109
Figura 41.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de <u>36</u>	111
Figura 42.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de <u>36</u>	112
Figura 43.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de <u>36</u>	112
Figura 44.	Fragmentograma experimental da substância <u>36</u>	113
Figura 45.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de <u>41</u>	114
Figura 46.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de <u>41</u>	116
Figura 47.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de <u>41</u>	116
Figura 48.	Espectro de RMN de HMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <u>41</u>	117
Figura 49.	Espectro de RMN de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <u>41</u>	118
Figura 50.	Fragmentograma experimental da substância <u>41</u>	118

Figura 51.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de <u>42</u>	121
Figura 52.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de <u>42</u>	121
Figura 53.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de <u>42</u>	122
Figura 54.	Fragmentograma experimental da substância <u>42</u>	122
Figura 55.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O) de <u>49</u>	124
Figura 56.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O) de <u>49</u>	124
Figura 57.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O) de <u>49</u>	125
Figura 58.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O ,) de <u>50</u>	126
Figura 59.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O ,) de <u>50</u>	127
Figura 60.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O ,) de <u>50</u>	127
Figura 61.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD ,) de <u>51</u>	129
Figura 62.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD ,) de <u>51</u>	129
Figura 63.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD ,) de <u>51</u>	130
Figura 64.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD e H_2O ,) de <u>52</u>	131
Figura 65.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de <u>52</u>	132
Figura 66.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de <u>52</u>	132
Figura 67.	Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , CDCl_3 e H_2O) de <u>53</u>	134
Figura 68.	Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de <u>53</u>	134
Figura 69.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de <u>53</u>	135
Figura 70.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de <u>44</u>	137
Figura 71.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de <u>44</u>	137
Figura 72.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de <u>44</u>	138
Figura 73.	Fragmentograma experimental da substância <u>44</u>	138
Figura 74.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de <u>46</u> ,.....	140
Figura 75.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de <u>46</u> ,.....	140
Figura 76.	Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135°(125 MHz, CDCl_3) de <u>46</u> ,.....	141
Figura 77.	Fragmentograma experimental da substância <u>46</u>	141
Figura 78.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) dos ésteres <u>17</u> , <u>19</u> , <u>45</u> , <u>46</u> , <u>27</u> e <u>47</u>	143
Figura 79.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) dos ésteres <u>17</u> , <u>19</u> , <u>45</u> , <u>46</u> , <u>27</u> e <u>47</u>	143
Figura 80.	Cromatograma total e fragmentograma experimentais das substâncias <u>17</u> , <u>19</u> , <u>45</u> , <u>46</u> , <u>27</u> e <u>47</u>	144

Figura 81.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- D_6 , CD_3OD) de <u>48</u>	146
Figura 82.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- D_6) de <u>48</u>	146
Figura 83.	Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, DMSO- D_6) de <u>48</u>	147
Figura 84.	Espectro de RMN de gHMQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <u>48</u>	147
Figura 85.	Espectro de RMN de gHMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de <u>48</u>	148
Figura 86.	Fragmentograma experimental da substância <u>48</u>	148
Figura 87.	Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- D_6 , CD_3OD) de <u>48</u>	150
Figura 88.	Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- D_6) de <u>48</u>	150
Figura 89.	Espectro de RMN de gHMQC (500 e 125 MHz, DMSO- D_6) de <u>48</u>	151
Figura 90.	Espectro de RMN de gHMBC (500 e 125 MHz, DMSO- D_6) de <u>48</u>	151
Figura 91.	Resultados das concentrações atômicas obtidas da análise do sal inorgânico obtido de órgãos de <i>G. elegans</i>	153
Figura 92.	Espectro total de XPS para a amostra do sal inorgânico obtido de órgãos de <i>G. elegans</i>	154
Figura 93.	Espectro de XPS de alta resolução para K 2p do sal inorgânico obtido de órgãos de <i>G. elegans</i>	154
Figura 94.	Espectro de XPS de alta resolução para N 1s do sal inorgânico obtido de órgãos de <i>G. elegans</i>	155
Figura 95.	Espectro de XPS em alta resolução para O 1s do sal inorgânico obtido de órgãos de <i>G. elegans</i>	155
Figura 96.	Espectro de XPS em alta resolução para Cl 2p do sal inorgânico obtido de órgãos de <i>G. elegans</i>	155
Figura 97.	Cromatogramas e espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), obtido dos extratos clorofórmios (folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia) de <i>G. elegans</i> (Col1).....	157
Figura 98.	Cromatograma e RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD), obtido dos extratos metanólicos (folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia) de <i>G. elegans</i> (Col1).....	159
Figura 99.	Cromatograma e RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , D_2O) obtido extratos aquosos (folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia) de <i>G. elegans</i> (Col1).....	161
Figura 100.	Parâmetros meteorológicos de precipitação média mensal e temperatura média mensal durante o período de coleta do material vegetal.....	163
Figura 101.	Massa total em grama obtida nas três coletas (folhas, caule submerso, caule emerso e raiz adventícia), de <i>G. elegans</i>	163
Figura 102.	Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir de folhas das três coletas de <i>G. elegans</i>	166
Figura 103.	Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir do	168

	caule aéreo das três coletas de <i>G. elegans</i>	
Figura 104.	Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir do caule submerso das três coletas de <i>G. elegans</i>	170
Figura 105.	Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir da raiz adventícias das três coletas de <i>G. elegans</i>	173
Figura 106.	Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Folhas das três coletas de <i>G. elegans</i>	175
Figura 107.	Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Caule Submerso das três coletas de <i>G. elegans</i>	176
Figura 108.	Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Caule Aéreo das três coletas de <i>G. elegans</i>	177
Figura 109	Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Raiz Adventícias das três coletas de <i>G. elegans</i>	178
Figura 110	Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Folhas das três coletas de <i>G. elegans</i>	179
Figura 111.	Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Caule Submerso das três coletas de <i>G. elegans</i>	180
Figura 112.	Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Caule Aéreo das três coletas de <i>G. elegans</i>	181
Figura 113.	Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Raiz adventícia das três coletas de <i>G. elegans</i>	182
Figura 114.	Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Folhas das três coletas de <i>G. elegans</i>	183
Figura 115.	Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Caule Submerso das três coletas de <i>G. elegans</i>	184
Figura 116.	Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Caule aéreo das três coletas de <i>G. elegans</i>	185
Figura 117.	Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Raiz adventícia das três coletas de <i>G. elegans</i>	186

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Rendimento de material obtido dos extratos da espécie <i>G. elegans</i> das coletas realizadas.....	58
Tabela 2.	Massa obtida após tratamento dos extratos brutos de <i>G. elegans</i> Col1.....	61
Tabela 3.	Gradiente de polaridade utilizado no extrato hexânico para obtenção das frações.....	64
Tabela 4.	Gradiente de polaridade utilizado no extrato acetato de etila para obtenção das frações.....	67
Tabela 5.	Gradiente de polaridade utilizado no extrato n-butanol para obtenção das frações.....	70
Tabela 6.	Rendimento de extratos obtidos por sonicação com diferentes solventes extratores para órgãos da espécie <i>G. elegans</i>	87
Tabela 7.	Diferença entre médias dos tratamentos extrativos aplicados a espécie <i>G. elegans</i> , segundo a ANOVA.....	88
Tabela 8.	Substâncias identificadas nos extratos hexânicos obtidos a partir de folhas (GF1), caule aéreo (GA1), caule submerso (GS1) e raiz adventícia (GR1) de <i>G. elegans</i> (Col1).....	94
Tabela 9.	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 75 MHz) de <u>38</u>	101
Tabela 10.	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 75 MHz) de <u>39</u>	105
Tabela 11.	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C de <u>40</u>	108
Tabela 12.	Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 75 MHz)* de <u>36</u>	111
Tabela 13.	Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de <u>41</u>	115
Tabela 14.	Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) de <u>42</u>	120
Tabela 15.	Dados de RMN de ^1H -(CD_3OD , 300 MHz) e ^{13}C -(CD_3OD , 75 MHz) de <u>49</u>	123
Tabela 16.	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de <u>50</u> , (CD_3OD , CH_3COOH e H_2O , 300 MHz e 75 MHz).....	126
Tabela 17.	Dados de RMN de ^1H (CD_3OD 300 MHz) e ^{13}C (CD_3OD 75 MHz) de <u>51</u>	128
Tabela 18.	Dados de RMN de ^1H (CD_3OD 300 MHz) e ^{13}C (CD_3OD 75 MHz) de <u>52</u>	131
Tabela 19.	Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz), de <u>53</u>	133
Tabela 20.	Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) de <u>44</u>	136
Tabela 21.	Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125MHz) de a <u>46</u>	139
Tabela 22.	Ésteres (<u>17</u> , <u>19</u> , <u>45</u> , <u>46</u> , <u>27</u> e <u>47</u>) identificados por CG-EM	142

Tabela 23.	Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- D_6 , CD_3OD) e ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) de 48	145
Tabela 24.	Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) e RMN ^1H (300 MHz, DMSO- D_6 , CD_3OD) de 43	149
Tabela 25.	Resultados das concentrações atômicas obtidas da análise do sal inorgânico obtido dos órgãos vegetais de <i>G. elegans</i> .	153
Tabela 26.	Substâncias identificadas nos extratos hexânicos obtidos da folha das três coletas de <i>G. elegans</i>	165
Tabela 27.	Substâncias identificadas nos extratos hexânicos do caule aéreo das três coletas de <i>G. elegans</i>	166
Tabela 28.	Substâncias identificadas nos extratos hexânicos do caule submerso das três coletas de <i>G. elegans</i>	169
Tabela 29.	Substâncias identificadas nos extratos hexânicos da raiz adventícia das três coletas de <i>G. elegans</i>	171
Tabela 30.	Resultados da Inibição do crescimento dos esporos do fungo <i>Cladosporium sphaerospermum</i> observado nos extratos de <i>G. elegans</i>	187
Tabela 31.	Efeito dos extratos de folhas de <i>G. elegans</i> sobre a germinação, IVG ^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de <i>Lactuca sativa</i>	190
Tabela 32.	Efeito dos extratos de raiz adventícias de <i>G. elegans</i> sobre a germinação, IVG ^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de <i>Lactuca sativa</i>	191
Tabela 33.	Efeito dos extratos de caule submerso de <i>G. elegans</i> sobre a germinação, IVG ^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de <i>Lactuca sativa</i>	192
Tabela 34.	Efeito dos extratos de caule emerso de <i>G. elegans</i> sobre a germinação, IVG ^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de <i>Lactuca sativa</i>	193
Tabela 35.	Efeito do sal inorgânico (KNO_3) obtidos de <i>G. elegans</i> sobre a germinação, IVG ^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de <i>Lactuca sativa</i>	194
Tabela 36.	Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos de <i>G. elegans</i> contra linhagens de células medido pelo ensaio MTT.....	195
Tabela 37.	Efeitos inseticidas de extratos de <i>G. elegans</i> sobre adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	197
Tabela 38.	Efeitos inseticidas de extratos de <i>Gomphrena elegans</i> sobre <i>Aedes aegypti</i>	198

LISTA DE ABREVIATURAS GERAIS

- ác - ácido
- AcOEt – Acetato de Etila
- DMSO- d_6 – Dimetil sulfóxido deuterado
- CC – Cromatografia em Coluna
- CCD - Cromatografia em Camada Delgada
- CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
- CG - Cromatografia de fase Gasosa
- CIM – Concentração Mínima Inibitória
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CV – Coeficiente de Variância
- d – dubleto
- dd – duplo dubleto
- DEPT – “Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
- EM - Espectrometria de Massas
- exp. – experimental
- Fig. – Figura
- Fr. – fração
- Hex – Hexano
- IV – Infravermelho
- IC₅₀ – Metade da Concentração Máxima Inibitória
- J – Constante de Acoplamento
- HMBC – Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
- HMQC – Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
- m – multiplete
- m/z – Relação carga/massa
- n.i. – não identificado
- p. – página
- Rf. – Retention factor
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- s – singleto
- $s/$ – singleto largo
- t – tripleto
- Tab. – tabela
- $t/$ – tripleto largo
- t_R – Tempo de Retenção
- δ – Deslocamento químico
- Δ - Variação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	36
1.1	Considerações preliminares	36
1.2	A família <i>Amaranthaceae</i>	38
1.3	Gênero <i>Gomphrena</i> Mart.	39
1.4	<i>Gomphrena elegans</i>	45
1.5	Considerações sobre os métodos utilizados no isolamento de produtos naturais	47
2	OBJETIVOS	51
2.1	Geral	51
2.2	Específicos	51
3	PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1	Procedimentos experimentais gerais (especificações de materiais, instrumentos, reagentes e métodos utilizados)	52
3.2	Coleta e identificação do material	55
3.3	Padronização da obtenção dos extratos	56
3.3.1	Padronização da extração	56
3.3.1.1	Avaliação dos rendimentos de extração	56
3.4	Obtenção dos extratos	57
3.5	Análise dos extratos provenientes do fracionamento e isolamento dos constituintes químicos (Col1)	58
3.5.1	Análise dos extratos hexânicos, por CG-EM	58
3.5.1.1	Identificação dos componentes	59
3.5.2	Tratamento dos extratos brutos clorofórmico, metanólico e aquoso Col1	59
3.5.2.1	Tratamento 1: extratos clorofórmicos	60
3.5.2.2	Tratamento 2: extratos metanólicos	60
3.5.2.3	Tratamento 3: extratos aquosos	61
3.5.3	Fracionamento dos extratos provenientes da partição, identificação e isolamento dos constituintes químicos (Col1)	64
3.5.3.1	Estudo do extrato hexânico obtido do extrato GF2	64
3.5.3.2	Estudo do extrato acetato de etila obtido do extrato GF2	66
3.5.3.3	Estudo do extrato <i>n</i> -butanol obtido do extrato GF3	69
3.5.3.4	Estudo da fase acetato de etila obtido do extrato GF4	72
3.5.3.5	Estudo da fase <i>n</i> -butanol do extrato GF4	73
3.5.4	Estudo dos extratos obtidos dos extratos bruto clorofórmico, metanólico e aquoso de GA e GS; e estudo dos extratos brutos de GR	74
3.5.4.1	Estudo dos extratos obtidos de GA	74
3.5.4.2	Estudo dos extratos obtidos de GS	75

3.5.4.3	<i>Estudo dos extratos brutos de GR</i>	77
3.6	Análise dos Perfis Cromatográficos (Col1)	78
3.7	Análise da substância inorgânica isoladas nas três coletas	79
3.8	Perfis Cromatográficos dos extratos das três coletas	79
3.9	Bioensaios para verificação de atividades biológicas	80
3.9.1	<i>Ensaio de atividade antifúngica (Bioautografia)</i>	80
3.9.2	<i>Ensaio de potencial alelopático sobre sementes de Lactuca sativa L</i>	81
3.9.3	<i>Ensaio de citotoxicidade in vitro sobre células tumorais</i>	82
3.9.4	<i>Ensaio de atividade inseticida, sobre Sitophilus zeamais Mots. (Coleoptera: Curculionidae)</i>	83
3.9.5	<i>Ensaio de atividade inseticida, sobre Aedes aegypti (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)</i>	84
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.1	Avaliações da Metodologia de Extração	86
4.1.1	<i>Avaliação da extração por ultrassom</i>	87
4.1.2	<i>Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos brutos obtidos nas metodologias com diferentes solventes extratores</i>	89
4.2	Composições químicas dos extratos hexânicos (Col1)	90
4.2.1	<i>Análise dos extratos hexânicos (identificação das substâncias)</i>	90
4.3	Composições químicas dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos (Col1)	98
4.3.1	<i>Análise dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos hexânicos (Substâncias isoladas)</i>	198
4.3.2	<i>Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas</i>	100
4.3.2.1	<i>Esteróides</i>	100
4.3.2.1.1	<i>Identificação de β- sitostenona (<u>38</u>)</i>	100
4.3.2.1.2	<i>Identificação de β-sitosterol (<u>39</u>)</i>	104
4.3.2.1.3	<i>Identificação de 5α-Stigmasta-7,22-dien-3β-ol (<u>40</u>)</i>	107
4.3.2.2	<i>Terpenos</i>	110
4.3.2.2.1	<i>Identificação de esqualeno (<u>36</u>)</i>	110
4.3.2.2.2	<i>Identificação de jatrofona (<u>41</u>)</i>	113
4.3.2.3	<i>Aromáticos</i>	119
4.3.2.3.1	<i>Identificação de di(2-etil-hexil) ftalato (<u>42</u>)</i>	119
4.3.2.3.2	<i>Identificação de ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico (<u>49</u>)</i>	123
4.3.2.3.3	<i>Identificação de 3-(4-hidróxi-3-metóxfenil)propenóico (<u>50</u>)</i>	125
4.3.2.3.4	<i>Identificação de Ácido p-hidroxibenzóico (<u>51</u>)</i>	128
4.3.2.3.5	<i>Identificação de ácido p-metoxibenzóico (<u>52</u>)</i>	130

4.3.2.3.6	Identificação de ácido 3,4-dimetoxibenzóico (53).....	133
4.3.2.4	Ácido.....	135
4.3.2.4.1	Identificação de ácido hexadecanóico (44) (ácido palmítico).....	135
4.3.2.5	Ésteres.....	139
4.3.2.5.1	Identificação de octadecanoato de metila (46) (estearato de metila).....	139
4.3.2.5.2	Identificação de ésteres 17 , 19 , 45 , 46 , 27 e 47	141
4.3.2.6	Alcalóides	145
4.3.2.6.1	Identificação de Pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (uracila) (48).....	145
4.3.2.6.2	Identificação de uridina (43).....	148
4.4	Análise da substância inorgânica	153
4.5	Avaliação dos perfis cromatográficos da espécie <i>G. elegans</i>.....	156
4.6	Análise do efeito da sazonalidade no rendimento e composição química de <i>G. elegans</i>.....	162
4.6.1	Rendimento.....	162
4.6.2	Composição química das três coletas de <i>G. elegans</i>	164
4.6.2.1	Composição química dos extratos GF1, GA1, GS1 e GR1 das três coletas de <i>G. elegans</i>	164
4.6.2.2	Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos GF2, GF3, GF4, GS2, GS3, GS4, GA2, GA3, GA4, GR2, GR3, GR4 das três coletas de <i>G. elegans</i>	173
4.7	Bioensaios para verificação da atividade antifúngica.....	187
4.8	Bioensaios para verificação da atividade Alelopática sobre Sementes de <i>Lactuca sativa</i> L.....	188
4.9	Bioensaios para verificação da atividade antitumoral.....	195
4.10	Bioensaios para verificação da atividade Inseticida sobre <i>Sitophilus zeamais</i> Mots, (Coleoptera: Curculionidae).....	196
4.11	Bioensaios para verificação da atividade Inseticida sobre <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae).....	198
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	199
	REFERÊNCIAS	203
	ANEXOS.....	211
	Anexo A.....	212
	Anexo B.....	235
	Anexo C.....	241

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações preliminares

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos, sendo que o uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana (MACIEL et al., 2002). Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de espécies existentes no planeta, sendo a maioria desconhecida sob o ponto de vista científico. Das 250 a 500 mil espécies conhecidas, poucas foram estudadas fitoquimicamente (CECHINEL; YUNES, 1998).

A conservação dos recursos genéticos do planeta e sua exploração sustentável são de grande relevância e por este motivo vários países do mundo, estão adotando programas de bioprospecção, integrando universidades, institutos de pesquisas e museus, com a finalidade de descobrir novas moléculas biologicamente ativas (DOBSON, 1996; PALMA et al., 2001). Dentre estas, as substâncias com atividade farmacológica são as mais procuradas, tanto pela comunidade científica mundial como pelas indústrias farmacêuticas. É muito difícil estimar o número total de produtos terapêuticos que utilizam formulações originárias de produtos naturais das mais diversas origens. Entretanto, acredita-se que cerca de 30% das prescrições de medicamentos do mundo ocidental contêm drogas de origem natural, sendo que este quadro vem se mantendo constante nos últimos 30 anos (PALMA et al., 2001).

Além da importância da descoberta de novas substâncias com atividade farmacológica, muitos metabólitos secundários atuam como protótipos na elaboração de flavorizantes, fragrâncias, inseticidas, herbicidas, bactericidas, fungicidas, nematicidas, que são utilizados tanto na proteção e prevenção de doenças em humanos e animais bem como protetores em sistemas agrícolas (HARVEY, 1999; CROTEAU et al., 2000). Há, também, um grande interesse da indústria agroquímica por biocidas de origem natural que sejam eficientes e seguros

ao ambiente quando utilizados no combate às pragas ou doenças (DE SANT'ANA, 2002).

Sabe-se que as plantas são consideradas fontes inesgotáveis de metabólitos secundários. Sendo conhecidas mais de 200.000 substâncias, número este que representa 10% do total dos possíveis metabólitos existentes na natureza (DIXON; STRACK, 2003). Suas estruturas moleculares, funções e usos foram pouco explorados. Estas substâncias geralmente, não fazem parte do metabolismo básico, entretanto são essenciais para a planta, interagindo na mediação planta-inseto, planta-planta e planta-microorganismo, atuando em aspectos tais como cor e fragrância das flores, paladar e coloração dos alimentos, além de resistência contra pragas e doenças (DIXON, 2001).

Estima-se que uma grande quantidade de espécies de plantas brasileiras, com algum estudo químico ou biológico, possua um potencial econômico para a identificação e exploração de novos fármacos (CORDELL, 1995). A atual situação de extinção da biodiversidade no Brasil pode causar não somente a perda de fontes valiosas de substâncias com propriedades terapêuticas, importantes para a humanidade, mas também, do conhecimento dos interessantes processos enzimáticos que ocorrem nas plantas e seu posterior uso nos estudos biossintéticos sobre novos produtos naturais (GRANJA et al., 1999).

A pesquisa na área de produtos naturais que está relacionada com a descoberta de substâncias com atividade biológica tem, na maioria sua maior parcela, a fase fitoquímica monitorada através do uso de bioensaios simples, rápidos, seletivos e de baixo custo, que permitem uma seleção racional de produtos bioativos a serem submetidos posteriormente a ensaios mais específicos. O trabalho químico biomonitorado vem sendo utilizado como uma alternativa muito eficiente, para a prospecção de fármacos e agroquímicos potenciais, nas pesquisas que buscam metabólitos secundários ativos (CORDELL, 1995).

Considerando a importância que representam os estudos de espécies vegetais, aliados à carência de informações sobre suas composições químicas e seus potenciais efeitos citotóxicos, fungicidas, inseticidas e alelopáticos, nosso grupo de pesquisa desenvolve estudos com espécies do Cerrado e Pantanal Sul Matogrossense, com o objetivo de obter essas informações. Portanto neste trabalho foi estudado a espécie *Gomphrena elegans* Mart. var. *elegans* pertencente à família

Amaranthaceae, fundamentados na sua resposta diferenciada em determinados nichos ecológicos.

1.2 A família Amaranthaceae

A família Amaranthaceae, da ordem das Caryophyllales (JUDD et al., 2002) tem aproximadamente 170 gêneros e 2.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas das Américas e África. Para o Brasil são citados 20 gêneros nativos e aproximadamente 100 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

Os representantes da família apresentam hábito variado, sendo predominantemente ervas, subarbustos, arbustos ou trepadeiras, anuais ou perenes (SIQUEIRA, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005). As folhas são opostas ou alternas, glabras ou pilosas, sem estípulas. Inflorescências capituliformes. As flores são pequenas, perigônio amarelado ou esverdeado, constituído de sépalas escariosas, hialinas, secas, glabras ou pilosas, caducas ou persistentes, livres ou soldadas. Possuem brácteas escariosas, na base do perigônio. Estames livres (*Amaranthus*), ou condescidos em tubos estaminal curtos (*Chamissoa*), e longo (*Pfaffia*, *Gomphrena*, *Alternanthera*). Anteras bitecas (*Amaranthus*, *Chamissoa*), ou monotecas (*Alternanthera*, *Gomphrena*, *Pfaffia*), lineares ou oblongas; ovário bicarpelar, súpero, unilocular ou pluriovulado (*Celosia*); estilete curto ou longo; estigma bifido ou capitado; e frutos na forma de cápsulas (BARROSO et al., 2002).

São encontrados em diversos tipos de ambientes, tais como campos rupestres, cerrados, beiras de matas, restingas, terrenos baldios e áreas cultivadas, sendo mais comuns em ambientes abertos, embora algumas espécies sejam encontradas no interior de florestas, principalmente em áreas perturbadas (SIQUEIRA, 2002; SOUZA; LORENZI, 2005).

Levantamento bibliográfico sobre a constituição química de Amaranthaceae mostra uma baixa diversificação de classes de metabólitos secundários: fafosídeos, saponinas (SHIOBARA et al., 1993); ecdisteróides (NISHIMOTO et al., 1987); esteróides, fafosídeos (TAKEMOTO et al., 1983; NAKAI et al., 1984; NISHIMOTO et al., 1984); fafosídeos, ecdisteróides (SHIOBARA et al., 1992); triterpenóides,

protoalcalóides, e flavonóides (FERREIRA; DIAS, 2004) e betacianinas (CAI et al., 2001), alcalóides poliamídicos (MARTIN-TANGUY et al., 1978).

Consideradas essas informações, embora a família *Amaranthaceae* possua uma quantidade relativamente grande de gêneros, apenas um número limitado de espécies nos gêneros tem sido estudadas quimicamente e dentre deste o gênero *Gomphrena* Mart. Este apesar de ser o segundo maior da família em número de espécies (HANDRO, 1964), não tem os extratos brutos ou compostos isolados de suas espécies estudados exaustivamente, com poucos trabalhos disponíveis na literatura, sob o ponto de vista químico e farmacológico.

1.3 Gênero *Gomphrena* Mart.

O gênero *Gomphrena* Mart., possui aproximadamente 120 espécies (SALVADOR et. al., 2004). No Brasil ocorrem 46 espécies do gênero *Gomphrena* sendo 19 delas no Cerrado (SIQUEIRA, 1984; 1992).

O gênero constitui-se de arbustos eretos, decumbentes, com sistemas subterrâneos geralmente desenvolvidos. Os caules são nodosos, geralmente ramificados, lisos ou estriados, glabras ou pilosos. As folhas apresentam-se inteiras ou reduzidas, rosuladas, opostas ou alternas; ovadas, lineares, lanceoladas, oblongas, subcordadas, obovadas ou espatuladas; base atenuada, obtusa ou semi-virgada; ápice agudo, acuminado, obtuso ou apiculado; sésseis, ou pecioladas, nervura central proeminente, glabras ou pilosas. Possuem brácteas, perigônio amarelado, róseo, vermelho-amarelado ou amarelo enegrecido. As flores apresentam, cinco sépalas soldadas somente na base, ovário bicarpelar, ovado, oblongo ou turbinado, uniovulado, estilete semi-alongado curto; estigma bífido, capitado ou bilobado, linear, cilíndrico ou crasso, papiloso ou piloso (SIQUEIRA, 1989).

Algumas espécies de *Gomphrena* são utilizadas na medicina popular como por exemplo, *G. arborescens* L., *G. globosa* L., *G. leucocephala* Mart., *G. mollis* Mart., *G. vaga* Mart. e *G. pohlii* Moq., sendo normalmente empregadas contra

infecções nas vias respiratórias e como febrífugas ou tônicas, com utilização, principalmente das raízes (SIQUEIRA, 1992).

Por suas variadas propriedades biológicas, algumas das espécies deste gênero estão sendo investigadas. Magalhães et al. (1986), realizaram estudo botânico (anatômico), farmacológico e ensaios biológicos quanto a ação antiviral e hemolítica com *G. officinalis* e identificaram a presença de heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos, esteróides e flavonóides, além de açúcares redutores. Estudos semelhantes, farmacológicos, realizado por Andre et. al. (2003), na espécie *G. globosa* identificaram, no extrato hexânico, a presença dos esteróides stigmasterol, sitosterol e campesterol, enquanto que nos extratos diclorometânico identificaram os triterpenos taraxerol, epitaraxerol e taraxenona e o ácido 3,4-dimetilbenzóico. No extrato metanólico identificaram a presença de alantoína, adenosina e um flavonóide.

Oshawa e Oshawa (2001) testaram e evidenciaram a atividade inseticida nos extratos de *Gomphrena globosa* (L.), sobre *Plutella xylostella* (L.) e *Crociodomia binotalis* (Zeller). Outro exemplo de eficácia com extratos de *G. boliviana* apresentaram atividade sobre um largo espectro de espécies de bactérias (POMILIO et al., 1992).

Vários trabalhos têm demonstrado que o gênero *Gomphrena* apresenta atividade antitumoral, possivelmente associada à produção de saponinas e fitoecdisteróides como relatado por Young et al. (1997), que das raízes de *G. macrocephala* isolaram saponinas (Figura 1). Kuroda et al. (2006) isolaram das raízes dois triterpenos do tipo oleanano e um do tipo taraxenona (Figura 1). Savchenko et al. (1998) testaram extratos de órgãos de sete espécies do gênero *Gomphrena* spp., e identificaram a presença de seis fitoecdisteróides (Figura 2).

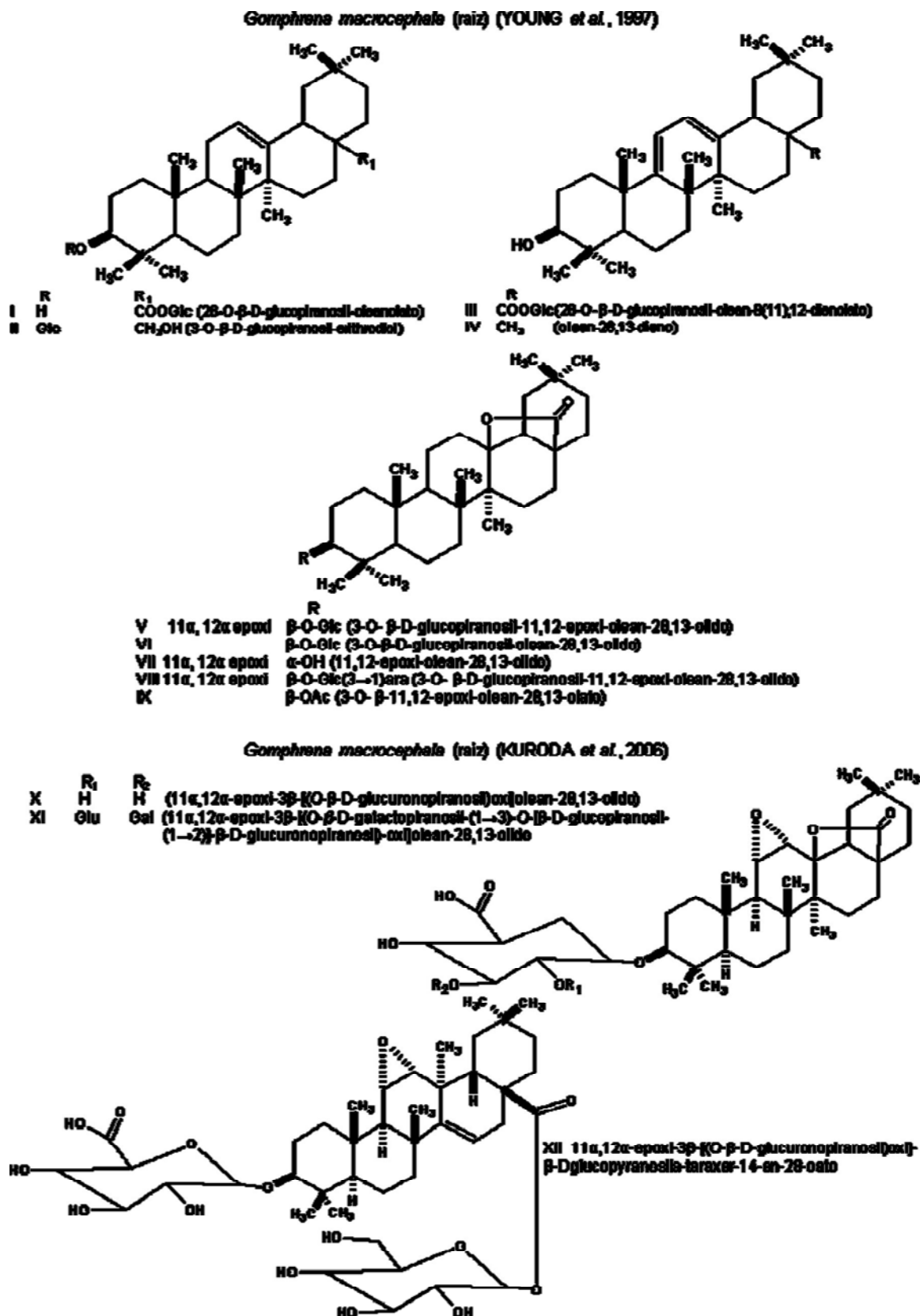


Figura 1. Substâncias isoladas da espécie *Gomphrena macrocephala*.

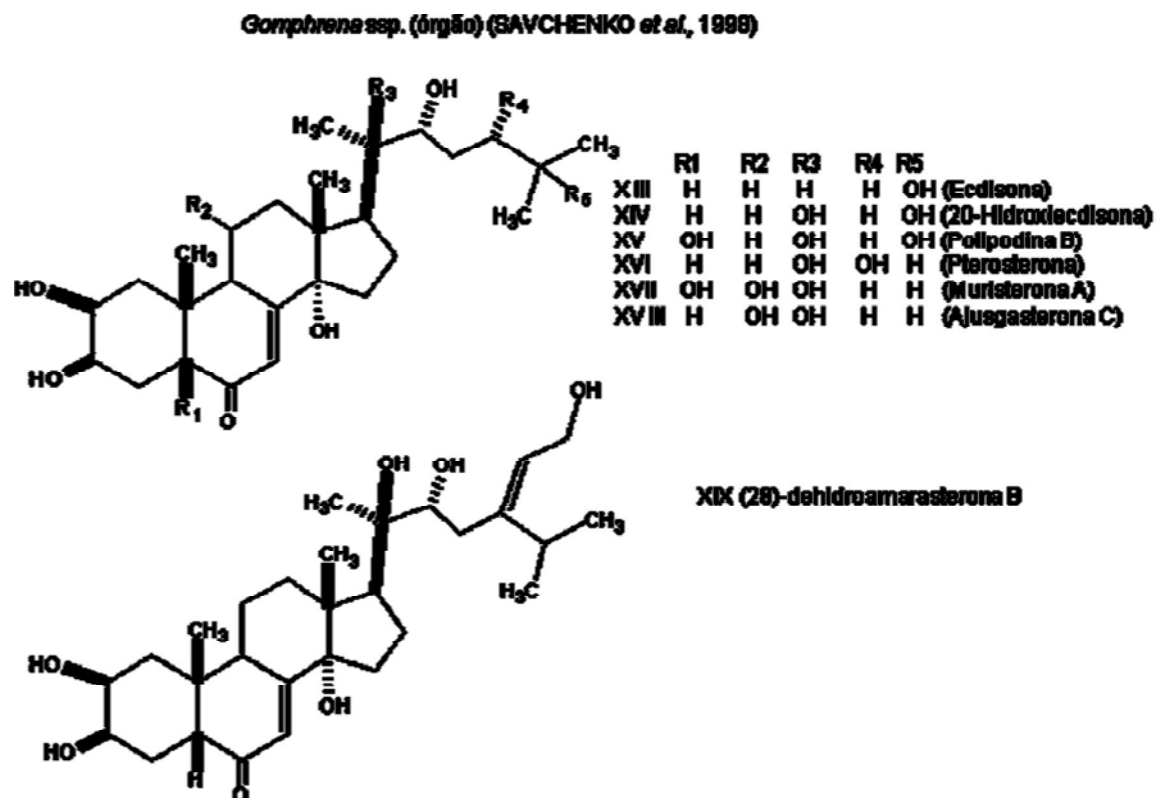


Figura 2. Fitoecdisteróides encontrados em várias espécies do gênero *Gomphrena* ssp.

Quanto a identificação das substâncias químicas presentes no gênero podemos ainda destacar o realizado por Heuer et al. (1992), que isolaram, dos extratos obtidos dos órgãos no período de floração da *G. globosa*, três betalaínas (Figura 3).

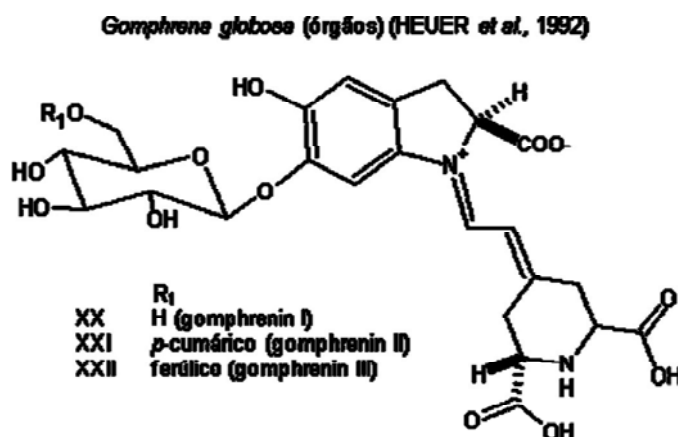


Figura 3. Betalaínas isolada na espécie *Gomphrena globosa*.

Martin-Tanguy et al. (1978) identificaram, também, no período de floração, nos extratos dos órgãos de *G. globosa*, alcalóides poliamídicos (Figura 4). Ferreira e Dias (2004) isolaram em *G. clausenii* Moq., triterpenos, flavonóides, isoflavonóides e protoalcalóides (Figura 5).

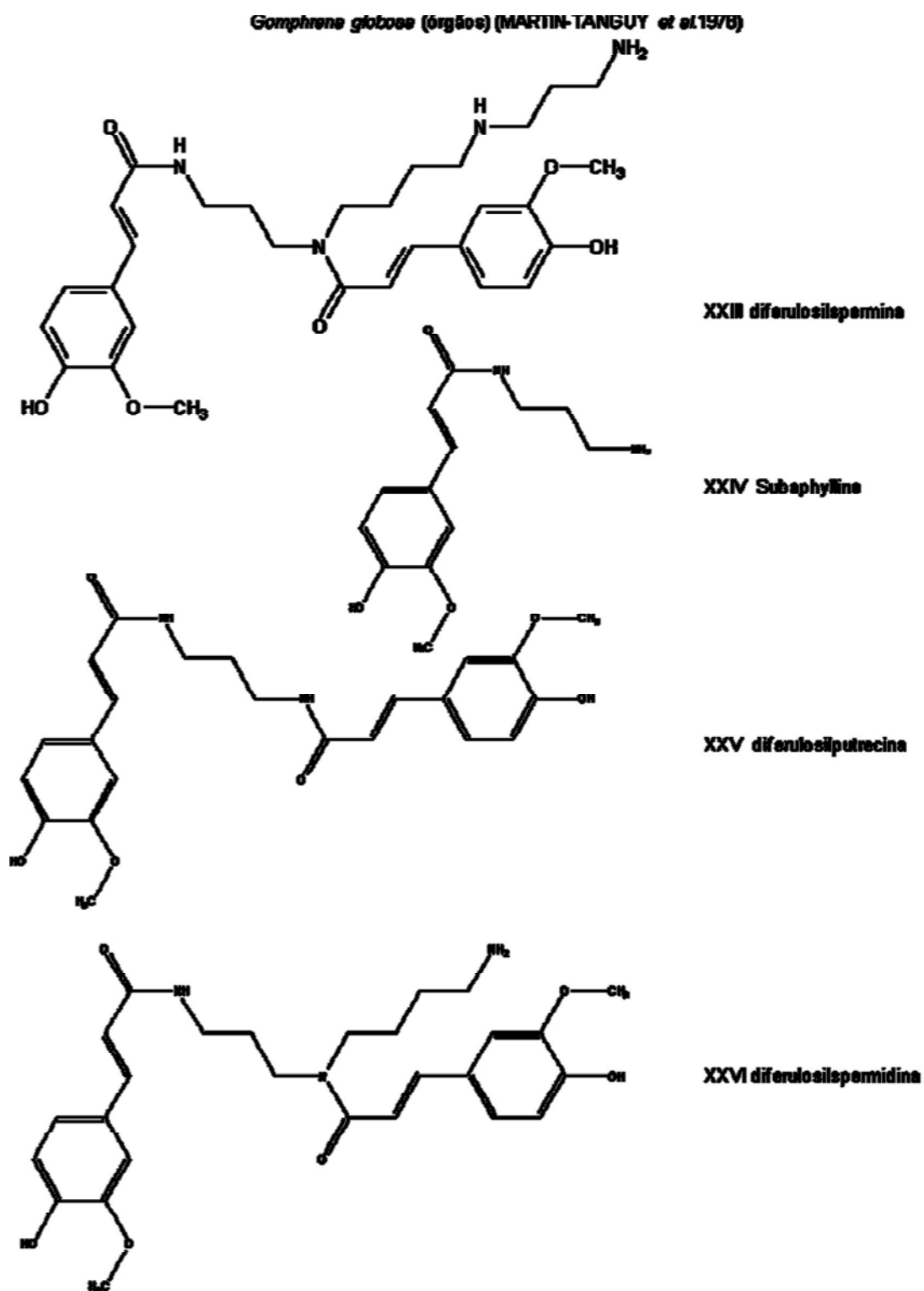


Figura 4. Alcalóides poliamídicos obtidos em espécies do gênero *Gomphrena Globosa*.

Talal Suleiman Mahmoud

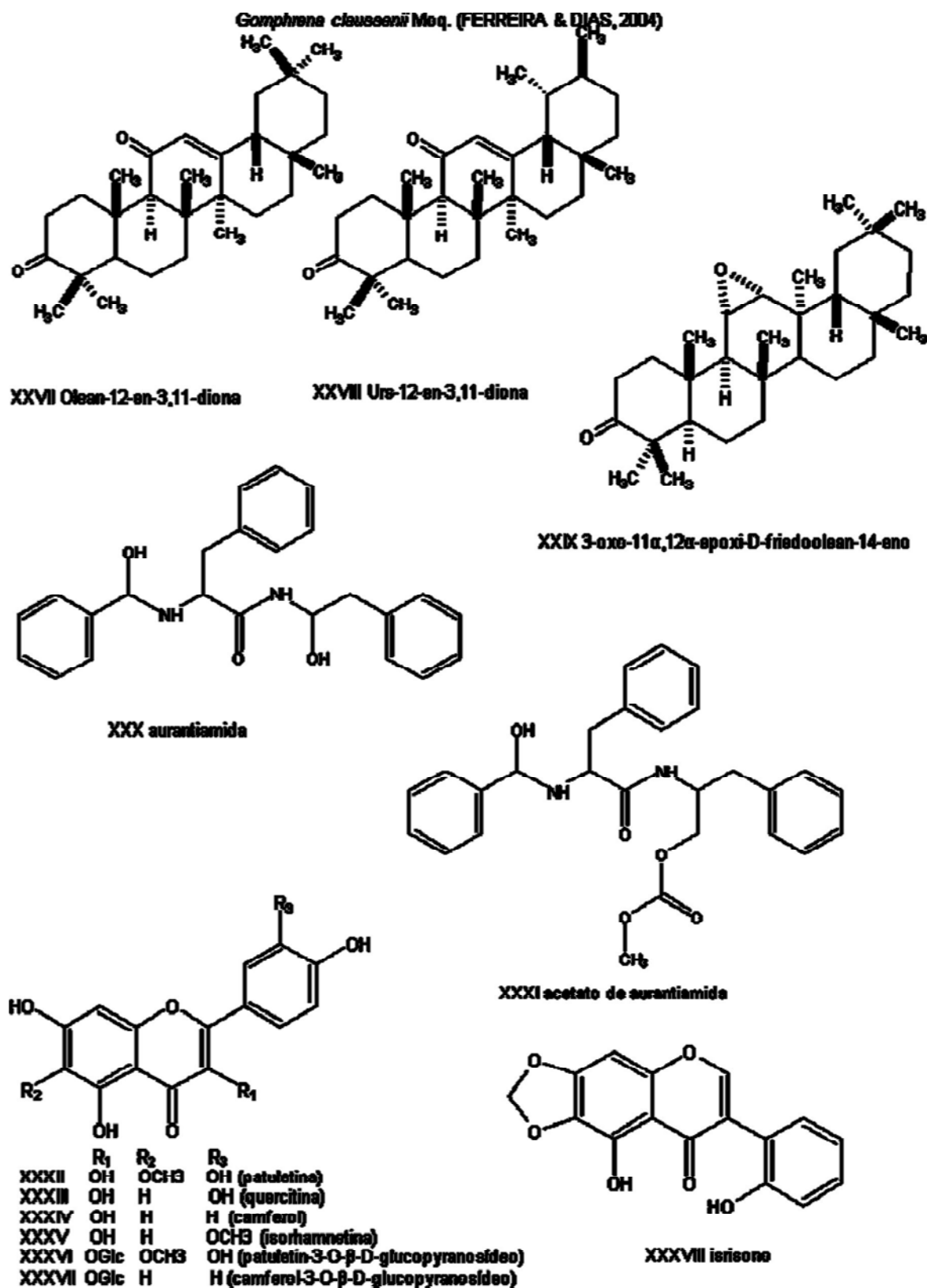


Figura 5. Substâncias isoladas da espécie *Gomphrena claussenii* Moq.

Talal Suleiman Mahmoud

1.4 *Gomphrena elegans*

A distribuição de *G. elegans* é restrita à América do Sul tropical e subtropical (POTT; POTT, 1994) sendo encontrada atualmente em países como Uruguai, Paraguai, Peru, Argentina e Brasil (LEÓN et al., 2006).

No Pantanal, *G. elegans* (Figura 6) é encontrada como macrófita aquática semi-submersa em rios e campos inundáveis com água corrente e alto nível de nutrientes, em solo argiloso e no rio Sucuri é encontrada como uma macrófita aquática submersa. É uma espécie herbácea de caule cilíndrico, com nós e entrenós evidentes (POTT; POTT, 2000a), apresenta pecíolo côncavo convexo, tricomas tectores pluricelulares ramificados e colênquima descontínuo, sendo o sistema vascular na região mediana com nove feixes colaterais. As folhas de *G. elegans* são simples, curto-pecioladas e com filotaxia oposta cruzada. O limbo apresenta forma ovada, ápice agudo, base obtusa e margem inteira e venação. A face adaxial possui tricomas esparsos e face abaxial pilosa (MUSSURY et al., 2006). Segundo Scremin-Dias et al. (1999), a espécie *G. elegans* Mart. var. *elegans* (Amaranthaceae), ocorrente no Rio Sucuri, devido às ações provocadas pelo homem, passou a colonizar o leito do rio, representando 40,6 % de sua cobertura vegetal, sendo que em algumas áreas chega a cobrir 90% da superfície (POTT; POTT, 2000b).

Diversos gêneros da família Amaranthaceae são considerados invasores e suas estratégias de ocupação do espaço são bem conhecidas (LORENZI, 2000). Estudos realizados por Lino et al. (2003) no rio Sucuri, mostraram que *G. elegans* coloniza rapidamente clareiras abertas em meio à vegetação aquática, devido ao rápido crescimento por expansão lateral dos ramos, recobrando rapidamente as diferentes macrófitas aquáticas que haviam recolonizado a clareira. A Figura 6 mostra detalhes da planta que ocorre no Rio Sucuri.

Devido à sua alta capacidade de sobrevivência e reprodução, competindo com sucesso com outras espécies aquáticas, é provável que *G. elegans* possua o potencial genético para produzir compostos com atividade biológica, além de substâncias de defesa contra herbívoros.

Gomphrena elegans merece destaque pela escassez de estudos tanto de sua composição química quanto das suas atividades biológicas.



Figura 6. **A** - Detalhe da folha e caule emerso de *Gomphrena elegans*. **B** - Detalhe do caule submerso e raiz adventícia de *Gomphrena elegans*. **C** - Banco de macrófitas aquáticas, com predomínio de *G. elegans* no leito do rio Sucuri (Foto: Paulo Robson de Souza).

Talal Suleiman Mahmoud

1.5 Considerações sobre os métodos utilizados no isolamento de produtos naturais

O estudo de produtos naturais de origem vegetal, segundo a tradição, é realizado com a utilização de métodos de isolamento e purificação de substâncias, associadas com as principais técnicas espectrométricas e espectroscópicas de identificação, como por exemplo, a espectrometria de massas (EM), a ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV) e o infravermelho (IV) (ROBARDS, 2003).

As etapas envolvidas nos processos de obtenção de substâncias são lentas, exigem grandes volumes de solventes orgânicos e praticamente inviabilizam um possível processo de automação (LANÇAS, 2004). A associação de técnicas empregadas na fase de caracterização torna a identificação dessas substâncias uma etapa de custos elevados, e na maioria das vezes não permite afirmar antecipadamente a estrutura da substância. Além do mais as quantidades de material puro obtidas normalmente são muito pequenas.

A dificuldade encontrada na identificação e quantificação dos metabólitos secundários, detectados ou isolados prejudica também a possibilidade de que se possa estabelecer uma possível relação entre a composição química e a atividade biológica quando observada; nem sempre o metabólito secundário isolado ou presente em maior quantidade é o responsável pela atividade biológica, ele pode tão somente ser aquele cuja técnica aplicada permitiu seu isolamento.

A padronização dos extratos é outro ponto importante, devendo ser observada a relação entre a massa de material vegetal e a massa de extrato obtido, ou seja, quanto em peso foi inicialmente utilizado da planta seca para fornecer uma determinada massa de extrato seco. Normalmente, uma planta seca, após extração e filtração fornece um extrato líquido que, submetido à evaporação fornece uma quantidade de material sólido (sem adição de excipientes) na proporção de cerca de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5-50% segundo a solubilidade dos seus metabólitos (GREGÓRIO et al., 2006) no solvente extrator. Por exemplo no caso dos 50%, a relação material vegetal-extrato é de 2:1, representando que foram

necessários 2 quilos da planta seca para fornecer 1 quilo de extrato seco (GREGÓRIO et al., 2006).

A maioria das análises, que envolvem amostras complexas, requer várias etapas de manipulação antes de se chegar à identificação e ou a medida da concentração de um ou mais analitos de interesse (SKOOG et al., 1996).

Dentre as várias etapas envolvidas na análise de amostras complexas, principalmente aquelas de fontes vegetais, as que mais se destacam são: extração (TREUTTER, 1988), pré-tratamento (SUÁREZ et al., 1996; SCHÜTZ et al., 2004), pré-concentração, ajuste de concentração entre outras (SUN et al., 1998; ROBARDS, 2003).

As etapas de pré-tratamento e ajustes de concentração geralmente são as que mais consomem tempo e são as que mais podem causar erros críticos quando não bem elaboradas e executadas.

Uma etapa de pré-tratamento é fundamental para eliminar compostos indesejáveis e que fazem parte da constituição da matriz, principalmente aqueles presentes em extratos vegetais e matrizes biológicas, como por exemplo, clorofila e proteínas, que podem interferir no método analítico a ser executado. Além do mais, a etapa de pré-tratamento é fundamental quando se deseja preservar a integridade da instrumentação usada, por exemplo, quando o objetivo é trabalhar em CLAE, usando fase reversa na avaliação de matrizes que apresentam grande quantidade de material lipofílico (WELLUM; KIRBY, 1981).

Uma forma de tentar solucionar ou minimizar os problemas anteriormente mencionados é empregar técnicas cromatográficas de separação, que consistem da separação dos componentes de uma amostra pela distribuição entre duas fases uma estacionária e uma móvel. A amostra é introduzida e conduzida pela fase móvel (líquida ou gasosa). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que, cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária. (PECSOK; SHIELDS, 1968; EDWARDS, 1970; COLLINS, 1988; JAMES, 1995; COLLINS et al., 2006).

Dentre as técnicas cromatográficas podemos citar a cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE recebe este nome devido ao fato da fase móvel utilizada ser um líquido que é impulsionado através da coluna (empacotada) com auxílio de bomba que gera pressão (COLLINS, 1988; SKOOG et al., 2002; COLLINS et al., 2006). Os principais componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, sistema de injeção de amostras, coluna cromatográfica, detector e registrador (COLLINS, 1988; SKOOG et al., 2002; COLLINS et al., 2006). Neste tipo de cromatografia o mecanismo de separação se faz pela cromatografia líquido-sólido ou por adsorção, na qual ocorre competição entre as moléculas da amostra e da fase móvel, para ocupar os sítios ativos na superfície da fase estacionária (COLLINS et al., 2006). À CLAE podem ser acoplados equipamentos ou detectores que permitam a determinação de vários compostos. O detector UV-visível mede a quantidade de luz absorvida durante a passagem do eluente por uma pequena célula de fluxo colocada no caminho óptico do feixe de radiação. Desta forma, este detector é específico para compostos que absorvem luz no ultravioleta (SKOOG et al., 2002; COLLINS et al., 2006).

A CG-EM recebe este nome devido ao fato da fase móvel (também chamada de gás de arraste) utilizada ser um gás (SKOOG et al., 2002; COLLINS et al., 2006). Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são: sistema de gases, sistema de injeção da amostra, forno da coluna, coluna cromatográfica, detector e registrador (SOARES, 2006). Na CG, por partição, o mecanismo de separação se faz pela partição gás-líquido que é baseada nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária (EDWARDS, 1970; CIOLA, 1973; SOARES, 2006). A CG é uma técnica utilizada na separação de substâncias gasosas ou volatilizáveis. A volatilidade dos compostos pode ser conseguida aumentando a temperatura no local de injeção da amostra e na coluna, ou derivatizando os compostos em outros, mais termicamente estáveis e menos polares (COLLINS, 1988; SOARES, 2006).

A derivatização é particularmente utilizada na CG para a análise de substâncias de alta massa molecular ou contendo grupos funcionais fortemente polares, a fim de evitar sua decomposição por aquecimento. Neste procedimento, ocorre a transformação da substância de interesse, em um derivado com características adequadas para ser analisada, ou ainda, introdução de grupos

específicos aumentando a detectabilidade da substância (EDWARDS, 1970; CIOLA, 1973; COLLINS, 1988; SKOOG et al., 2002; COLLINS et al., 2006; SOARES, 2006).

O cromatógrafo gasoso pode ser acoplado a equipamentos ou detectores que permitam a determinação seletiva de várias classes de substância (COLLINS, 1988; SKOOG et al., 2002).

Assim, as técnicas cromatográficas permitem uma rápida tipificação da composição da matriz vegetal estudada, com base nos tempos de retenção e/ou propriedades espectroscópicas e espectrométricas todas associados às características intrínsecas de cada substância presente, tais como polaridade, massa molecular, entre outras (SNYDER et al., 1997, ARDREY, 2003). Na maioria das vezes, a resposta obtida pelo detector permite a identificação inequívoca de metabólitos secundários presentes na matriz (ARDREY, 2003), que posteriormente podem ser quantificados com o uso de técnicas de calibração variadas, como por exemplo, adição de padrão, padrão externo e/ou padrão interno (ROBARDS, 2003).

Uma vez isoladas as substâncias, a utilização de dados espectrométricos de RMN, IV e EM, obtidos na literatura para substâncias conhecidas e a utilização de bibliotecas especializadas, auxiliam muito na sua identificação. Como já citado antes, existe uma grande quantidade de substâncias de origem naturais conhecidas, e novas estruturas, juntamente com seus espectros de RMN, IV e EM, estão sendo publicadas numa proporção de cerca de 10.000/ano (DICTIONARY, 1999).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo:

2.1 Geral

Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a composição química e atividade biológica de *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae), espécie aclimatada no Rio Sucuri, Município de Bonito em Mato Grosso do Sul.

2.2 Específicos

- a) Investigar os principais constituintes químicos presentes em *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae), utilizando técnicas cromatográficas de separação e de elucidação estrutural;
- b) Avaliar as atividades biológicas empregando ensaios (antineoplásico, alelopática, inseticida e antifúngica) dos extratos obtidos de *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae);
- c) Analisar os perfis cromatográficos dos extratos obtidos das três coletas realizadas neste estudo da espécie *G. elegans*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimentos experimentais gerais (especificações de materiais, instrumentos, reagentes e métodos utilizados)

1. A moagem do material vegetal foi realizada em moinho de facas tipo Wiley. Os solventes orgânicos utilizados para obtenção de extratos e fracionamentos foram das marcas Merck[®] (P.A.), Quimex[®] (P.A) e J. T. Baker[®] (grau de pureza CLAE). A água utilizada foi destilada e deionizada (resistividade mínima de 18,2 MΩ/cm a 25 °C). As soluções foram concentradas em evaporador rotativo (BuchiTM R-114), sob pressão reduzida.
2. Nas análises por CCD (cromatografia em camada delgada) foi utilizada sílica gel 60 G (Merck[®]) e para a CCDP (cromatografia em camada delgada preparativa) sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck[®], 90% < 45 µm). As placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v) sobre placas de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se 0,10 e 0,75 mm de espessura de adsorvente, para CCD e CCDP respectivamente. As placas foram deixadas em repouso por cerca de 6 a 8 horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 100 °C por 12 horas.
3. Como reveladores para CCD foram utilizados: irradiação na região do ultravioleta em 254 e 366 nm (Chromatovus), vapores de iodo, solução de sulfato de cério IV em ácido sulfúrico concentrado e solução metanólica de anisaldeído em ácido sulfúrico seguido de aquecimento em estufa.
4. Para CC (cromatografia em coluna) foram utilizadas: sílica gel 70 – 200 µm (Acros[®]), sílica gel 35 – 70 µm (Acros[®]), sílica de fase reversa LiChroprep RP-18 15 – 25 µm (Merck[®]) e gel polimérico LH 20 (SephadexTM).
5. O pré-tratamento das amostras para injeção em CLAE foi realizado em cartucho preenchido com sílica de fase reversa (C18), seguido de filtração em membrana de polivinilideno (PVDF) com 0,20 µm ou 0,45 µm (SigmaTM) de dimensão de poro. As soluções das amostras foram acondicionadas em *vials*

de 2,0 mL. O pré-tratamento das amostras para injeção em Cromatógrafo Gasoso (CG) foi realizado obtendo-se uma alíquota de 10,0 mg dos extratos hexânicos oriundo da folha, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícias que foi dissolvida em acetona (1,0 mL) seguida de filtração em membrana de politetrafluoretileno (PVFE) com 0,22 μm (Gelman[®]) de dimensão de poro e acondicionada em *vials*.

6. As análises por CLAE foram feitas utilizando um cromatógrafo Shimadzu[™] (LC-10A) com bomba binária (LC-8A), controlador (SCL-10Avp), detector UV/VIS variável Shimadzu[™] (SPDV-6AV) com arranjo de fotodiodos (AFD). Foram utilizadas colunas Phenomenex[®] Luna[®] C18 analítica (250 x 4,60 mm, com 5 μm de tamanho de partícula) e preparativa (250 x 21,20 mm, com 10 μm de tamanho de partícula). Os cromatogramas foram adquiridos em 254 nm.
7. Os espectros de massas foram obtidos através do método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) em um aparelho Shimadzu[™] (QP-5050A). Condições programadas no aparelho: coluna capilar de DB-1 (dimetil-polisiloxano) com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno; gás de arraste: Hélio (1 mL/min); programa: 50-295 °C a 2 °C/min e, depois, 295 °C a 20 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 μL , split 1:21.
8. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram adquiridos nos espectrômetros: Bruker[™] DPX-300 operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C e Varian[™] INOVA 500, operando a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . O padrão interno utilizado como referência foi tetrametilsilano (TMS) e os solventes deuterados (CDCl_3 , CD_3OD e Piridina- D_5) empregados foram da marca Sigma-Aldrich[™].
9. As análises de XPS (*X-Rays Photoelectron Spectroscopy* - Espectroscopia Fotoelétrica de Raios-X) foram realizadas usando um Sistema Modular de Ultra-Alto Vácuo (UNI-SPECS UHV *Surface Analysis System*) e os espectros obtidos por uma fonte de excitação com radiação de Al (alumínio) e K (potássio) [1486,6 eV] operando a 250 W (10 kW). A faixa de intervalo inicialmente estudada foi de 0 (zero) a 1100 eV com um tempo de retenção de 0,5 s, energia de passo de 50 eV em ciclos de 0,4 eV. Para as análises de

alta resolução, o número de varreduras foi aumentado, e a energia de passo usada foi 10 eV em ciclos de 0,05 eV com tempo de retenção de 1 s.

10. As frações analisadas em modo analítico foram submetidas à CLAE em fase reversa, utilizaram coluna Phenomenex[®] Luna[®]C18 (250 x 4,60 mm, 5 µm), utilizando-se como eluentes misturas MeOH/H₂O com detecção a 254nm.
11. As frações analisadas em modo preparativo foram submetidas à CLAE em fase reversa utilizando coluna Phenomenex[®] Luna[®]C18 (250 x 21,20 mm, com 10 µm de tamanho da partícula), utilizando-se como eluentes misturas MeOH/H₂O com detecção a 254nm.
12. Equipamento de ultrassom (Thornton[®], mod. T 50), com potência de 120 W, frequência de 40 KHz e intensidade de radiação de 0,27 W cm⁻² foi utilizado para as extrações ultrassônicas dos órgãos da espécie *G. elegans*. As dimensões do banho de ultrassom usado foram de 30 cm x 50 cm x 20 cm. Utilizaram-se erlemeyers de 250 mL e 2000 mL. A água do banho foi mantida, a uma temperatura de 25 °C ± 5 °C, para evitar possível influência no processo de extração.
13. Os processamentos dos sinais de RMN unidimensionais (¹H, ¹³C) e bidimensionais (HMQC e HMBC) foram realizados com os programas SpinWorks 2.5.5 ou MestReNova versão 6.0.2-5475.
14. A coleta e obtenção dos extratos foram realizadas de acordo com o fluxograma na Figura 7.

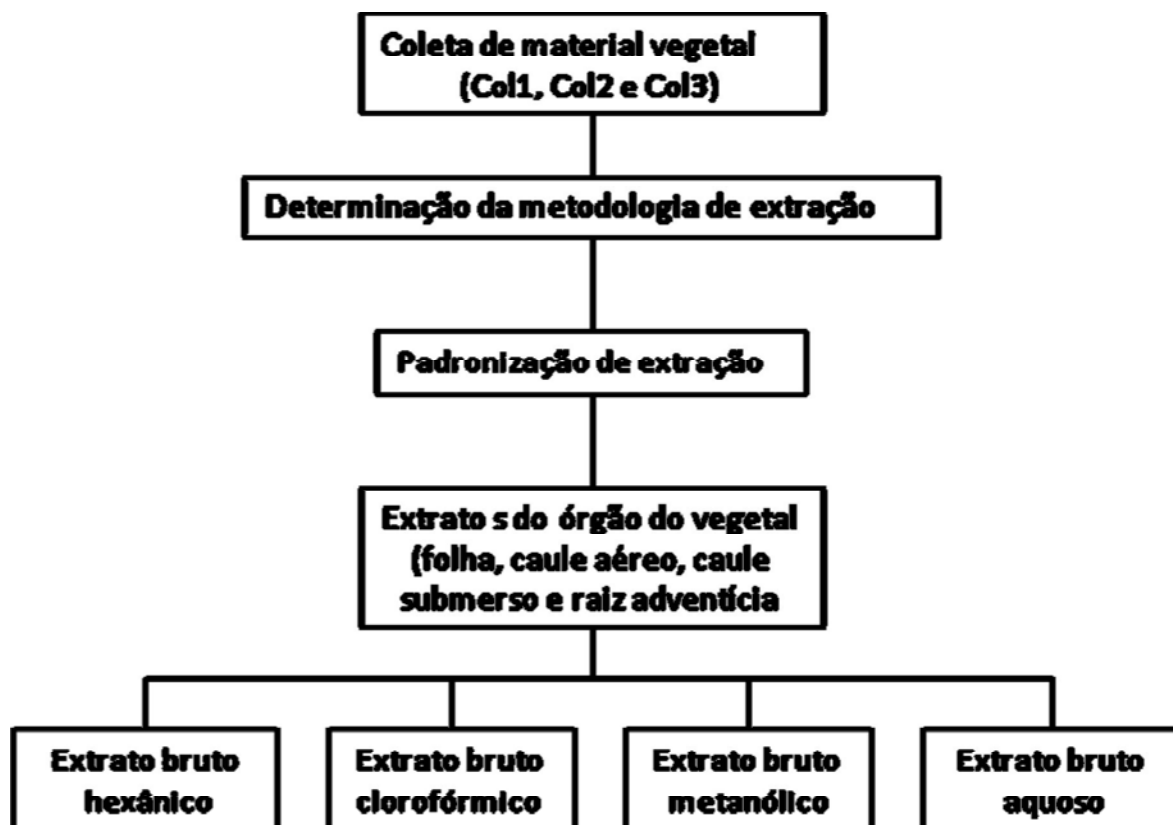


Figura 7. Fluxograma dos procedimentos para obtenção dos extratos.

3.2 Coleta e identificação do material

Foram coletadas, folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia, de *G. elegans* Mart., que em seguida foram armazenadas à temperatura ambiente em sacos plásticos durante o transporte até o local de trabalho.

A Primeira coleta (**Col1**) da espécie foi realizada em 28 de março de 2007 no Rio Sucuri (21°15'36,4"S e 56°32'58,1"W), no município de Bonito/MS, a segunda coleta (**Col2**) foi realizada dia 06 de agosto de 2007, a terceira coleta (**Col3**) foi realizada em 8 de fevereiro de 2008. Exemplares botânicos foram amostrados e a exsicata correspondente foi identificada pela taxonomista Msc. Leila Carvalho da Costa, encontrando-se depositada e registrada no Herbário CGMS sob nº17.715.

3.3 Padronização da obtenção dos extratos

3.3.1 Padronização da extração

O método selecionado para este estudo comparativo de desempenho foi o ultrassom. Os solventes foram: etanol, etanol/água 50:50 (v/v), clorofórmio:água:metanol 33:33:34 (v/v) e sistema utilizando um único solvente (hexano, clorofórmio, metanol e água), seguido de avaliação qualitativa por CCD.

Para a avaliação da metodologia extrativa levou-se em conta, o rendimento em extrato seco e a economia de tempo.

Os materiais da *G. elegans* Mart., folhas (GF), caule aéreo (GA), caule submerso (GS) e raiz adventícia (GR) foram separados e devidamente denominados. As amostras, separadamente, foram secadas em estufa com circulação de ar a 40 °C durante 72 h, e posteriormente pulverizadas em partículas de 0,5 – 1,0 mm. O material seco foi acondicionado em frascos de vidro com tampo de vidro na cor âmbar e armazenado em dessecador contendo sílica gel dessecante e protegido da luz.

Para a extração de cada amostra foram utilizadas 4,0 g $\pm$ 0,05 g do material vegetal com um volume de 400 mL de solvente extrator perfazendo a proporção de massa seca do vegetal:solvente de 1:100 (m/v). Todos os processos de extração foram realizados em triplicata (FUKUSAKI; KOBAYASHI, 2005).

3.3.1.1 Avaliação dos rendimentos de extração

As extrações foram realizadas em banho de ultra-som por 120 minutos, em temperatura ambiente (temperatura média entre 25 °C a 30 °C), foram utilizados quatro sistemas extratores, para avaliação dos rendimentos de extratos, sendo eles:

a) etanol (**SE**);

- b) sistema hidroalcoólico (etanol/água 50:50 [v/v]) (**SEA**);
- c) sistema utilizando um único solvente a cada extração (hexano, clorofórmio, metanol e água) (**SHCMA**) (30 minutos para cada solvente);
- d) sistema de solventes contendo mistura $\text{CHCl}_3\text{:H}_2\text{O:CH}_3\text{OH}$ 33:33:34 (v/v) [**SCAM**].

Os extratos obtidos após a sonicação foram filtrados, recolhidos em balões de fundo redondo, e evaporados em rota-evaporador à temperatura inferior a 60 °C, sob pressão reduzida, para preservação de seus constituintes. Após concentração, os extratos foram mantidos em estufa a 40 °C pelo período de 72 h, e levados a dessecador contendo sílica gel dessecantes para eliminação completa de água.

O rendimento de extração foi calculado em relação à matéria-prima vegetal seca e a seletividade dos constituintes químicos foram avaliados por CCD, utilizando como fase móvel acetona:metanol (9:1 v/v).

Os resultados obtidos (massas) foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando evidenciada diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Tukey.

3.4 Obtenção dos extratos

Após análise de seletividade dos solventes extratores e rendimento da extração (massa extraída/massa de vegetal seca), foi realizada a extração total utilizando o sistema **SHCMA** de solventes extratores (Figura 7). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e determinadas as massas dos resíduos secos (Tabela 1).

Tabela 1. Rendimento de material obtido dos extratos da espécie *G. elegans* das coletas realizadas

OV	MS (g)	Solventes	Sigla	ME (g) Col1	ME (g) Col2	ME (g) Col3
Caule aéreo (GA)	500,0	Hexano	GA1	1,70	1,29	1,60
		Clorofórmio	GA2	2,87	2,84	2,71
		Metanol	GA3	31,63	31,79	17,98
		Água	GA4	25,33	18,64	83,35
Caule submerso (GS)	500,0	Hexano	GS1	1,57	1,54	1,38
		Clorofórmio	GS2	2,40	2,00	2,09
		Metanol	GS3	16,60	13,88	32,77
		Água	GS4	18,52	34,22	30,58
Raiz (GR)	150,0	Hexano	GR1	0,35	0,31	0,24
		Clorofórmio	GR2	0,70	0,76	0,67
		Metanol	GR3	2,68	2,37	2,28
		Água	GR4	3,62	7,46	5,58
Folha (GF)	500,0	Hexano	GF1	2,65	1,66	2,22
		Clorofórmio	GF2	6,86	5,35	3,81
		Metanol	GF3	32,60	32,58	23,42
		Água	GF4	46,61	46,83	49,41

ME= Massa do extrato bruto; MS= Massa seca do vegetal, OV = órgãos do vegetal.

3.5 Análise dos extratos provenientes do fracionamento e isolamento dos constituintes químicos referentes à Coleta 1 (Col1)

3.5.1 Análise dos extratos hexânicos da Col1, por CG-EM

Os extratos hexânicos dos órgãos coletados de *G. elegans* (5mg/mL) foram submetidos a um pré-tratamento conforme *item 3.1 subitem 5*, para injeção em CG-EM.

3.5.1.1 Identificações dos componentes

As identificações dos componentes foram baseadas na comparação entre os índices de retenção de Kovats, os espectros de massas obtidos experimentalmente, dados da literatura e comparação com espectros de massas registrados nos bancos espectrais: NIST (*National Institute of Standards and Technology*), Wiley (versão 229) e FFNSC (*Flavor and Fragrance Natural and Synthetic Compounds*; versão 1.2)

Os índices de retenção de Kovats foram obtidos utilizando como padrões a série homóloga de *n*-alcanos C8-C32, Sigma[®]. A utilização dos índices de Kovats teve a finalidade de eliminar erros, devidos à variação do tempo de retenção das substâncias, decorrentes de alterações como temperatura, fluxo de gás de arraste, operador, etc. Os índice de retenção foram obtidos através da Equação 1:

Equação 1 $I = 100z + 100(\log t'_{RX} - \log t'_{RZ}) / (\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ})$

Onde:

z = número de átomos de carbono com menor peso molecular.

t'_{RX} = tempo de retenção do composto x , sendo t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$.

t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$ = tempos de retenção ajustados dos alcano de cadeia normal.

3.5.2 Tratamento dos extratos brutos clorofórmico, metanólico e aquoso da Col1

Os extratos brutos: clorofórmico, metanólico e aquoso, dos órgãos obtidos da Col1, exceto da raiz adventícia, passaram pelos tratamentos descritos na Figura 8, antes de serem analisados. As massas obtidas de cada órgão bem como a representação desses tratamentos são apresentadas na Tabela 2 e Figuras 9, 10, 11 e 12. A solubilização dos extratos, porém, não foi completa obtendo-se material insolúvel em todos os extratos tratados. Como os extratos brutos da raiz adventícia apresentavam pouca massa optou-se por não realizar os tratamentos nesses extratos.

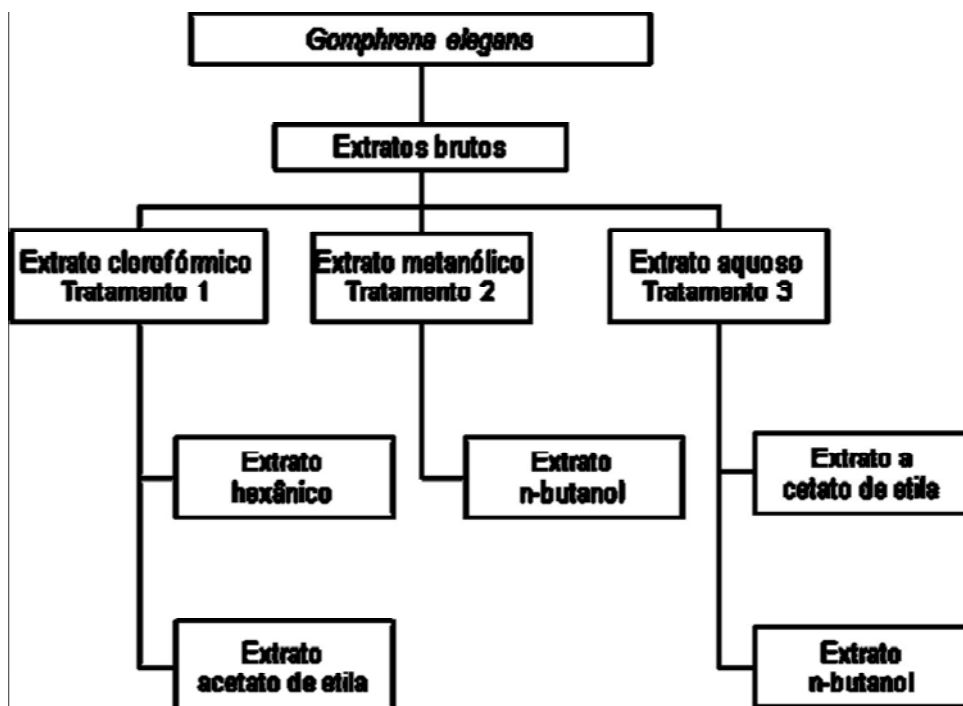


Figura 8. Obtenção dos extratos a partir dos tratamentos nos extratos brutos das folhas, caule aéreo e caule submerso da espécie *Gomphrena elegans*.

Os tratamentos foram:

3.5.2.1 Tratamento 1: extratos clorofórmicos

O extrato clorofórmico bruto foi submetido a uma partição em metanol/água/hexano 80:20:80 (v/v) [2,3 L], obtendo-se deste processo os extratos hexânico e hidrometanólico. O extrato hidrometanólico foi submetido a uma nova partição sendo que a concentração metanol/água foi ajustada para 40:60, sendo extraída com acetato de etila (1L) obtendo assim o extrato acetato de etila.

3.5.2.2 Tratamento 2: extratos metanólicos

O extrato metanólico bruto foi submetido a uma partição butanol/água 50:50 (v/v) [2,0 L], obtendo-se deste processo os extratos butanólico e aquoso sendo que o extrato aquoso foi descartado.

3.5.2.3 Tratamento 3: extratos aquosos

O extrato aquoso bruto foi submetido a uma nova extração com acetato de etila (1,0 L) e n-butanol (2,0 L), obtendo-se deste processo os extratos acetato de etila e butanólico.

Tabela 2. Massa obtida após tratamento dos extratos brutos de *G. elegans* Col1

EB	MV(g)	EH	EActE	EnB	CI	T ¹
GA2	2,87	1,11	0,86	-	0,06	0,84
GA3	31,63	-	-	5,04	3,96	22,63
GA4	25,33	-	0,28	0,14	0,05	24,86
GS2	2,40	0,87	0,46	-	0,02	1,05
GS3	16,60	-	-	2,34	1,29	12,97
GS4	18,52	-	0,19	0,85	0,06	17,42
GR2	0,70 ²	-	-	-	-	-
GR3	2,68 ²	-	-	-	-	-
GR4	3,62 ²	-	-	-	-	-
GF2	6,86	3,06	1,51	-	0,60	1,69
GF3	32,60	-	-	4,89	4,92	22,79
GF4	46,61	-	0,68	0,58	0,04	45,31

¹ material insolúvel, ² extratos analisados sem partição diretamente do extrato bruto (sem partição), EB= Extratos brutos; MV= massa do vegetal; EH= Extrato hexânico; EActE= Extrato Acetato de etila; EnB= Extrato n-Butanol; CI= Cristais inorgânicos; T= Torta.

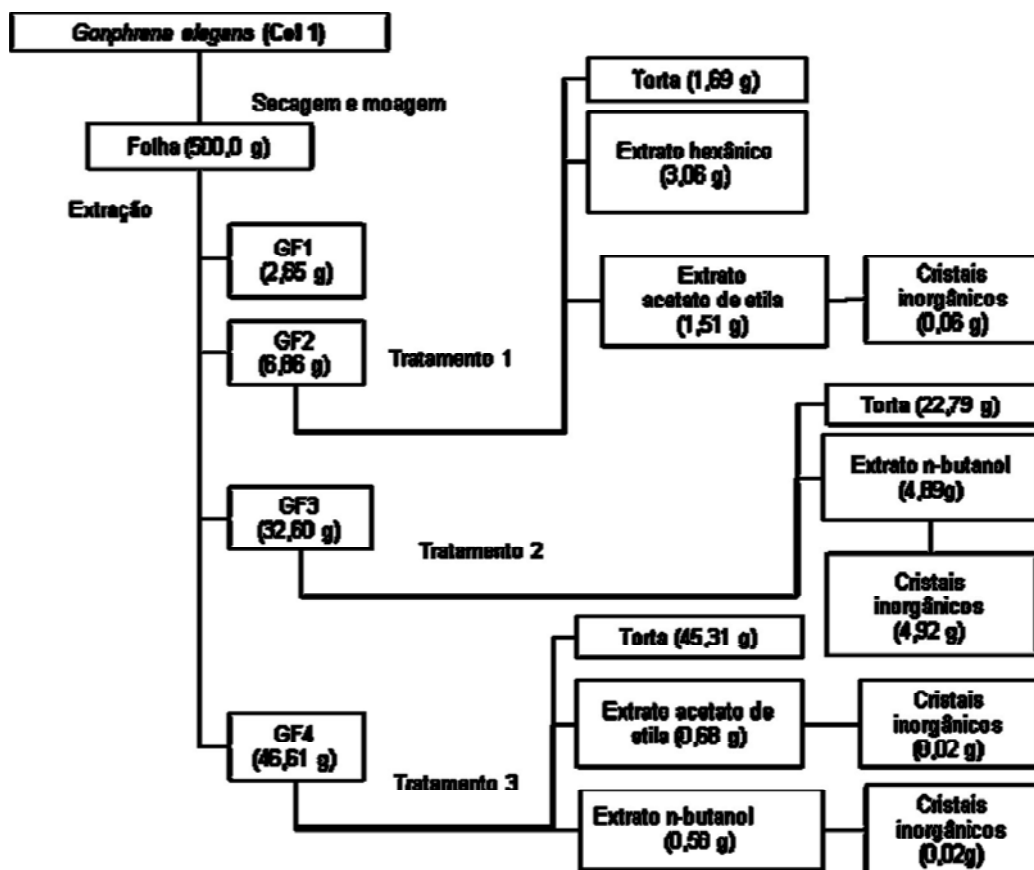


Figura 9. Fracionamento dos extratos da folha da espécie *Gomphrena elegans* (Col1).

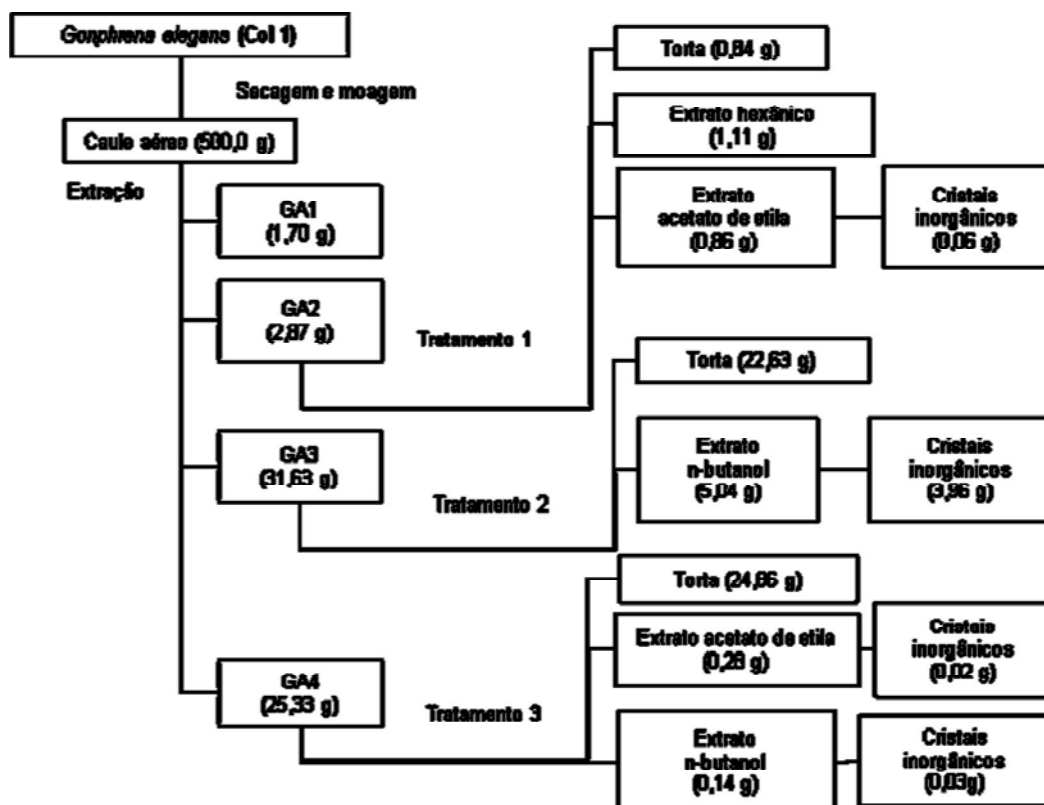


Figura 10. Fracionamento dos extratos do caule aéreo da espécie *Gomphrena elegans* (Col1).

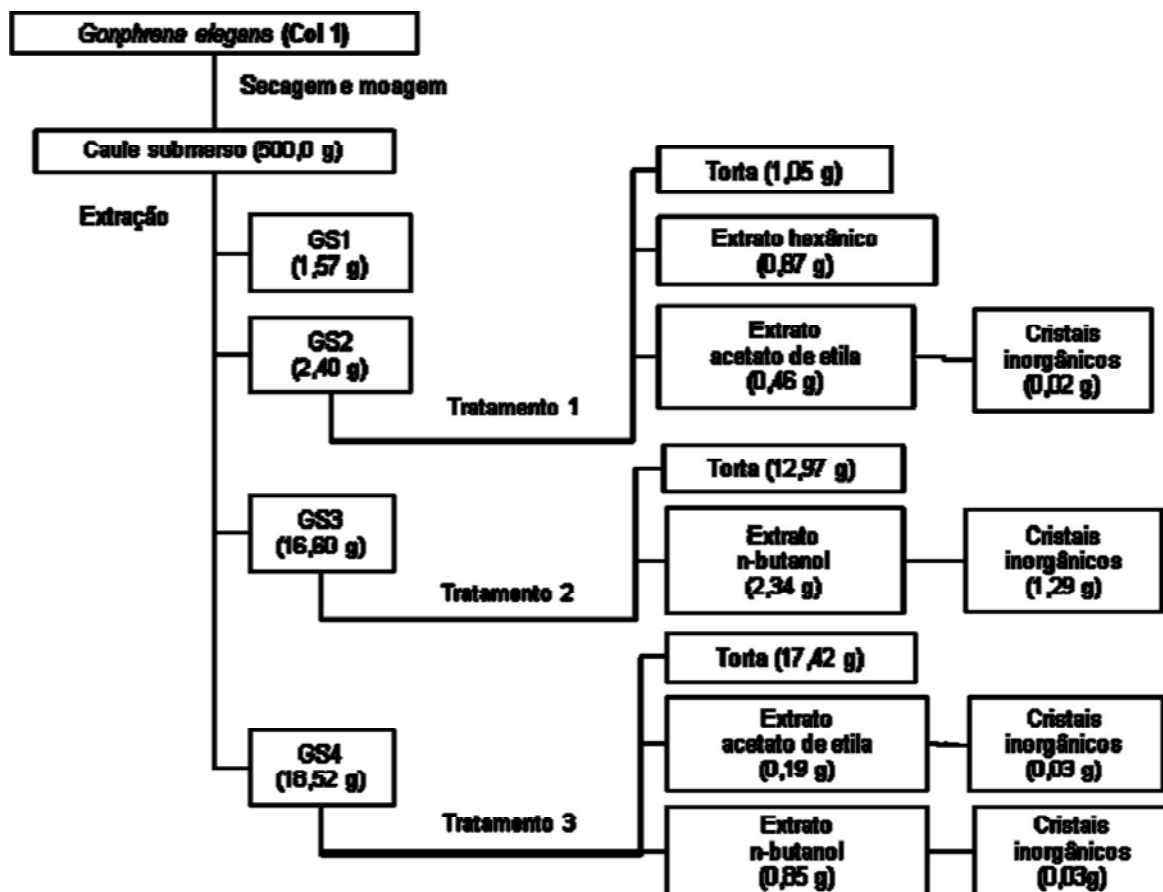


Figura 11. Fracionamento dos extratos do caule submerso da espécie *Gomphrena elegans* (Col1).

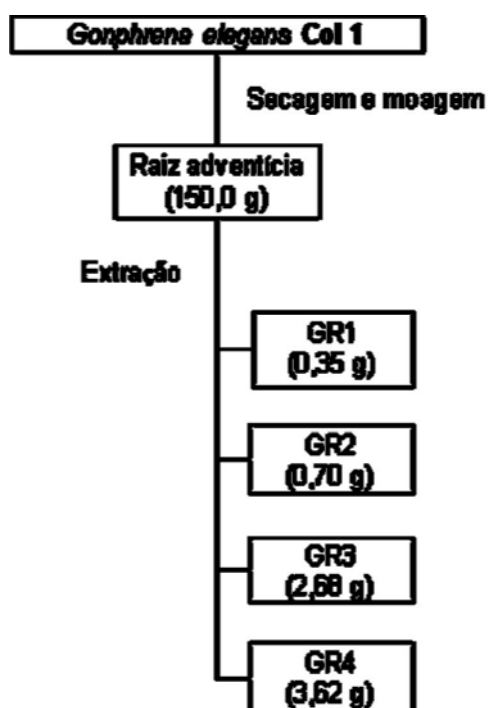


Figura 12. Extratos da raiz adventícia da espécie *Gomphrena elegans* (Col1).

3.5.3 Fracionamento dos extratos provenientes da partição, identificação e isolamento dos constituintes químicos (Col1)

3.5.3.1 Estudo do extrato hexânico obtido do extrato GF2

Inicialmente o estudo fitoquímico foi realizado com o extrato hexânico obtido da folha (3,06 g) oriundo do extrato GF2.

O extrato foi submetido a uma cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica gel (70-230 μm) como fase estacionária, eluída com hexano, acetato de etila e metanol no gradiente de polaridade conforme Tabela 3.

Tabela 3. Gradiente de polaridade utilizado no extrato hexânico para obtenção das frações

Eluente	Proporção (%)	Volume (mL)
hexano	100	500
hexano/acetato de etila	2	380
hexano/acetato de etila	5	220
hexano/acetato de etila	10	550
hexano/acetato de etila	20	520
hexano/acetato de etila	30	580
hexano/acetato de etila	50	500
hexano/acetato de etila	70	600
acetato de etila	100	1000
acetato de etila/metanol	2	210
acetato de etila/metanol	5	325
acetato de etila/metanol	10	350
acetato de etila/metanol	20	300
acetato de etila/metanol	50	300
metanol	100	100

- ✓ Foram obtidas 19 frações de 365 mL cada, que foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), onde foi constatada nas frações 1 (3,8 mg), 2 (28,1 mg), 3 (258,2 mg) e 4 (87,3 mg) a presença de substâncias majoritárias. As metodologias de análise das frações trabalhadas estão descritas a seguir:
- ✓ A fração 1, mostrou ser constituída de uma única substância, através de análise por CCD, seguida de revelação com iodo. Sua estrutura foi determinada através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , como sendo a substância **36** (3,8 mg).
- ✓ A fração 2, foi submetida a uma CC de gel polimérico LH 20 , eluída com $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 3:2 (v/v), obtendo-se 15 subfrações de 10 mL cada. A subfração 2.6 (4,0 mg) apresentou uma substância majoritária, que através de CCD, seguida de revelação com sulfato de cério IV, apresentou uma mancha cor avermelhada clara. A análise dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° da fração demonstrou que este constituinte majoritário tratava-se da substância **38**.
- ✓ A fração 3, foi submetida a uma CC de gel polimérico LH 20 usando-se como eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 3:2 (v/v), obtendo-se 25 subfrações de 5 mL cada. As subfrações obtidas desta coluna foram submetidas à análise por CCD e agrupadas, segundo critérios de semelhança, as subfrações 3.7-3.8 (5,0 mg) apresentaram uma mancha alongada de cor vermelha através de CCD, seguida de revelação com sulfato de cério IV, sendo identificada através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° como sendo o **39**.
- ✓ A fração 4, foi submetida a uma CC de Gel polimérico LH 20 usando-se como eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 3:1 (v/v), obtendo-se 32 frações de 5 mL cada. Sendo submetidas à análise por CCD e agrupadas, segundo critérios de semelhança. Foi constatado através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e espectro de massa que as subfrações 4.13-4.18 eram as substâncias identificadas como **17**, **19**, **45**, **46**, **27** e **47** (6,4 mg).

Um esquema do fracionamento pode ser visualizado na figura 13.

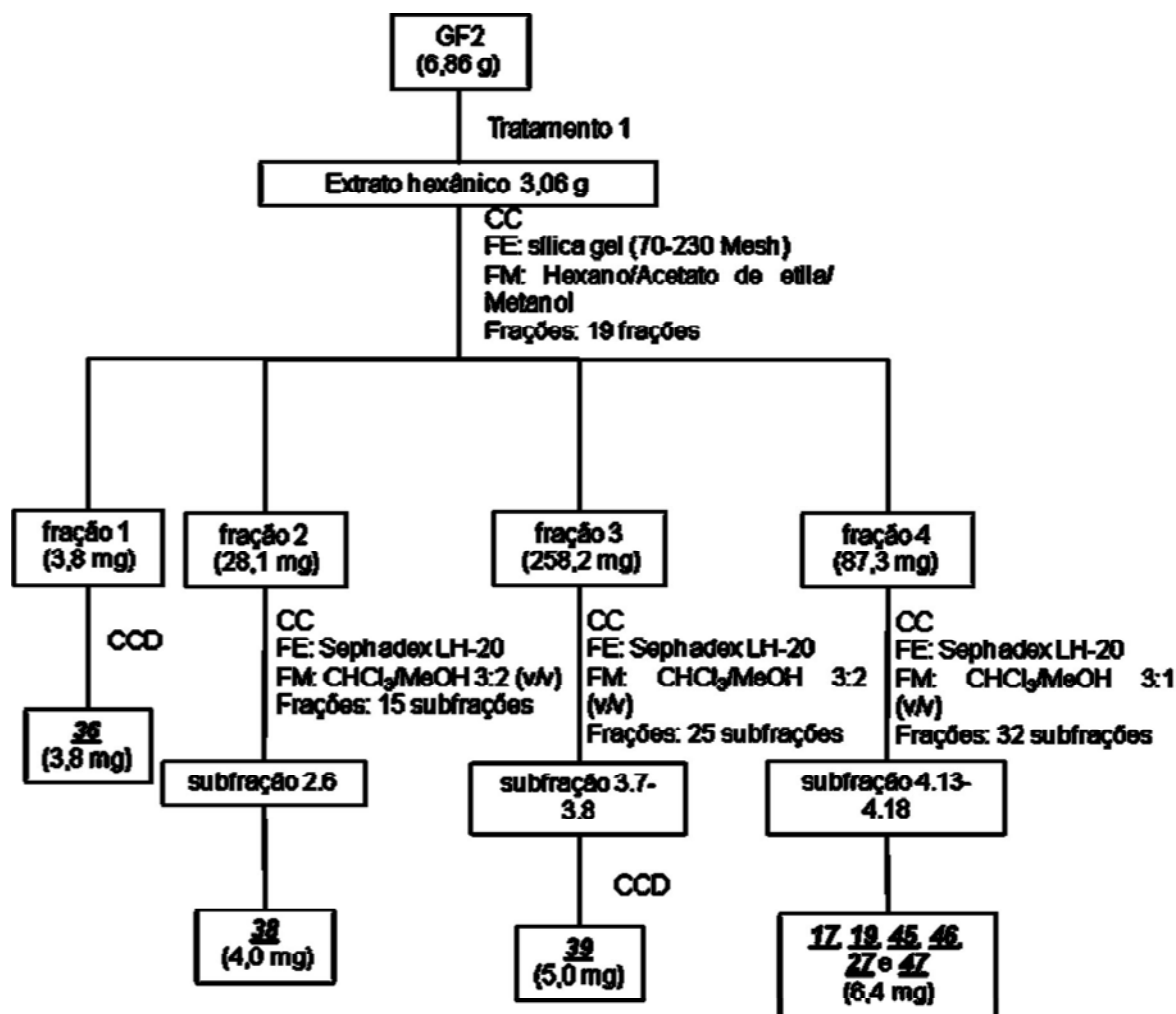


Figura 13. Fracionamento do extrato hexânico obtido do extrato GF2 da Folha de *G. elegans*.

3.5.3.2 Estudo do extrato acetato de etila obtido do extrato GF2

O extrato acetato de etila (1,51 g) obtido do extrato GF2 foi submetido a uma CC de sílica gel (70-230 μ m), eluída com hexano, acetato de etila e metanol, no gradiente de polaridade conforme Tabela 4.

Tabela 4. Gradiente de polaridade utilizado no extrato acetato de etila para obtenção das frações

Eluente	Proporção (%)	Volume (mL)
hexano	100	500
hexano/acetato de etila	2	380
hexano/acetato de etila	5	220
hexano/acetato de etila	10	550
hexano/acetato de etila	20	520
hexano/acetato de etila	30	580
hexano/acetato de etila	50	500
hexano/acetato de etila	70	600
acetato de etila	100	1000
acetato de etila/metanol	2	210
acetato de etila/metanol	5	410
acetato de etila/metanol	10	350
acetato de etila/metanol	20	300
acetato de etila/metanol	50	300
metanol	100	600

Foram obtidas 18 frações de 390 mL cada, que foram analisadas por CCD, foi constatada nas frações 2 (123,0 mg), 3 (93,4 mg) e 8 (78,0 mg) a presença de uma substância majoritárias.

As metodologias de análises das frações trabalhadas estão descritas a seguir (Figura 14)

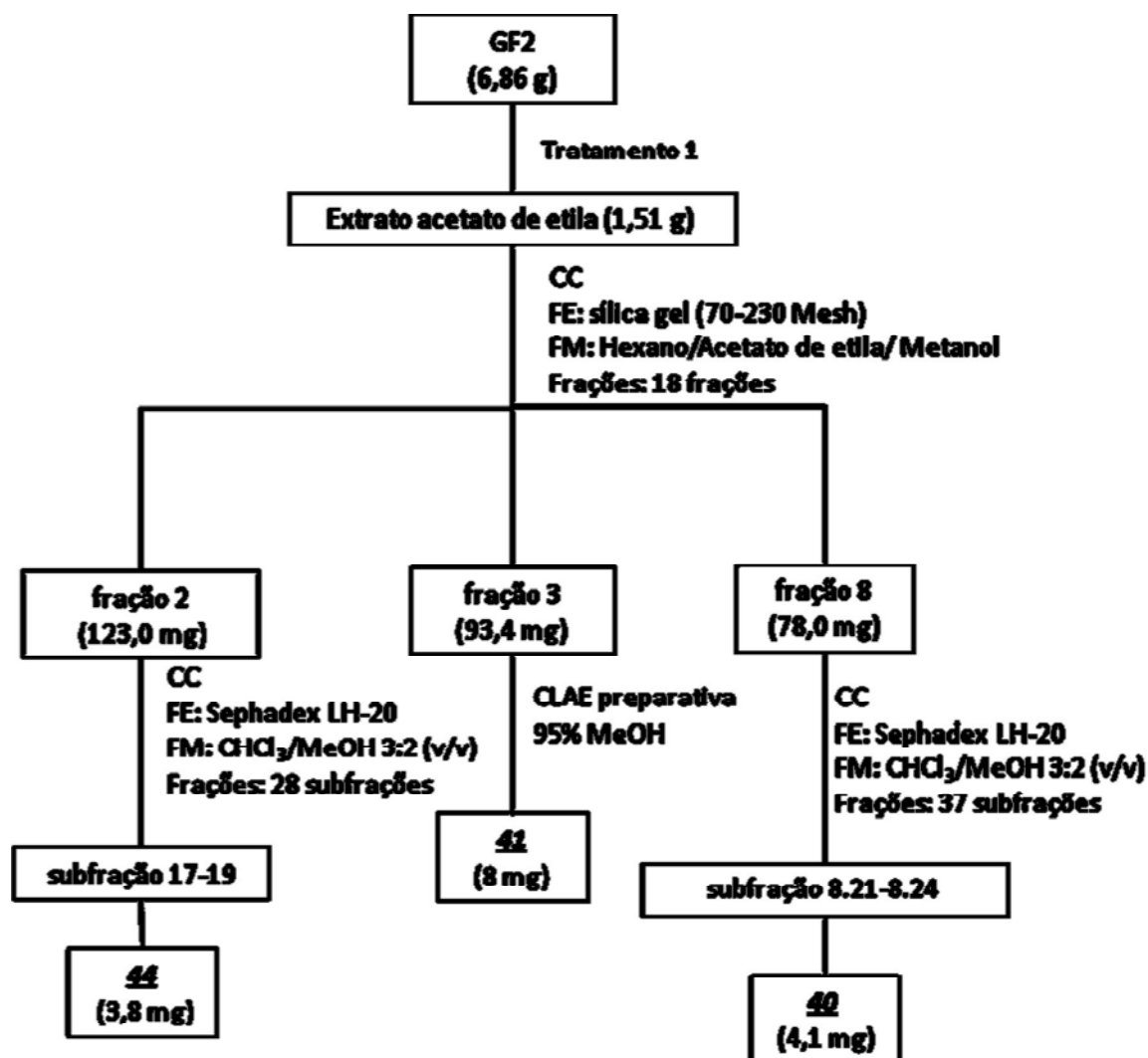


Figura 14. Fracionamento do extrato acetato de etila obtido do extrato bruto clorofórmico da folha de *G. elegans*.

- ✓ A fração 2, foi submetida a uma CC de Gel polimérico LH 20 tendo como eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 3:2 (v/v), sendo obtidas 28 subfrações de 5 mL cada. As subfrações obtidas desta coluna foram submetidas à análise por CCD seguida de revelação com solução metanólica de anisaldeído em ácido sulfúrico e agrupadas, segundo critérios de semelhança. Foi constatada através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e espectro de massa nas frações 2.17-2.19 (3,8 mg) a presença de uma substância majoritária denominada 44.
- ✓ Na fração 3, foi efetuado um pré-tratamento (*item 3.1 subitem 5*), para injeção em CLAE. A fração foi então submetida à CLAE conforme *item 3.1 subitem*

10, fluxo de 1,0 mL/min (95:05). No cromatograma obtido foi observada a presença de um (1) componente (pico 1), com tempo de retenção de 9,7 minutos. Após esta análise, a fração foi submetida a uma separação conforme *item 3.1 subitem 11*, fluxo de 14 mL/min [95:05 (v/v)], desses processos, resultou a obtenção da substância identificada como **41** (8 mg).

- ✓ A fração 8, foi submetida a uma CC de Gel polimérico LH 20 tendo como eluente CHCl₃:MeOH 3:2 (v/v), sendo obtidas 37 subfrações de 5 mL cada. As subfrações obtidas desta coluna foram submetidas à análise por CCD e agrupadas, segundo critérios de semelhança. Estas subfrações 8.21-8.24 (4,1 mg) apresentaram uma substância majoritária, que através de CCD, seguida de revelação com sulfato de cério IV, apresentou uma mancha cor avermelhada. A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C das subfrações demonstrou que este constituinte majoritário tratava-se de **40**.

3.5.3.3 Estudo do extrato *n*-butanol obtido do extrato GF3

O extrato *n*-butanol (4,89 g) obtido do extrato GF3 foi submetido a uma CC de sílica gel (70-230 µm), eluída em gradiente de polaridade, com hexano, acetato de etila e metanol Tabela 5.

Tabela 5. Gradiente de polaridade utilizado no extrato n-butanol para obtenção das frações

Eluente	Proporção (%)	Volume (mL)
hexano	100	500
hexano/acetato de etila	2	380
hexano/acetato de etila	5	220
hexano/acetato de etila	10	550
hexano/acetato de etila	20	520
hexano/acetato de etila	30	580
hexano/acetato de etila	50	500
hexano/acetato de etila	70	600
acetato de etila	100	1000
acetato de etila/metanol	2	210
acetato de etila/metanol	5	410
acetato de etila/metanol	10	350
acetato de etila/metanol	20	300
acetato de etila/metanol	50	300
metanol	100	600

Foram obtidas 18 frações de 390 mL cada, que foram analisadas por CCD. Foi constatada nas frações 5 (79,3 mg), fração 10 (83,4 mg), fração 11 (112,7 mg) e 17 (57,9 mg) a presença de substâncias majoritárias.

Foi então efetuado um pré-tratamento (*item 3.1 subitem 5*) das frações para injeção em CLAE.

- ✓ A fração 5, foi submetida a uma CC de gel polimérico LH 20 usando como eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 3:1 (v/v), sendo obtidas 32 subfrações de 5 mL cada. As subfrações foram submetidas à análise por CCD seguida de revelação com solução metanólica de anisaldeído em ácido sulfúrico e agrupadas, segundo critérios de semelhança. Foi constatado através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e espectro de massas nas subfrações 5.12-5.18 (5,1 mg) a presença de uma substância majoritária denominada **44**.

- ✓ A fração 10 foi analisada conforme *item 3.1 subitem 10*, fluxo de 0,6 mL/min [50:50 (v/v)]. No cromatograma obtido foi observada a presença de dois (2) componentes com tempo de retenção de 7,9 minutos (pico 1) e 10,3 minutos (pico 2). Após esta análise, a fração 10 foi analisada conforme *item 3.1 subitem 11*, fluxo de 12 mL/min [50:50 (v/v)]. Desses processos, resultou a obtenção das substâncias identificadas através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° como **49** (3,6 mg) e **50** (4,3 mg).
 - ✓ A fração 11 foi analisada conforme *item 3.1 subitem 10*, fluxo de 0,6 mL/min [50:50 (v/v)]. No cromatograma obtido foi observada a presença de três (3) componentes com tempo de retenção de 7,9 minutos (pico 1), 10,8 minutos (pico 2) e 17,9 minutos (pico 3). Após esta análise, a fração 11 foi analisada conforme *item 3.1 subitem 11*, fluxo de 12 mL/min [50:50 (v/v)]. Esses processos, resultaram na obtenção das substâncias identificadas através de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° como **51** (12,9 mg) [pico 1], **52** (5,6 mg) [pico 3] e **53** (4,4 mg) [pico2].
 - ✓ A fração 17 foi submetida à análise em CLAE analítico e a condição para sua purificação, em escala preparativa, foi estabelecida: fluxo de 10,0 mL/min, utilizando como eluente metanol (254nm). Na separação foi obtida a substância (4,9 mg) correspondente ao pico 1 com tempo de retenção de 9,2 minutos identificada como **42**. Para esta substância foram obtidos espectros de RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135° e espectro de massas.
- Todo este fracionamento pode ser visualizado na Figura 15.

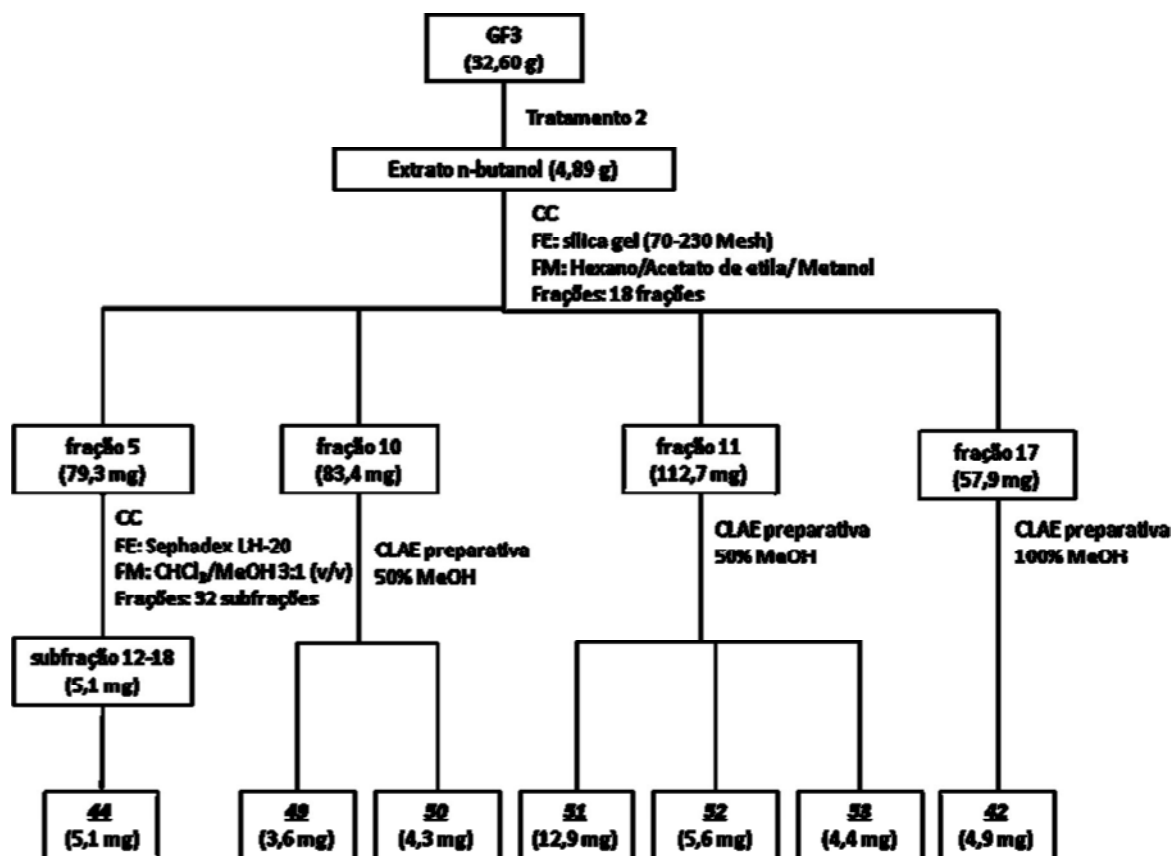


Figura 15. Fracionamento do extrato *n*-butanol obtido do extrato GF3 de *G. elegans*.

3.5.3.4 Estudo do extrato acetato de etila obtido do extrato GF4

Foi investigada a hipótese de uma possível contaminação nos extratos, através de análises cromatográficas dos extratos etanólicos dos materiais plásticos utilizados no laboratório (tampa plástica dos frascos utilizados para armazenar as frações e dos resíduos de solventes concentrados).

O extrato acetato de etila (0,68 g) obtido do extrato GF4 foi submetido a um pré-tratamento (item 3.1 subitem 5) para injeção em CLAE de fase reversa, analítica (item 3.1.10). Através do cromatograma obtido foi observada a presença de picos bem definidos. Após esta análise, as frações foram submetidas a uma separação em coluna semi-preparativa (item 3.1 subitem 11). Este processo resultou na obtenção da substância identificada como **48** (5,3 mg) com tempo de retenção de 7,5 minutos, utilizando como eluente MeOH/H₂O 05:95 (v/v) (254nm) fluxo de 10 mL/min. Foram, também, realizados experimentos RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135°.

Todo este fracionamento pode ser visualizado na Figura 16.

Talal Suleiman Mahmoud

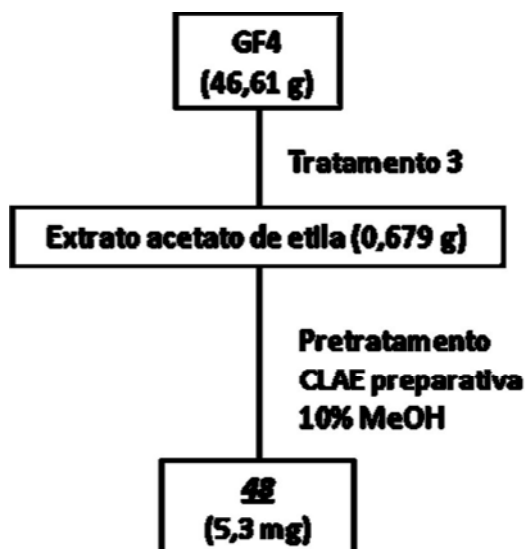


Figura 16. Fracionamento do extrato acetato de etila obtido do extrato GF4 de *G. elegans*.

3.5.3.5 Estudo do extrato *n*-butanol obtido do extrato GF4

O extrato *n*-butanol (0,579 g) obtido do extrato GF4 foi submetido a um pré-tratamento (*item 3.1 subitem 5*) para injeção em CLAE conforme *item 3.1 subitem 10* [05:95 (v/v)] (254nm). Através do cromatograma obtido foi observada a presença de picos bem definidos. Após esta análise, as frações foram analisadas conforme *item 3.1.1*. Desse processo, resultou a obtenção da substância identificada como **43** (7,7 mg) com tempo de retenção de 9,6 minutos. Foram também realizados os experimentos de RMN uni e bidimensionais.

Este fracionamento pode ser visualizado na Figura 17.

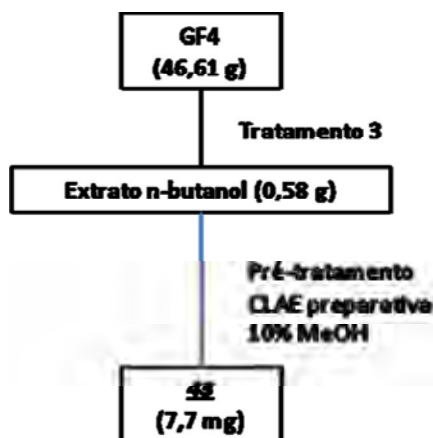


Figura 17. Fracionamento do extrato *n*-butanol obtido do extrato GF4 de *G. elegans*.

3.5.4 Estudo dos extratos obtidos dos extratos brutos clorofórmico metanólico e aquoso de GA e GS; e estudo dos extratos brutos de GR.

3.5.4.1 Estudo dos extratos obtidos de GA

O fracionamento seguiu o mais rigorosamente possível os procedimentos utilizados no fracionamento dos extratos obtidos da Folha da espécie *G. elegans*, conforme *item 3.5.3.1* e *item 3.5.3.2* para os extratos brutos clorofórmicos, conforme *item 3.5.3.3* para os extratos brutos metanólicos e *item 3.5.3.4* e *item 3.5.3.5* para os extratos brutos aquoso.

Esse fracionamento pode ser visualizado na Figura 18.

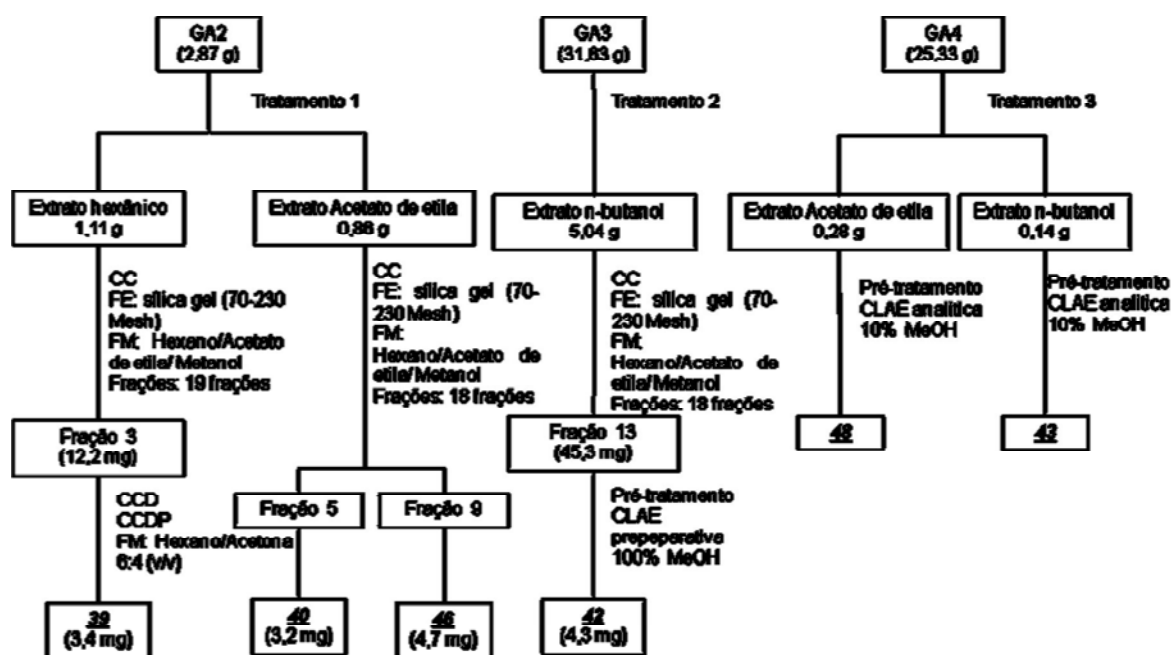


Figura 18. Fracionamento dos extratos obtidos dos extratos bruto do caule aéreo de *G. elegans*.

- ✓ O extrato hexânico (1,11 g), obtido do extrato GA2, foi submetido a uma CC, conforme *item 3.5.3.1*. As frações foram analisadas por CCD seguida de revelação com vapores de iodo, onde foi constatada na fração 3 (12,2 mg) a presença de substâncias majoritárias. O material foi então submetido a uma cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), eluída em

hexano:acetona (6:4, v/v), que forneceu uma substância, cuja estrutura, foi determinada como sendo **39** (3,4 mg), através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

- ✓ O extrato acetato de etila (0,86 g), obtido do extrato GA2, foi submetido a uma CC, conforme *item 3.5.3.1*. Das 18 frações obtidas apenas as frações 3 á 12 foram analisadas por CCD por apresentarem massa suficiente. Na fração 5 (3,2 mg) foi constatada a presença de substâncias majoritárias, cuja estrutura, através dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foi determinada como sendo **40**, e na fração 9 (4,7 mg) os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135° e espectro de massa, evidenciaram que se tratava de **46**.
- ✓ O extrato n-butanol (5,04 g) obtido do extrato GA3 foi analisado conforme *item 3.5.3.3*. Das 18 frações, que foram analisadas por CCD seguida de revelação com vapores de iodo, foi constatada na fração 13 (45,3 mg) a presença de substância majoritária. Foi então efetuado um pré-tratamento conforme *item 3.1, subitem 5*, na fração. A análise em CLAE seguiu as mesmas condições do *item 3.5.3.3* (Fração 17), obtendo-se um mesmo tempo de retenção na separação da substância, que os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C confirmaram tratar-se de **42** (4,3mg).
- ✓ O extrato acetato de etila (0,28 g) obtido do extrato GA4 foi analisado conforme *item 3.5.3.4*, e por comparação de tempos de retenção (7,5 min). Seu espectro de UV foi comparado com o da substância já isolada nas folhas. Desse processo resultou a confirmação da presença de **48** no extrato analisado.
- ✓ O extrato n-butanol (0,14 g) obtido do extrato GA4 foi analisado conforme *item 3.5.3.5*, e por comparação de tempo de retenção (9,6 min) e de seu espectro de UV com a substância já isolada nas folhas. Desse processo resultou a confirmação da presença de **43** no extrato analisado.

3.5.4.2. Estudo dos extratos obtidos de GS.

Foram realizadas as análises dos extratos obtidos do caule submerso conforme os procedimentos utilizados no fracionamento dos extratos obtidos da Folha da espécie *G. elegans*, conforme *item 3.5.3.1* e *item 3.5.3.2* para os extratos brutos clorofórmicos, conforme *item 3.5.3.3* para os extratos brutos metanólicos e conforme *item 3.5.3.4* e *item 3.5.3.5* para os extratos brutos aquoso, como apresentado na Figura 21. Todas as frações obtidas foram comparadas por CCD ou CLAE com as substâncias já isoladas para confirmação da presença destas últimas.

Um esquema dos procedimentos pode ser visualizado na Figura 19.

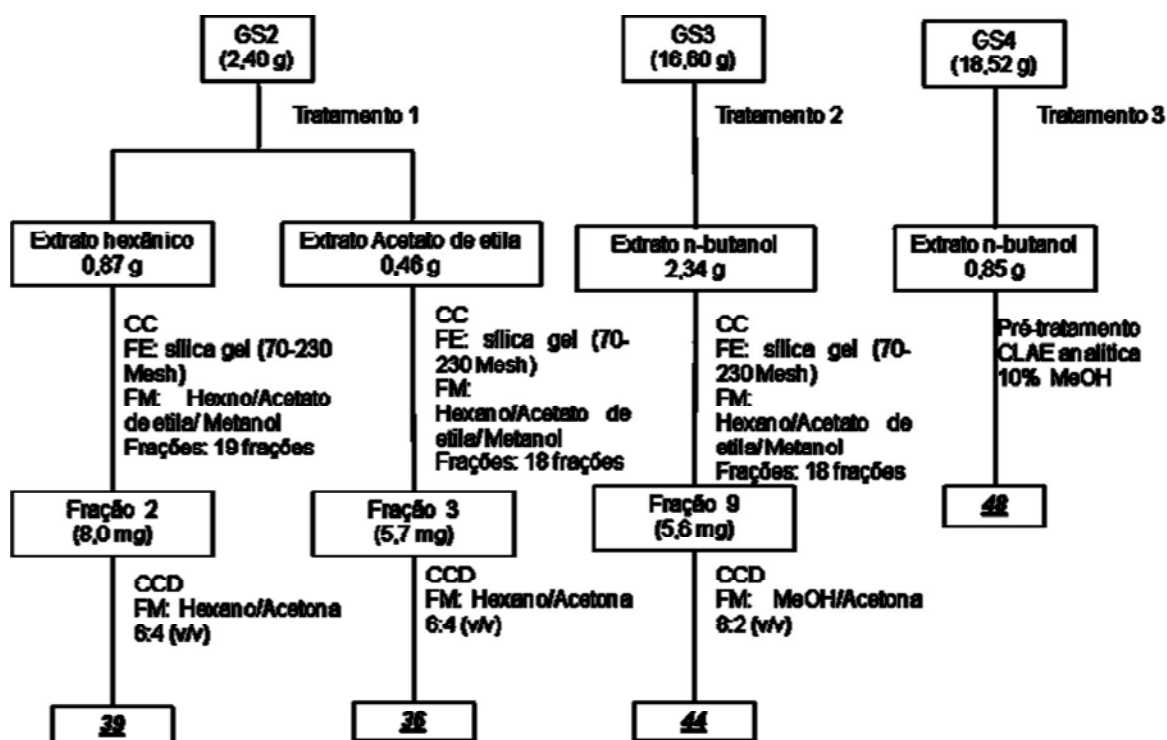


Figura 19. Fracionamento dos extratos obtidos dos extratos brutos do caule submerso de *G. elegans*.

Abaixo seguem as frações obtidas e trabalhadas (Figura 19):

- ✓ Do extrato hexânico (0,87 g), obtido do extrato bruto clorofórmico, as frações foram analisadas por CCD eluída em hexano:acetona (6:4, v/v), seguida de revelação com sulfato de cério IV, onde foi constatada na fração 2 (8,0 mg) a presença de substâncias majoritária com o mesmo tempo de Rf que a substância 39.

- ✓ O extrato acetato de etila (0,46 g), obtido do extrato bruto clorofórmico, das 18 frações obtidas e analisadas por CCD eluída em hexano:acetona (6:4, v/v), apenas a fração 3 (5,7 mg) apresentou substância com o mesmo Rf de substância já isolada, sendo ela determinada como **36**.
- ✓ O extrato n-butanol (2,34 g) obtida do extrato metanólico, das frações analisadas por CCD e eluída em metanol:acetona (8:2 v/v), e revelada com vapores de iodo, foi constatada na fração 9 (5,6 mg) a presença de substância com o mesmo Rf de substância já isolada, sendo caracterizada como a **44**.
- ✓ Do extrato acetato de etila (0,19 g) obtido do extrato aquoso não foram obtidas, após análise conforme *item 3.5.3.4*, substâncias com mesmo tempo de retenção ou espectro de UV das já isoladas nas folhas.
- ✓ Do extrato n-butanol (0,85 g) obtido do extrato aquoso foi analisado também conforme *item 3.5.3.5*, e por comparação de tempo de retenção (9,6 min) e seu espectro de UV com a substância já isolada nas folhas, desse processo resultou na confirmação da presença da substância **48**.

3.5.4.3 Estudo dos extratos brutos de GR

Foram realizada análise dos extratos bruto da raiz adventícia da espécie *G. elegans* (Figura 20). Todos os extratos brutos foram comparados por CCD ou CLAE com as substâncias já isoladas para confirmação da presença ou não delas.

O fluxograma do processo está representado na Figura 20.

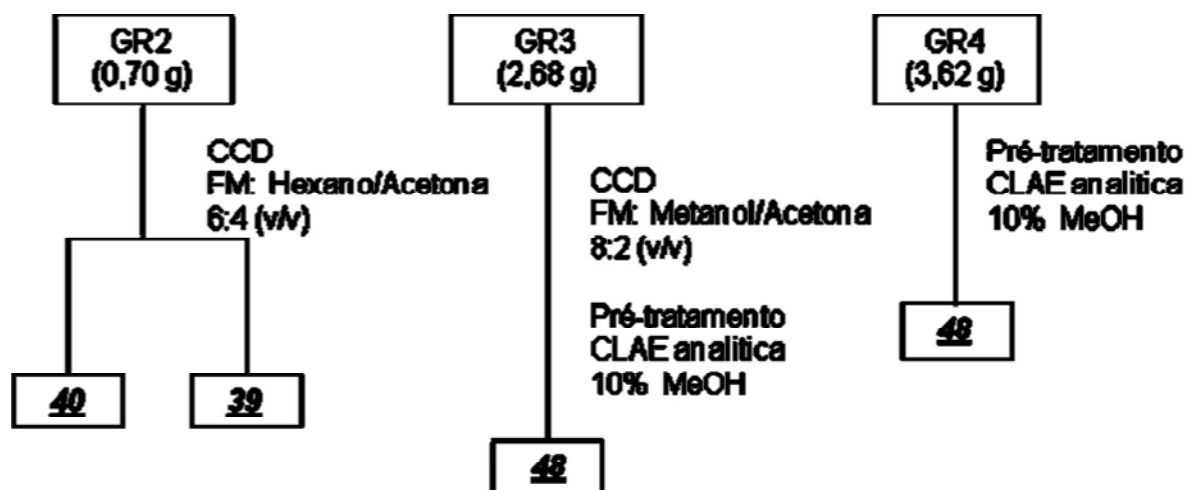


Figura 20. Fracionamento dos extratos brutos obtidos da raiz adventícia de *G. elegans*.

Abaixo seguem as frações obtidas e trabalhadas (Figura 20):

- ✓ Do extrato bruto clorofórmico (0,70 g), após análise em CCD eluída em hexano:acetona (6:4 v/v), foi constatado, através de Rf idênticos a presença da substâncias 39 e 40.
- ✓ Do extrato bruto metanólico (2,68 g), foi realizada a análise em CCD eluída em metanol:acetona (8:2 v/v). Como não foi constatada a presença de substância com os mesmos Rf já identificados, foi realizada análise em CLAE seguindo as mesmas condições do *item 3.5.3.3* (Fração 17), sendo obtido um pico com o mesmo tempo de retenção e mesmo espectro de UV da substância 48.
- ✓ O extrato bruto aquoso (3,62 g) foi analisado conforme *item 3.5.3.5*, e por comparação de tempo de retenção em CLAE (9,6 min) e espectro de UV com a substância já isolada nas folhas, sendo confirmada a presença da substância 48.

3.6 Análise dos Perfis Cromatográficos (Col1)

A fim de determinar com maior precisão o perfil químico da espécie *G. elegans* e assim estabelecer uma estratégia para futuros trabalhos na separação das substâncias presentes na espécie, foram registrados os perfis cromatográficos

dos extratos de *G. elegans* (Col1) por meio de análises por CLAE-AFD e análise de RMN de ^1H .

Alíquotas de 10,0 mg dos extratos clorofórmico, metanólico e aquoso oriundo da folha, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícias foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH:H₂O 95:5 (v/v), filtradas em membranas de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm (Sigma TM) de dimensão de poro.

Cada solução foi submetida ao cartucho Sep-Pak C18 (Supelco, com 6 g de adsorvente), e eluída com 10,0 mL de MeOH/H₂O 9,5:0,5 (v/v)., após passar por nova filtração em membrana de polivinilideno (PVDF) (Sigma TM) com 0,20 µm de dimensão de poro. As soluções resultantes foram analisadas por CLAE-AFD, com gradiente de eluição exploratório para os extratos clorofórmicos: MeOH:H₂O acidificado com ácido acético 1%, 40:60 (5 min), 60:40 (5min), 70:30 (5 min), 80:20 (5 min), 100:0 (20 min), e para os extratos metanólicos e aquoso com o gradiente de eluição exploratório: MeOH:H₂O acidificado com ácido acético 1%, 5:95 (5 min), 5:95 (25 min), 40:60 (30 min), 60:40 (10 min), 100:0 (20 min).

3.7 Análise da substância inorgânica isoladas nas três coletas

Foram isoladas em todos os órgãos estudados da espécie *G. elegans*, nos extratos, clorofórmico, metanólicos e aquoso, substância sólida cristalina encontrada em todas coletas (Col1, Col2 e Col3).

Uma amostra do cristal foi analisada na forma de pó usando como substrato uma fita de carbono dupla face. A amostra foi mantida no ultra-alto vácuo por 24 h e analisada conforme *item 3.1 subitem 9*.

3.8 Perfis Cromatográficos dos extratos das três coletas

Após um pré-tratamento conforme *item 3.1 subitem 5*, para injeção em CG-EM, foram analisados os perfis cromatográficos dos extratos GF, GA, GS e GR, de

G. elegans das três coletas (Col1, Col2 e Col3) [5 mg/mL]. As análises foram realizadas no equipamento conforme *item 3.1 subitem 7*, e suas identificações ocorreram conforme *item 3.5.1.1*.

Para se determinar também os perfis cromatográficos com maior precisão na espécie *G. elegans* foram registrados os perfis cromatográficos dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos oriundos das folhas, caule aéreo, caule submerso e raízes adventícias das coletas Col1, Col2 e Col3. As análises foram realizadas no equipamento conforme *item 3.1 subitem 6*, e seguiram a metodologia da preparação e análise de todas as alíquotas conforme *item 3.6*.

3.9 Bioensaios para verificação de atividades biológicas

3.9.1 Ensaios de atividade antifúngica

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob supervisão da Professora. Dra. Maria Rita Marques.

Os microrganismos utilizados nos ensaios antifúngicos *Cladosporium sphaerospermum* (Penzig) foram mantidos no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, Brasil.

Para o ensaio antifúngico, foram preparadas soluções contendo 100, 50, 25, 10, 5 e 1 mg dos extratos oriundos da Col1 (folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia) da espécie *G. elegans*. Foram aplicados 10,0 µL de cada solução a cromatoplasmas pré-revestidas e eluídas com diferentes solventes: extrato hexânico (hexano:acetona [9:1 v/v]), extrato clorofórmico (hexano:acetona [6,5:2,5 v/v]), extrato metanólico (clorofórmio:metanol [8:2 v/v]) e extrato aquoso (clorofórmio:metanol [7:3 v/v]) como fase móvel. A eluição foi desenvolvida em percurso de 5,0 cm, usando a técnica de ascensão unidimensional, e após o que foram removidos completamente os eluentes através de câmara de secagem. As placas foram pulverizadas com suspensão de esporos de *C. sphaerospermum* em

glicose e solução salina e incubada por 72 h no escuro em uma câmara úmida a 25 °C. Após o tempo de incubação, foi observado o crescimento do fungo sobre a placa. Nos locais onde existiam substâncias fungitóxicas surgiu um halo de inibição. Foi utilizada nistatina (1 µg) como padrão positivo (HOMANS; FUCHS, 1970).

3.9.2 Ensaio de potencial alelopático sobre sementes de *Lactuca sativa* L.

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob supervisão da Professora. Dra. Maria Rita Marques

Foram realizados ensaios para verificar a ação dos extratos e sal inorgânico oriundos da Col1 (folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia) de *G. elegans* na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. cv. *Grand rapids* (Asteraceae).

As variáveis analisadas foram: porcentagem de germinação (LOUBARIAN; VALADARES, 1976), comprimento de hipocótilo, comprimento da raiz primária das plântulas (DOBREMEZ et al., 1995) e índice de velocidade de germinação (IVG) (MAGUIRE, 1962).

As sementes de *Lactuca sativa* L. cv. *Grand rapids* (Asteraceae) foram obtidas comercialmente.

Para os bioensaios foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro) previamente esterilizadas em autoclave contendo papel de filtro, sobre os quais foram vertidos 2 mL das soluções-teste dissolvidas nos solventes apropriados, nas concentrações de 5,0; 2,5 e 1,25 mg/mL. As placas foram acondicionadas em capela de exaustão de gases, até evaporação completa do solvente. Em seguida, 25 sementes de *L. sativa* foram colocadas em cada placa, e posteriormente umedecidas com 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,025 M pH 6,0.

Os experimentos foram mantidos em câmara tipo BOD (modelo MA 415/S Marconi) a 20 °C e fotoperíodo de 12 h. Como controle positivo foi utilizado cafeína, substância de comprovada atividade inibitória de germinação de sementes, e como

controle negativo a solução tampão e o solvente utilizado na dissolução das amostras (DOBREMEZ et al., 1995).

Os resultados foram expressos como percentagem de inibição de germinação.

Todos os testes foram realizados em triplicatas. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protrusão de raiz, conforme as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1999). No último dia de contagem, foram obtidos o comprimento de raízes primárias e dos hipocótilos.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando evidenciada diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Tukey.

3.9.3 Ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre células tumorais

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a supervisão da Professora Cláudia do Ó Pessoa.

Foram realizados ensaios para verificar a ação dos extratos oriundos da Col1 (folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia) de *G. elegans* sobre a citotoxicidade *in vitro* contra linhagens de células tumorais. Essa análise faz parte de um *screening* inicial para determinação do potencial antitumoral.

As linhagens utilizadas, HCT-8 (carcinoma de cólon humano), SF-295 (glioblastoma) e MDA-MB-435 (melanoma) foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI - EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295 e $0,7 \times 10^5$ cél/mL para a linhagem HCT-8. Os extratos foram acrescidos em concentração única de 100 µg/mL diluídos em DMSO puro estéril. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C.

Os grupos controle receberam a mesma quantidade de DMSO. Doxorubicina (0,01-0,58 mg/mL) foi utilizada como controle positivo.

Ao final do processo, as células foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado em 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

O percentual de letalidade celular foi obtido pela fórmula $[100 \times (T - T_0) / (C - T_0)]$, onde T = teste, T₀ = crescimento celular antes da adição dos extratos. Os extratos foram classificados como possuindo nenhuma atividade, baixa atividade (até 50% de inibição de crescimento), atividade moderada (entre 51% e 75% de inibição de crescimento) e alta atividade (mais de 75% de inibição de crescimento) para cada uma das linhagem testadas.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da inibição do crescimento celular usando o programa GraphPad (Intuitive Software for science, San Diego, CA). Cada ensaio foi realizado em duplicata.

3.9.4 Ensaio de atividade inseticida, sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob supervisão do Professor. Dr. Antonio Pancrácio de Souza.

Foram realizados ensaios para verificar a ação inseticida sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), dos extratos da Col1 (folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia) de *G. elegans*.

Os insetos utilizados nos ensaios foram provenientes de criação mantida em laboratório, em grãos de trigo, utilizando-se frascos de vidro de 300 mL, com o gargalo vedado com tecido filó à temperatura de $25 \pm 2,2$ °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e foto-período natural.

Os grãos de trigo foram pulverizados em capela de fluxo laminar com auxílio de um pulverizador acoplado a um compressor de ar, com os extratos obtidos a partir de 10 g de matéria seca da planta.

Após a secagem por 72 horas a 38 °C, o trigo foi acondicionado em caixas plásticas circulares (6 cm de diâmetro e 2,1 cm de altura), totalizando 10 g de trigo por recipiente. Foram realizados testes testemunha com trigo não tratado.

Em cada recipiente foram liberados 20 adultos não sexados de *S. zeamais*, com idade entre dez e quinze dias.

As avaliações foram feitas ao primeiro, segundo e quinto dia, pela contagem do número de insetos mortos, que foram descartados.

As parcelas foram organizadas segundo o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com dez repetições para cada tratamento. Para efeito de análise os dados foram cumulativos desde o primeiro até o quinto dia.

Os testes foram desconsiderados quando a mortalidade ficou acima de 20% ou os números de pupas chegaram a 10%.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando evidenciada diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Tukey.

3.9.5. Ensaio de atividade inseticida, sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

Estes ensaios foram realizados no laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul sob supervisão do Professor. Dr. Antonio Pancrácio de Souza.

Foram realizados ensaios para verificar a ação inseticida sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) dos extratos da Col1 (folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia) de *G. elegans*.

Os testes de atividade inseticida foram conduzidos segundo adaptação ao padrão da Organização Mundial da Saúde (OMS) [WHO, 1980]. Para os testes

foram preparadas as diluições em água destilada na concentração de 10 mg/L. Esta concentração é utilizada em testes de atividade inseticida porque na mesma concentração o inseticida temefós (O,O,O',O'-tetrametil O,O'-ditio-p-fenileno fosforotionato), mata até 98% das larvas de terceiro e quarto "instar" (CARVALHO et al., 2004).

Preparadas as diluições e controle estas foram divididas em tubos de vidro com capacidade de 30 mL. Em cada tubo (réplica) foram colocadas 20 larvas em terceiro para o quarto estágio. Foram utilizadas oito réplicas para o controle e para as substâncias.

A mortalidade foi verificada após 24 h. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas ou que apresentavam tremores ou rigidez, foram consideradas como mortas. Todas as larvas sobreviventes aos testes foram congeladas e descartadas.

Como forma de garantir a qualidade e veracidade dos testes, foi adotada que eles seriam desconsiderados caso a mortalidade atingisse 20% ou o número de pupas chegasse a 10% no controle.

Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e quando evidenciada diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de probabilidade de erro, foi efetuada a complementação da análise através da comparação entre médias pelo teste de Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliações da Metodologia de Extração

Para que se pudesse propor um processo extrativo em escala piloto havia necessidade de definir a seletividade de cada solvente a ser empregado, primeiramente em escala de bancada. A escolha do solvente extrator estava diretamente ligada a não alteração na composição química do vegetal, sendo então uma etapa crítica para realizar o processo de extração total. O objetivo era obter um extrato que contivesse a maior parte dos constituintes químicos do vegetal em estudo e não um extrato que se apresentasse somente constituintes químicos com uma determinada característica. No primeiro caso utilizamos solventes não seletivos como no caso de etanol e etanol:água. No segundo caso empregamos solventes seletivos, de menor polaridade como o hexano e o clorofórmio para retirada de graxas, ceras e substâncias apolares.

Optamos por utilizar uma metodologia moderna e eficiente, a extração por ultrassom (EU), que é definido como ondas sonoras com frequências acima de 20.000Hz. A extração ultrassônica (sonicação) é a técnica que emprega essa energia, na forma de ondas, que criam variações na pressão do solvente extrator formando o fenômeno conhecido como “cavitação”, o qual provoca a formação espontânea de bolhas no solvente, mesmo em temperatura abaixo de seu ponto de ebulição. Estas bolhas rompem a tensão superficial e explodem gerando uma forte onda mecânica, fazendo com que a célula vegetal passe por uma interface poderosa de fricção, o que permite que o conteúdo intracelular seja extraído (SHARAPIN et al., 2000). O aumento da permeabilidade das paredes celulares, produção de cavitações e aumento do estresse mecânico no interior das células vegetais são os principais fatores geradores da extração por ultrassom (BUCHI et al., 1960)

4.1.1 Avaliação da extração por ultrassom

Este estudo da técnica de extração das amostras das folhas, caule aéreo e caule submerso de *G. elegans* (Col1), consistiram em avaliar o efeito das variáveis da seletividade e quantidade de extrato obtido em relação à massa seca de cada órgão com diferentes solventes extratores.

A Tabela 6 descreve de forma geral o primeiro estudo de rendimento em massa seca de extrato das folhas, caule aéreo e caule submerso da espécie *G. elegans*. Os resultados foram obtidos nas condições experimentais de extrações conforme parte experimental *item 3.3.1.1*, considerando como variável de resposta a massa da extração. O rendimento foi calculado com base na massa do extrato em relação à massa da amostra utilizada nas extrações. A resposta da análise da seletividade (Figura 23) foi analisada por CCD, utilizando como fase móvel acetona:metanol (9:1, v/v). Foram aplicados os testes estatísticos para verificação da diferença entre as massas em gramas obtidas por cada método de extração através de ANOVA, descrita na Tabela 7.

Tabela 6. Rendimento de extratos obtidos por sonicação com diferentes solventes extratores para órgãos da espécie *G. elegans*

Sistema	Caule aéreo		Caule submerso		Folha	
Extrator						
	x ± S (g)	CV %	x ± S (g)	CV %	x ± S (g)	CV %
SE	0,10 ± 0,01 d	6,51	0,22 ± 0,01 c	4,51	0,16 ± 0,01 c	7,12
SEA	0,37 ± 0,02 c	5,49	1,06 ± 0,05 b	4,49	0,98 ± 0,04 ab	4,57
SCAM	0,82 ± 0,02 b	5,77	1,25 ± 0,06 a	3,43	0,92 ± 0,02 b	1,20
SHCMA	0,90 ± 0,03 a	0,51	1,31 ± 0,04 a	7,11	1,03 ± 0,04 a	2,71

x= média das massas extraídas, S = desvio padrão, CV% Coeficiente de variação em %; As médias nas colunas seguidas pela mesma letra não diferiram uma da outra pelo teste de Tukey em 5% de significância.

Tabela 7. Diferença entre médias dos tratamentos extrativos aplicados a espécie *G. elegans*, segundo a ANOVA

Órgãos	Fonte de variação	SQ	gl	MQ	$F_{calc.}$	valor- P	$F_{crit.}$
Caule aéreo	Entre grupos	1,308	3	0,436	1003,417	0,001	7,591
	Dentro do grupo	0,003	8	0,001			
	Total	1,311	11				
Caule submerso	Entre grupos	2,263	3	0,754	279,939	0,001	7,591
	Dentro do grupo	0,021	8	0,003			
	Total	2,284	11				
Folha	Entre grupos	1,517	3	0,506	449,490	0,001	7,591
	Dentro do grupo	0,009	8	0,001			
	Total	1,526	11				

SQ = soma dos quadrados; gl = graus de liberdade; MQ = mínimo quadrado; P = probabilidade; F_{cal} = calculado; F_{crit} = crítico.

As análises estatísticas dos resultados indicaram que nos experimentos da folha e caule aéreo ocorreram diferenças significativas entre as metodologias dos diferentes extratores, já no caule submerso os sistemas misturas dos três solventes e sistema de solventes não apresentaram diferença significativa quanto rendimento de extrato sobre massa seca.

Mas como os valores de F_{calc} são maiores que o F_{crit} para os três órgãos estudados, estatisticamente comprova-se que há diferenças entre os rendimentos em extratos secos obtidos para os diferentes solventes extratores. Além disto, os órgãos apresentaram F_{calc} diferenciados, o que mostra a influência dos solventes extratores propostos sobre a matriz vegetal.

Os resultados demonstraram que a extração por ultrassom com o Sistemas de solventes (SHCMA) é método que produz a maior quantidade de extrato nos três órgãos analisados, seguindo-se do sistema de mistura dos três solventes (SCAM) nos órgãos caule aéreo e folha, logo a seguir os sistemas etanol:água (SEA), e por ultimo o sistema etanol (SE).

As propriedades exercidas pelo ultrassom facilitaram a dilatação e hidratação do material vegetal causando a abertura dos poros da parede celular e conseqüentemente ocorreu o aumento da razão de transferência de massa,

resultando em melhor eficiência de extração e com redução do tempo de extração, conforme é relatado na Tabela 6, que mostra o rendimento em massa seca de vegetal/massa de extrato obtido das folhas, caule aéreo e caule submerso da espécie *G. elegans*, pelo sistema SHCMA.

Cuja justificativa é devida ao ataque efetivo à integridade das paredes celulares, pelos efeitos de pronunciados de cavitação, os quais não ocorrem com outras técnicas extrativas.

SILVA et al., 2002 relatam vantagens no uso da extração por ultrassom, sugerindo que o melhor desempenho da ultrassonicação se dá sempre na comparação da relação massa do vegetal seco e a massa seca extraída.

O elevado rendimento da extração não irá garantir um alto rendimento de componentes bioativos no extrato. Alguns componentes bioativos tais como ácidos graxos livres e tocoferóis são muito sensíveis ao oxigênio e calor. Neste caso, mais cuidados devem ser tomados para evitar a oxidação e a degradação térmica dos componentes. Portanto, o rendimento e a quantidade dos componentes bioativos também devem ser considerados quando for selecionado um método de extração.

4.1.2 Análise cromatográfica em camada delgada dos extratos brutos obtidos com diferentes solventes extratores

Na interpretação das análises cromatográficas (Figura 21) foi perceptível que o sistema **SHCMA** permite uma melhor separação dos constituintes químicos.

A análise das variáveis da extração permitiu-se observar que existem outros fatores com efeito positivo na extração. As principais variáveis que influenciaram o processo de extração foram tempo de extração, polaridade crescente do solvente (razão massa de amostra por quantidade de solvente). Sendo assim, maior tempo de extração, maior quantidade de solvente e solvente com polaridade crescente produz maior quantidade de extrato, e contribui para uma eficaz previsão de classes dos compostos encontrados nesses extratos, em comparação com as demais técnicas de extração, como é relatado por Cechinel Filho e Yunes (1998).

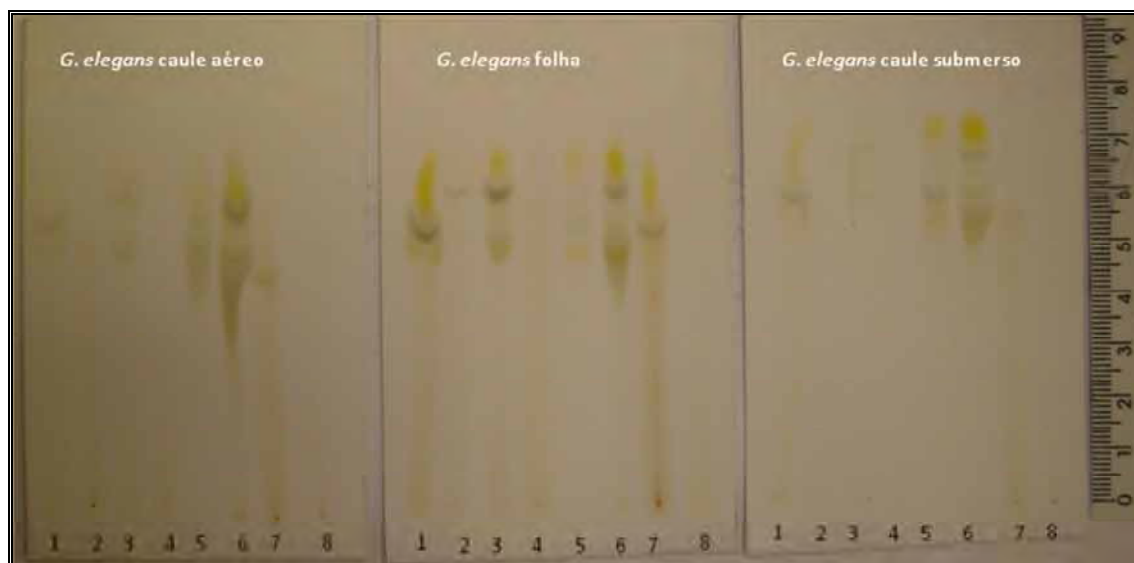


Figura 21. Análise cromatográfica em CCD dos extratos oriundos dos órgãos de *G. elegans*. 1.Extrato etanólico; 2.Extrato etanol/água; 3.Extrato clorofórmico; 4.Extrato metanol/água; 5. Extrato hexânico; 6.Extrato clorofórmico; 7.Extrato metanólico; 8.Extrato aquoso.

4.2 Composições químicas dos extratos hexânicos (Col1)

4.2.1 Análise dos extratos hexânicos (identificação das substâncias)

A análise da composição química por CG-EM dos extratos hexânicos de *G. elegans*, foram realizadas para as amostras obtidas na primeira coleta em março de 2007 (**Col1**). A composição química determinada para estas amostras foram utilizada como parâmetro comparativo para as demais amostras obtidas nas coletas realizada em agosto de 2007 (**Col2**) e fevereiro de 2008 (**Col3**) analisadas através de CG-EM.

Sabendo que a cromatografia em fase gasosa (CG) é usada para análise de compostos ditos fixos (semivoláteis), mas que em alguns casos necessita-se de derivatização para reduzir a polaridade e aumentar a volatilidade destes compostos e que é também usada para compostos semivoláteis de peso molecular um pouco mais elevado, i.e., os metabolitos secundários com peso molecular de até 500 u.m.a. e com pontos de ebulição inferiores a 300 °C podem ser analisados por CG. Os

demaís que tem peso molecular elevado apresentam dificuldade de volatilização e podem apresentar degradações químicas a altas temperaturas (SILVA, 2009).

Uma solução seria aumentar a volatilidade destas substâncias com a diminuição das interações químicas (ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e forças de van der Waals [forças de Keesom, força de Debye e forças de London]) através da derivatização com isso reduzindo a polaridade e aumentando a volatilidade para serem analisados cromatograficamente. Na cromatografia gasosa o analito é transportado por uma fase móvel gasosa conhecida como gás de arraste e as separações desses analitos ocorrem em uma coluna apolar, segundo a ordem crescente do ponto de ebulição (SILVA, 2009).

Para avaliar a matriz dos extratos, realizamos testes de análises utilizando amostras derivatizadas e *in natura*. Observou-se que não ocorreu alteração na matriz da amostra, comprovando que não haveria necessidade de derivatizar as amostras.

Iniciou-se a investigação química de *G. elegans* com o estudo **(Col1)** dos extratos hexânicos obtidos a partir de GF, GA, GS e GR, submetidos ao pré-tratamento conforme parte experimental *item 3.1. subitem 5*.

O estudo levou a identificação de 37 substâncias (Figuras 22 e 23) sendo: 14 alcanos, 7 alcenos, 8 ésteres, 1 aromático, 4 terpenos, 1 álcool e 2 cetona.

As composições químicas dos extratos demonstraram perfis cromatográficos semelhantes entre os diferentes órgãos analisados de *G. elegans*, entretanto algumas substâncias não foram detectadas em todos os órgãos, na Tabela 8 estão reunidas as substâncias identificadas bem como suas porcentagens relativas e índice de Kovats calculado, seus cromatogramas totais são representados na Figura 24.

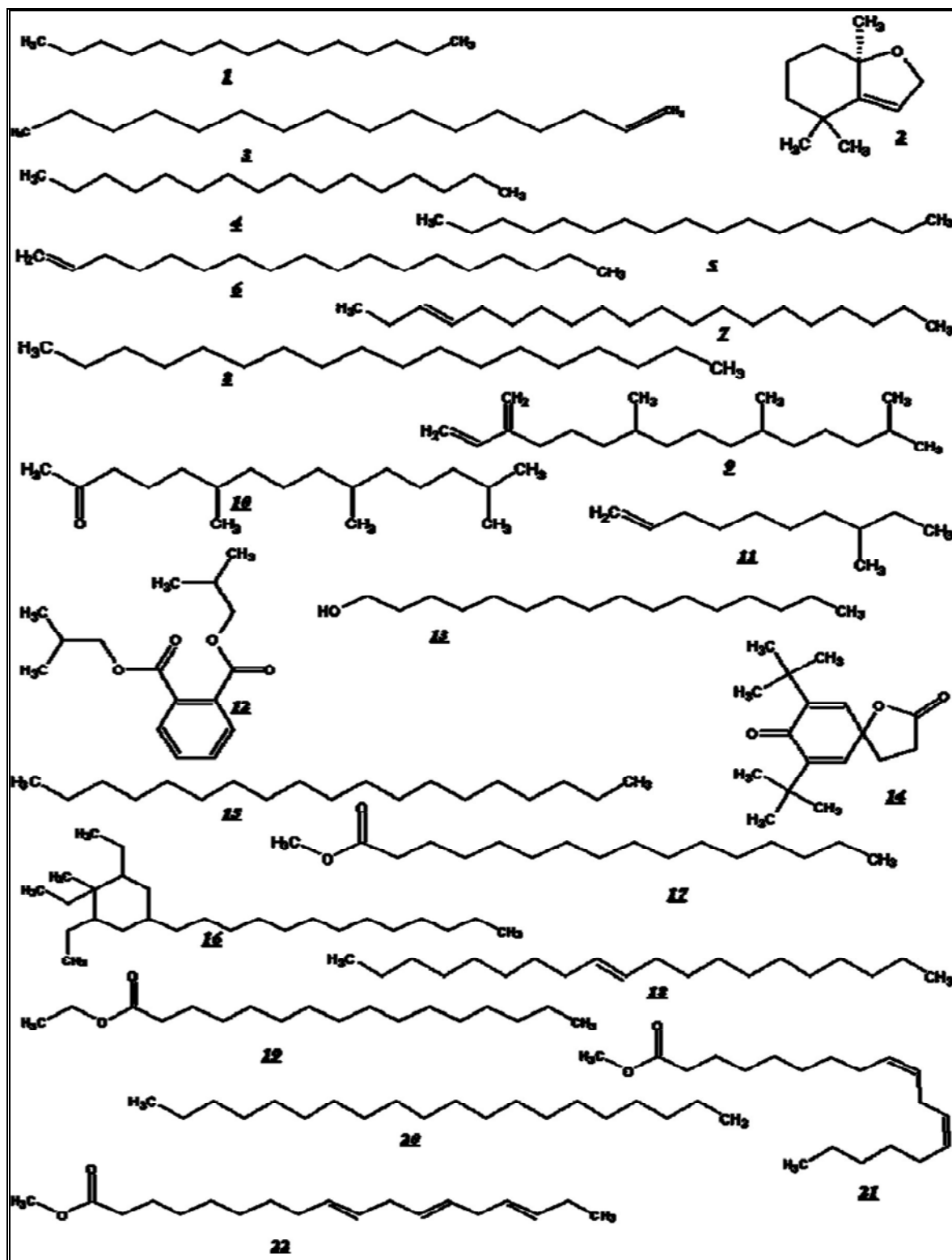


Figura 22. Substâncias identificadas nas frações hexânicas de *G. elegans*.

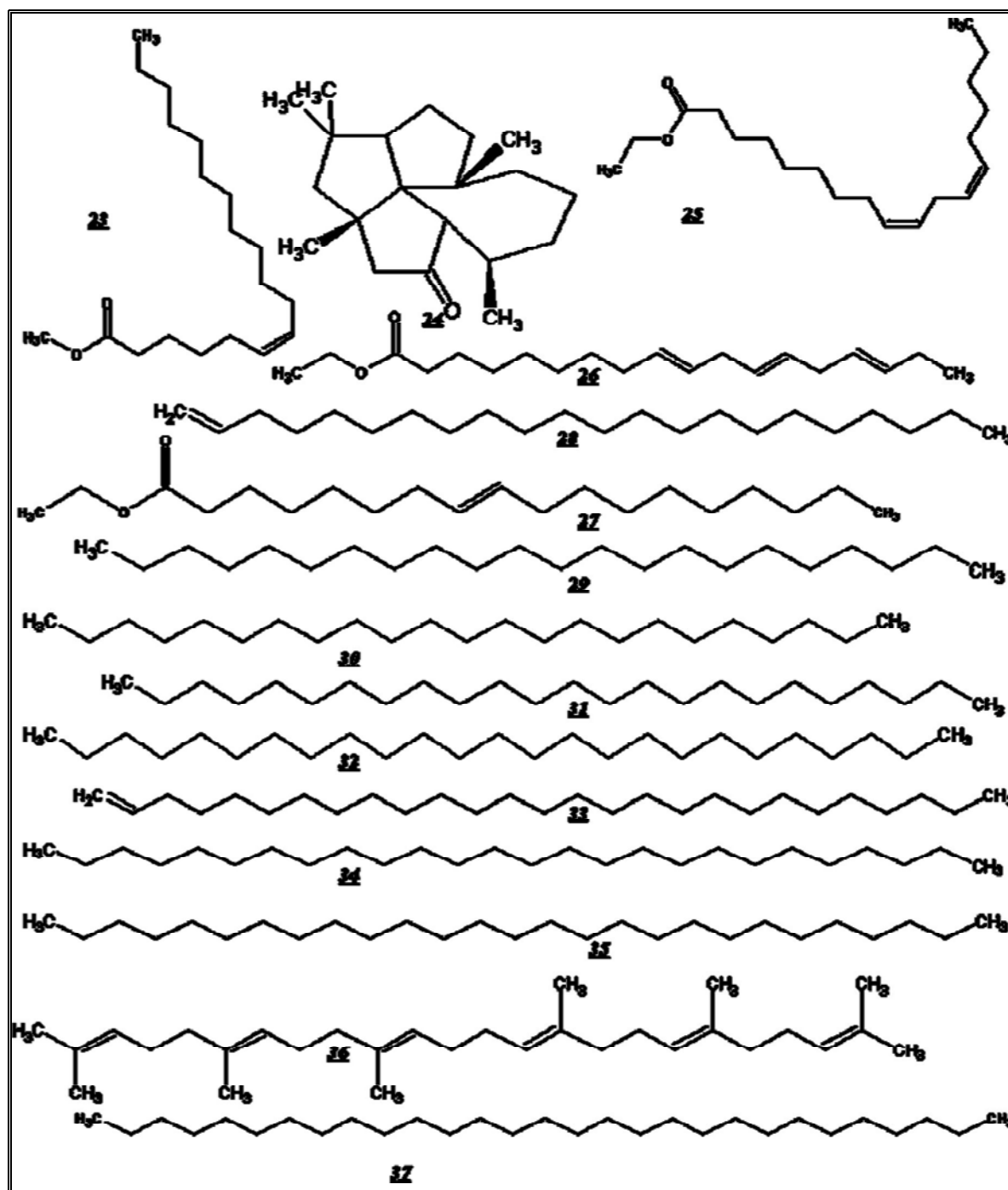


Figura 23. Substâncias identificadas nas frações hexânicas de *Gomphrena elegans*.

Tabela 8. Substâncias identificadas nos extratos hexânicos obtidos a partir de folhas (GF1), caule aéreo (GA1), caule submerso (GS1) e raiz adventícia (GR1) de *G. elegans* (Col1)

Talal Suleiman Mahmoud

Nº	Componentes ^a	IK	TR	AR (%)			
				GA1	GR1	GF1	GS1
<u>1</u>	Pentadecano	1500	44,79	-	-	0,71	0,75
<u>2</u>	Dihidroactinidiolide	1516	48,33	-	-	2,96	-
<u>3</u>	1-Hexadeceno	1592	53,00	0,72	1,63	-	1,46
<u>4</u>	Hexadecano	1600	53,46	2,64	4,43	-	4,23
<u>5</u>	Heptadecano	1700	59,34	0,35	1,81	-	0,55
<u>6</u>	1-octadeceno	1793	64,49	-	9,50	-	3,57
<u>7</u>	3-eicoseno	1794	64,50	2,70	-	-	-
<u>8</u>	Octadecano	1800	64,89	3,00	12,15	-	5,71
<u>9</u>	7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadec-1-eno	1835	66,76	4,88	-	3,84	5,90
<u>10</u>	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	1840	66,99	-	5,47	0,95	-
<u>11</u>	8-Metil-1-deceno	1841	67,10	0,42	-	-	-
<u>12</u>	Diisobutil Ftalato	1853	67,70	2,90	-	-	-
<u>13</u>	1-Hexadecanol	1879	69,00	0,80	-	0,38	-
<u>14</u>	7,9-di-ter-butil-oxaspiro[4,5]deca-6,9-dien-2,8-diona	1894	69,87	-	1,59	-	-
<u>15</u>	Nonadecano	1900	70,19	0,27	2,41	-	-
<u>16</u>	3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano	1906	70,50	-	0,88	-	-
<u>17</u>	Palmitato de metila	1927	71,45	0,56	-	14,25	25,96
<u>18</u>	9-Eicoseno	1970	73,74	-	3,47	-	-
<u>19</u>	Palmitato de etila	1993	74,91	21,87	13,38	8,80	7,73
<u>20</u>	Eicosano	2000	75,27	1,76	8,38	-	4,46
<u>21</u>	Linoleato de metila	2092	79,57	0,19	-	7,77	25,36
<u>22</u>	Linolenato de metila	2094	79,84	-	-	21,95	2,76
<u>23</u>	6-octadecenoato de metila	2096	79,93	-	-	-	6,61
<u>24</u>	Laurenan-2-ona	2107	80,40	-	-	19,63	-
<u>25</u>	Linoleolato de etila	2157	82,76	34,07	4,03	1,15	1,96
<u>26</u>	Linolenato de etila	2162	83,01	10,46	2,70	1,77	-
<u>27</u>	9-octadecenoato de etila	2164	83,08	6,89	1,74	-	-
<u>28</u>	Docoseno	2195	84,49	1,96	7,51	0,54	1,20
<u>29</u>	Docosano	2200	84,76	1,62	4,83	-	1,79
<u>30</u>	Tricosano	2300	89,24	-	1,71	-	-
<u>31</u>	Tetracosano	2400	93,50	0,63	3,67	-	-
<u>32</u>	Pentacosano	2500	97,63	-	3,66	-	-
<u>33</u>	1-Hexacoseno	2595	101,40	-	1,19	-	-
<u>34</u>	Hexacosano	2600	101,60	-	3,86	-	-
<u>35</u>	Heptacosano	2700	105,44	-	-	0,49	-
<u>36</u>	Esqualeno	2806	109,33	1,31	-	14,34	-
<u>37</u>	Nonacosano	2900	112,71	-	-	0,47	-

^aIdentificadas pelo programa NIST, e identificada utilizando fragmentograma. IK= Índice de Kovat's calculado e determinado pelo tempo de retenção em coluna DB-1 usando uma série homóloga de *n*-alcanos. TR= Tempo de Retenção em minutos, AR= área relativa (área do pico relativo pela área total dos picos).

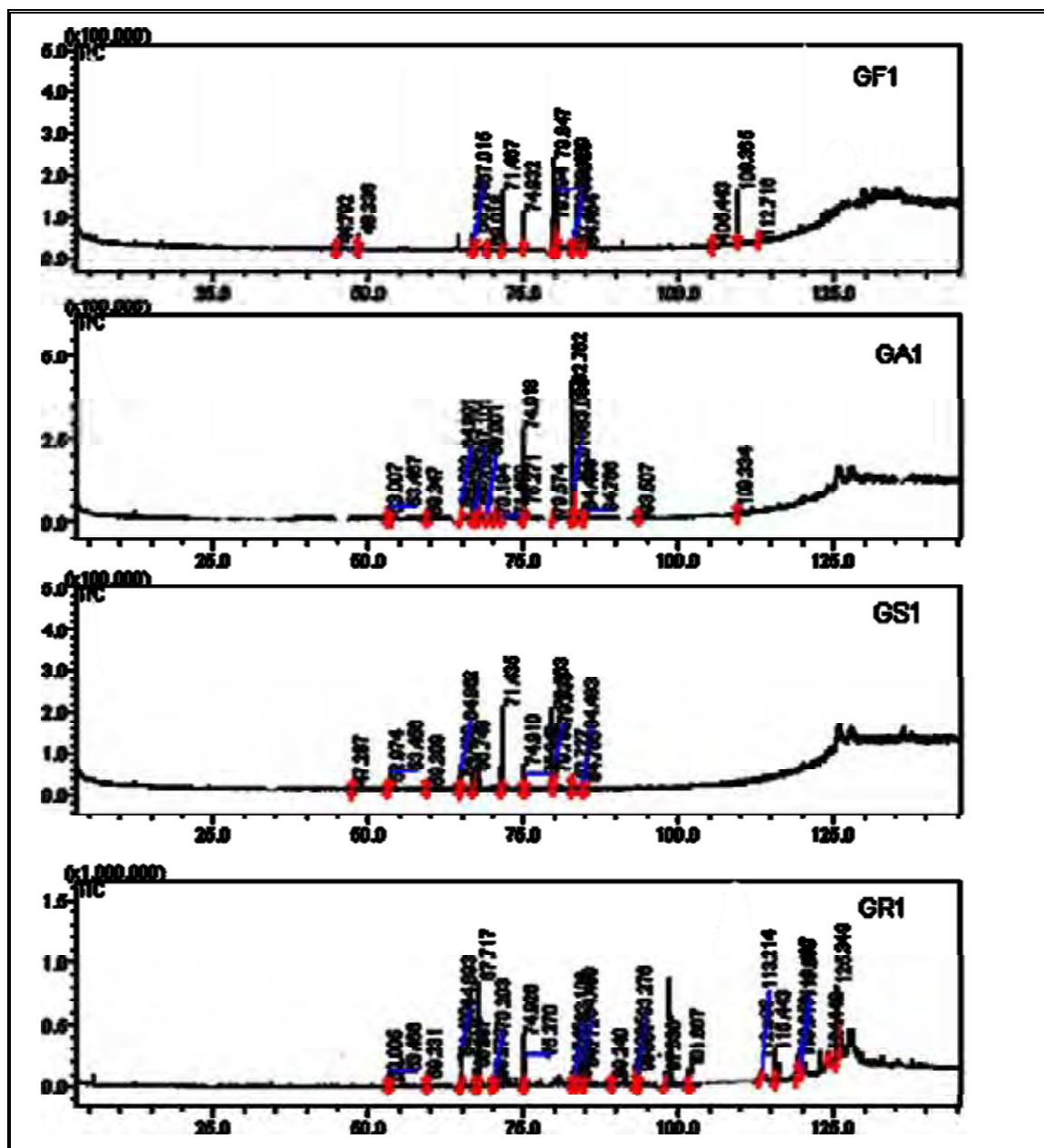


Figura 24. Cromatogramas totais das frações hexânicas obtidos a partir de folhas (GF1), caule aéreo (GA1), caule submerso (GS1) e raiz.adventícia (GR1) de *G. elegans* (Col 1).

No extrato hexânico das folhas foram identificadas 16 substâncias (Figura 25), as principais substâncias detectadas foram: palmitato de metila (14,25%), linolenato de metila (21,95%), laurenan-2-ona (19,63%) e esqualeno (14,34%).

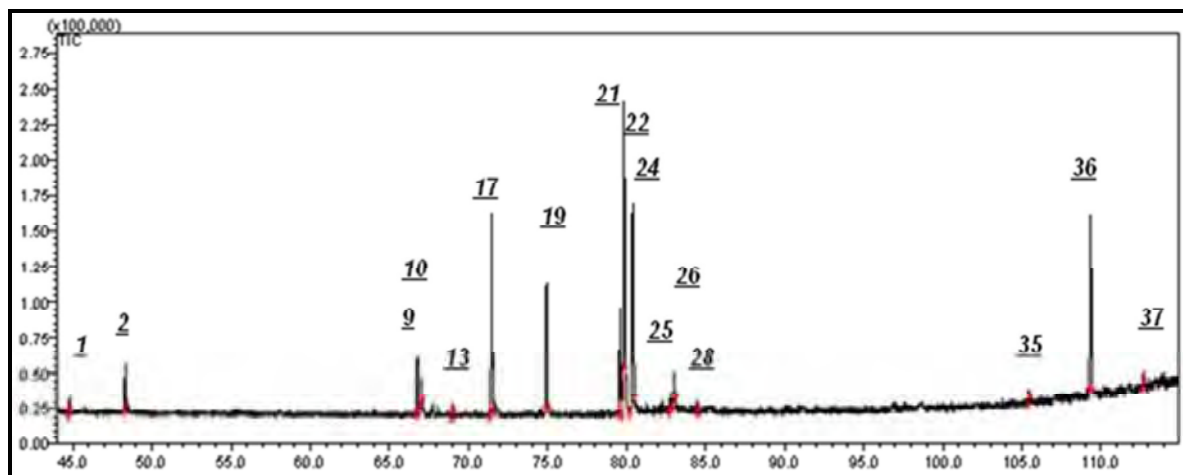


Figura 25. Ampliação do cromatograma do extrato hexânico da folha (GF1) de *G. elegans* (Col 1).

Das 21 substâncias identificadas (Figura 26), as com maior concentração no caule aéreo foram: linoleolato de etila (34,07%), palmitato de etila (21,87%) e linolenato de etila (10,46%).

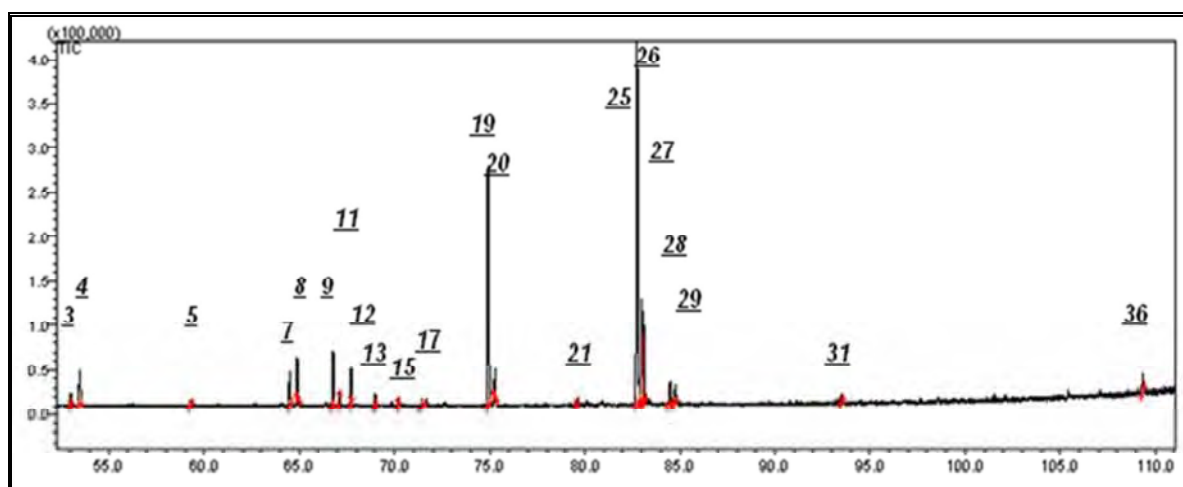


Figura 26. Ampliação do cromatograma do extrato hexânico de caule aéreo (GA1) de *G. elegans* (Col 1).

Na raiz das 22 substâncias identificadas (Figura 27), as de maior concentração foram: palmitato de etila (13,38%), octadecano (12,15%) e 1-octadeceno (9,50%).

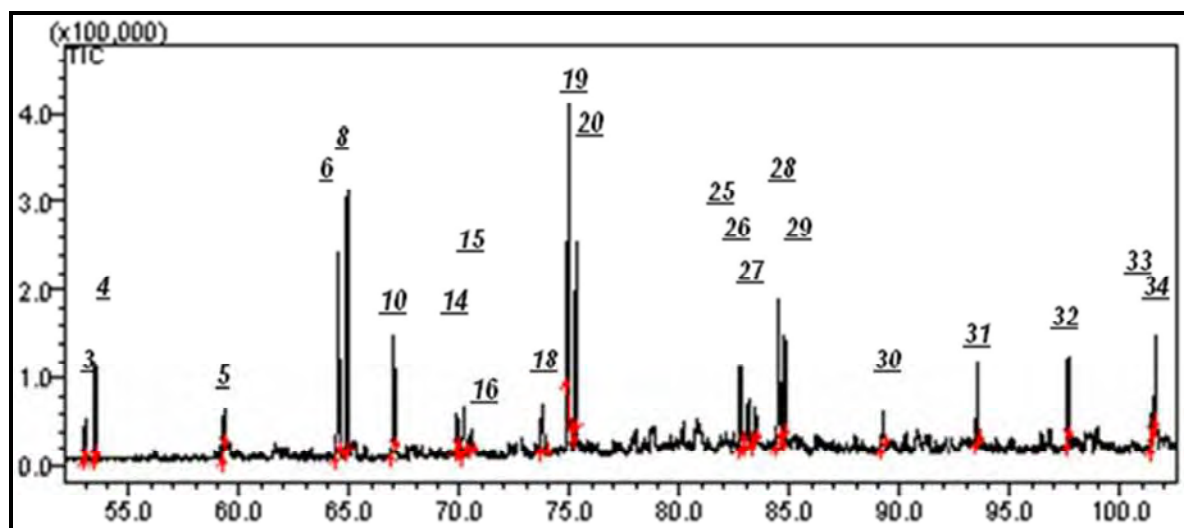


Figura 27. Ampliação do cromatograma do extrato hexânico da raiz adventícia (GR1) de *G. elegans* (Col 1).

No caule submerso (Figura 28), das 16 substâncias identificadas, as majoritárias foram: palmitato de metila (25,96%) e linoleato de metila (25,36%).

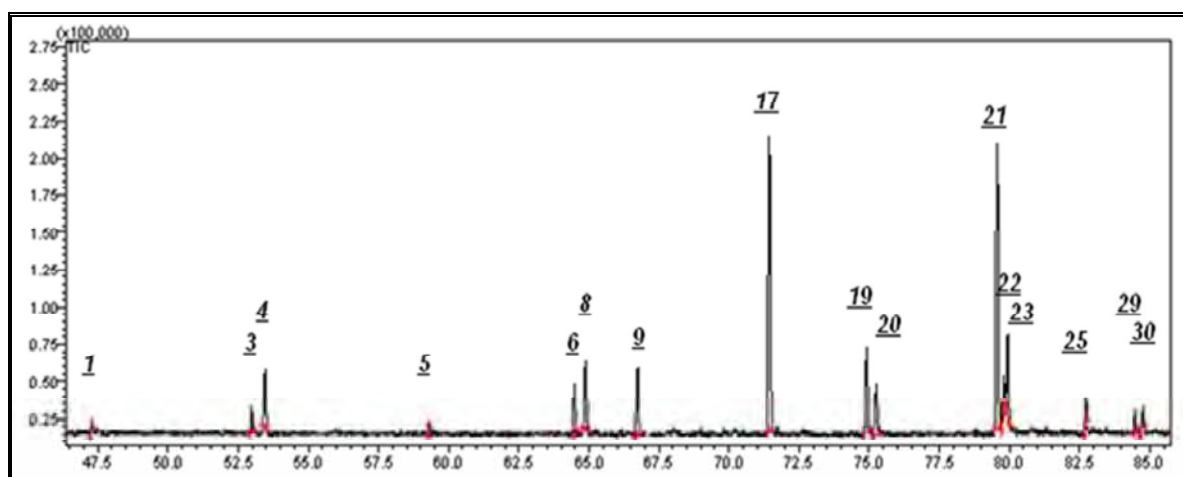


Figura 28. Ampliação do cromatograma do extrato hexânico do caule submerso (GS1) de *G. elegans* (Col1).

Somente as substâncias palmitato de etila, linoleolato de etila e docoseno são comuns em todos os órgãos analisado.

Os perfis dos compostos extraídos apresentaram certa similaridade. Os extratos que cromatograficamente apresentaram a maior variabilidade de compostos

foram proveniente GA1 e GR1. A identificação foi realizada com base na comparação dos espectros de massas e dos tempos de retenção para elucidação da identidade dos compostos do extrato. Os demais compostos foram identificados por comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley, NIST e FFNSC do próprio equipamento. Foram considerados tentativamente identificados os picos quando as probabilidades de semelhança do espectro de massa foram superiores a 95%.

Foram detectados os ésteres graxos que formam uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares. É evidente, em concentrações significativas, a presença de ésteres metílicos e etílicos de alto peso molecular, estes compostos foram detectados assim como a presença alcanos lineares.

Como não há relato na literatura de estudos desta espécie não podemos comparar a presença destas substâncias com outros estudos do próprio gênero *Gomphrena*.

4.3 Composições químicas dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos (Col1)

4.3.1 Análise dos extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos hexânicos (Substâncias isoladas)

Do estudo realizado com os extratos obtidos a partir de folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia de *G. elegans* foram isoladas, vinte substâncias de diferentes classes, compreendendo esteróides, terpenos (diterpenos e triterpenos), ésteres, ácido, alcalóides e compostos da classe C₆-C₁ e C₆-C₃, dentre essas 3 substâncias já foram identificadas no *item 4.2.1*, as estruturas são representadas na Figura 29.

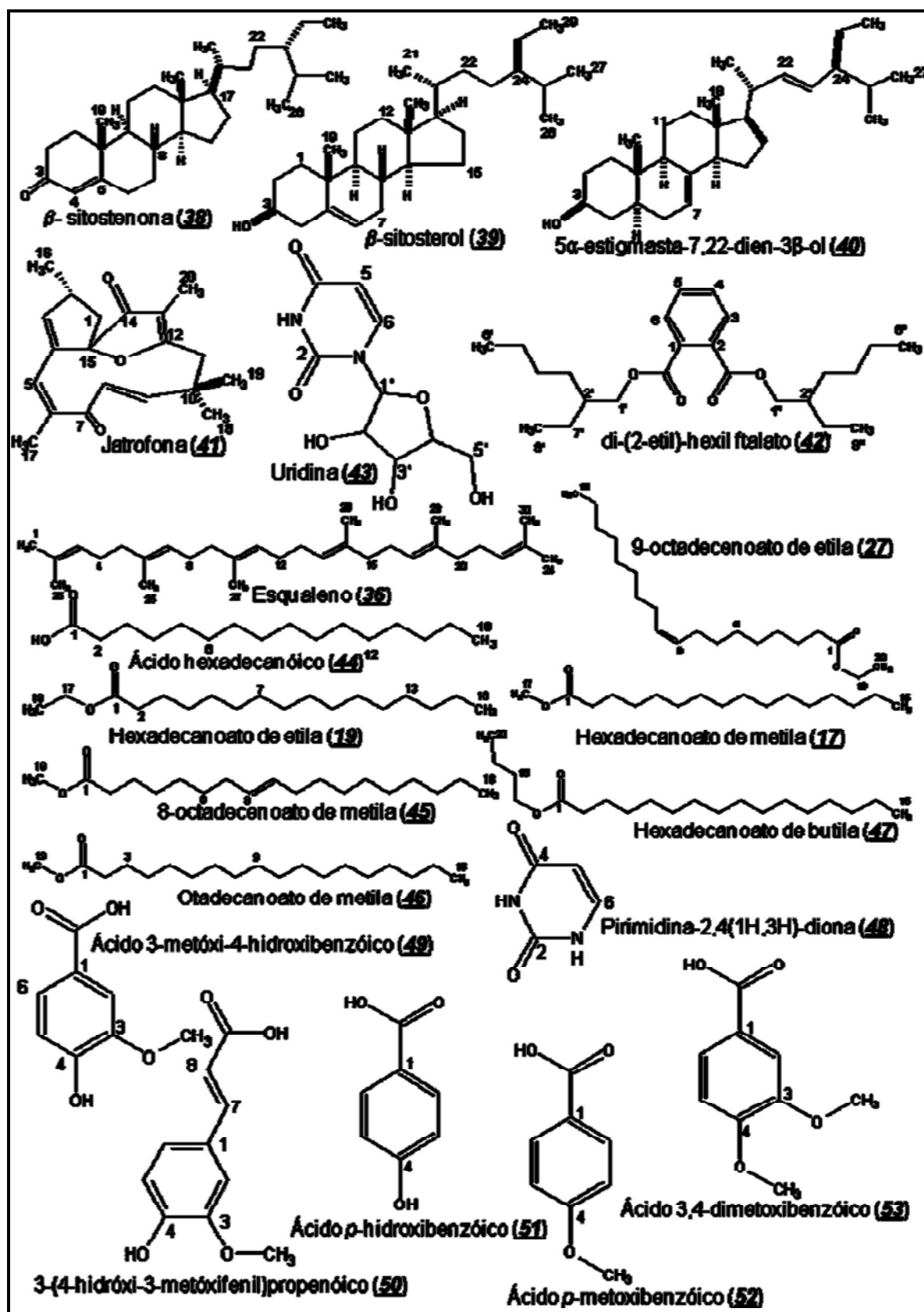


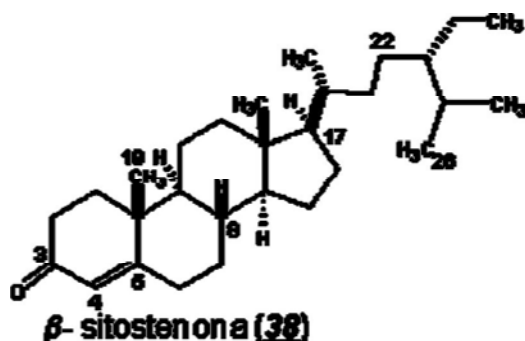
Figura 29. Substâncias isoladas das folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia de *G. elegans*.

4.3.2 Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas

A identificação e ou elucidação estrutural das substâncias isoladas nos órgãos da espécie *G. elegans* foram realizadas baseada na análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC, em dados de espectros de massas e na comparação com dados da literatura.

4.3.2.1 Esteróides

4.3.2.1.1 Identificação de β -sitostenona (**38**)



A substância representada na Figura 29 e designada por **38**, foi obtida como um dos componentes principais do extrato GF2 subfração 2.6. (4,0 mg) [Parte experimental *item* 3.5.3.1].

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H (Figura 30), foram observados sinais entre δ 0,68 a 5,69. Destes, os sinais na região δ 0,68 a 1,30, foram atribuídos a grupos metílicos e metilênicos. A ausência de um multipeto em torno de δ 3,50; atribuível a H-3 em 3- β -hidróxi-esteróides, sugeriu a presença de uma carbonila nesta posição. O singlete largo em δ 5,69 (1H, s; H-4) foi sugestivo de um hidrogênio olefínico α à carbonila presente na estrutura da β -sitostenona, sendo semelhante ao descrito na literatura para esta substância δ 5,72 (1H, d, J = 1,4 Hz, H-4) [MAHMOUD, 2005].

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 31 e Figura 32) apresentou sinais localizados entre δ 11,8 e 199,7; sendo observados sinais de carbonos

olefínicos localizados em δ 124,1 (CH, C-4) e 172,1 (C, C-5) indicativos de um sistema carbonílico α,β -insaturado. A presença de um sinal a δ 199,7 (C) confirmou esta proposta. Esta informação, aliada aos valores de deslocamentos químicos das metilas em δ 18,7 (CH₃-21), 19,8 (CH₃-26), 19,0 (CH₃-27), e 11,9 (CH₃-29), e aos dos demais carbonos (Tabela 9), foram compatíveis com os descritos na literatura (RIBEIRO,1999), e os dados obtidos no fragmentograma, que exibiu o pico do íon molecular a m/z 412 (Figura 33), compatível com a fórmula molecular C₂₉H₄₈O, concluiu-se que a substância tratava-se da **β -sitostenona**.

Tabela 9. Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz) e ¹³C (CDCl₃ 75 MHz) de **38**

H e C	δ_H	δ_C	δ_C^*	H e C	δ_H	δ_C	δ_C^*
1	-	35,8 <i>t</i>	35,8	16	-	28,2 <i>t</i>	28,3
2	-	34,0 <i>t</i>	34,0	17	-	56,0 <i>d</i>	56,1
3	-	199,7 <i>s</i>	198,8	18	0,68 <i>s</i>	12,0 <i>q</i>	12,1
4	5,69 <i>s</i>	124,1 <i>d</i>	124,0	19	0,99 <i>s</i>	17,4 <i>q</i>	17,5
5	-	172,1 <i>s</i>	170,8	20	-	36,1 <i>d</i>	36,2
6	-	33,0 <i>t</i>	33,0	21	1,30 <i>d</i> (<i>J</i> =6,5 Hz)	18,7 <i>q</i>	18,9
7	-	32,0 <i>t</i>	32,2	22	-	33,9 <i>t</i>	34,0
8	-	35,6 <i>d</i>	35,8	23	-	26,0 <i>t</i>	26,2
9	-	53,8 <i>d</i>	53,9	24	-	45,8 <i>d</i>	45,9
10	-	38,6 <i>s</i>	38,5	25	-	29,1 <i>d</i>	29,2
11	-	21,0 <i>t</i>	21,1	26	0,81 <i>s</i>	20,0 <i>q</i>	20,0
12	-	39,6 <i>t</i>	39,7	27	0,80 <i>s</i>	19,0 <i>q</i>	19,2
13	-	42,4 <i>s</i>	42,5	28	-	23,0 <i>t</i>	23,2
14	-	56,0 <i>d</i>	56,0	29	0,85 <i>s</i>	11,9 <i>q</i>	12,1
15	-	24,2 <i>t</i>	24,3				

*Mahmoud, (2005)

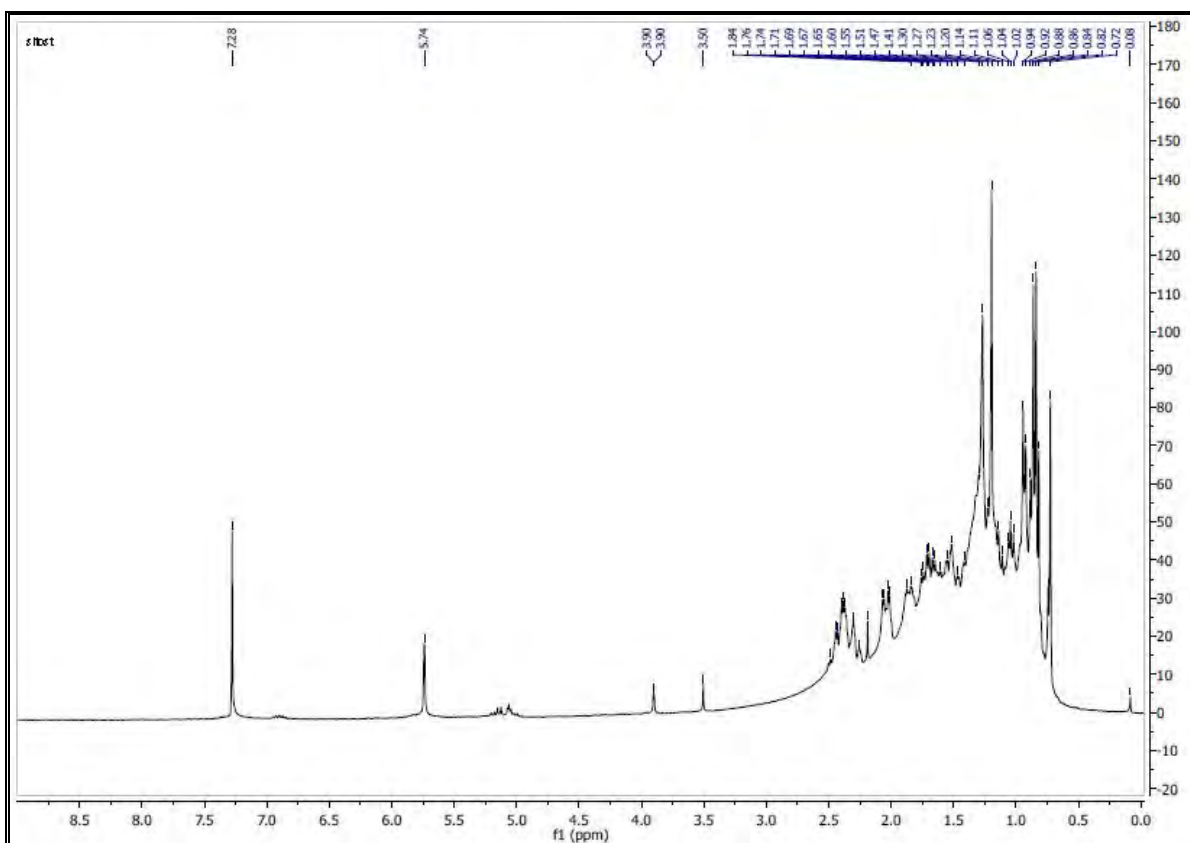


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **38**.

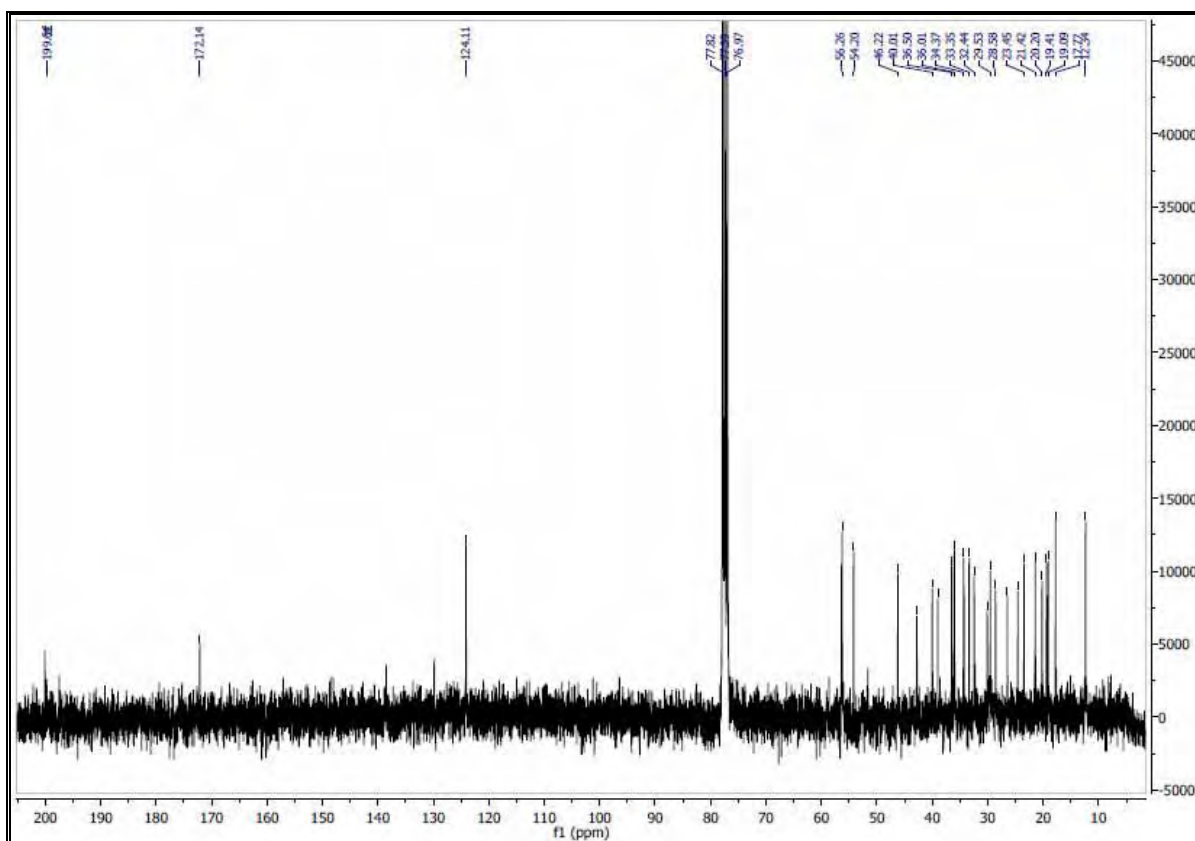


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **38**.

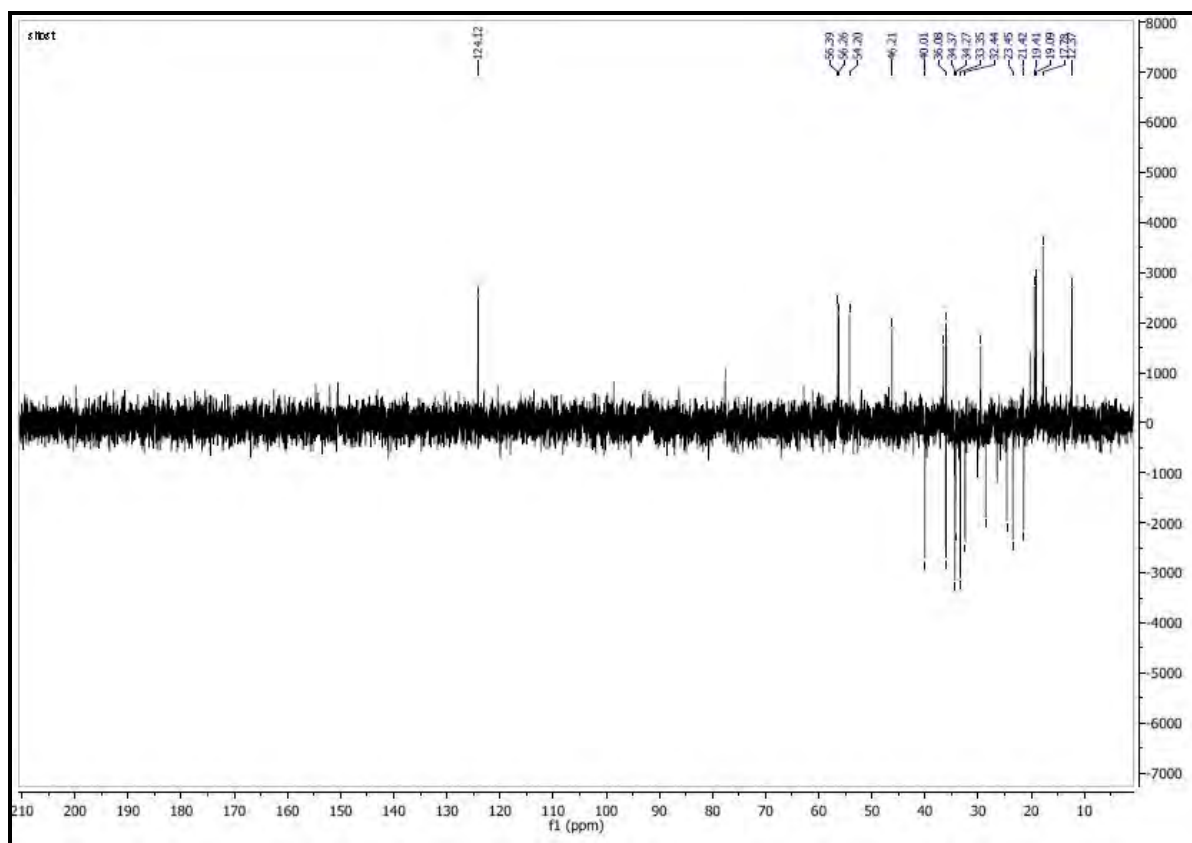


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de **38**.

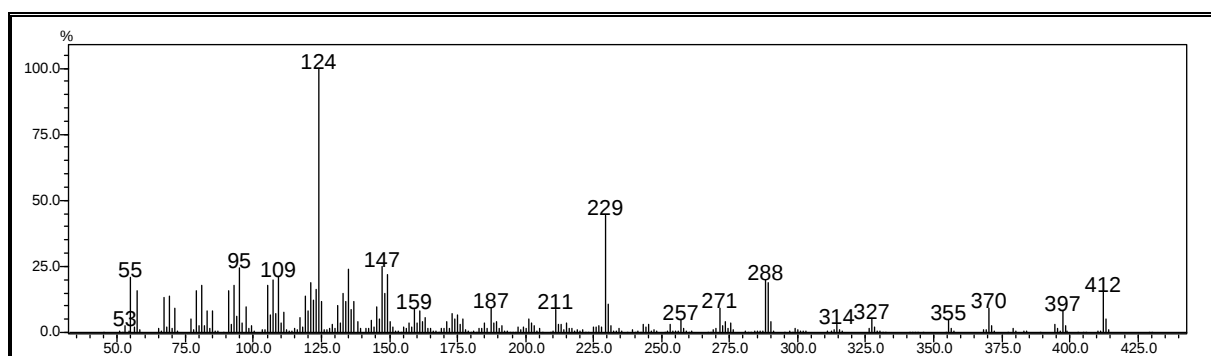
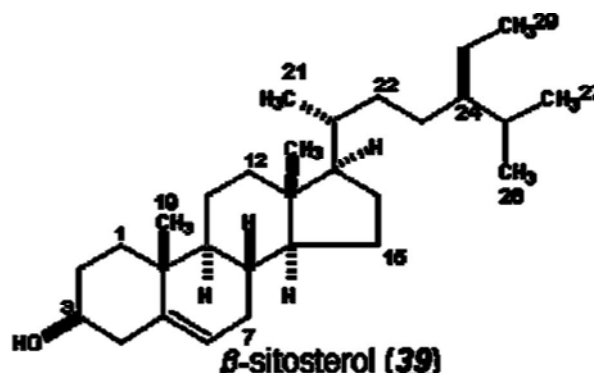


Figura 33. Fragmentograma experimental da substância **38**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.1.2 Identificação de β -sitosterol (**39**)



A substância representada na Figura 29 e designada por **39**, apresentou-se na forma de um sólido amorfo sendo obtida como um dos constituintes do extrato GF2, subfrações 3.7-3.8 (5,0 mg) e identificada nos extratos GA2, GS2 e GR2 (Parte exp. *itens* 3.5.3.1, 3.5.4.1, 3.5.4.2. e 3.5.4.3).

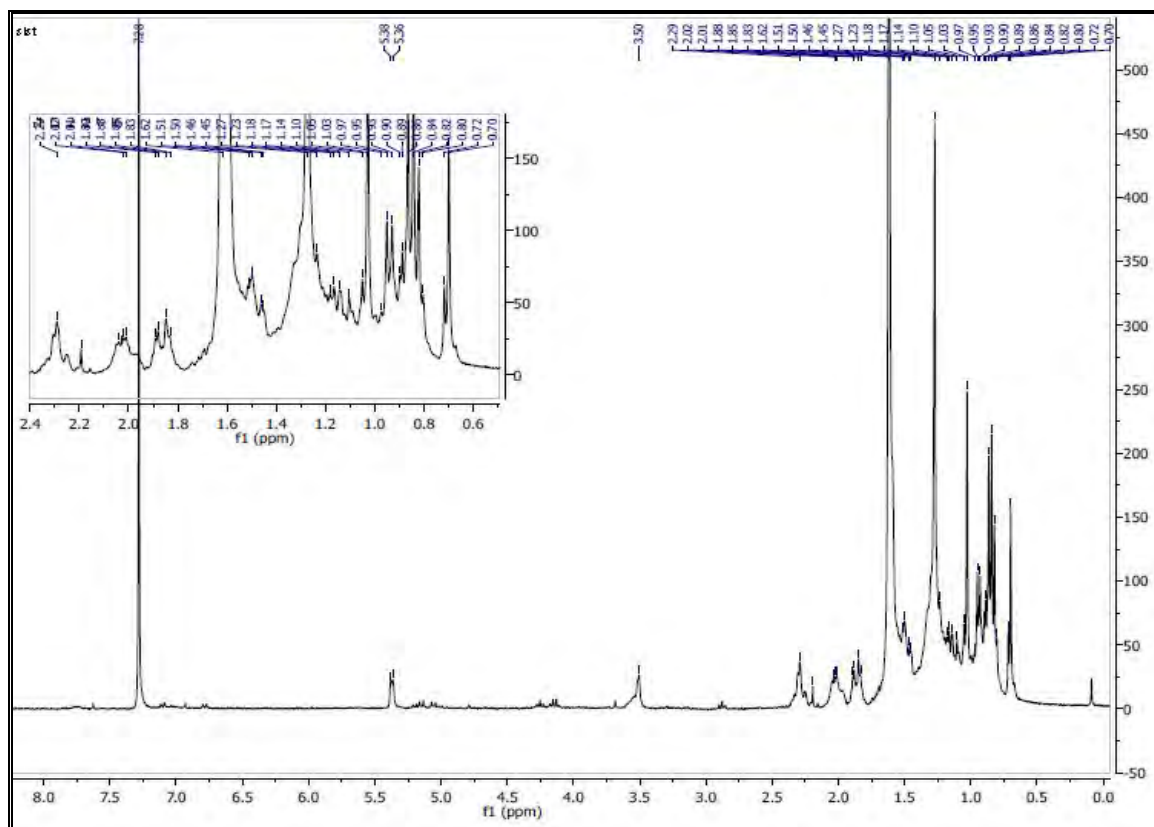
Ao analisar o espectro de RMN de ^1H (Figura 34), foram observados sinais entre δ 0,66 a 5,82. A região entre δ 0,66 a 0,99 apresentou vários sinais indicativos da presença de grupos metílicos, em δ 3,49 (1H, *m*) e δ 5,33 (1H, *d*, $J = 4,53$ Hz) foram observados sinais atribuíveis a um hidrogênio carbinólico e um olefínico num esqueleto esteroidal, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 35 e Figura 36), os sinais dos carbonos olefínicos a δ 122,1 (CH) e δ 141,2 (C) e os valores de deslocamentos químicos das metilas a δ 18,8; 19,8; 19,0 e 12,0 confirmaram a proposta juntamente com os demais sinais presentes no espectro e os dados obtidos no fragmentograma (Figura 37), que exibiu o pico do íon molecular a m/z 414, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ indicaram que o esteróide tratava-se do **β -sitosterol**. Os dados de RMN de ^{13}C desta substância mostraram-se bastante semelhante aos descritos na literatura (MAHMOUD, 2005) [Tabela 10].

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) de **39**

H e C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*	H e C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*
1	-	37,2 <i>t</i>	37,3	16	-	28,9 <i>t</i>	28,9
2	-	31,6 <i>t</i>	31,6	17	-	56,0 <i>d</i>	56,1
3	3,49 <i>m</i>	71,8 <i>d</i>	71,7	18	0,66 <i>s</i>	11,8 <i>q</i>	11,9
4	-	42,3 <i>t</i>	42,3	19	0,99 <i>s</i>	19,4 <i>q</i>	19,4
5	-	141,2 <i>s</i>	140,8	20	-	36,1 <i>d</i>	36,2
6	5,33 <i>d</i> ($J = 4,5$ Hz)	122,1 <i>d</i>	121,6	21	0,90 <i>d</i> ($J = 6,5$ Hz)	18,8 <i>q</i>	18,8
7	-	31,9 <i>t</i>	31,9	22	-	33,9 <i>t</i>	34,0
8	-	31,9 <i>d</i>	31,9	23	-	26,0 <i>t</i>	26,1
9	-	50,1 <i>d</i>	50,2	24	-	45,8 <i>d</i>	45,9
10	-	36,5 <i>s</i>	36,5	25	-	29,2 <i>d</i>	29,2
11	-	21,1 <i>t</i>	21,1	26	0,81 <i>d</i> ($J = 6,5$ Hz)	19,8 <i>q</i>	19,8
12	-	39,8 <i>t</i>	39,8	27	0,79 <i>d</i> ($J = 7,0$ Hz)	19,0 <i>q</i>	19,1
13	-	42,3 <i>s</i>	42,3	28	-	23,1 <i>t</i>	23,1
14	-	56,8 <i>d</i>	56,8	29	0,83 <i>t</i> ($J = 7,5$ Hz)	12,0 <i>q</i>	12,3
15	-	24,3 <i>t</i>	24,3				

* Mahmoud, (2005)

**Figura 34.** Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **39**.

Tatal Suleiman Mahmoud

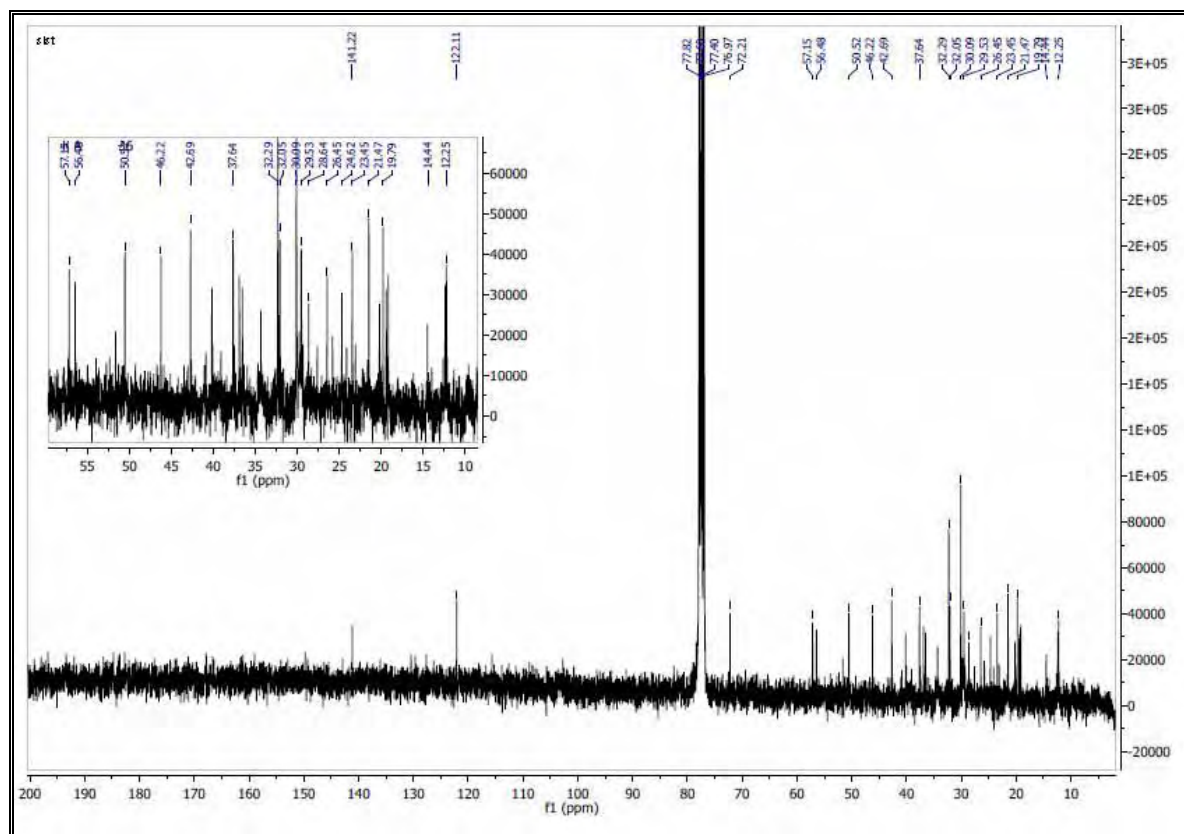


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **39**.

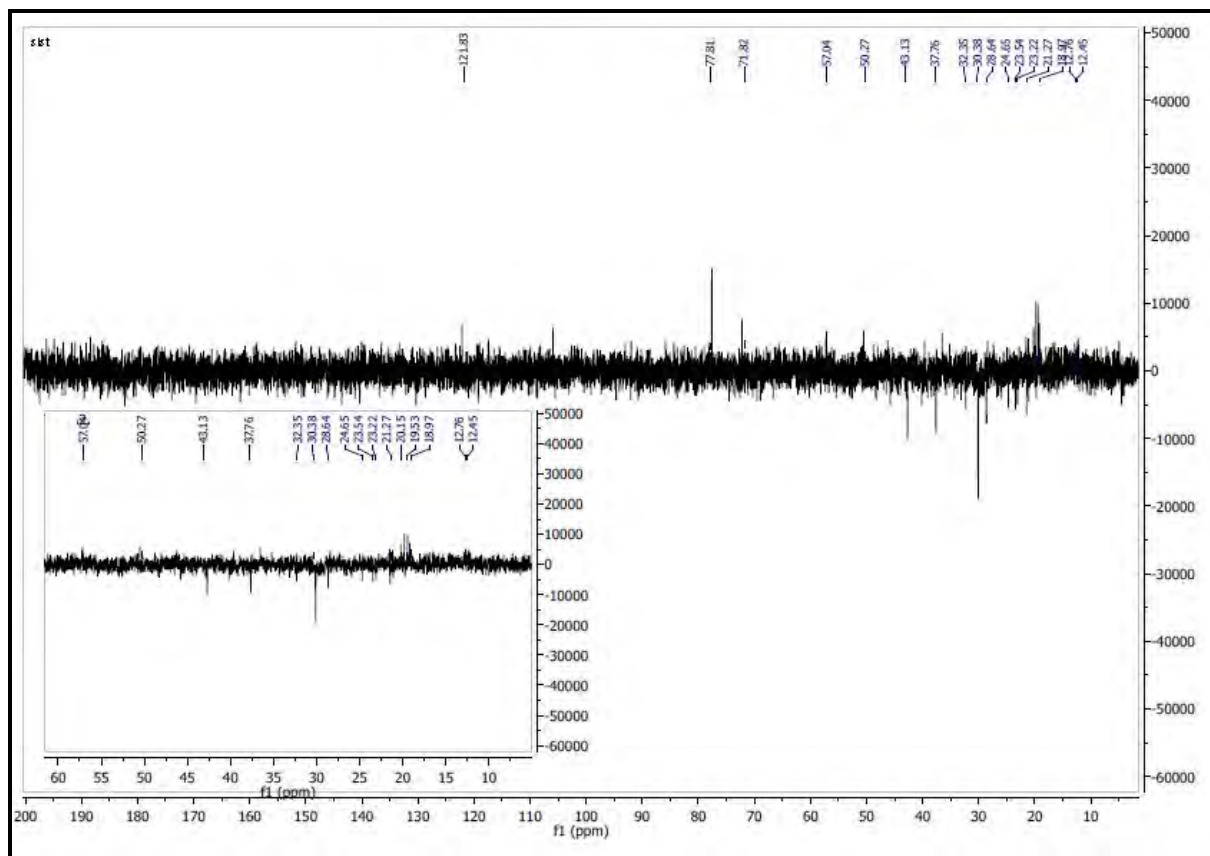


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de **39**.

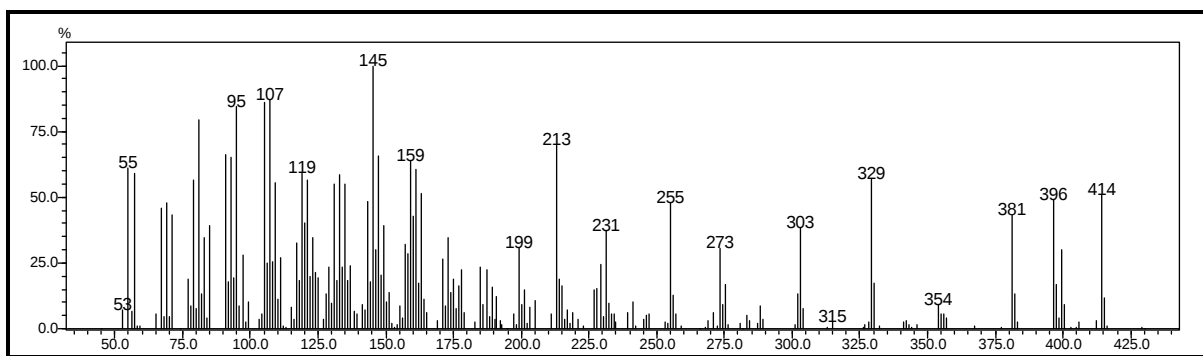
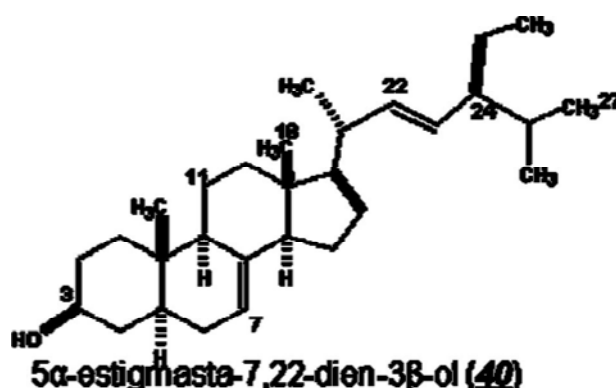


Figura 37. Fragmentograma experimental da substância **39**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.1.3 Identificação de 5 α -estigmasta-7,22-dien-3 β -ol (**40**)



A substância representada na Figura 29 e designada por **40** apresentou-se na forma de um sólido cristalino de difícil purificação sendo um dos constituintes do extrato GF2 subfrações 8.21-8.24 (4,0 mg) [Parte exp. item 3.5.3.3.], e identificado sua presença nos extrato GA2 e GR2 (Parte exp. itens 3.5.4.1 e 3.5.4.3)

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H (Figura 38) foram observados sinais entre δ 0,56 a 5,33. Na região de δ 5,01, 5,13 a 5,34 característicos de hidrogênios olefínicos a integração foi proporcional a três hidrogênios, em δ 3,47 identificamos um multiplete sugerindo hidrogênio carbinólico e os vários singletes na região de δ 0,70 a 1,23 nos indicaram a presença de várias metilas, o singlete em δ 0,53 *d* ($J=4,4$ Hz) indicou a presença de uma metila bastante protegida.

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 39 e Figura 40), os sinais dos carbonos olefínicos a δ 117,4 (CH), 129,4 (CH), 138,1 (CH) e 139,4 (C) e a presença de sinal em δ 71,06 (CH) característico de carbono oxigenado e os valores de deslocamentos químicos das metilas a δ 12,0; 12,2; 13,0; 19,0; 21,0 e 21,5 confirmaram a proposta juntamente com os demais sinais presentes no espectro

indicaram que o esteróide tratava-se do 5 α -estigmasta-7,22-dien-3 β -ol (**40**) [espinasterol]. Os dados de RMN de ^{13}C desta substância mostraram-se bastante semelhante aos descritos na literatura (Tabela 11) para o espinasterol (JUNKUSZEW et al., 1998).

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C de **40**

H e C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*	H e C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*
1	-	37,1 t	37,1	16	-	28,4 t	28,4
2	-	31,4 t	31,4	17	-	56,0 d	55,8
3	3,47 s	71,0 s	70,9	18	0,53 d (J= 4,4 Hz)	13,0 q	12,9
4	-	37,9 t	37,9	19	0,65 m	12,0 q	12,0
5	-	40,2 d	40,2	20	-	40,8 d	40,7
6	-	29,6 t	29,6	21	1,23 m	21,2 q	21,2
7	5,34 d (J= 4,9 Hz)	117,7 d	117,4	22	5,13 dd (J= 8,9 e 15 Hz)	138,1 d	138,1
8	-	139,4 s	139,5	23	5,01 dd (J= 8,9 e 15 Hz)	129,4 d	129,3
9	-	49,4 d	49,9	24	-	51,2 d	51,2
10	-	34,2 s	34,1	25	-	37,1 d	37,1
11	-	21,5 t	21,5	26	0,82 d (J= 4,7 Hz)	21,0 q	21,3
12	-	37,9 t	38,4	27	0,80 d (J= 7,4 Hz)	19,0 q	18,9
13	-	43,4 s	43,2	28	-	25,3 t	25,3
14	-	55,8 d	55,1	29	0,84 s	12,2 q	12,1
15	-	23,0 t	22,9				

* Junkuszew et al., (1998).

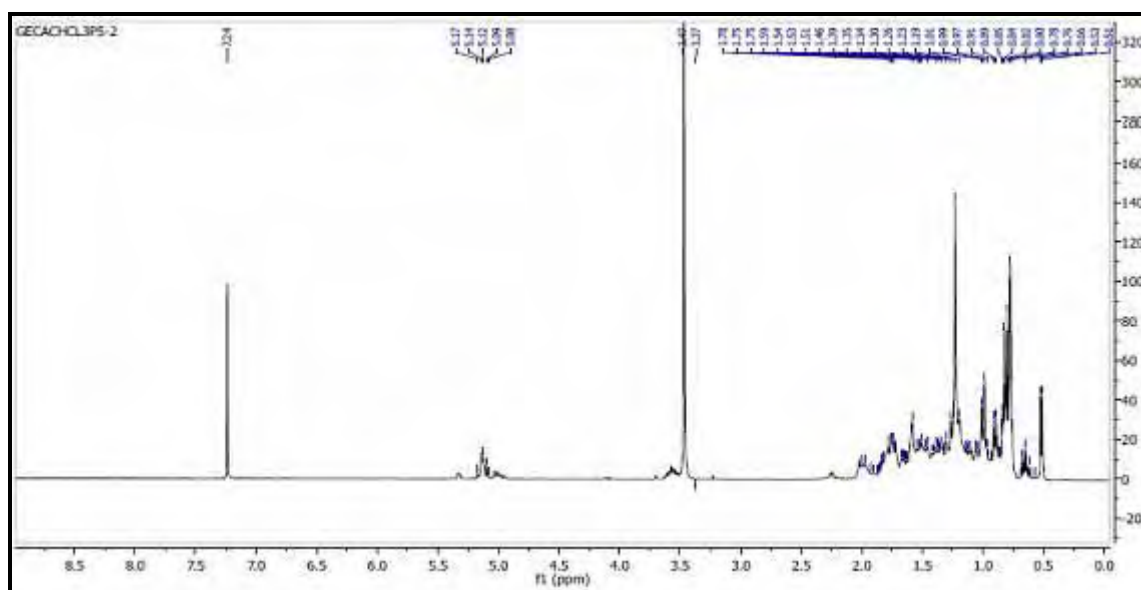


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **40**.

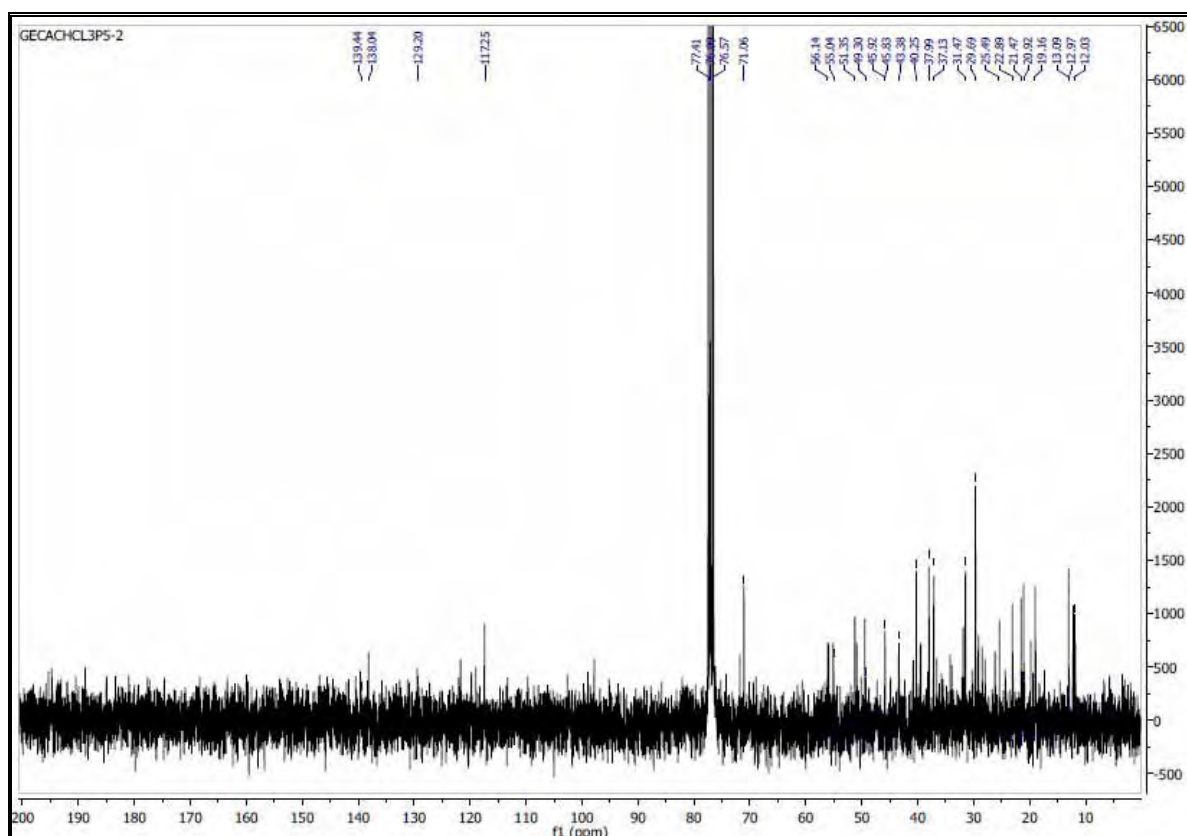


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **40**.

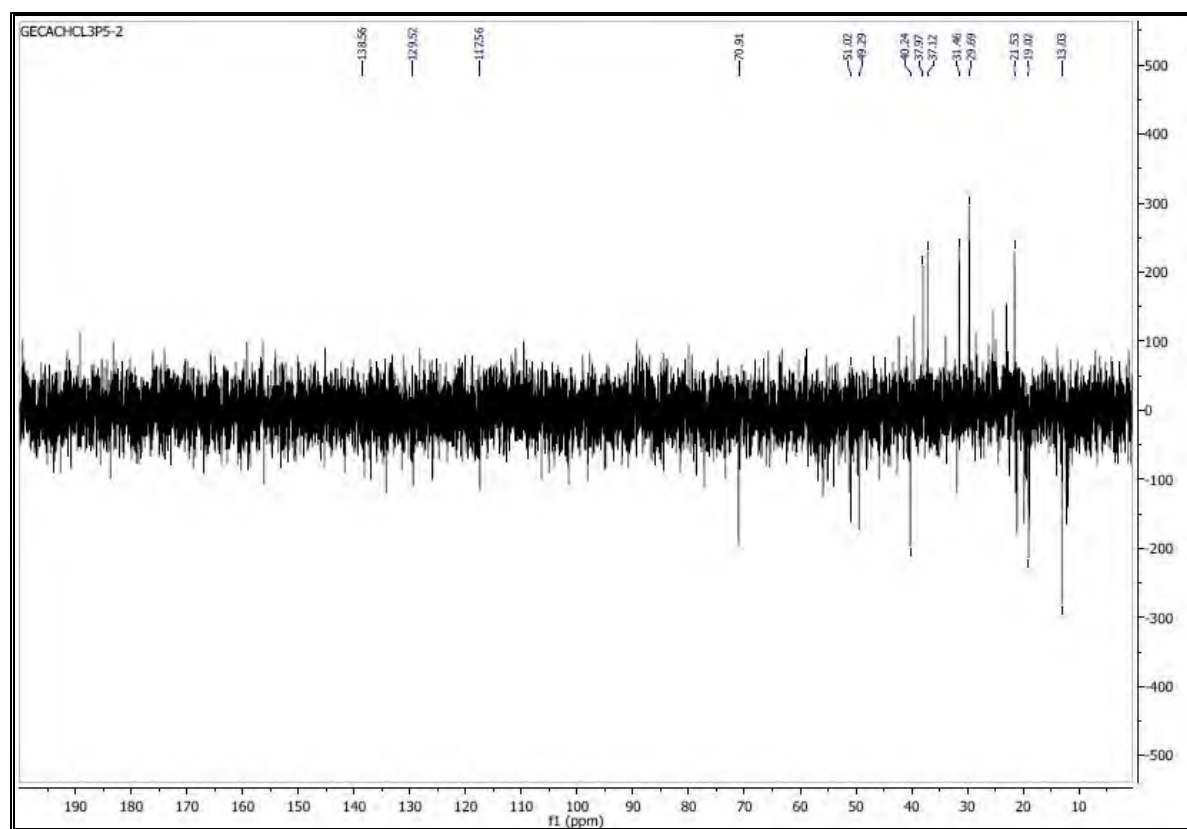
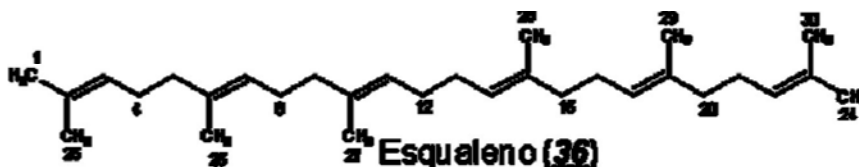


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de **40**.

4.3.2.2 Terpenos

4.3.2.2.1 Identificação de esqualeno (**36**)



A substância **36**, cuja estrutura é representada na Figura 29, apresentou-se na forma amorfa, a qual foi obtida das frações GF2 (3,8 mg) [Parte exp. 3.5.3.1] a mesma foi identificada nos extratos GS2 (Parte exp. 3.5.4.2), sendo ela também identificada nos extratos hexânicos como apresentado no *item 4.2.1*.

Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 41) apresentou sinais compatíveis com os de um hidrocarboneto insaturado, dentre eles: um tripleto largo em δ 5,11 na região de hidrogênios olefínicos, um multiplete na região de δ 2,00 a 2,06 e um singlete em δ 1,59, atribuíveis a um grupo metilênico α à ligação dupla e a uma metila ligada a carbono olefínico, respectivamente.

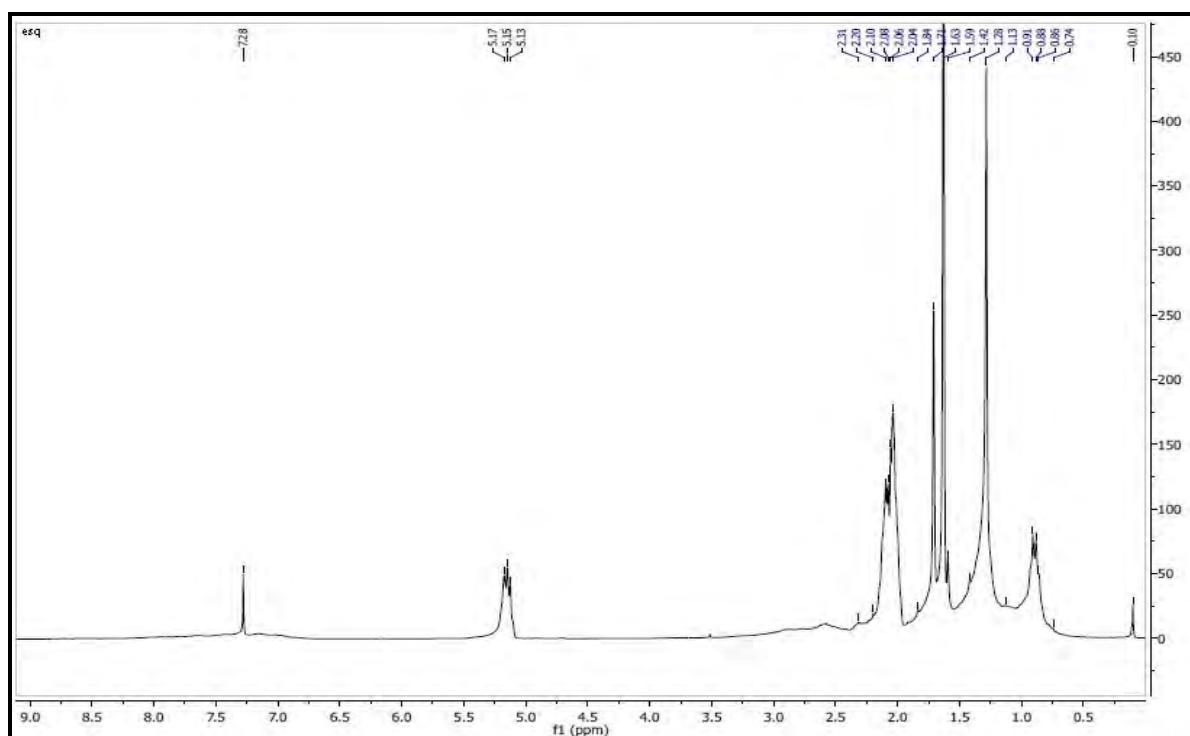
Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$ (Figuras 42 e 43), foram evidenciados sinais de carbonos olefínicos, a δ 124,3 (CH); 124,3 (CH); 124,4 (CH) e 131,2 (C); 134,9 (C); 135,1 (C), indicativos da presença de ligações duplas de carbonos trissubstituídos na estrutura de **36**. Os sinais correspondentes a metilas vinílicas foram observados a δ 15,99; 16,03; 17,7 e 25,7.

Considerando-se estas e as demais informações contidas no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 12), a feição apresentada pelo espectro de RMN de ^1H e dados obtidos no fragmentograma (Figura 44), que exibiu o pico do íon molecular a m/z 410, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$, concluiu-se que a substância **36** tratava-se de um triterpeno acíclico, identificado como **esqualeno**.

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz)* de **36**.

H e C	δ_{H}	δ_{C}	δ_{C}^*
1/24	1,67	25,7 <i>q</i>	25,7
2/23	-	131,2 <i>s</i>	131,1
3/22	5,11 <i>t</i> ($J=7,8\text{Hz}$)	124,3 <i>d</i>	124,3
4/21	2,20 <i>d</i> ($J=4,8\text{Hz}$)	26,8 <i>t</i>	26,8
5/20	2,08 <i>s</i>	39,7 <i>t</i>	39,7
6/19	-	134,9 <i>s</i>	134,8
7/18	5,11 <i>t</i> ($J=7,8\text{Hz}$)	124,3 <i>d</i>	124,3
8/17	2,20 <i>d</i> ($J=4,8\text{Hz}$)	26,7 <i>t</i>	26,7
9/16	2,08 <i>s</i>	39,7 <i>t</i>	39,7
10/15	-	135,1 <i>s</i>	135,0
11/14	5,11 <i>t</i> ($J=7,8\text{Hz}$)	124,4 <i>d</i>	124,4
12/13	2,31 <i>d</i> ($J=6,0\text{Hz}$)	28,3 <i>t</i>	28,3
25/30	1,24* <i>s</i>	17,7 <i>q</i>	17,7
26/29	1,24* <i>s</i>	16,03* <i>q</i>	16,04 $^{\Delta}$
27/28	1,54* <i>s</i>	15,99* <i>q</i>	16,00 $^{\Delta}$

Pouchert, (1993); * valores que podem estar trocados

**Figura 41.** Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **36**.

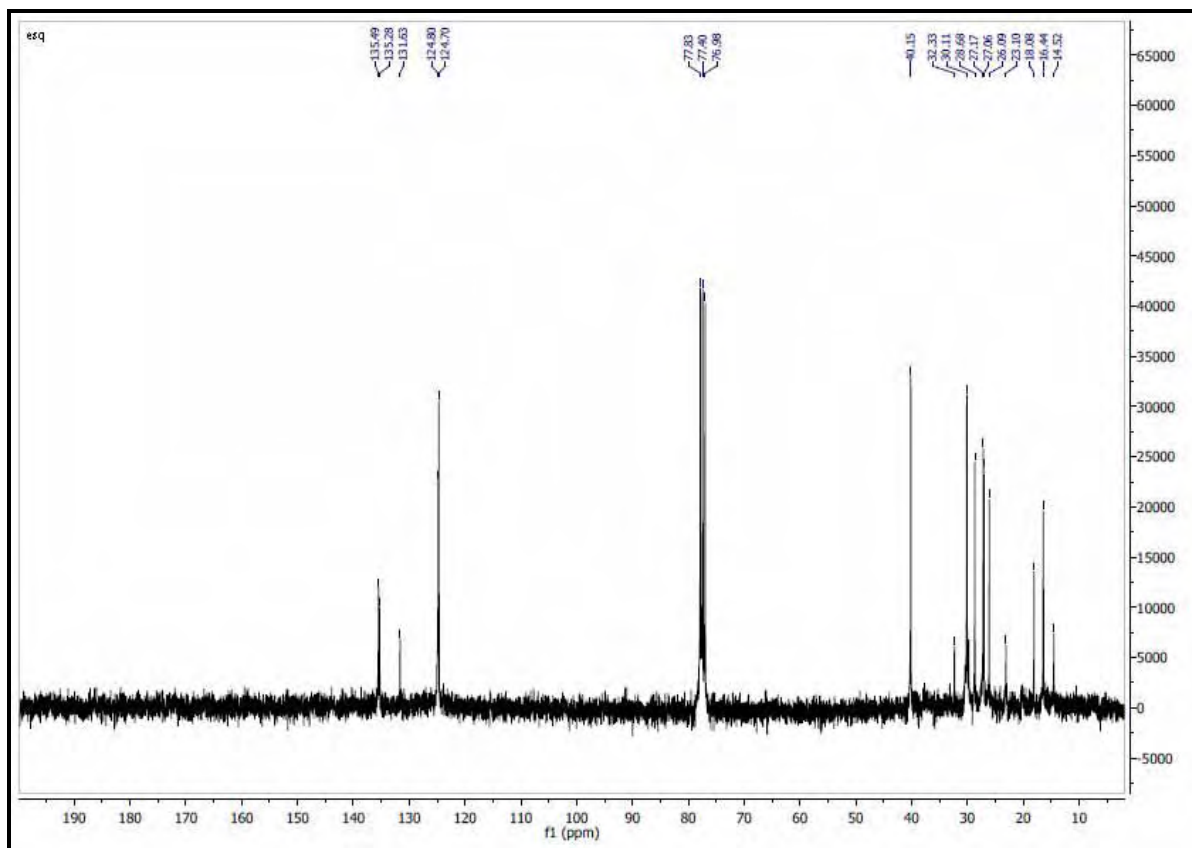


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **36**.

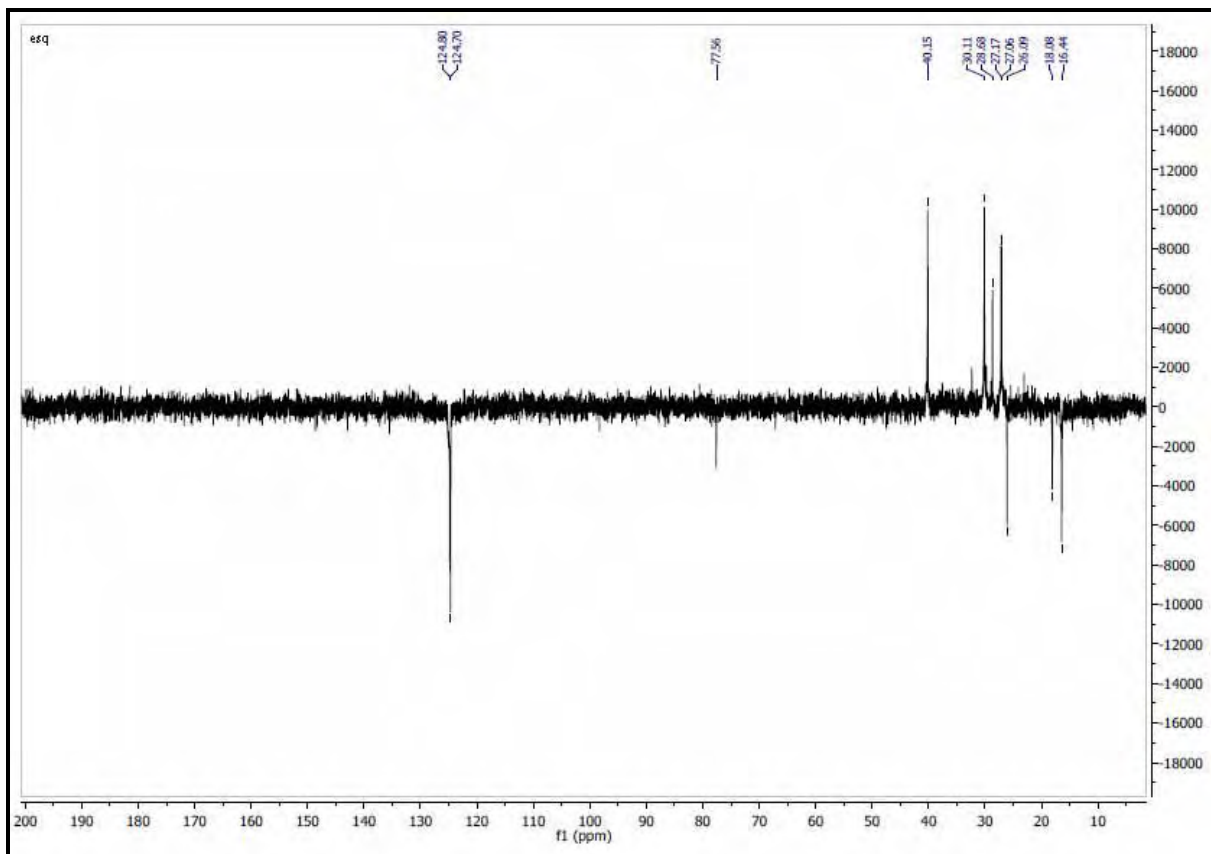


Figura 43. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de **36**.

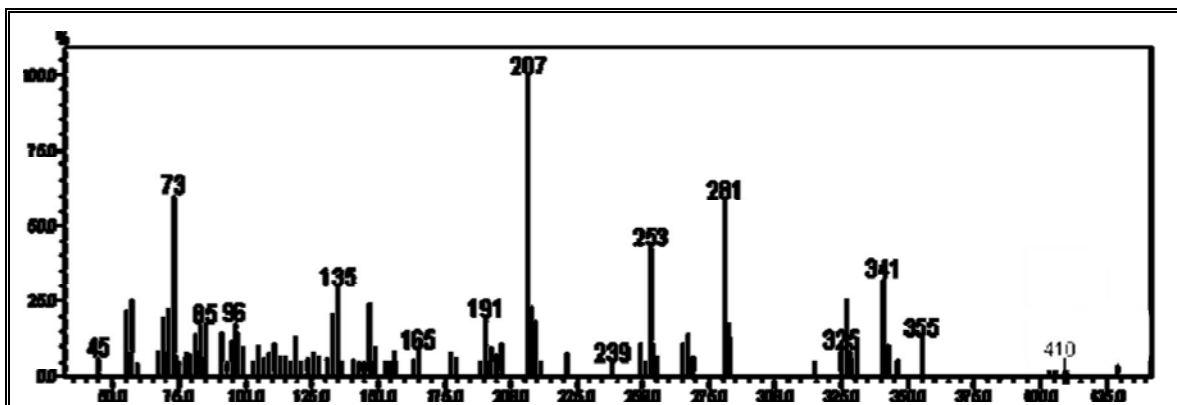
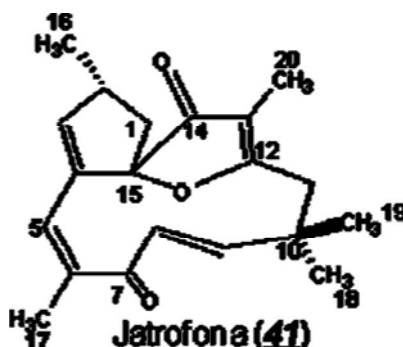


Figura 44. Fragmentograma experimental da substância **36**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.2 Identificação de jatrofona (**41**).



A substância representada na figura 29 e designada por **41**, apresentou-se na forma de um sólido amorfo, proveniente do extrato GF2 (8,0 mg) [Parte exp. *item* 3.5.3.2].

Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 45) apresentou um conjunto de sinais com valores de deslocamento químico entre δ 1,0 e 6,5, incluindo quatro singletos (δ 1,22; 1,34; 1,73; 1,86) e um duplete em δ 1,07 ($J = 7$ Hz) atribuídos a grupos metila. Apresentou também dois dupletos largos em δ 6,4 ($J = 16,2$ Hz) e δ 5,9 ($J = 16,2$ Hz), e dois multipletos em δ 5,70 e 5,98 sugestivos a hidrogênios olefínicos, além de sinais na região de δ 2,0 a 3,0.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46) mostrou a presença de vinte sinais os quais, com o auxílio das informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 47), foram atribuídos a cinco carbonos metínicos (sendo quatro olefínicos), cinco carbonos metílicos, dois carbonos metilênicos e oito carbonos tetrasubstituídos (sendo dois carbonílicos). Os valores dos deslocamentos químicos observados para

os carbonos olefínicos δ 123,74 (CH), 137,13 (C), 147,09 (CH) e 141,77 (C), revelaram a presença de ligações duplas. Estas informações indicaram que a substância **41** tratava-se de um diterpeno do tipo tricíclico.

O espectro de RMN bidimensional HMQC (Figura 48) possibilitou correlacionar os sinais de carbono e hidrogênio diretamente ligados (Tabela 13).

O experimento HMBC (Figura 49) mostrou correlação das atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos quaternários C-4, C-6, C-7, C-10, C-12, C-13, C-14 e C-15 com isso foram confirmadas as correlações à longa distância com os hidrogênios, observadas no espectro HMBC, junto com as demais correlações presentes no espectro são apresentadas na Tabela 15.

Esses valores foram compatíveis com os descritos na literatura (GOULART, et al.,1993), e os dados obtidos no espectro de massas (Figura 50), que exibiu o pico do íon molecular a m/z 312, compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_3$, concluiu-se que a substância **41** tratava-se de um diterpeno tricíclico identificado como **jatrofona**.

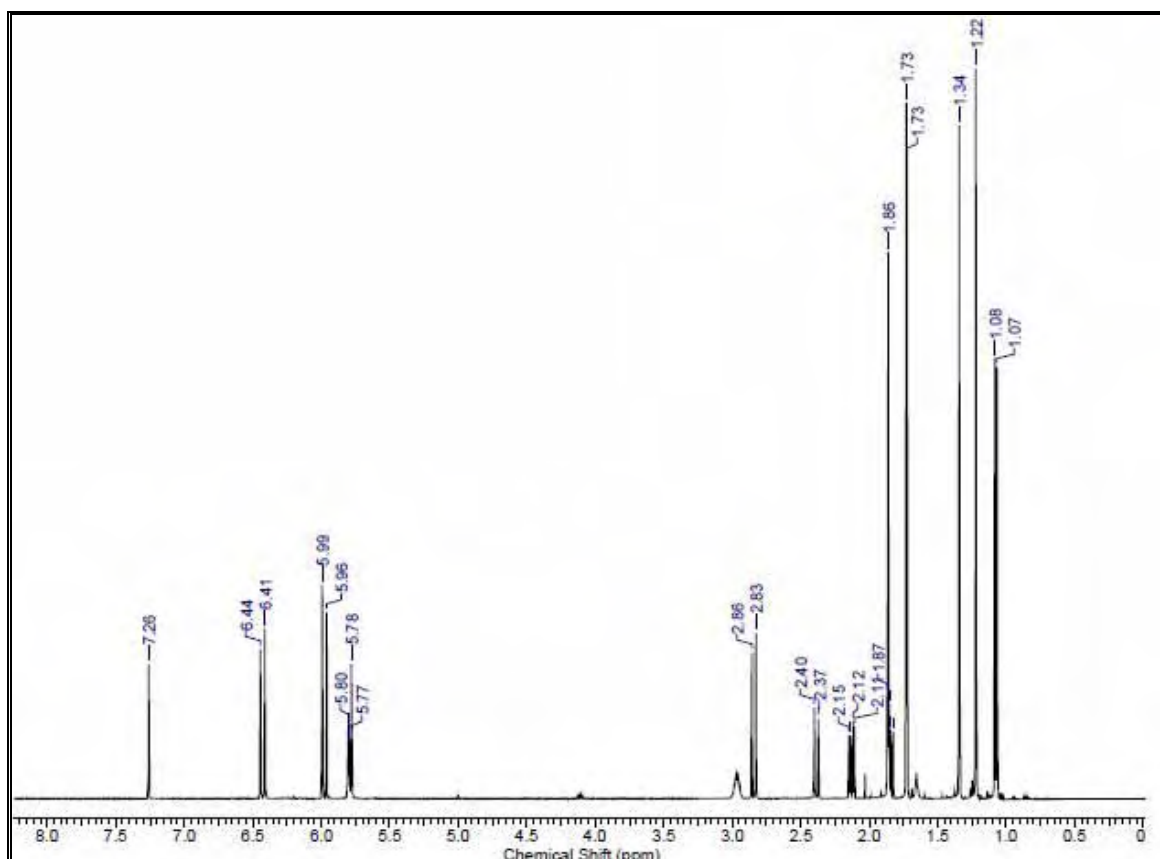


Figura 45. Espectro de RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de **41**.

Talal Suleiman Mahmoud

Tabela 13. Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de **41**

C e H	HMQC		HMBC		literatura*
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	
1	42,47 <i>t</i>	1,82 (<i>dd</i> ; $J = 13,5$ e $6,0$ Hz), H-1a 2,12 (<i>dd</i> ; $J = 13,5$ e $5,8$ Hz), H-1b			42,45
2	38,32 <i>d</i>	3,00 (<i>m</i>)	H-16		38,30
3	123,74 <i>d</i>	5,8 0(<i>m</i>)		H-16	123,70
4	137,13 <i>s</i>	-	H-5	H-1	137,10
5	147,09 <i>d</i>	5,78 (<i>m</i>)		H-17	147,03
6	141,77 <i>s</i>	-	H-17	H-8	141,75
7	201,90 <i>s</i>	-		H-9, H-17	201,84
8	128,70 <i>d</i>	5,70 (<i>d</i> ; $J = 16,2$ Hz)	H-9		128,71
9	158,94 <i>d</i>	6,40(<i>d</i> ; $J = 16,2$ Hz)		H-18	158,71
10	36,61 <i>s</i>	-	H-19	H-11	36,59
11	41,25 <i>t</i>	2,40 (<i>d</i> ; $J = 14,0$ Hz), H-11a 2,86 (<i>d</i> ; $J = 14,0$ Hz), H-11b	H-11	H-18, H-19	41,25
12	183,18 <i>s</i>	-		H-20	183,13
13	112,40 <i>s</i>	-	H-20	H-11	112,36
14	203,80 <i>s</i>	-		H-20	203,78
15	99,77 <i>s</i>	-	H-1		99,75
16	18,97 <i>q</i>	0,9(<i>d</i> ; $J = 7,0$ Hz)			18,93
17	20,70 <i>q</i>	1,86 (<i>s</i>)			20,68
18	30,39 <i>q</i>	1,22 (<i>s</i>)			30,38
19	26,89 <i>q</i>	1,34 (<i>s</i>)			26,89
20	6,06 <i>q</i>	1,73 (<i>s</i>)			6,02

*Goulart, et al., (1993)

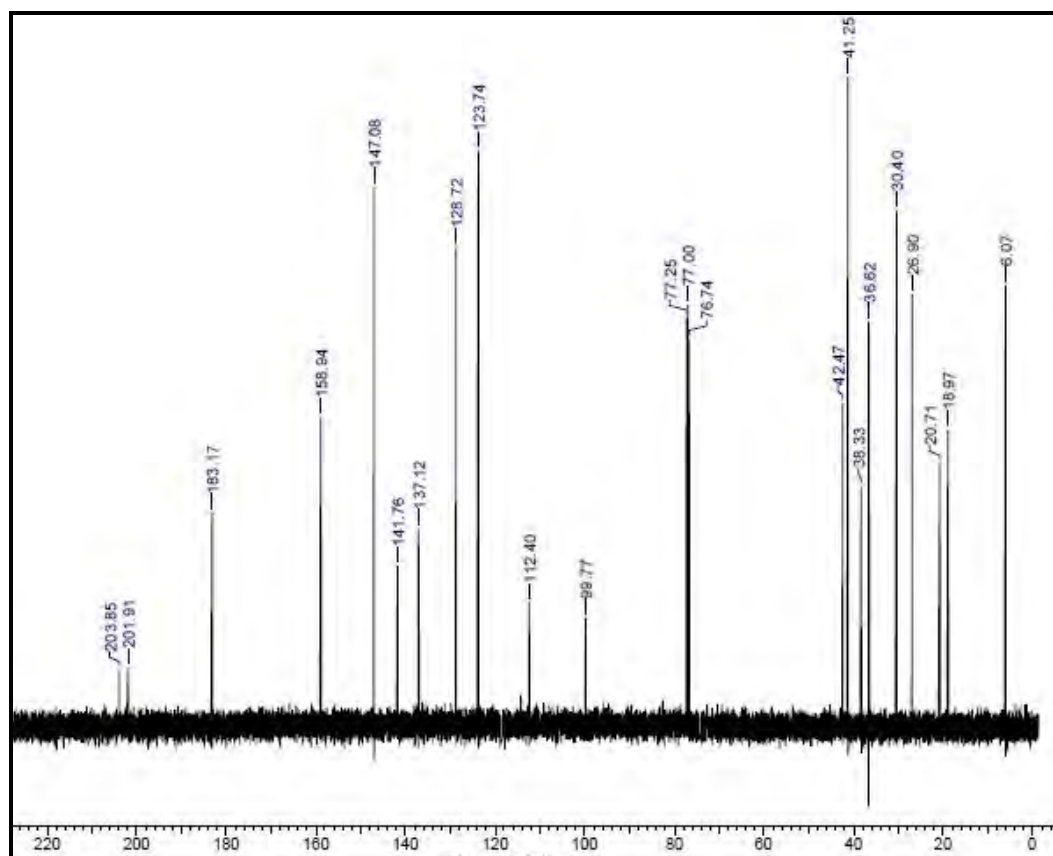


Figura 46. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **41**.

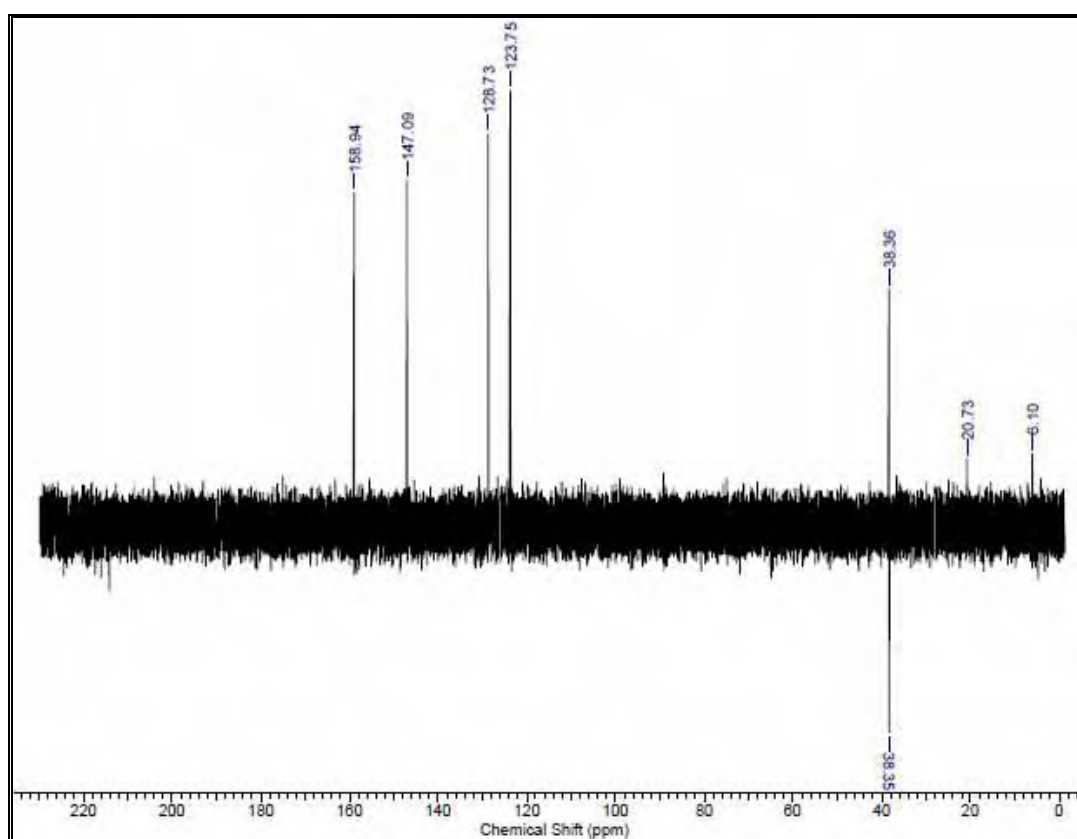


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de **41**

Talal Suleiman Mahmoud

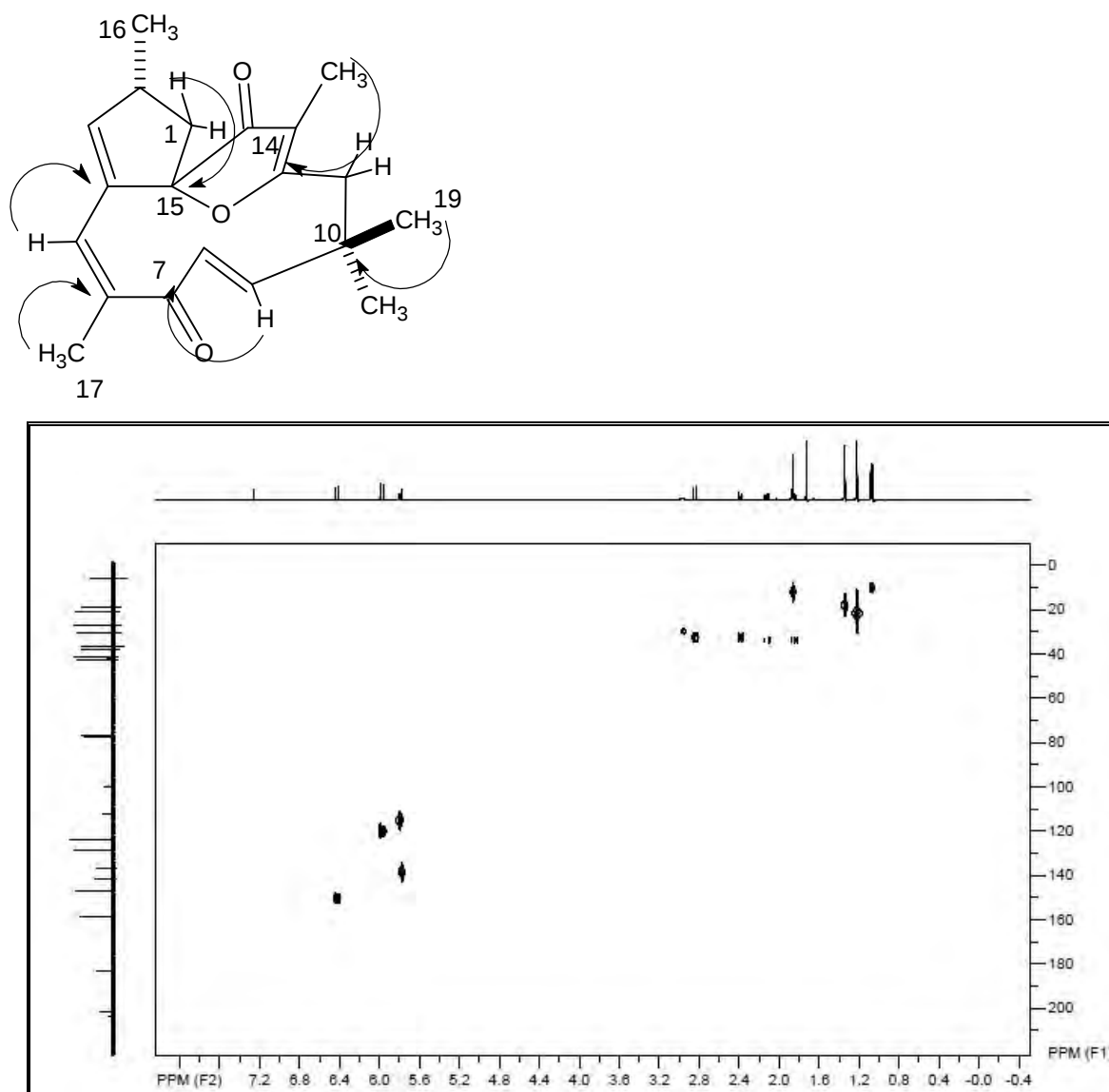


Figura 48. Espectro de RMN HMQC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de **41**

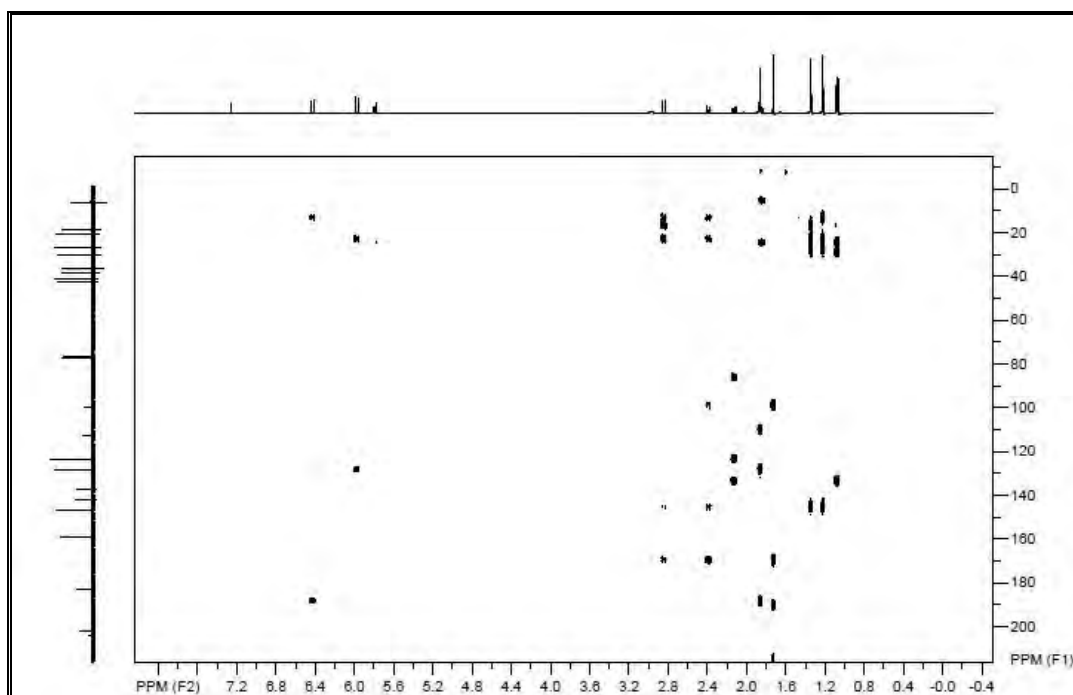


Figura 49. Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de **41**

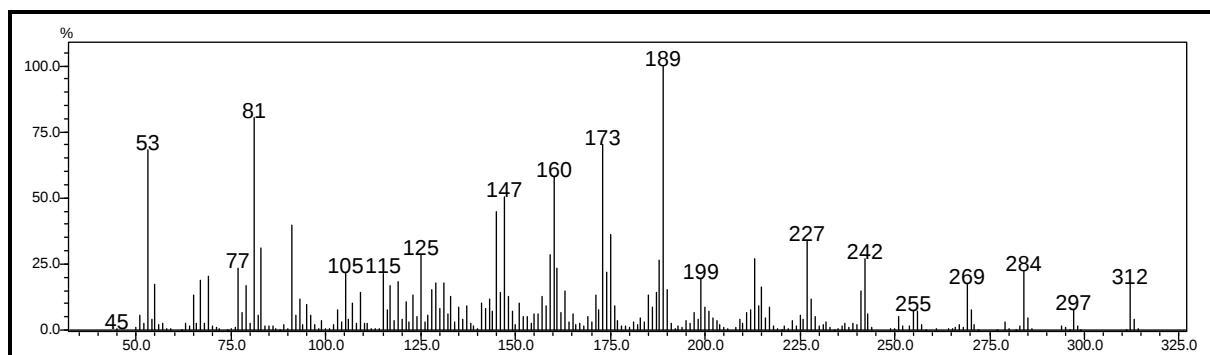
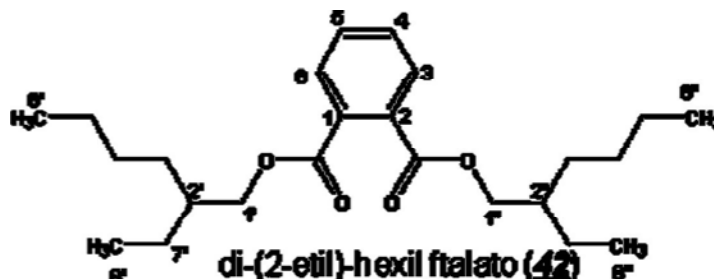


Figura 50. Fragmentograma experimental da substância **41**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.3 Aromáticos

4.3.2.3.1 Identificação de di(2-etil-hexil) ftalato (**42**).



A substância representada na figura 29 e designada por **42**, foi obtida como um dos constituintes do extrato GF3, fração 17 (4,9 mg) e GA3 fração 13 (4,3 mg)[Parte exp. *itens* 3.5.3.3 e 3.5.4.1].

Foram obtidos espectros de RMN de ^1H (Figura 51), ^{13}C e DEPT 135° (Figuras 52 e 53), o espectro de RMN de ^1H confirmou a presença de hidrogênios ligados a um anel aromático, em δ 7,70 e 7,52. Os sinais em δ 4,23 correspondem aos hidrogênios de grupos metilenos ligados ao oxigênio. Na região entre δ 1,7 e 0,9 identificam-se os sinais referentes aos hidrogênios alifáticos. No espectro de RMN de ^{13}C foi identificado um sinal em δ 167,7 atribuído ao grupo carboníla de éster aromático, além de sinais atribuíveis a carbonos aromáticos em δ 132,4, 130,8 e 128,7.

O número de sinais referentes aos carbonos aromáticos sugeriram uma estrutura simétrica dissustituída, com dois carbonos quaternários e 4 grupos metino, os quais aparecem no espectro de RMN de ^1H como dubletos de dubletos em δ 7,70 e 7,52. Esses dados permitem a proposição da estrutura parcial de um anel aromático com duas substituições de grupos carbonila. Como o sinal em δ 132,4 também aparece com intensidade menor isso reforçou a idéia de que este sinal corresponde aos carbonos quaternários da estrutura proposta. A partir dos deslocamentos dos carbonos (Tabela 14) da substância e por comparação aos descritos por Rao et al. (2000), que isolou substância das folhas de *Cassia auriculata*, concluiu-se que trata-se do di(2-etil-hexil) ftalato (DEHP), os dados obtidos no espectro de massas, que exibiu o pico do íon molecular a m/z 390 (Figura 54), compatível com a formula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$ reforçaram essa conclusão.

Após a confirmação de que a substância era um ftalato, foi analisada a hipótese de uma possível contaminação. Foram realizadas análises cromatográficas dos extratos etanólicos dos materiais plásticos utilizados no laboratório (tampa plástica dos frascos utilizados para armazenar as frações e dos resíduos de solventes concentrados, não sendo detectada tal substância. Segundo Rao et al. (2000), este ftalato é encontrado como sedimentos, na água, solos, plantas e organismos aquáticos, sugerindo que este componente possa ser proveniente da poluição das águas.

Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) de 42

H e C	δ_{H}	δ_{C}	Literatura δ_{C}^*
1	-	132,1 (C)	132,4
2	-	132,1 (C)	132,4
3	7,70 <i>dd</i> ($J= 3,5; 6,0$ Hz)	128,4 (CH)	128,7
4	7,52 <i>dd</i> ($J= 3,5; 6,0$ Hz)	131,0 (CH)	130,8
5	7,52 <i>dd</i> ($J= 3,5; 6,0$ Hz)	131,0 (CH)	130,8
6	7,70 <i>dd</i> ($J= 3,5; 6,0$ Hz)	128,4 (CH)	128,7
1'' – 1'	4,23 <i>dd</i> ($J= 1,3; 4,0$ Hz)	67,7 (CH_2)	68,1
2'' – 2'	1,69 <i>dd</i> ($J= 6,0; 12,0$ Hz)	30,2 (CH)	30,3
3'' – 3'	1,42 <i>m</i>	38,7 (CH_2)	38,7
4'' – 4'	-	28,7(CH_2)	28,9
5'' – 5'	-	22,6(CH_2)	22,9
6'' – 6'	0,90 <i>m</i>	13,0 (CH_3)	14,0
7'' – 7'	-	23,5 (CH_2)	23,7
8'' – 8'	0,92 <i>m</i>	10,0 (CH_3)	10,9
9'' – 9'	-	167,8(COO)	167,7

*Rao et al.(2000)

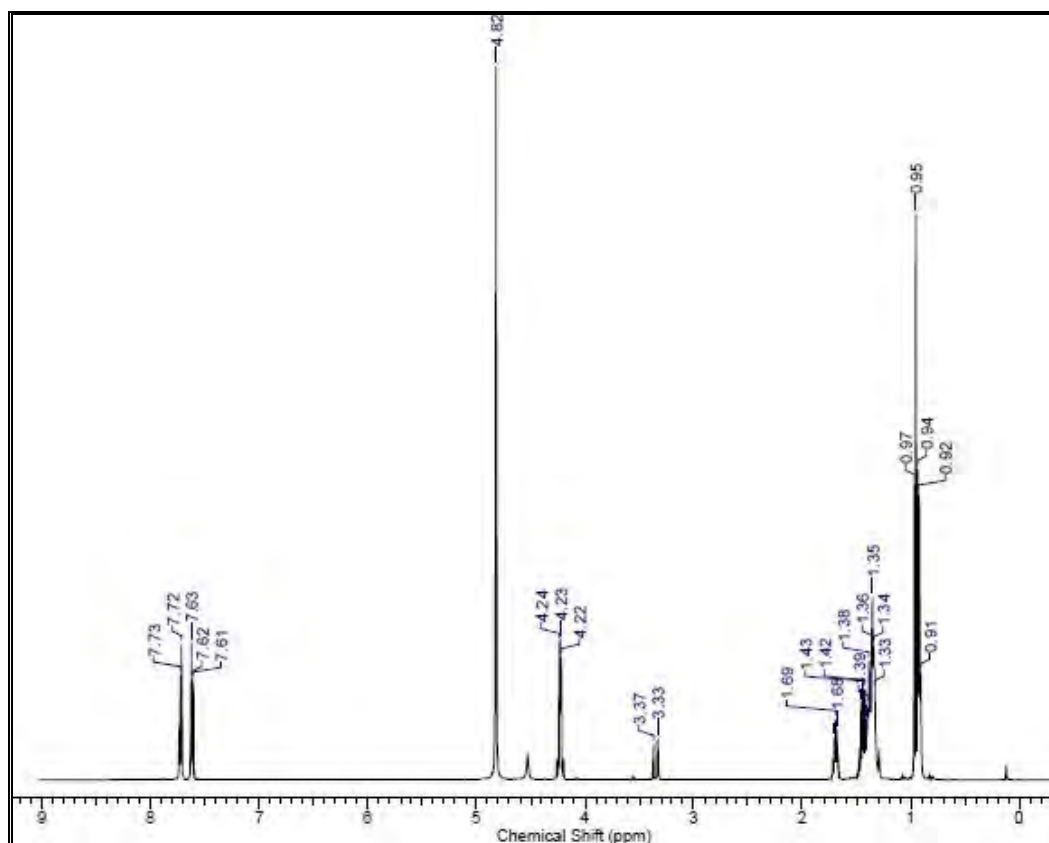


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **42**.

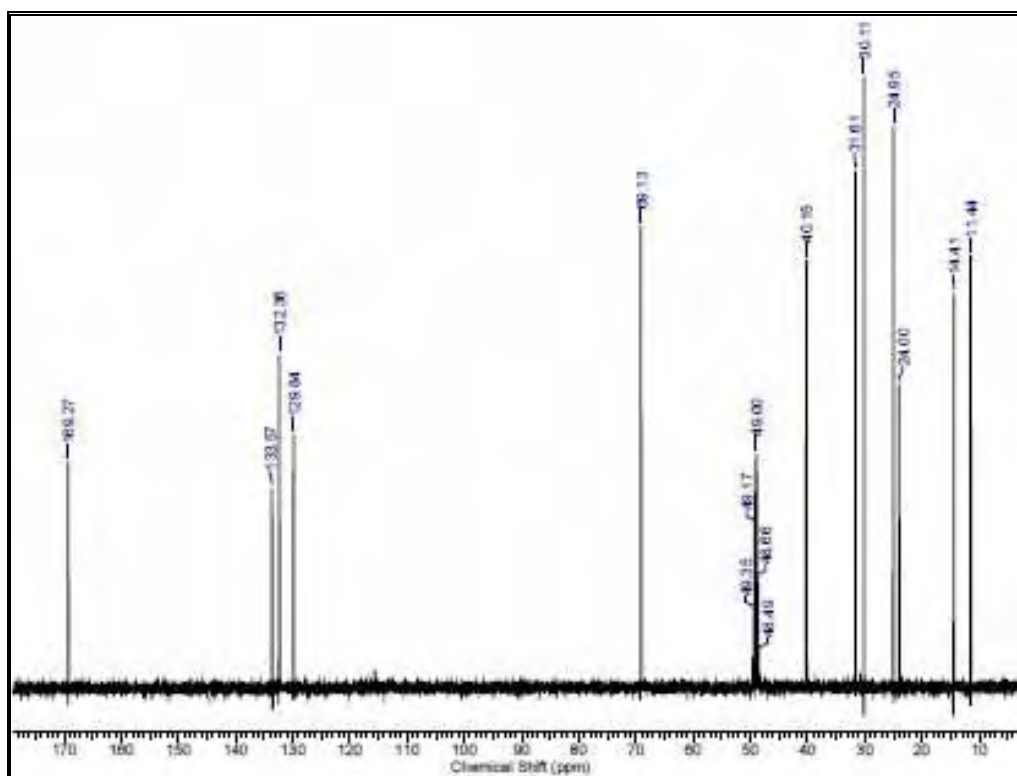


Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **42**.

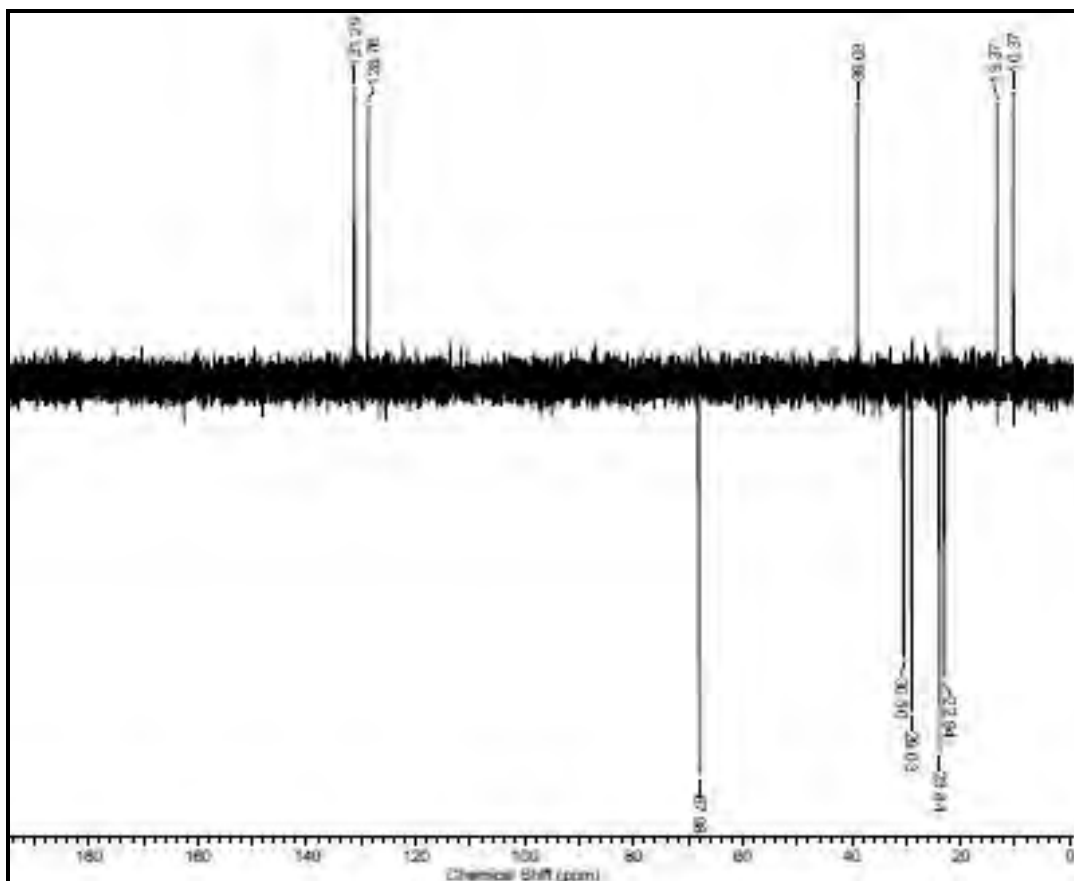


Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de 42.

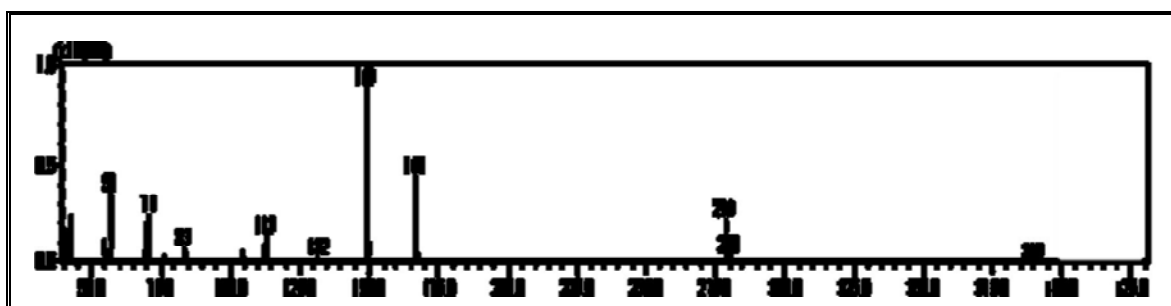
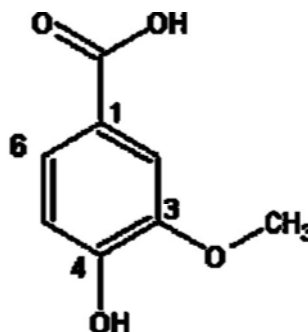


Figura 54. Fragmentograma experimental da substância 42.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 μL , split 1:25.

4.3.2.3.2 Identificação de ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico (**49**)



Ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico (49**)**

A substância representada na Figura 29 e designada por **49** apresentou-se na forma de um sólido cristalino, o qual foi obtido do extrato GF3, fração 10 (83,4mg) (Parte exp. 3.5.3.3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 55) apresentou três sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos e indicativos de um anel trissubstituído a: δ 7,87 (s); 7,54 (d, $J = 1,7$ Hz) e 6,82 (d, $J = 8,4$ Hz). Foi também observado neste espectro um sinal correspondente a um grupo metoxila em δ 3,87. As análises dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 56 e 57) definiram a estrutura da substância como a do ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico (ácido vanílico), em função da presença de 8 sinais compatíveis com um anel aromático contendo três substituintes (uma carboxila, uma metoxila e uma hidroxila), nas posições 1, 3 e 4, respectivamente. Estes dados mostraram-se bastante semelhantes aos sinais descritos na literatura para esta substância (SILVA, 2007), [Tabela 15].

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H -(CD₃OD, 300 MHz) e ^{13}C -(CD₃OD, 75 MHz) de **49**

Nº	δ_{H}	δ_{C}	Literatura δ_{C} ^{a, *}
1	-	121,7 s	121,0
2	7,54 δ (d, $J = 1,7$ Hz)	113,8 d	112,07
3	-	148,6 s	147,0
4	-	152,4 s	151,4
5	7,87 (s)	115,8 d	114,8
6	6,82 δ (d, $J = 8,4$ Hz)	125,1 d	123,4
OCH ₃	3,87 (s)	56,3 q	55,5
COOH	-	168,0 s	165,0

*Silva, (2007); a-DMSO-d₆, 125 MHz

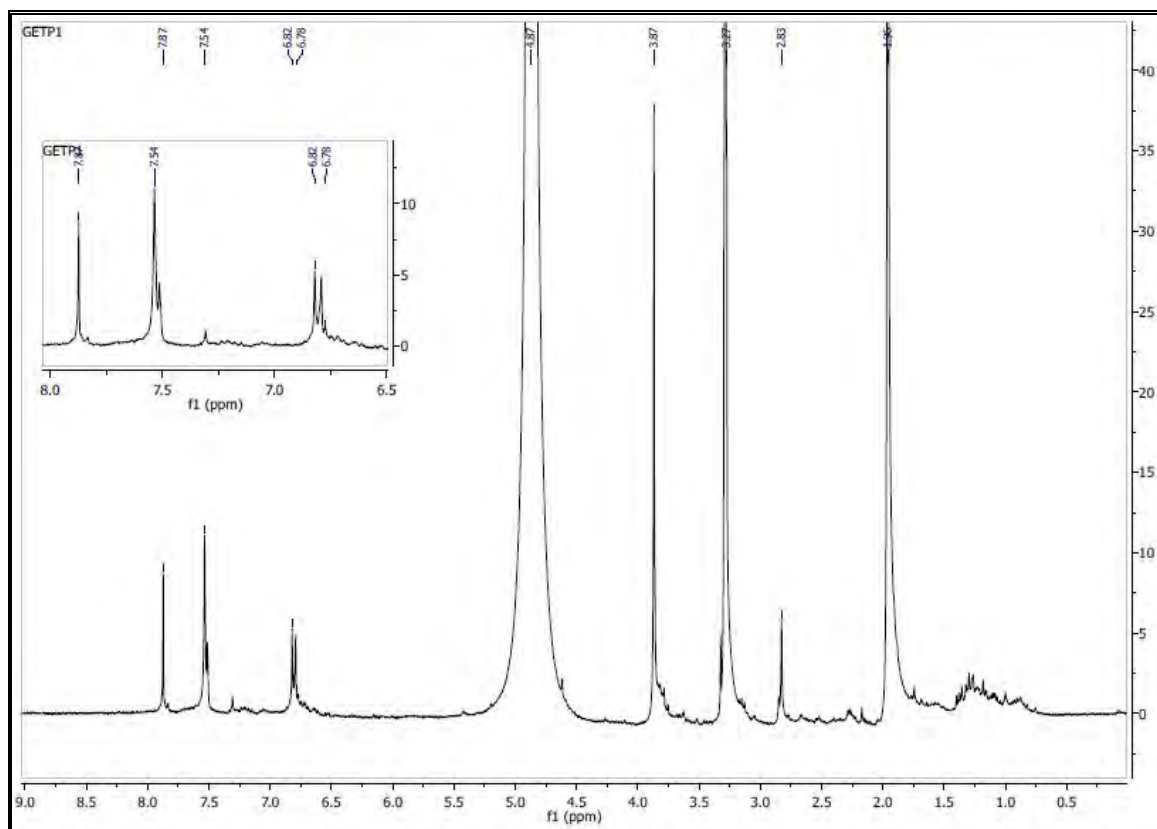


Figura 55. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O) de **49**.

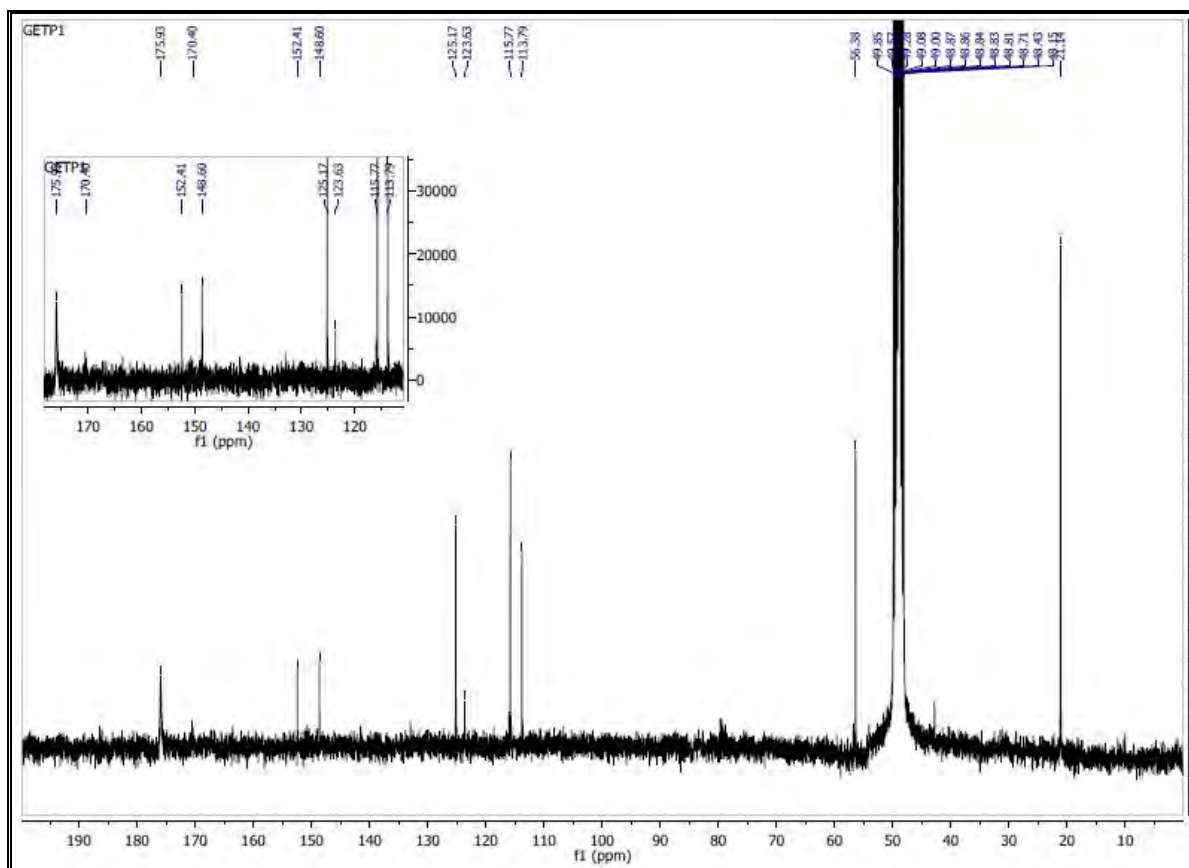


Figura 56. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O) de **49**.

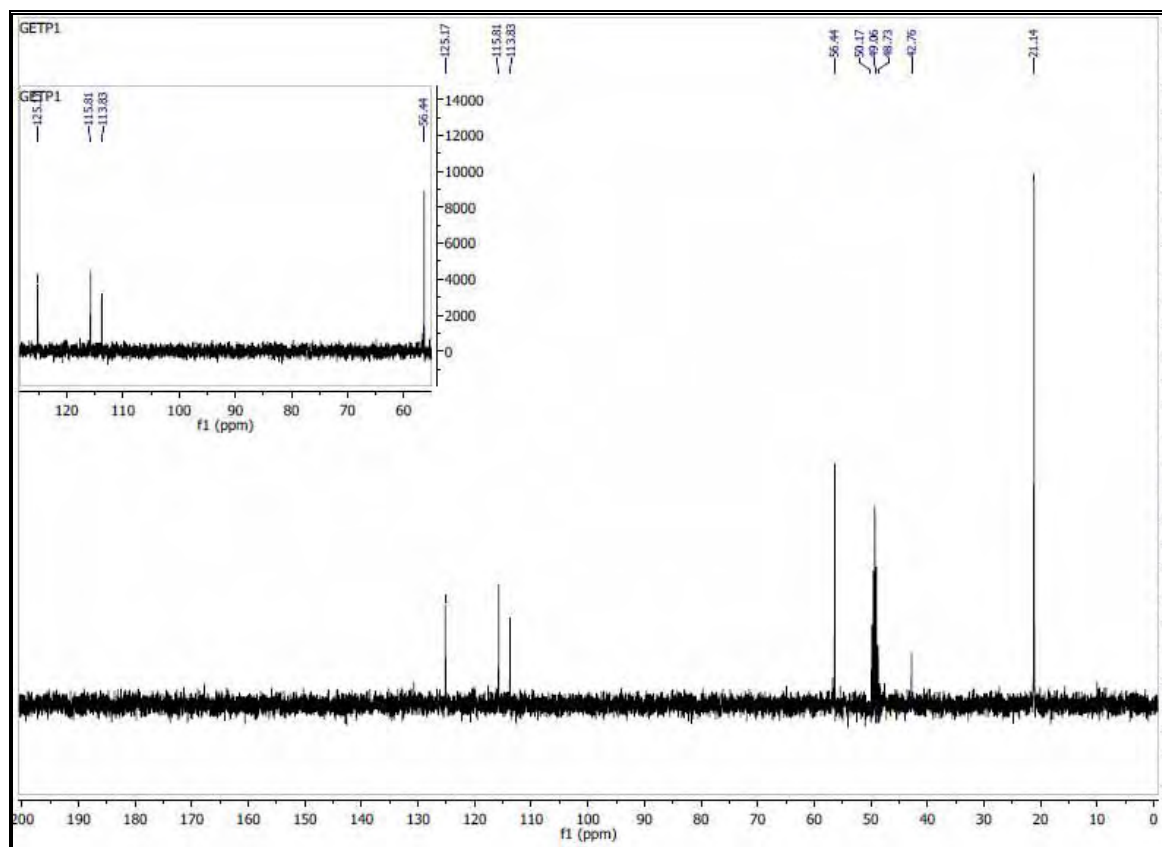
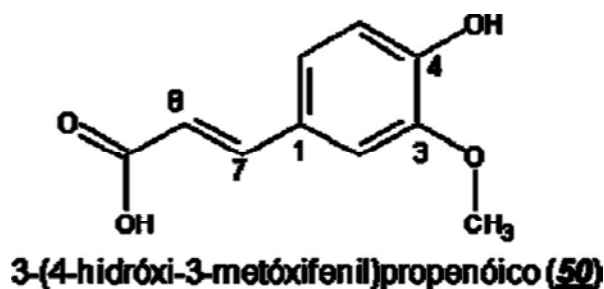


Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O) de **49**.

4.3.2.3.3 Identificação de 3-(4-hidróxi-3-metóxi-fenil)propenóico (**50**)



A substância representada na Figura 29 e designada por **50** apresentou-se na forma de um sólido cristalino, o qual foi obtido do extrato GF3, fração 10 (83,4mg) (Parte exp. item 3.5.3.3).

Os dados de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° (Figura 58, 59 e 60) de **50** estão reunidos na Tabela 16. A análise destes dados revelou a presença de um anel aromáticos do tipo 1,3,4 – trissubstituído caracterizados pelos conjuntos de sinais a: δ 6,79 (1H, *d*, J = 8,2 Hz), δ 7,04 (1H, *dd*, J = 1,9; 8,2 Hz) e δ 7,17 (1H, *d*, J = 1,9 Hz) e um sinal correspondente a um grupo metoxila em δ 3,89 (s). Também puderam ser observados dois dubletos em δ 6,29 e 7,54, atribuíveis aos hidrogênios olefínicos α e

β , respectivamente, de um grupo carbonílico α,β -insaturado. Estes hidrogênios estão acoplados entre si com $J_{\text{trans}} = 15,9$ Hz. O sinal observado a 171,0 δ no espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de uma carbonila. Desta forma, e também com base nos dados fornecidos pelo RMN de C e DEPT 135° que apresentou 10 sinais, confirmou-se a ser a substância 3-(4-hidróxi-3-metóxfenil)propenóico também conhecida como 4-hidróxi-3-metóxicinâmico ou ainda ácido Isoferúlico **50**.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **50**, (CD_3OD , CH_3COOH e H_2O , 300 MHz e 75 MHz)

H e C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	127,7 s
2	7,17 (1H, <i>d</i> , $J = 1,9$ Hz)	111,6 <i>d</i>
3	-	149,3 s
4	-	150,3 s
5	6,79 δ (1H, <i>d</i> , $J = 8,2$ Hz)	116,7 <i>d</i>
6	7,04 (1H, <i>dd</i> , $J = 1,9; 8,2$ Hz)	123,8 <i>d</i>
7 β	7,54 (1H, <i>d</i> $J = 15,9$ Hz)	146,6 <i>d</i>
8 α	6,29 (1H, <i>d</i> $J = 15,9$ Hz)	116,4 <i>d</i>
COOH	-	171,0 s
OCH ₃	3,89 (s).	56,4 <i>q</i>

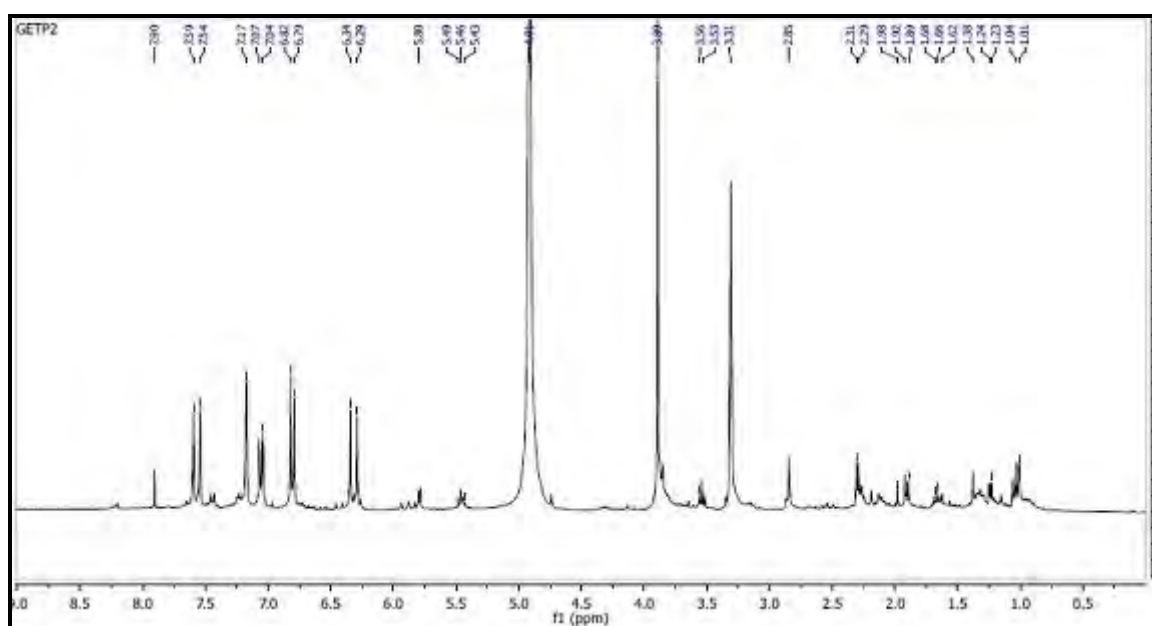


Figura 58. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O ,) de **50**.

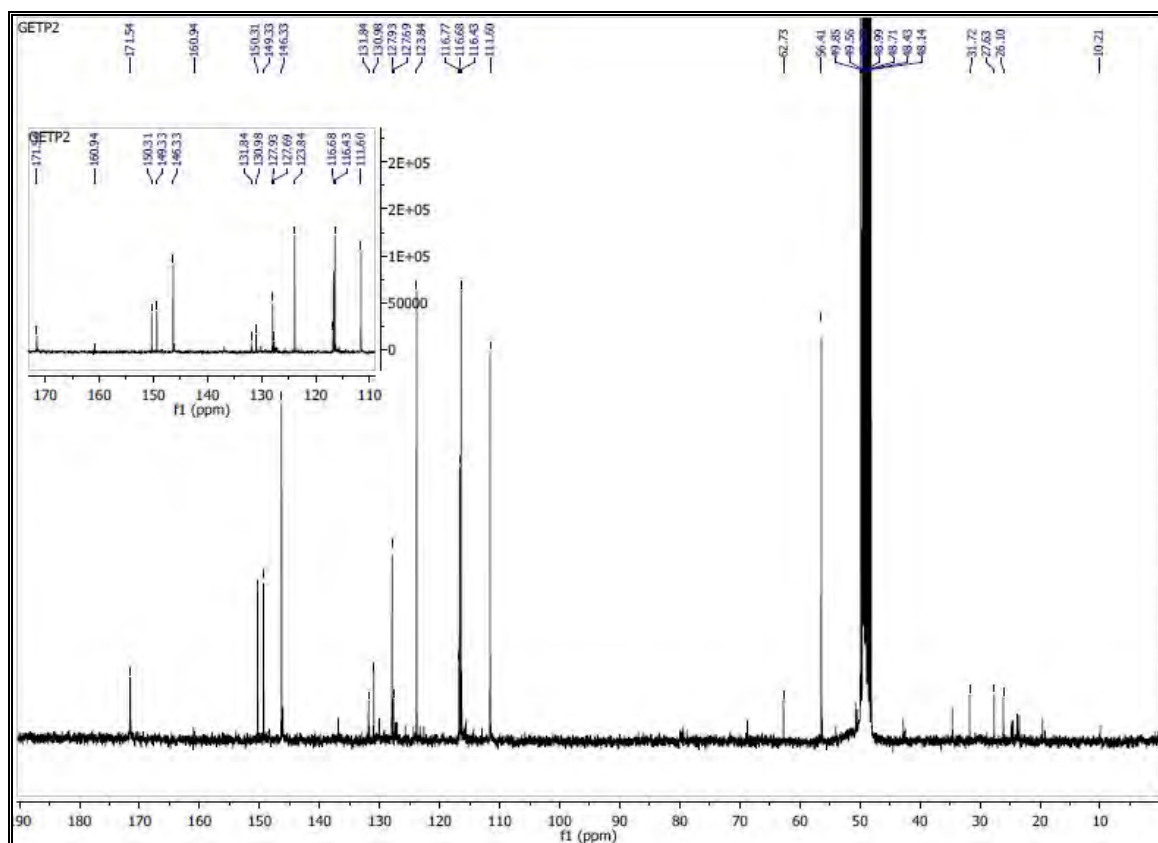


Figura 59. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O .) de **50**.

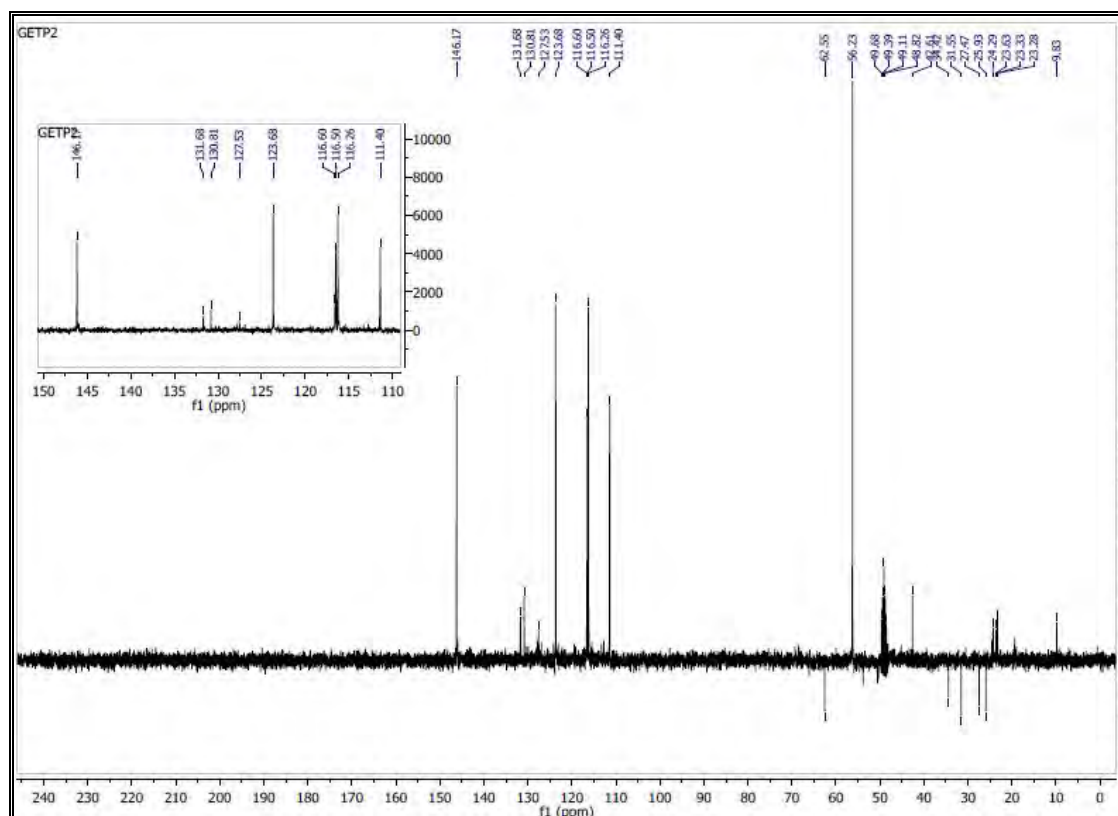
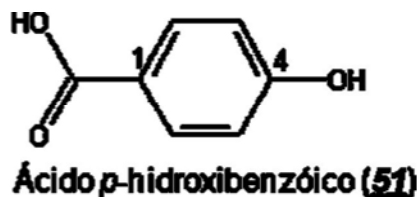


Figura 60. Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD , CH_3COOH e H_2O .) de **50**

4.3.2.3.4 Identificação de Ácido *p*-hidroxibenzóico (**51**).



A substância representada na Figura 29 e designada por **51** apresentou-se na forma de um sólido cristalino, o qual foi obtido do extrato GF3, fração 11 (112,7 mg) (Parte exp. item 3.5.3.3).

O espectro de RMN de ^1H (Figura 61) apresentou sinais indicativos da presença de um anel aromático *para*-substituído (dubletos em δ 7,81 e 6,79; $J = 8,5$ Hz). Esta informação foi confirmada pelos sinais presentes no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 62) a (δ 115,0; 121,3; 132,1 e 1612,3), os quais, aliados às informações fornecidas pelo espectro DEPT 135° (Figura 63) mostraram-se compatíveis com os de um anel aromático possuindo dois substituintes em orientação *para*, sendo um deles oxigenado (hidroxila) e o outro uma carboxila (169,2 δ). Após comparação dos valores de deslocamento químico dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C com informações da literatura (POUCHERT, 1993) pôde-se constatar que a substância tratava-se do ácido *p*-hidroxibenzóico (Tabela 17).

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD 300 MHz) e ^{13}C (CD_3OD 75 MHz) de **51**,

H e C	δ_{H}	δ_{C}	Literatura δ_{C} ^{a*}
1	-	121,3 s	121,4
2	7,81 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	132,1 <i>d</i>	131,5
3	6,79 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	115,1 <i>d</i>	114,9
4	7,81 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	162,3 s	161,5
5	6,79 (<i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	115,2 <i>d</i>	114,9
6	-	132,1 <i>d</i>	131,4
COOH	-	169,2 s	167,5

*Pouchert, (1993); a-(CDCl_3 + DMSO-d_6 , 75 MHz)

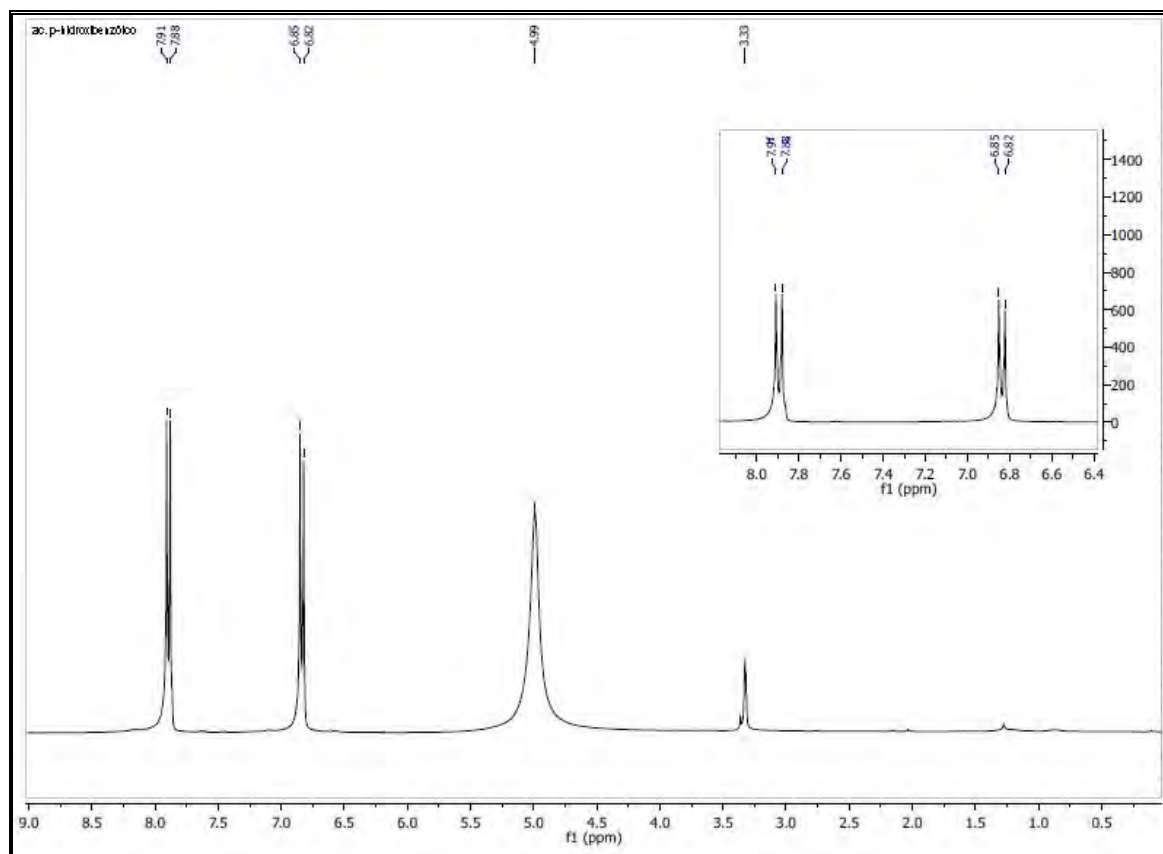


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de **51**

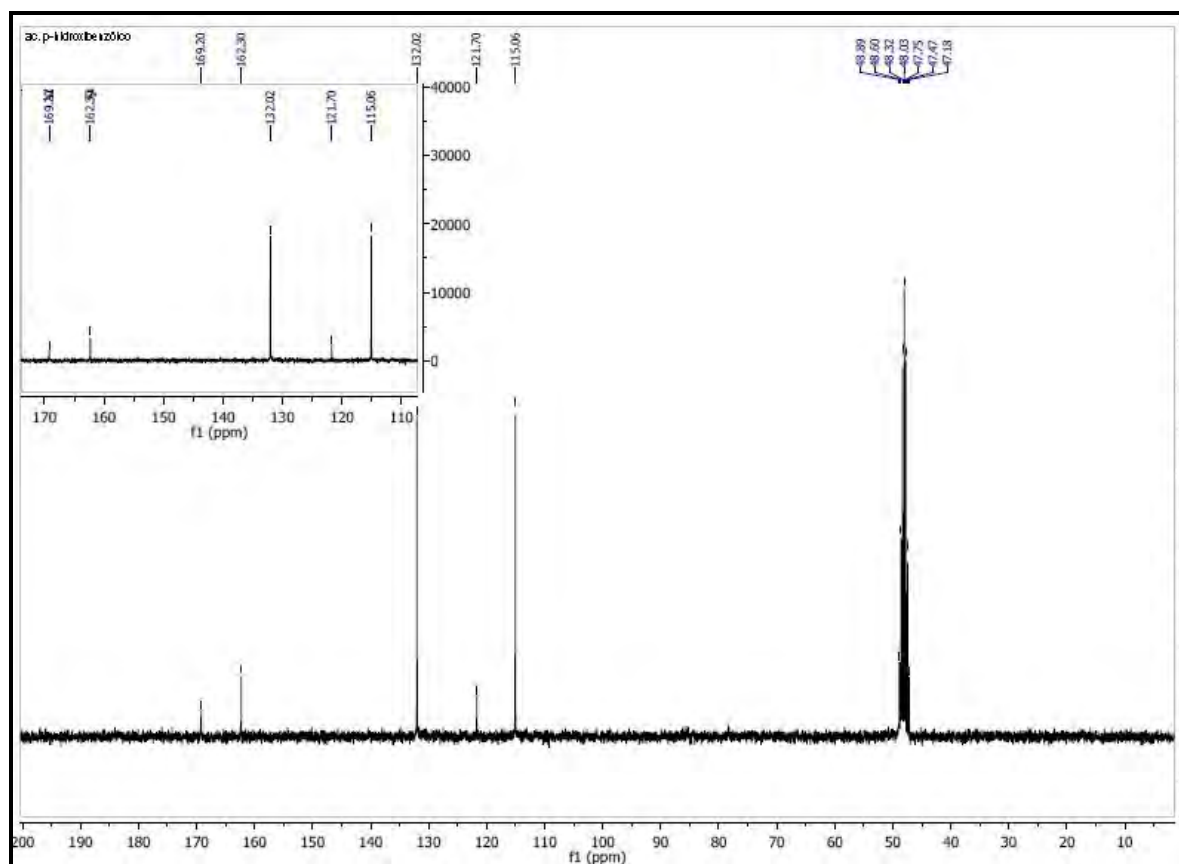


Figura 62. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de **51**

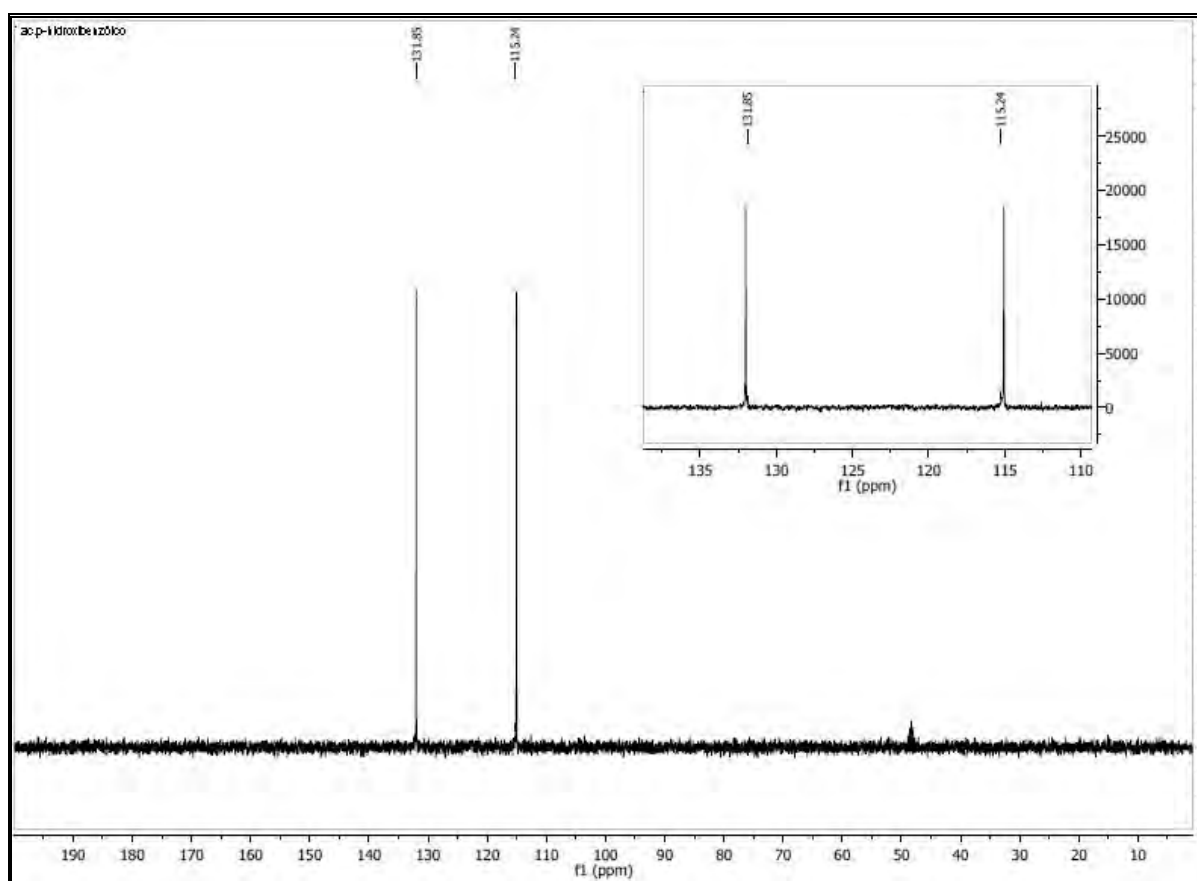
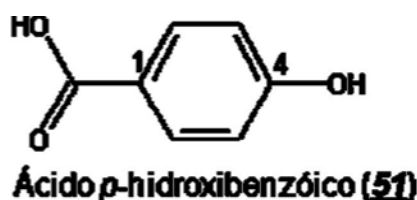


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD ,) de **51**.

4.3.2.3.5 Identificação de ácido *p*-metoxibenzóico (**52**).

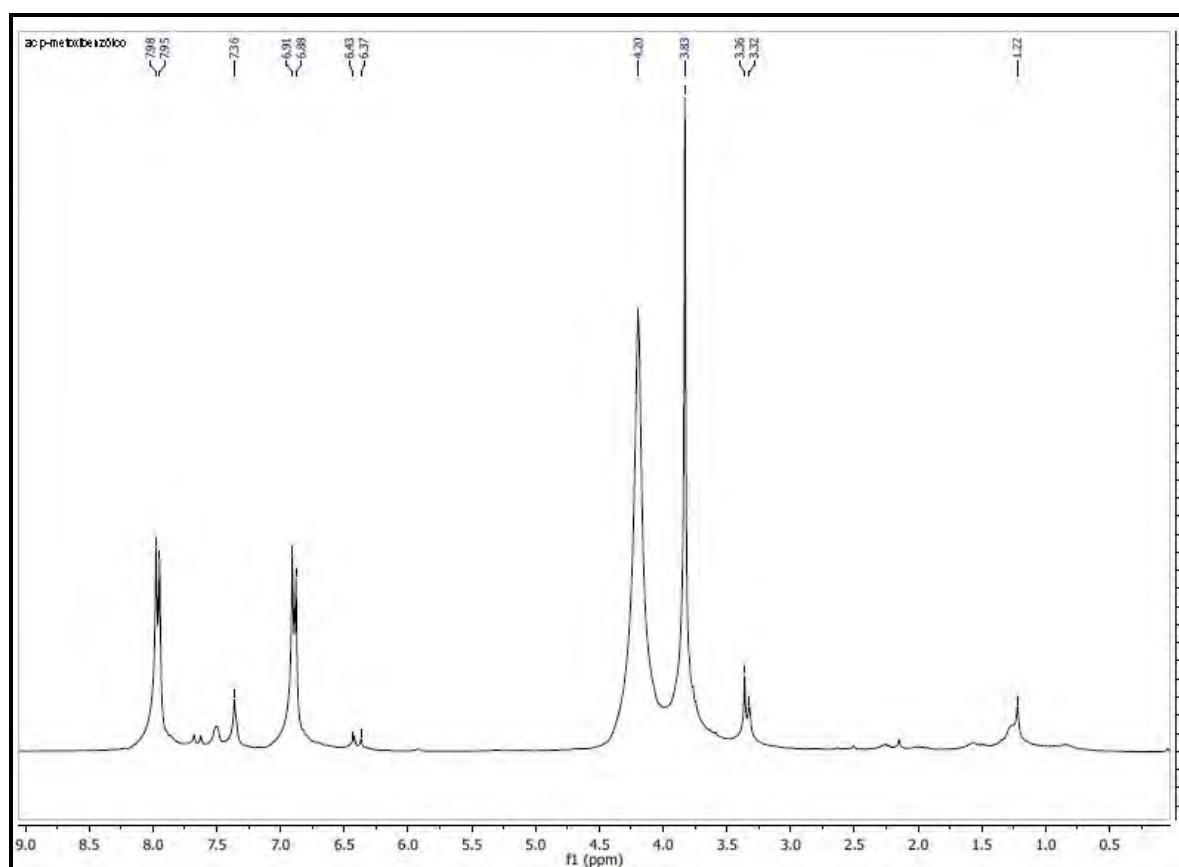


A substância representada na Figura 29 e designada por **51** apresentou-se na forma de um sólido cristalino, o qual foi obtido do extrato GF3, fração 11 (112,7 mg) (Parte exp. item 3.5.3.3).

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° (Figura 64, 65 e 66) desta substância mostraram-se bastante semelhantes aos do ácido *p*-hidroxibenzóico (Resultado e Discussão, item 4.3.4.4.), com exceção da presença de um sinal adicional referente a um grupo metoxila (δ_{H} 3,79, δ_{C} 55,1). Assim, esta substância foi identificada como o do **ácido *p*-metoxibenzóico **52****, cujos dados espectrais apresentaram uma boa correlação com os relatados na literatura (POUCHERT, 1993) [Tabela 18].

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD e H_2O 300 MHz) e ^{13}C (CD_3OD 75 MHz) de **52**

Nº	δ_{H}	δ_{C}	Literatura δ_{C} ^{a*}
1	-	122,5 s	123,0
2	7,95 (d, $J= 8,5$ Hz)	131,6 d	131,3
3	6,88 (d, $J= 8,5$ Hz)	113,6 d	113,4
4	-	163,2 s	162,7
5	7,95 (d, $J= 8,5$ Hz)	113,3 d	113,4
6	6,88 (d, $J= 8,5$ Hz)	131,6 d	131,3
8	3,79 (s)	55,1 q	55,2
COOH	-	163,2 s	167,1

*Pouchert, (1993); a =(CDCl₃ + DMSO-d₆, 75 MHz)**Figura 64.** Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD e H_2O) de **52**

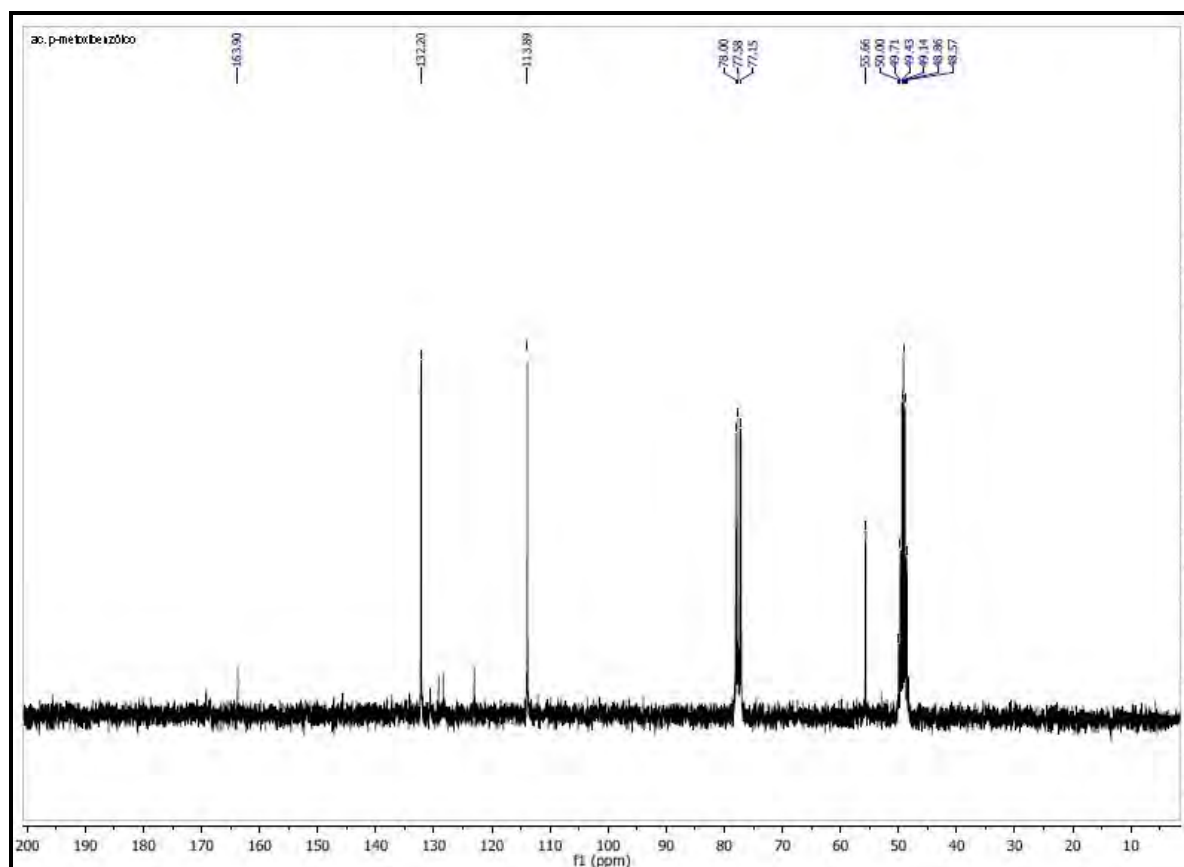


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **52**

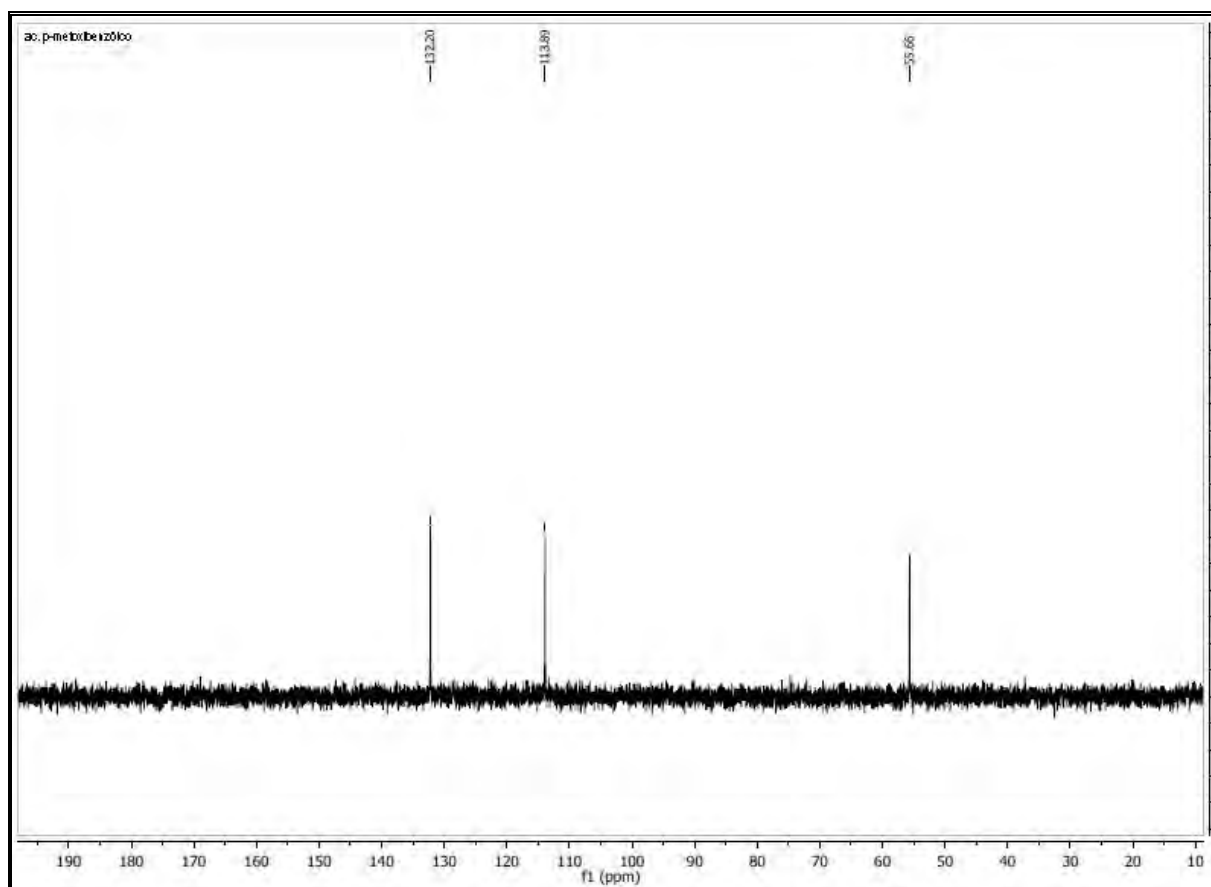


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CDCl_3) de **52**

Talal Suleiman Mahmoud

4.3.2.3.6 Identificação de ácido 3,4-dimetoxibenzóico (**53**)



A substância representada na Figura 29 e designada por **53** apresentou-se na forma de um sólido cristalino, o qual foi obtido do extrato GF3, fração 11 (112,7 mg) (Parte exp. *item 3.5.3.3*).

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° (Figura 67, 68 e 69) desta substância mostraram-se bastante semelhantes aos do ácido vanílico (Resultado e Discussão, *item 4.3.4.2*). Com exceção da presença de um sinal correspondente a dois grupos metoxila em δ 4,70. (δ_{C} 55,9 e δ_{C} 56,0). Assim, esta substância foi identificada como o do **ácido 3,4-dimetoxibenzóico 53**, cujos dados espectrais apresentaram uma boa correlação com os relatados na literatura (POUCHERT, 1993) [Tabela 19].

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 300 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 75 MHz), de **53**

Nº	δ_{H}	δ_{C}	Literatura δ_{C} ^{a*}
1	-	123,8 s	123,2
2	8,10 δ (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,7 Hz)	113,0 (CH)	112,0
3	-	149,5 s	148,2
4	-	154,1 s	152,5
5	7,54 δ (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)	111,3 <i>d</i>	110,5
6	8,20 δ (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 1,7 Hz)	124,6 <i>d</i>	123,3
OCH ₃	4,70(s)	56,1 <i>q</i>	55,6
OCH ₃	4,70 (s)	55,9 <i>q</i>)	55,5
COOH	-	169,4 s	167,3

*Pouchert, (1993); a =(CDCl₃ + DMSO-d₆, 75 MHz)

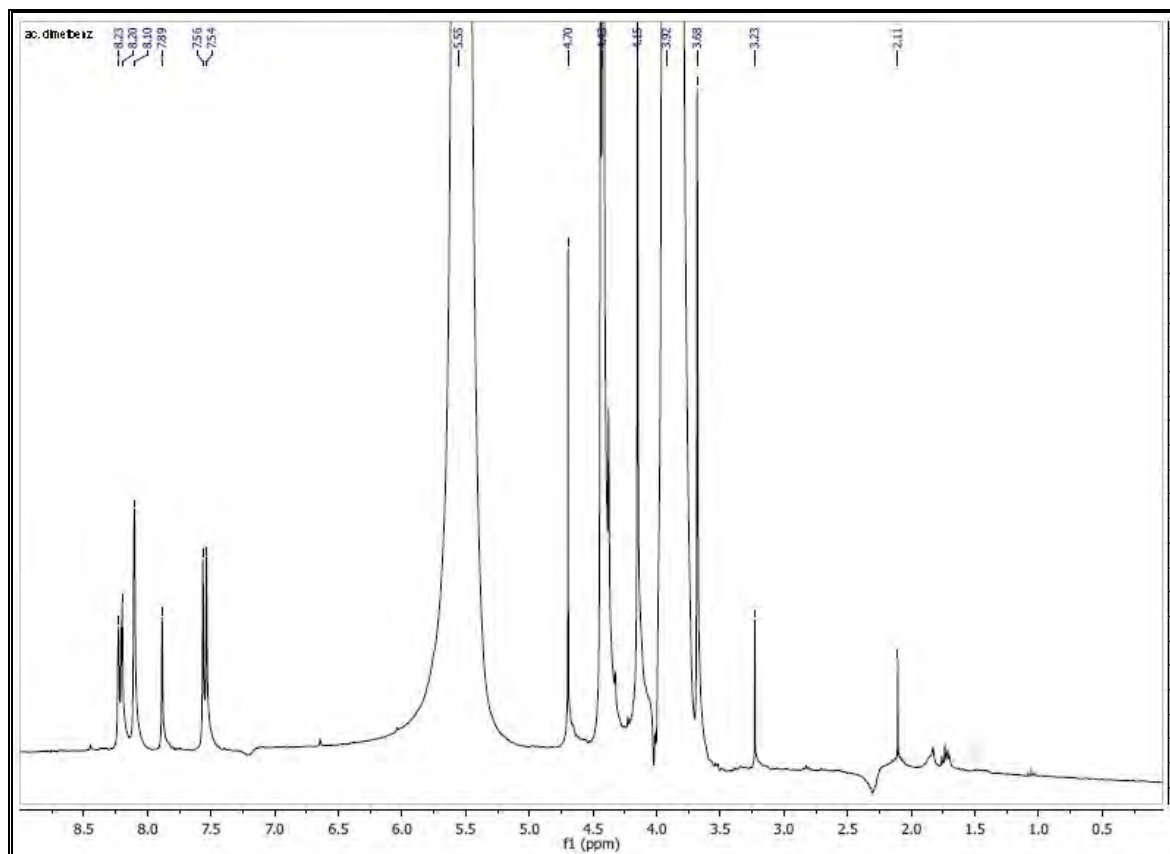


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , CDCl_3 e H_2O) de **53**

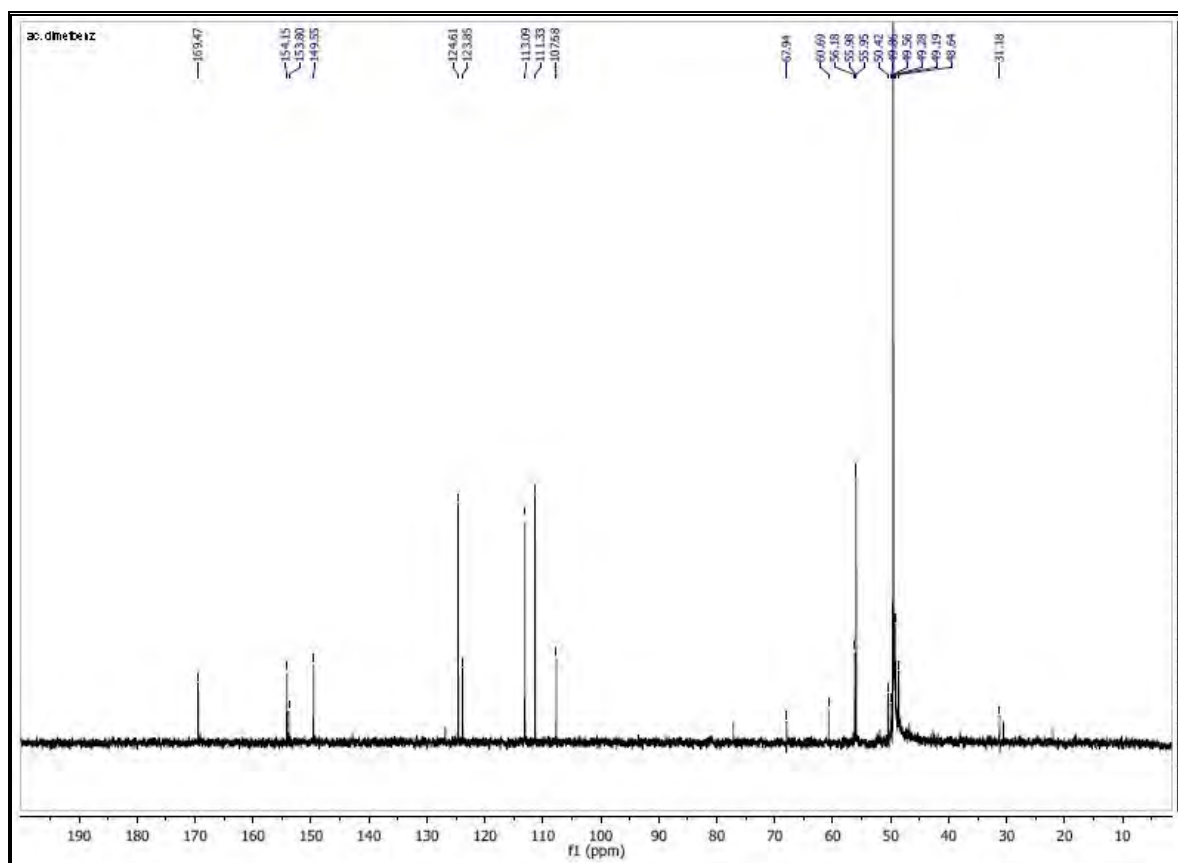


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de **53**

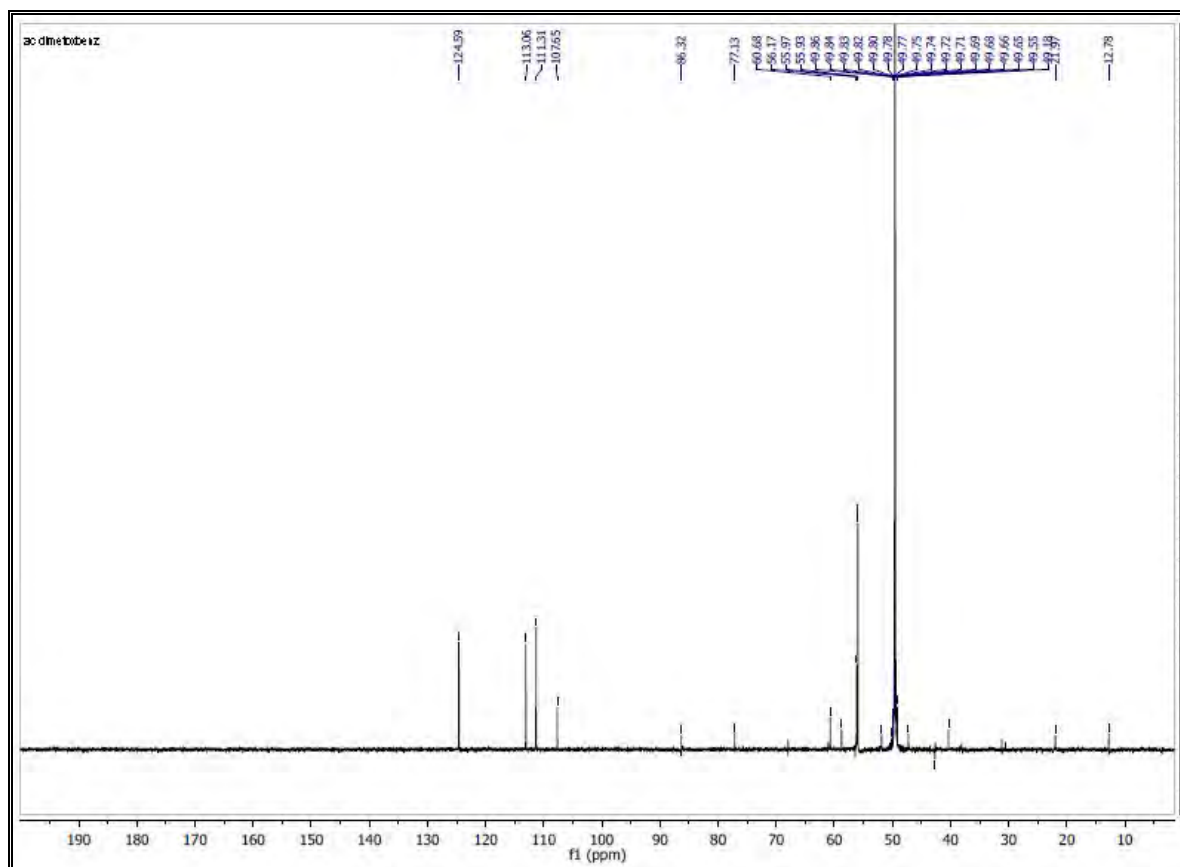


Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (75 MHz, CD_3OD) de **53**

4.3.2.4 Ácido

4.3.2.4.1 Identificação de ácido hexadecanóico (**44**) [ácido palmítico]



A substância representada na Figura 29 e designada por **44** apresentou-se na forma de um sólido amorfo, proveniente da GEF3 das subfrações 5.12-5.18 (5,1 mg) [Parte exp. 3.5.3.3], sendo esta obtida também nas frações 2.17-2.19 oriunda de GEF2 (3,2 mg) *item* 3.5.3.2.

Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 70) apresentou sinais compatíveis com os de um hidrocarboneto saturado, dentre eles: um tripleto largo em δ 2,25, um multiplete em δ 1,57, atribuíveis respectivamente a grupo metilênicos α e β ao

carbono carboxílico, apresentou ainda sinais em δ 1,27 atribuíveis a uma série de carbonos metilênicos e sinal a δ 0,90 característica de metila terminal.

Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 71 e 72), foram evidenciados sinais atribuíveis a uma cadeia longa de ácidos saturados seis sinais foram facilmente reconhecidos em δ 176,4 atribuído ao carbono carbonílico, δ 33,6; 28,8; 31,6; 22,3 e 13,0 atribuídos respectivamente aos carbonos C-2, C-3 e aos carbonos $\omega\text{C-3}$, $\omega\text{C-2}$ e $\omega\text{C-1}$. Os sinais restantes na região δ 28,9-29,3 se apresentaram como um "envelope de metileno".

Considerando-se estas informações contidas no espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 20), a feição apresentada pelo espectro de RMN de ^1H e dados obtidos no espectro de massas, que exibiu o pico do íon molecular a m/z 256 (Figura 73), compatível com fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$, concluiu-se que a substância **44** tratava-se de um ácido saturado, identificado como **ácido hexadecanóico**.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) e ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) de **44**

H e C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	176,4 s
2	2,5 (t, $J = 7,4$ Hz)	36,6 t
3	1,7 m	28,8 t
4-13	1,27 s	28,9-29,3 t
14 ω 3	1,27 s	31,6 t
15 ω 2	1,27 s	22,3 t
16 ω 1	0,9 (t, $J = 6,8$ Hz)	13,1 q

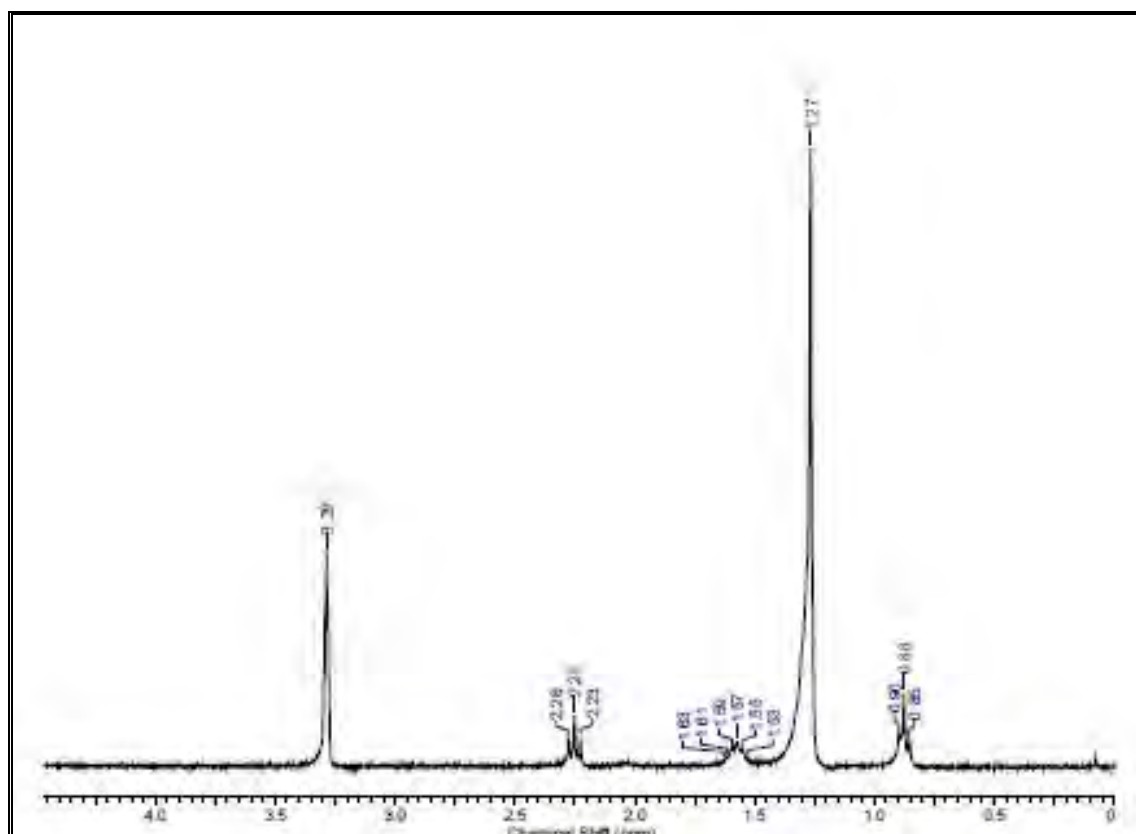


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) de **44**.

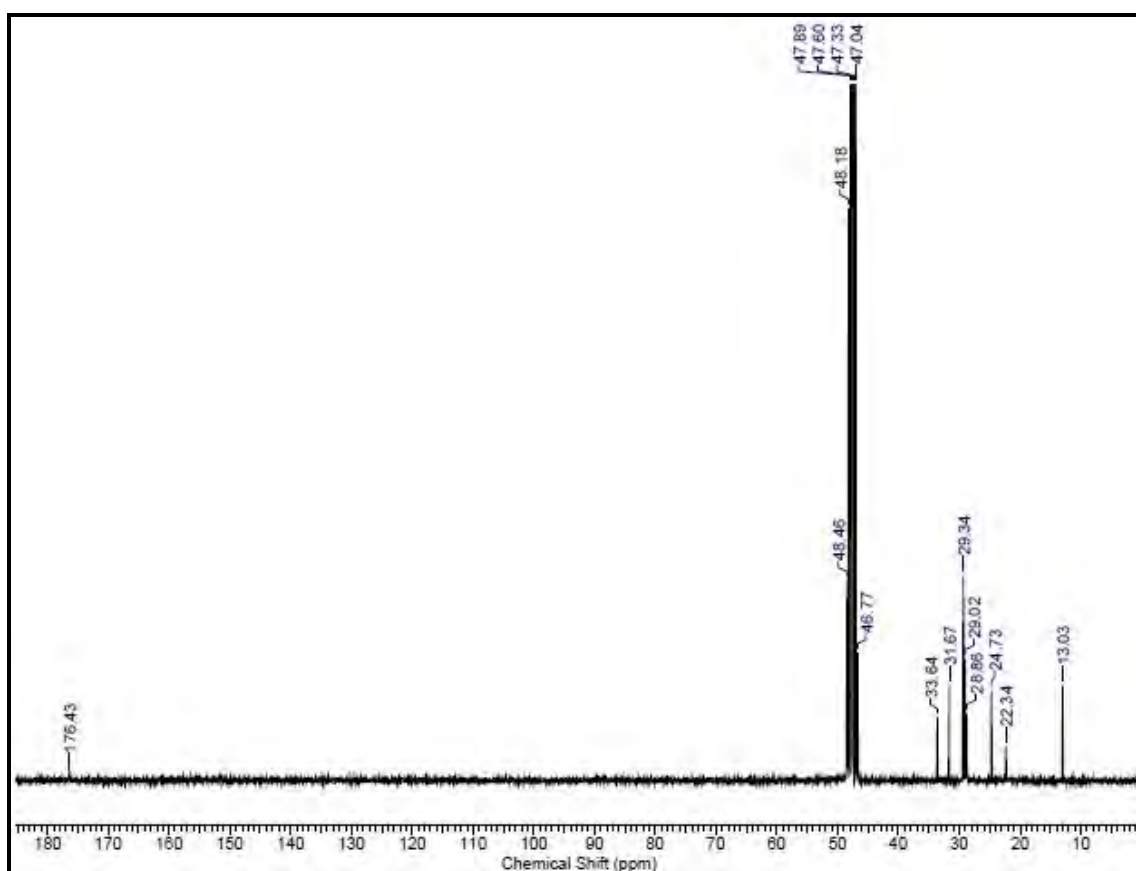


Figura 71. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de **44**.

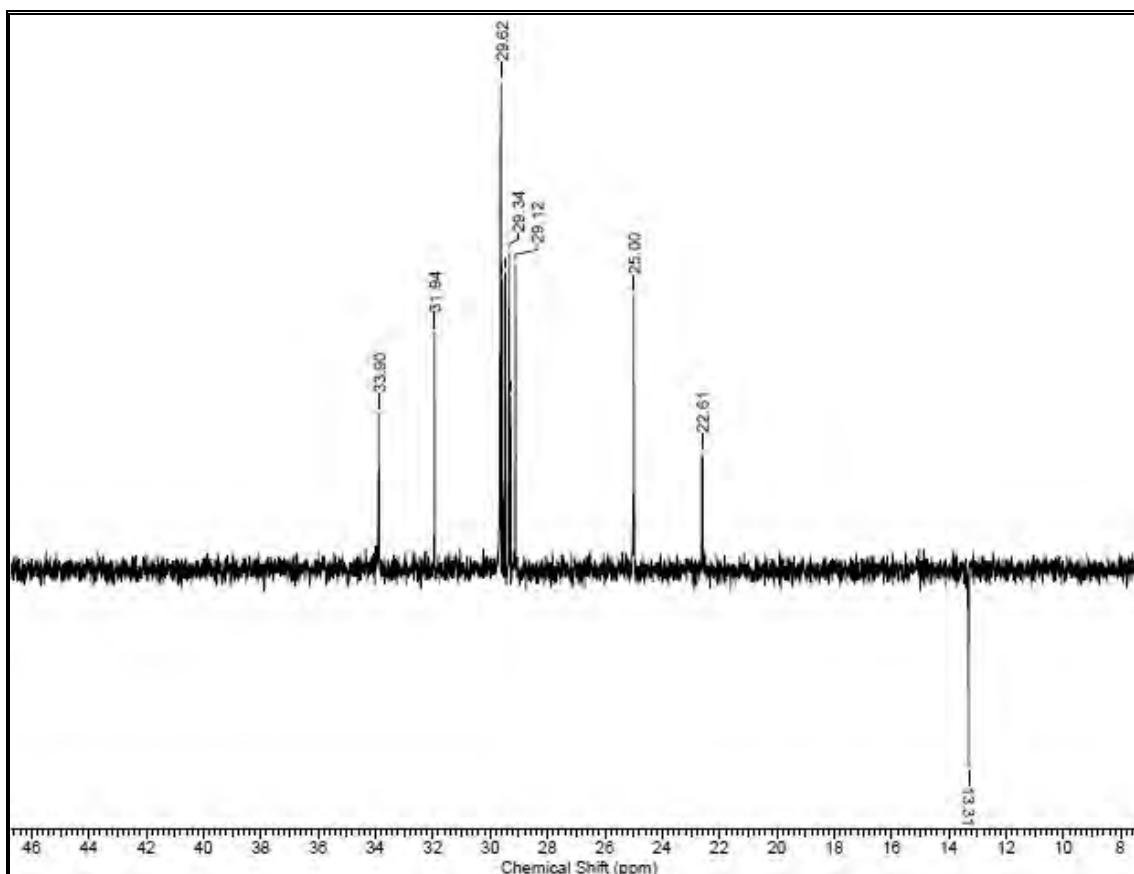


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CD_3OD) de **44**.

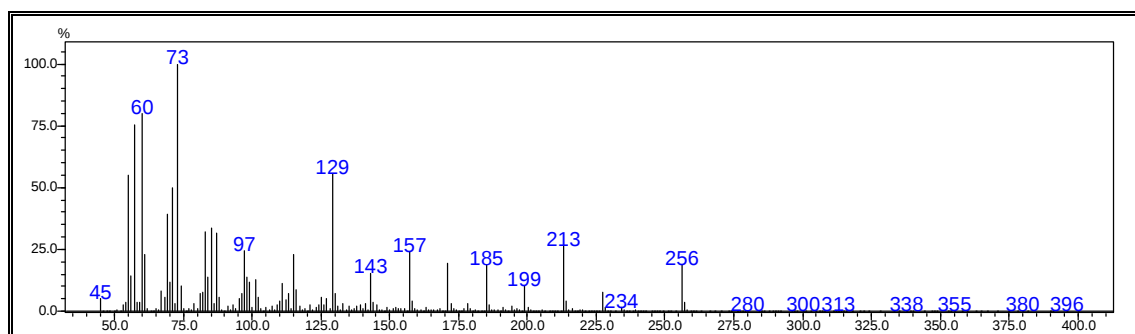
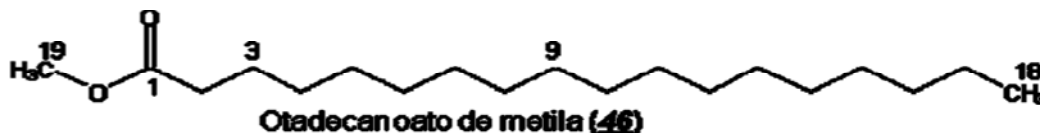


Figura 73. Fragmentograma experimental da substância **44**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.5 Ésteres

4.3.2.5.1 Identificação de octadecanoato de metila (**46**) [estearato de metila]



A substância representada na Figura 29 e designadas por **46**, proveniente do extrato GA2 fração 9 (4,7 mg) [Parte exp. *item* 3.5.4.1].

Seu espectro de RMN de ^1H (Figura 74) apresentou deslocamentos químicos na região de hidrogênios alifáticos. Observou-se a presença de tripleto em δ 0,86 (*t*, $J = 6,8$ Hz) atribuído a presença de metila terminal. Na região entre δ 1,19 a 1,32 observou-se um singleto largo (*sl*) atribuível a ligações $-\text{CH}_2$ o sinal em δ 3,64 (*s*) correspondentes a hidrogênio ligado a carbono oxigenado. O tripleto em δ 2,28 indica a presença de CH_2 ligado a carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 75 e 76) confirmou a presença de sinais de carbonos alílicos (δ 20,0 a 39,3) e a presença de sinal em δ 51,4 característicos de carbono oxigenado. Esses dados sugeriram ser a molécula um éster de cadeia longa. Para a confirmação, foi realizada análise CG-EM (Figura 77), o qual junto com os demais dados obtidos (Tabela 21), confirmaram que a substância **46** tratava-se do **octadecanoato de metila**.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) e ^{13}C (CDCl_3 , 125MHz) de a **46**

H e C	δ_{H}	δ_{C}
1 (COO)	-	174,4 <i>s</i>)
2	2,28 (<i>t</i> , 7,4 Hz)	34,0 <i>t</i>
3	-	24,9 <i>t</i>
4-15	1,23 <i>sl</i>	29,1-29,9 <i>t</i>
16	1,08 <i>s</i>	32,0 <i>t</i>
17	1,57 <i>sl</i>	22,5 <i>t</i>
18	0,86 (<i>t</i> , 6,8 Hz)	14,1 <i>q</i>
CH_3	3,64 <i>s</i>	51,4 <i>q</i>

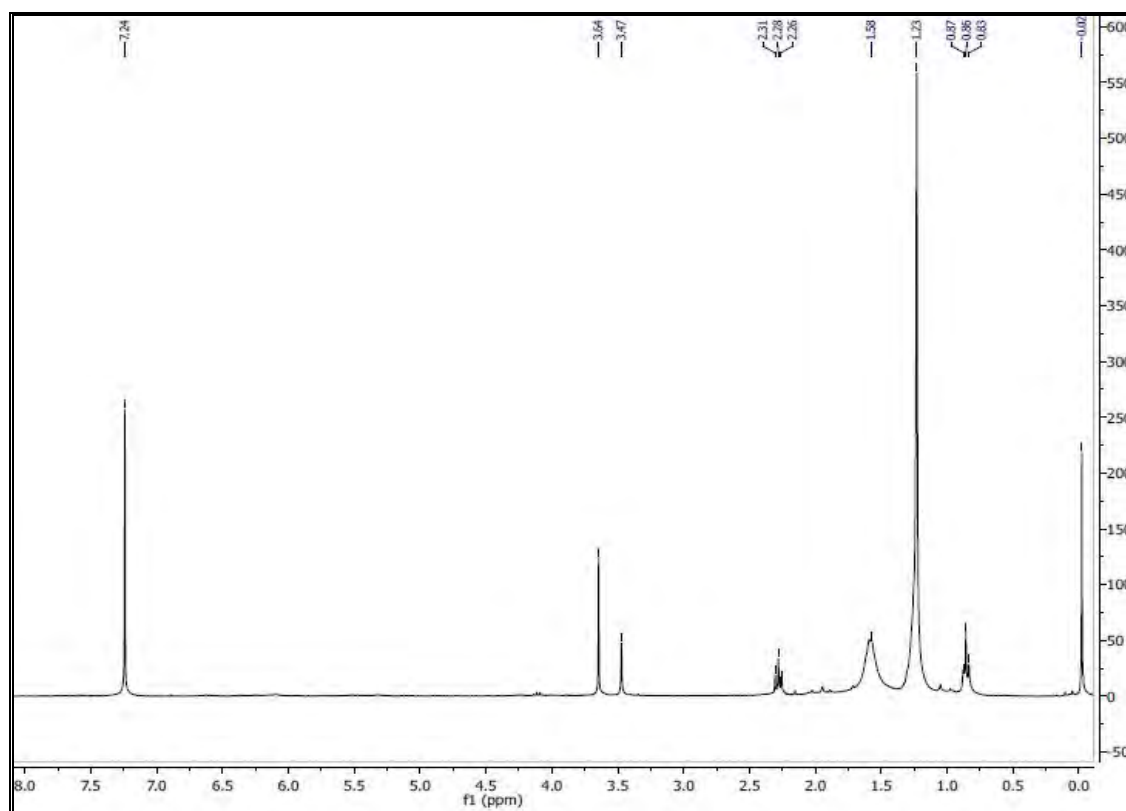


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **46**.

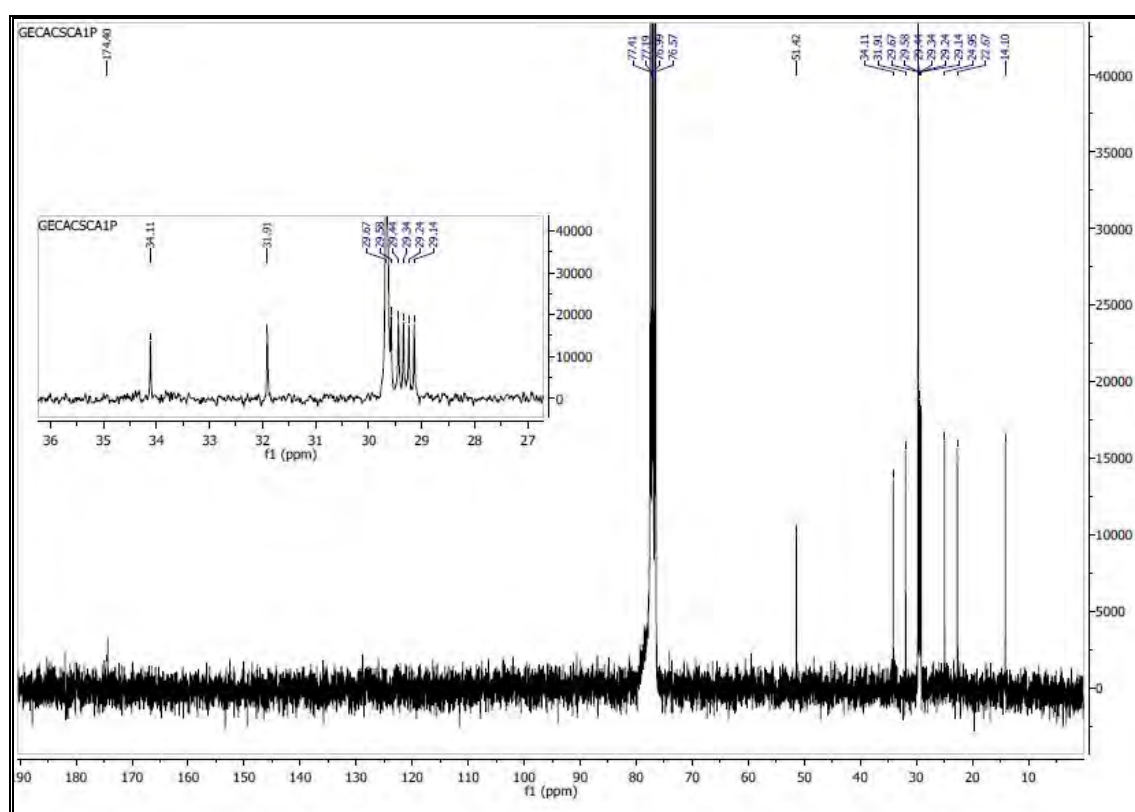


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **46**.

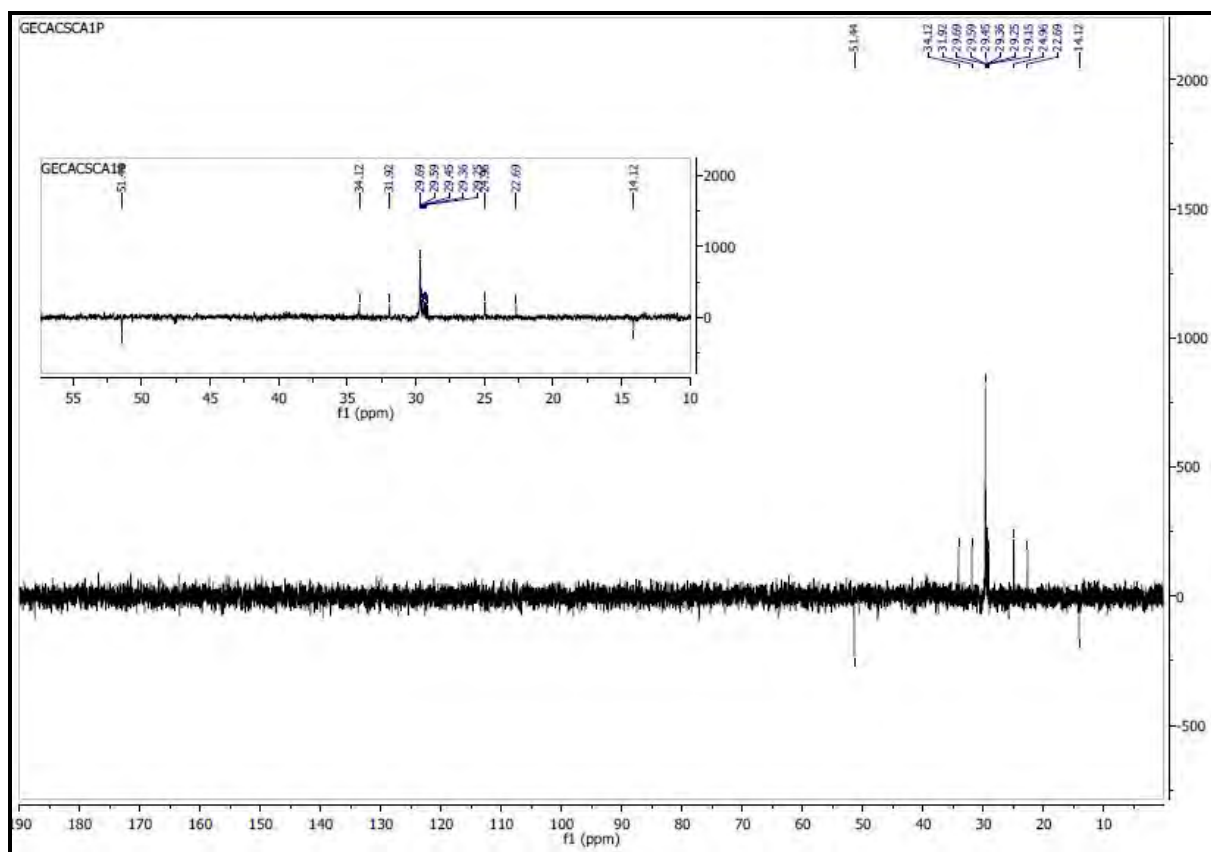


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de **46**.

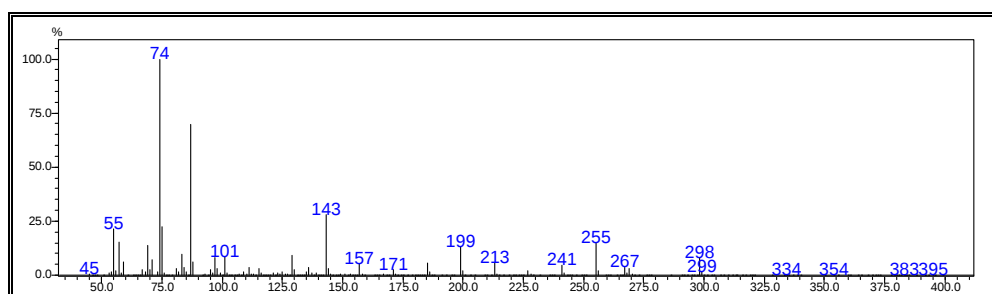
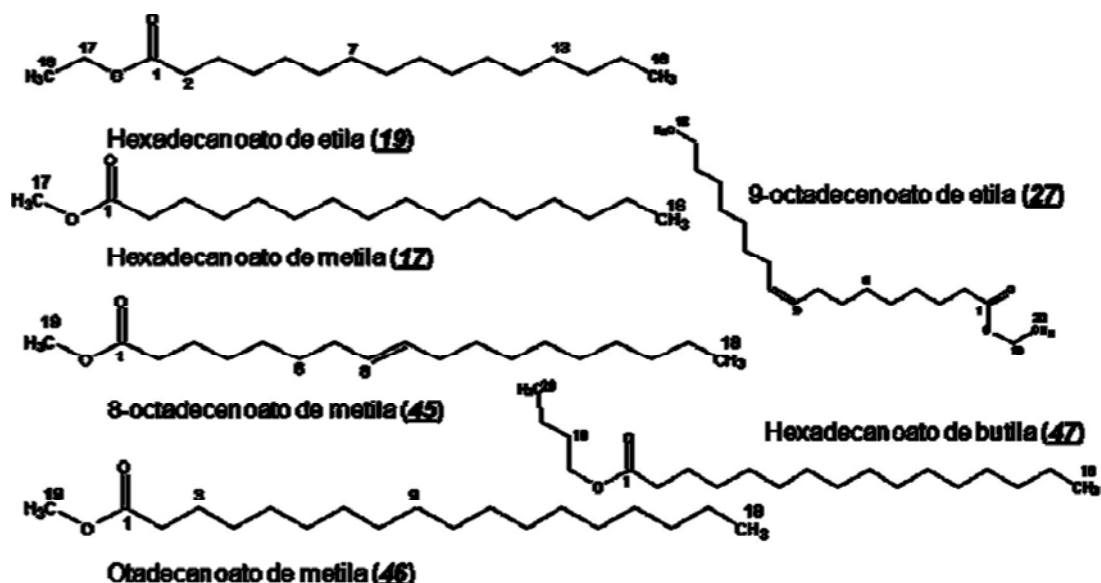


Figura 77. Fragmentograma experimental da substância **46**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.5.2 Identificação de ésteres **17**, **19**, **45**, **46**, **27** e **47**

As substâncias representadas na Figura 29 e designadas por **17**, **19**, **45**, **46**, **27** e **47**, proveniente do extrato GF2 subfrações 4.13-4.18 (6,4 mg) [Parte exp. item 3.5.3.1].



O espectro de RMN de ^1H (Figura 78) apresentou deslocamentos químicos na região de hidrogênios alifáticos. Observou-se a presença de tripleto em δ 0,96 atribuído a presença de metila terminal. Na região entre δ 1,28 e 2,25 observaram-se vários multipletos que podem ser atribuídos a ligações $-\text{CH}_2$ e multipletos em δ 5,33 e 5,09 devido à presença de duas ligações duplas, sinal em δ 4,70 correspondentes a hidrogênio ligado a carbono oxigenado. Os tripletos em δ 2,26 e 2,80 indicam a presença de CH_2 ligado a carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 79) confirmou a presença de sinais de carbonos olefínicos (δ 128,23; 128,35; 130,0 e 132,0) e alílicos (δ 20,0 a 39,3) e a presença de sinais em δ 51,5 e 55,0 característicos de carbono oxigenado. Esses dados sugeriram serem as moléculas ésteres de ácido graxo de cadeia longa. Para a confirmação, optou-se por fazer análise em CG-EM (Figura 80). A fração apresentou 6 picos os quais corresponderam as substâncias listadas na tabela 22.

Tabela 22. Ésteres (**17**, **19**, **45**, **46**, **27** e **47**) identificados por CG-EM

Nº	Componente	TR	ÍR	MM
17	hexadecanoato de metila	11,360	87,00-143,00	270
19	Hexadecanoato de etila	12,235	101,00-70,00	284
45	8-Octadecenoato de metila	13,728	69,00-83,00	296
46	Octadecanoato de metila	14,078	87,00-143,00	298
27	9-octadecenoato de etila	14,685	69,00-83,00	310
47	hexadecanoato butila	14,918	57,00-257,00	312

TR= Tempo de retenção, IR= Íons de referencia, MM= Massa molecular

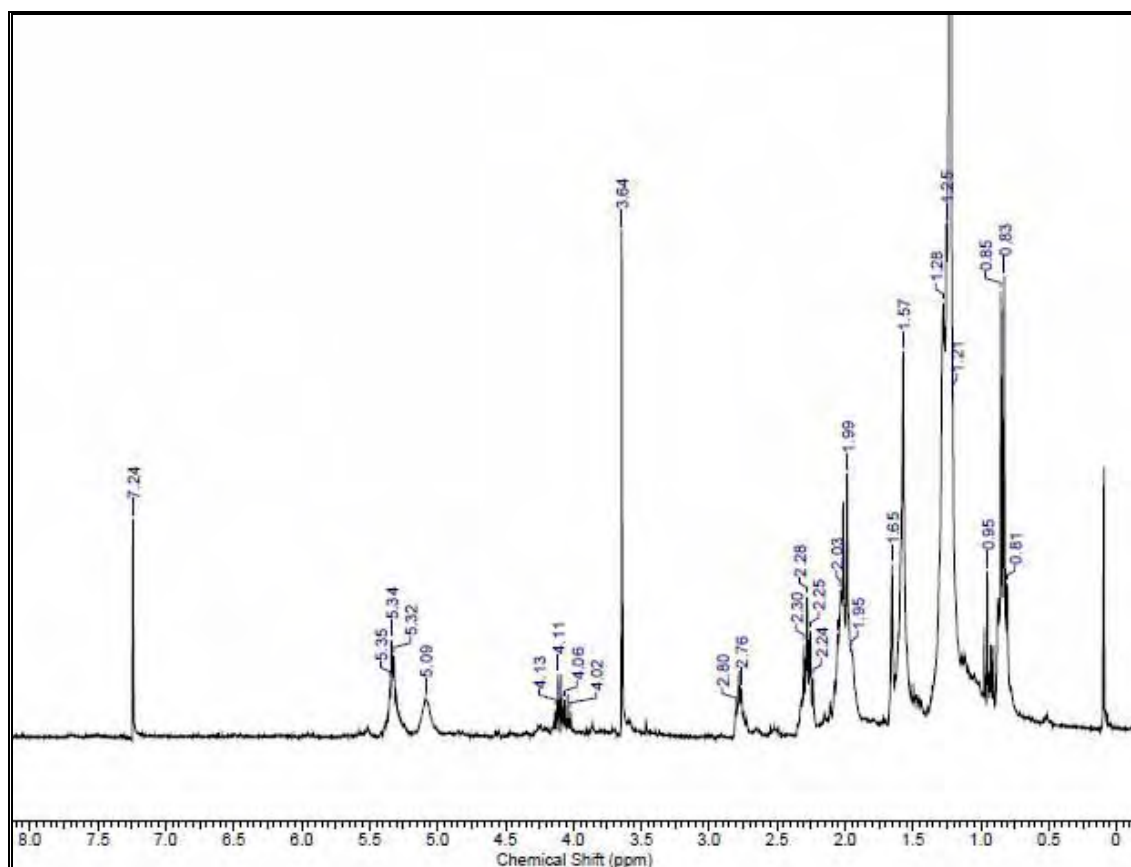


Figura 78. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) dos ésteres 17, 19, 45, 46, 27 e 47.

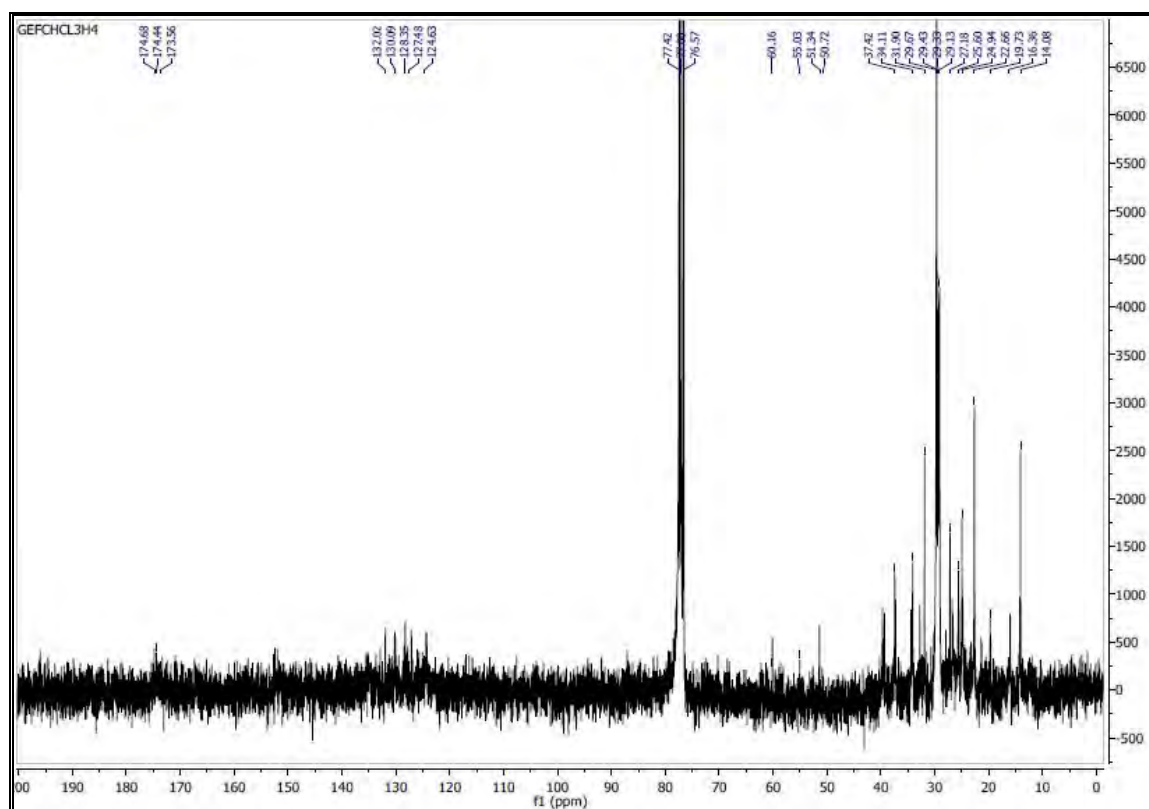


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) dos ésteres 17, 19, 45, 46, 27 e 47.

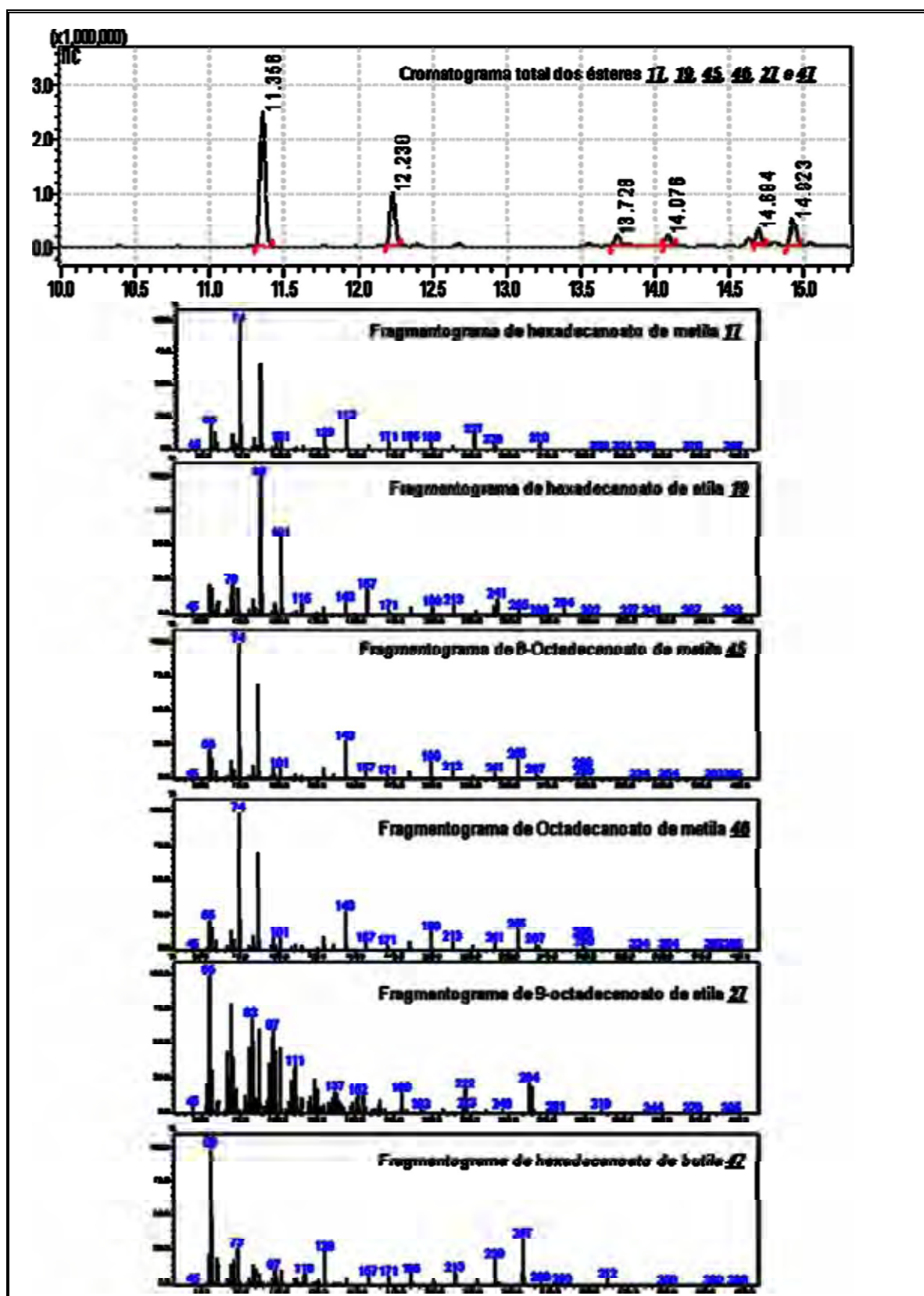


Figura 80. Cromatograma total e fragmentogramas experimentais das substâncias 17, 19, 45, 46, 27 e 47.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 50-320 °C a 3 °C/min e, depois, 320 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 240 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:50.

4.3.2.6 Alcalóides

4.3.2.6.1 Identificação de Pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (uracila) **48**



A substância representada na Figura 29 e designada por **48**, isolada do extrato GF4 (5,2 mg) [Parte exp. 3.5.3.4], sendo esta identificada também nos extratos GA4, GS4 e GR4 (Parte exp. *itens* 3.5.4.1, 3.5.4.2 e 3.5.4.3).

O espectro de RMN de ^1H de **48** (Figura 81) apresentou sinais em δ 5,44 (1H, *d*, $J = 7,7$ Hz) e δ 7,37 (1H, *d*, $J = 7,7$ Hz) atribuíveis a hidrogênios olefinicos e sinal em δ 10,97; atribuível a hidrogênio ligado a nitrogênio.

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 82 e 83) apresentaram quatro sinais sendo dois comumente atribuídos a carbonilas δ 152,2 (C-2) e 165,0 (C-4) e dois sinais atribuíveis a carbonos metínicos δ 100,9 (C-5) e 142,8 (C-6).

Através da obtenção do experimento de HMQC (Figura 84) que confirmou as correlações das atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos C-6 (142,8), C-5 (100,9) respectivamente com os hidrogênios em 7,37 δ . 5,44 δ e as correlações obtidas através do experimento HMBC (Figura 85) que são apresentados na Tabela 23 e os dados obtidos do espectro de massas (Figura 86), que exibiu o pico do íon molecular a m/z 112, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$, concluiu-se que a substância **48** tratava-se de uma base pirimidínica, identificado como **Pirimidina-2,4(1H,3H)-diona** (uracila).

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6 , CD_3OD) e ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) de **48**

Nº	(δH)	(δC)
1-NH	10,97 <i>s/l</i>	-
2-C=O	-	152,2
3-NH	10,97 <i>s/l</i>	-
4-C=O	-	165,0 <i>s</i>
5	5,44 (1H, <i>d</i> , $J = 7,7$ Hz)	100,9 <i>d</i>
6	7,37 (1H, <i>d</i> , $J = 7,7$ Hz)	142,8 <i>d</i>

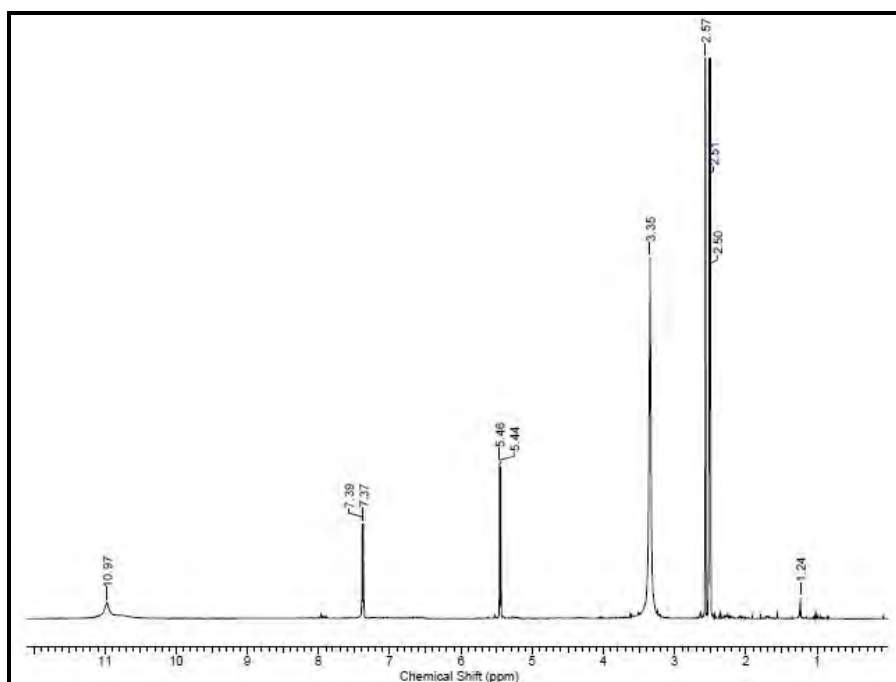


Figura 81. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{CD}_3\text{OD}$) de **48**.

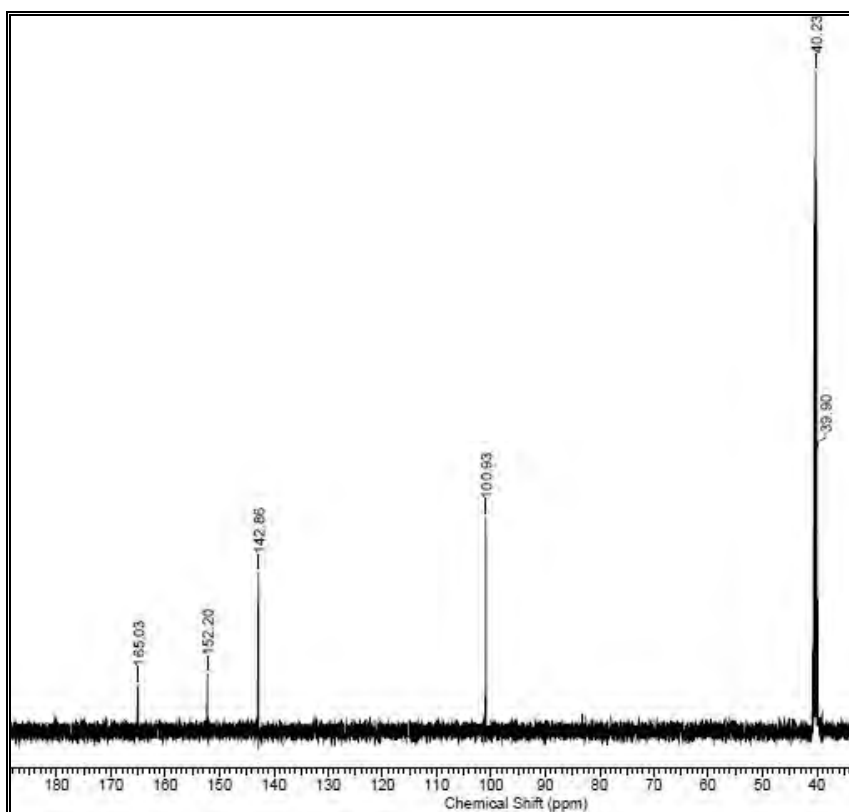


Figura 82. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) de **48**.

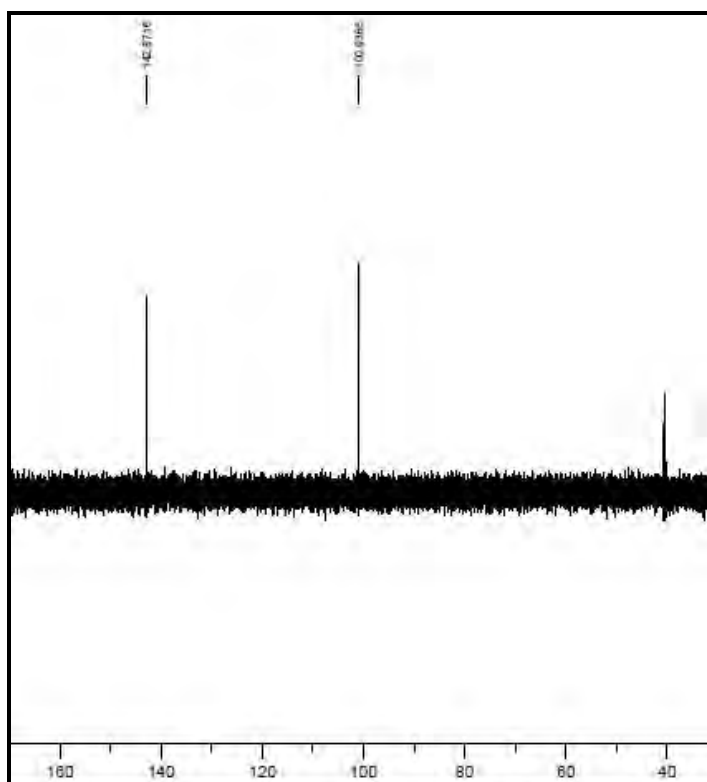


Figura 83. Espectro de RMN de ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, DMSO-d₆) de **48**.

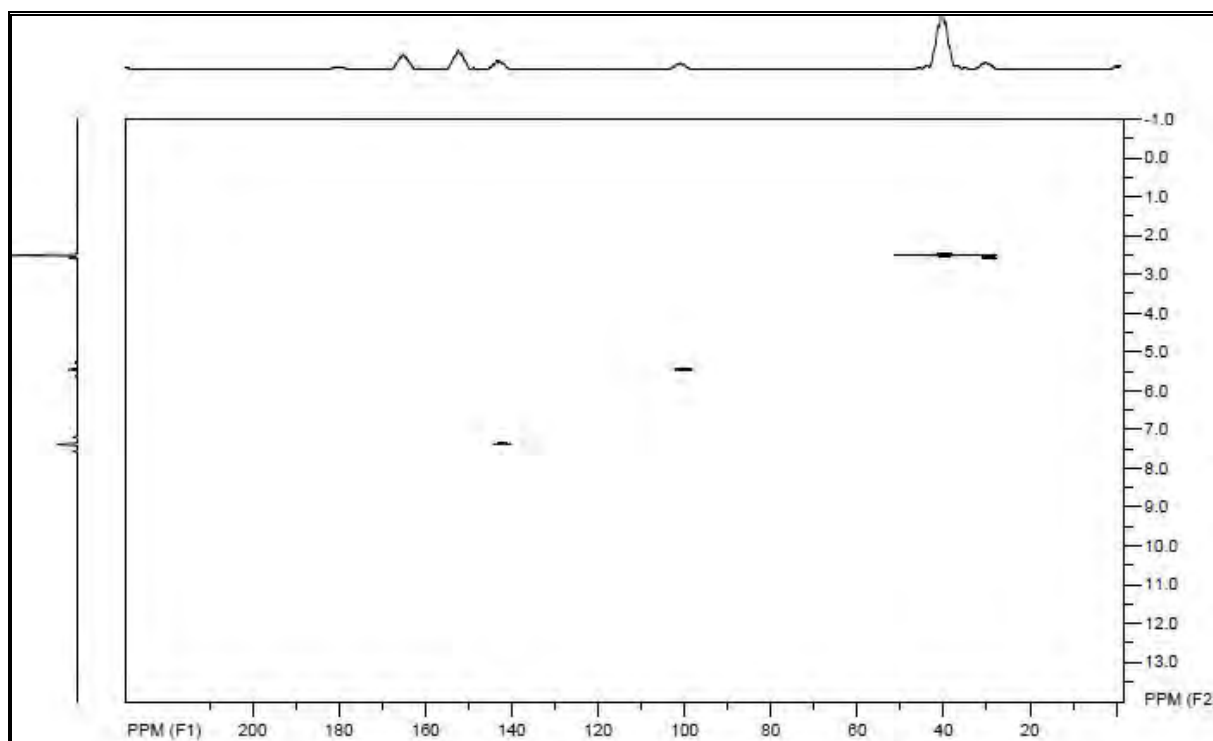


Figura 84. Espectro de RMN de HMQC (500 e 125 MHz, CDCl₃) de **48**.

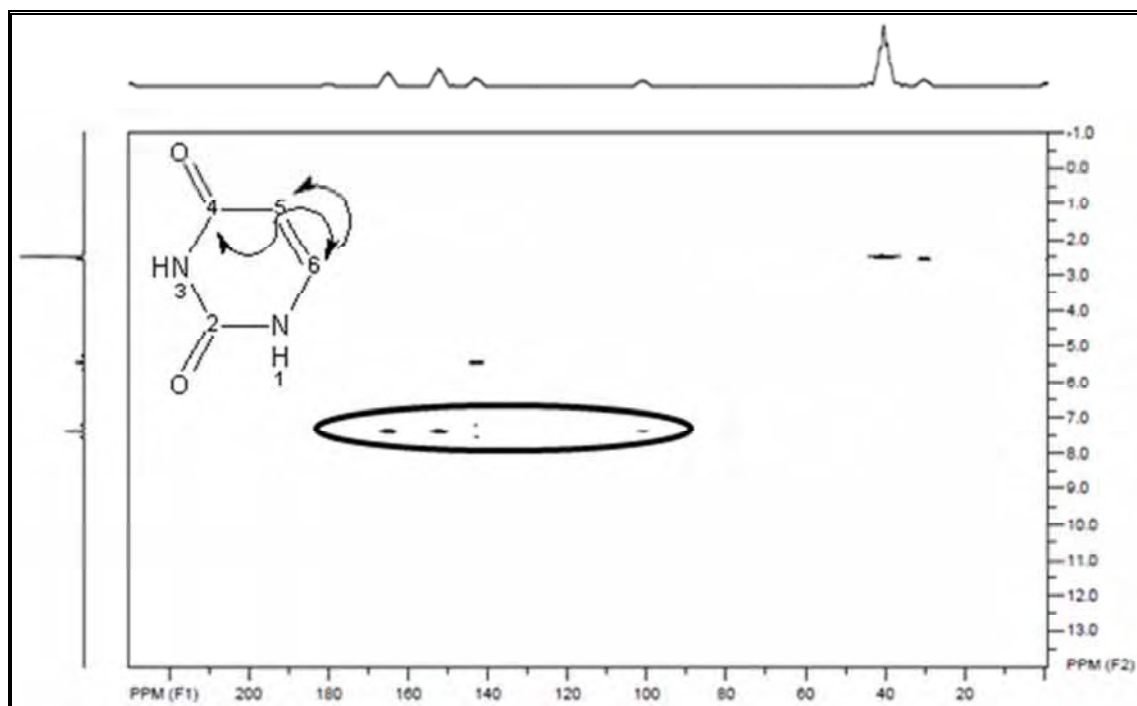


Figura 85. Espectro de RMN de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de **48**.

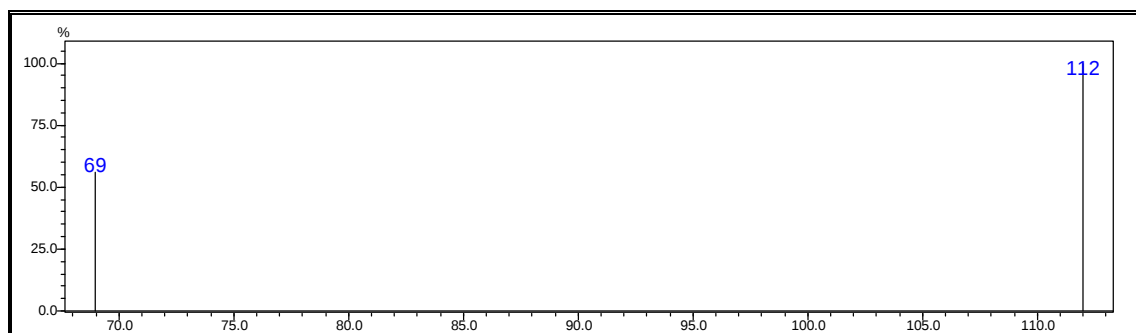
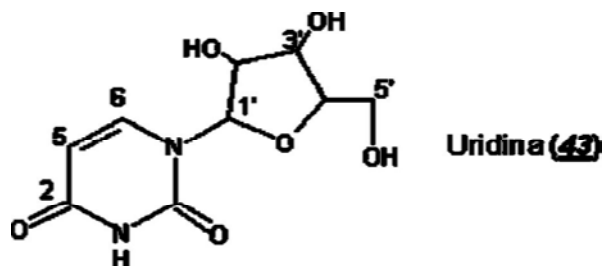


Figura 86. Fragmentograma experimental da substância **48**.

* Condições: coluna capilar de DB-1; gás de arraste Hélio (1 mL/min); programa: 100-295 °C a 5 °C/min e, depois, 295 °C a 10 °C/min; temperatura do injetor: 280 °C; modo de injeção: 0,1 µL, split 1:25.

4.3.2.6.2 Identificação de uridina (**43**)

A substância representada na Figura 29 e designada por **43**, proveniente do extrato GF4 (7,7 mg) [Parte exp. 3.5.3.5.], sendo esta identificada também no extrato GA4 (Parte exp. 3.5.4.1).



Os sinais do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C de **43** (Figura 87 e 88) mostraram boa correlação com os observados para a base pirimidínica **48**, com exceção dos sinais em δ 3,5 (*dd*, $J = 3,0$ e $6,0$ Hz), δ 3,8 (*dd*, $J = 3,0$ e $6,0$ Hz), δ 3,90 (*m*), δ 4,18 (*m*) e δ 5,7 ($J = 5,4$ Hz) do espectro de RMN de ^1H que revelou a presença de hidrogênios presentes em açúcares (δ 3,50 – 5,70) os quais apresentaram correlações no espectro HMQC (Figura 89) com os sinais a δ 60,8 (CH_2), 84,5 (CH), 69,8 (CH), 73,5 (CH) e 87,6 (CH) respectivamente. O carbono δ 87,69 (CH) apresentou correlação no espectro HMBC (Figura 90) com o hidrogênio δ 7,37, sugeriram a ligação existente do resíduo de açúcar presente na estrutura.

Através da obtenção do experimento de HMQC que confirmou as correlações das atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos C-5' (δ 60,8), C-4' (δ 84,8) respectivamente com os hidrogênios em δ 3,86 e 3,50 e demais correlações que são apresentadas na Tabela 24, concluiu-se que a substância **43** tratava-se de uma base pirimidínica ligada a um açúcar ribofuranose identificado como **Uridina**.

Tabela 24. Dados de RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125MHz) e RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD) de **43**

HMQC			HMBC	
H e C	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1-NH	-	-		
2-C=O	150,7 s	-		H-6
3-NH	-	-		
4-C=O	163,1 s	-		H-6
5	101,7 d	5,65 (1H, d, J = 7,8 Hz)	H-6	
6	140,7 d	7,90 (1H, d, J = 7,8 Hz)	H-5	H-1'
1'	87,6 d	5,7 (J = 5,4 Hz)	H-2'	
2'	73,5 d	4,18 (m)	H-3' - H-3'	
3'	69,8 d	3,9 (m)	H-2' - H-4'	
4'	84,85 d	3,8 (dd, J = 3,0 e 6,0 Hz)	H-5'	H-2'
5'	60,8 t	3,5 (dd, J = 3,0 e 6,0 Hz)	H-4'	

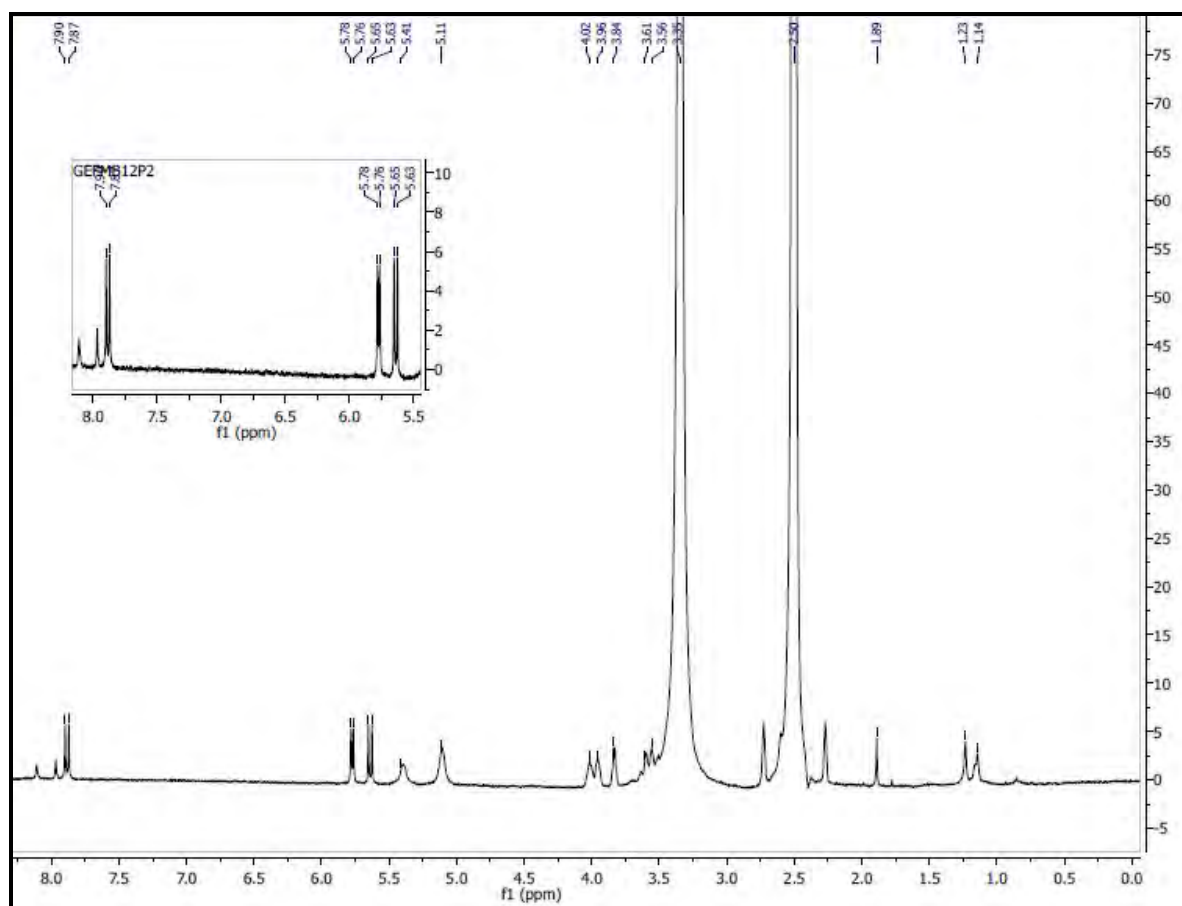


Figura 87. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-d}_6/\text{CD}_3\text{OD}$) de **48**.

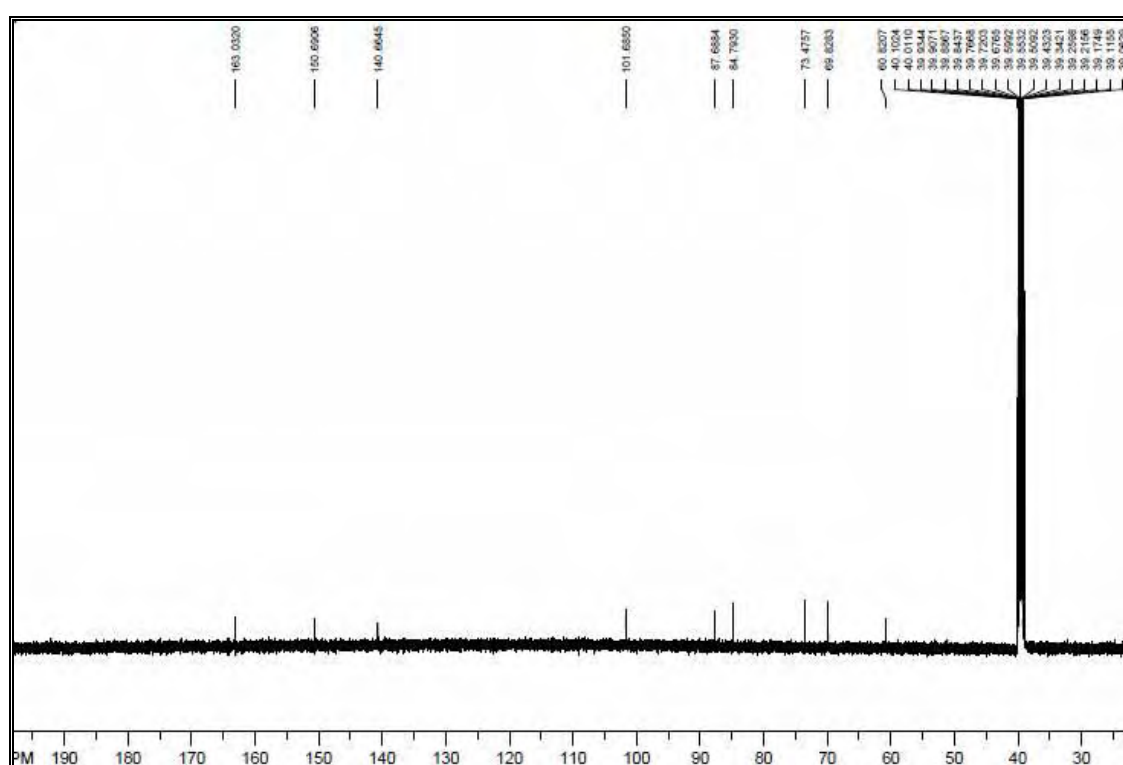


Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) de **48**.

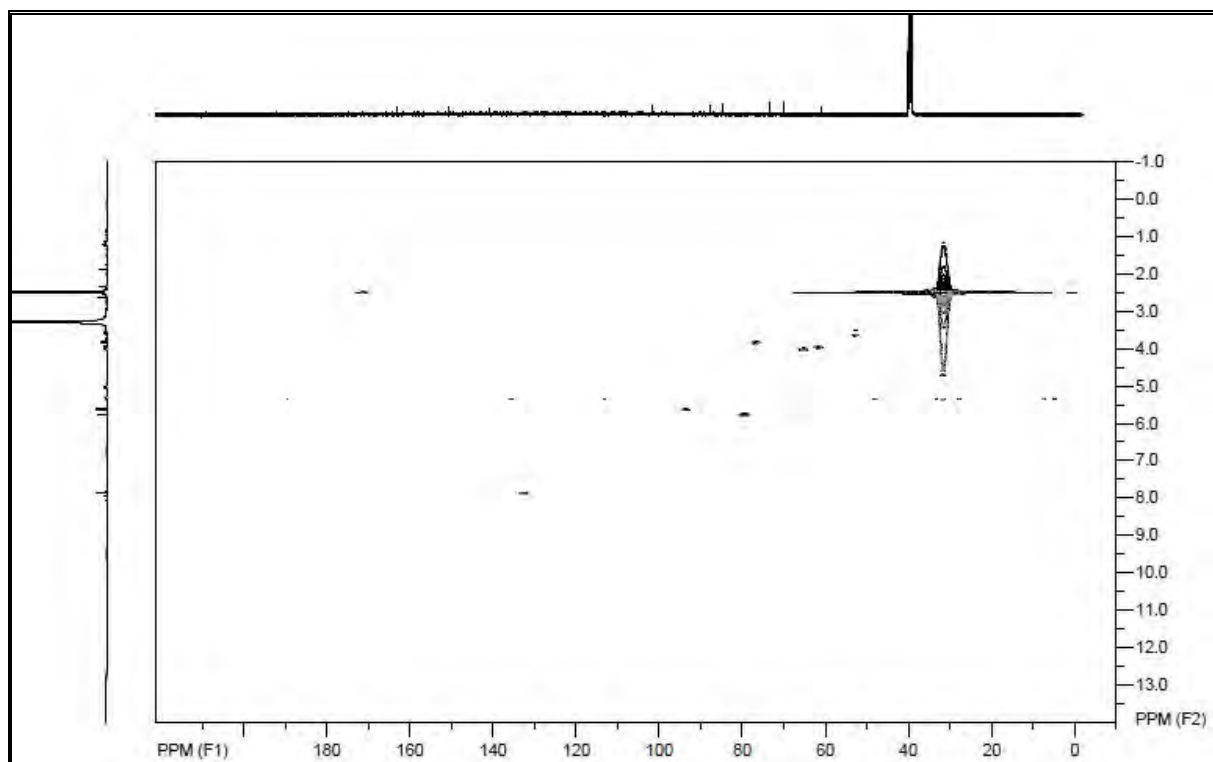


Figura 89. Espectro de RMN de HMQC (500 e 125 MHz, DMSO-d_6) de **48**.

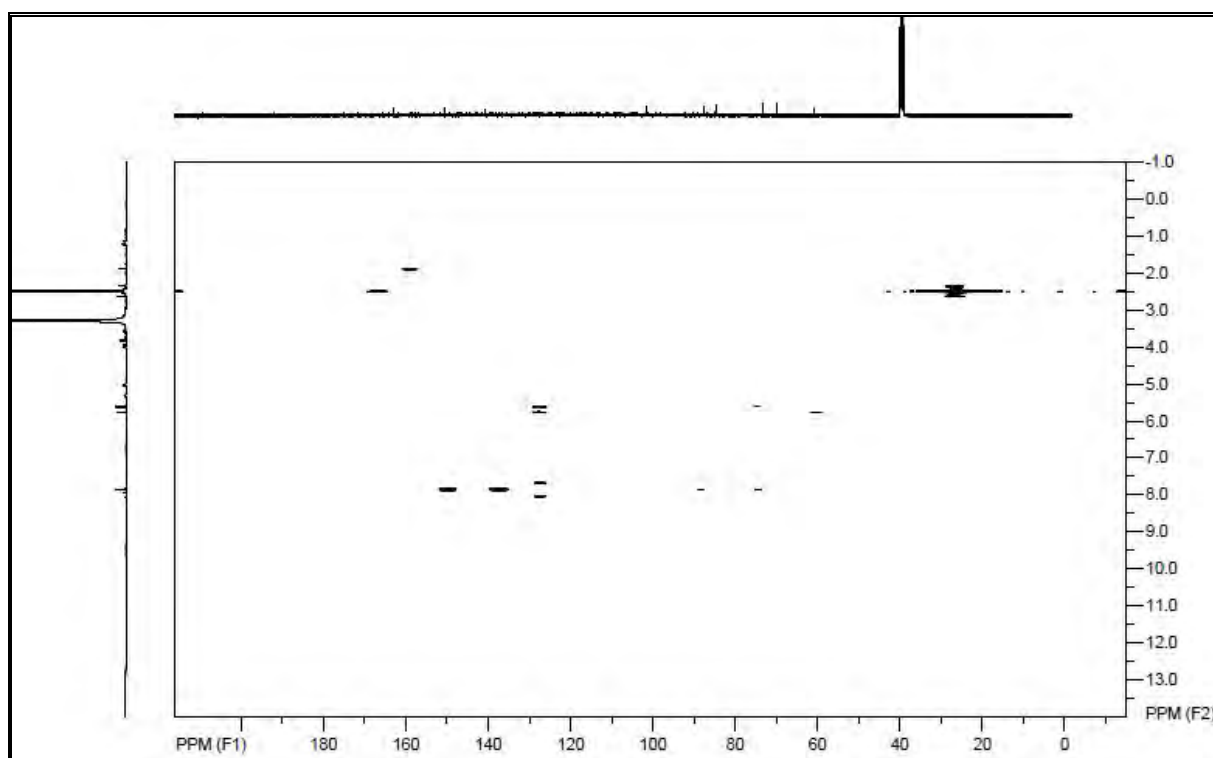


Figura 90. Espectro de RMN de HMBC (500 e 125 MHz, DMSO-d_6) de **48**.

4.4 Análises da substância inorgânica

A substância inorgânica que foi isolada em todos os órgãos estudados da espécie *G. elegans*, nos extratos, clorofórmico, metanólicos e aquoso. A massa média da substância correspondeu a 11% da massa total do extrato obtido, demonstrando ser ela a substância majoritária contida na espécie analisada.

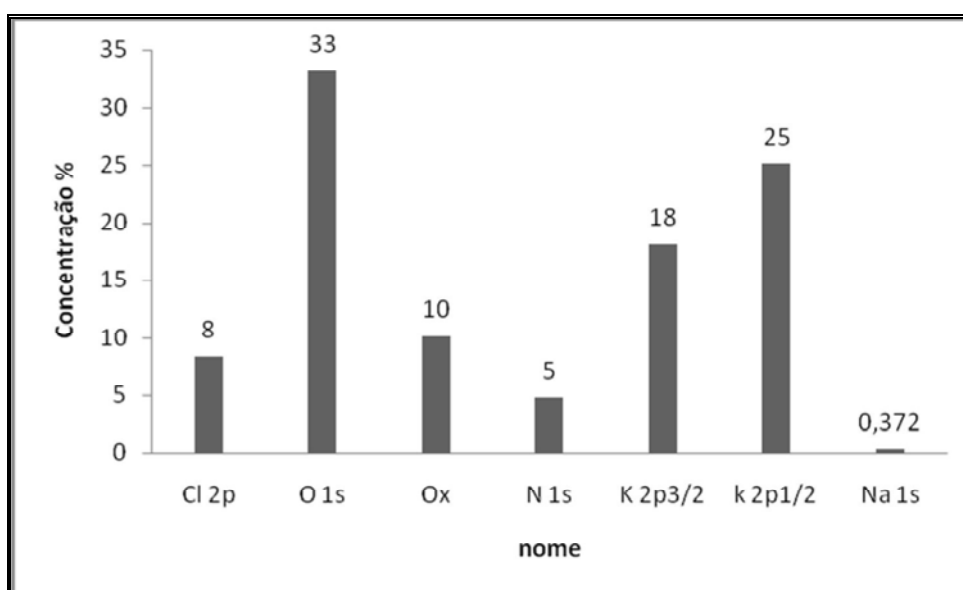
A Figura 92 mostra o espectro de XPS total, com a descrição dos possíveis átomos dos compostos pertencentes à parte isolada da planta. Pode-se observar a presença de Na, K, N, O e Cl. O espectro de alta resolução da região de K 2p apresentou dois picos correspondentes ao 2p_{1/2} e 2p_{3/2}, com energias de ligação (BE) de 295,6 eV e 293,1 eV, respectivamente, com Δ eV de 2,5 eV (Figura 93). Na região do O 1s a desconvolução do espectro apresentou dois picos com BE de 532,4 eV e 530,7 eV (Figura 94). Para o N 1s o espectro de XPS da amostra apresentou um sinal com BE em 407,3 eV (Figura 95). Na região do Cl 2p a amostra mostrou um pico com BE de 199,8 eV (Figura 96).

De acordo com os espectros de alta resolução de XPS observou-se a presença de alguns compostos inorgânicos (Tabela 25, Figura 91) na amostra. Os sinais de BE de K 2p_{3/2} em 293,1 eV, N 1s em 407,2 eV e O 1s em 532,4 eV são característicos de KNO₃ (NEFEDOV et al., 1997), o que confirmou a presença deste sal na amostra.

O espectro de Cl 2p com BE de 199,8 eV, juntamente com o de K 2p caracterizou a presença de KCl (NEFEDOV et al., 1997). Outro fator relevante é a presença de um sinal de O 1s (desconvolução) em torno de 530,7 eV, podendo estar relacionado com a presença de diferentes tipos de óxidos de potássio (K₂O, K₂O₂, KO_x) [LAMONTAGNE et al., 1995].

Tabela 25. Resultados das concentrações atômicas obtidas da análise do sal inorgânico obtido dos órgãos vegetais de *G. elegans*

Nome	% Concentração
Cl 2p	8,342
O 1s	33,168
Ox	10,166
N 1s	4,761
K 2p3/2	18,100
k 2p1/2	25,090
Na 1s	0,372

**Figura 91.** Resultados das concentrações atômicas obtidas da análise do sal inorgânico obtido de órgãos de *G. elegans*.

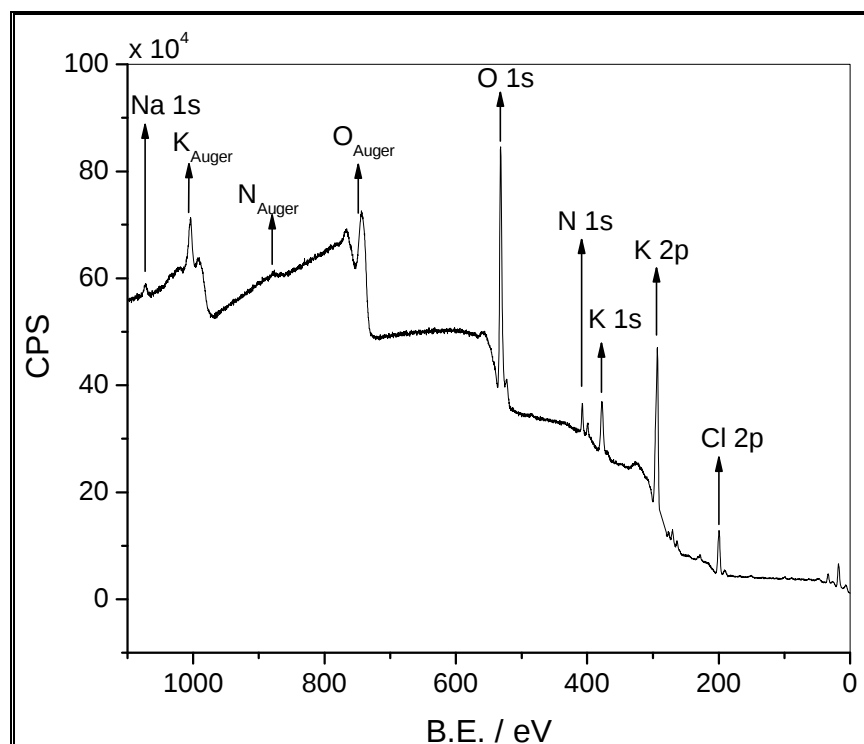


Figura 92. Espectro total de XPS para a amostra do sal inorgânico obtido de órgãos de *G. elegans*.

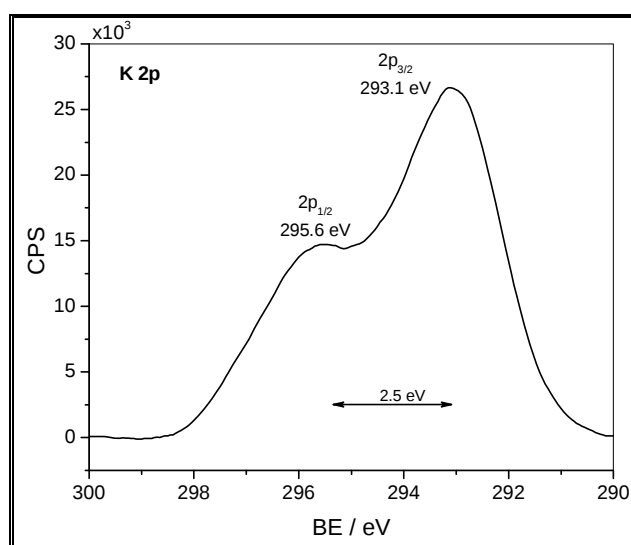


Figura 93. Espectro de XPS de alta resolução para K 2p do sal inorgânico obtido de órgãos de *G. elegans*.

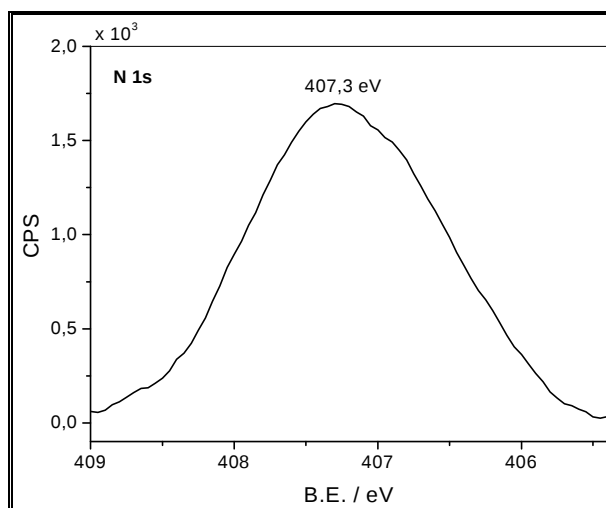


Figura 94. Espectro de XPS de alta resolução para N 1s do sal inorgânico obtido de órgãos de *G. elegans*.

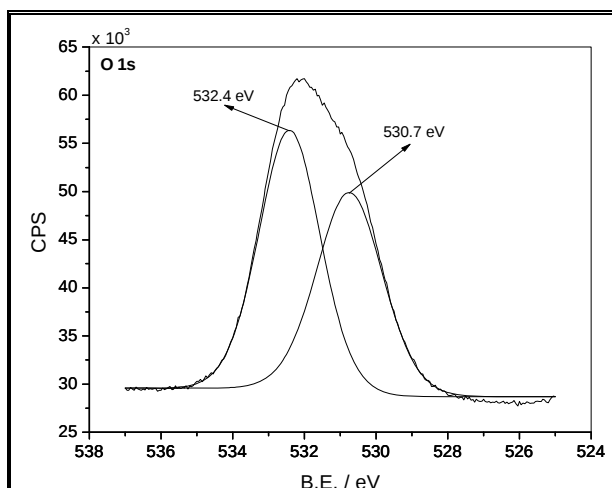


Figura 95. Espectro de XPS em alta resolução para O 1s do sal inorgânico obtido de órgãos de *G. elegans*.

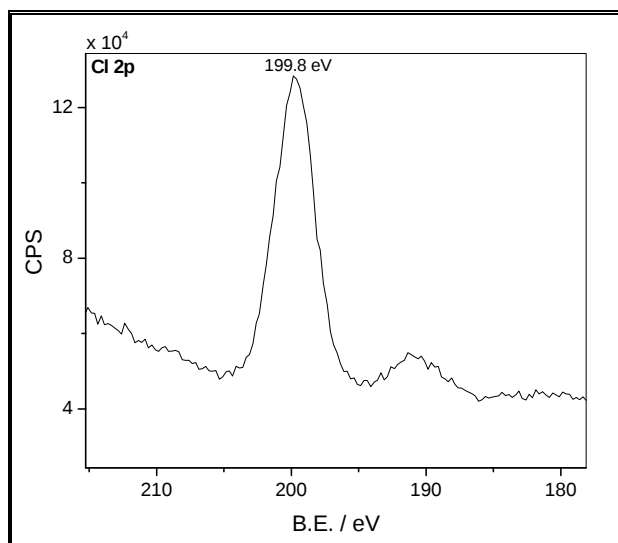


Figura 96. Espectro de XPS em alta resolução para Cl 2p do sal inorgânico obtido de órgãos de *G. elegans*.

4.5 Avaliações dos perfis cromatográficos da espécie *G. elegans*

A utilização da CLAE-AFD é uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo caracterizar simultaneamente as substâncias constituintes ou seus principais grupos estruturais (SELMA et al., 2002). Na análise por CLAE buscou-se verificar comparativamente a composição química dos extratos vegetais.

Após avaliação de diferentes condições cromatográficas para realização do experimento por CLAE-AFD, foi selecionada uma condição para os extratos clorofórmicos e uma condição para os extratos metanólicos e aquosos (as condições utilizadas nas cromatografias estão descritas na parte experimental *item 3.6*. Perfis cromatográficos). Nas Figuras 97, 98 e 99 encontram-se os cromatogramas obtidos dos extratos dos órgãos da espécie de *G. elegans* (Col1), sendo eles GF2, GF3, GF4, GS2, GS3, GS4, GA2, GA3, GA4, GR2, GR3, GR4.

A Figura 97 mostra o perfil cromatográfico e perfil espectroscópico por RMN de ^1H dos extratos GF2, GS2, GA2 e GR2 a partir da análise dos sinais apresentados no cromatograma análise de seus espectros de RMN de ^1H foi possível verificar que a composição química nos quatro órgãos da planta são bastante semelhante, sendo notada a diferença apenas entre as concentrações dos sinais, como pode ser verificado no cromatograma de GA2 o qual apresenta maior intensidade de sinais na região das substâncias menos polares (20 - 25 min) de acordo com as condições de análise.

Foram observadas através de espectros de UV as seguintes substâncias: jatrofona **41**; ($t_r = 14,4$ min), sendo esta substância presente no extrato GF2, ftalatos ($t_r = 22,9$ e $23,5$ min), a substância com $t_r = 23,5$ corresponde a substância di-(2-etil)-hexil ftalato **42** cujos sinais apresentam-se em todos o cromatogramas destes extratos foram observados muitos outros sinais, caracterizando extratos ricos em várias substâncias.

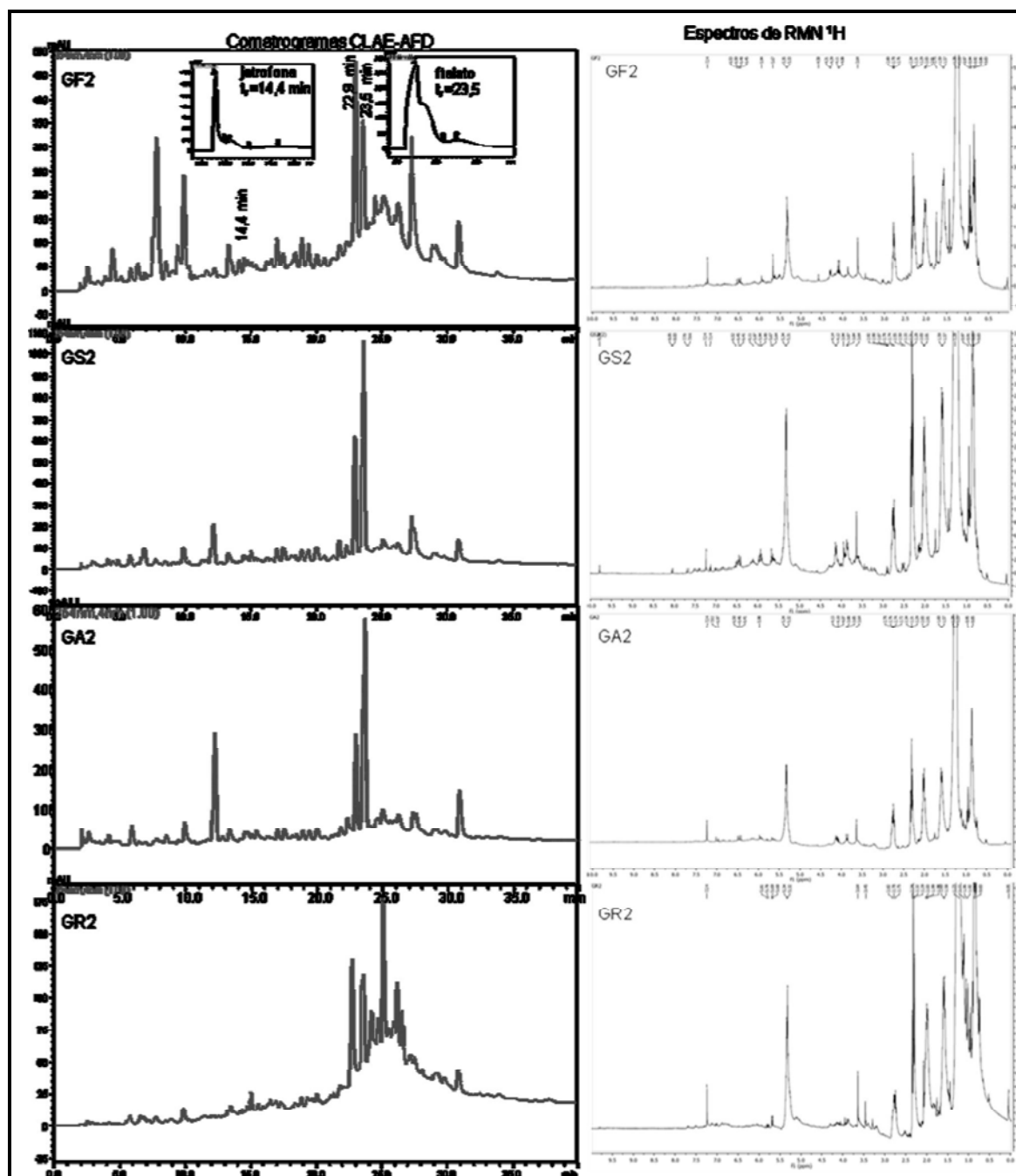


Figura 97. Cromatogramas e espectros de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), obtido dos extratos clorofórmios (folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia) de *G. elegans* (Col1).

Os cromatogramas (Figura 98) obtidos para os extratos de GF3, GS3, GA3 e GR3 sugerem que também possuam perfis cromatográficos similares. Sendo observada diferença apenas entre as concentrações dos sinais onde se verifica que o cromatograma de GA3 e GS3, apresenta maior intensidade.

Foram observadas através de espectros de UV as seguintes substâncias: uracila (**48**) [t_r = 3,1 min], uridina (**43**) [t_r = 4,1 min], ácido p-hidroxibenzoico (**51**) [t_r = 25,4 min], ácido vanílico (**49**) [t_r = 29,04 min], ácido isoferúlico (**50**) [t_r = 37,52 min], ácido 3,4-dimetoxibenzóico (**53**) [t_r = 37,9 min], ácido p-metoxibenzóico (**52**) [t_r = 44,7 min] e di-(2-etil)-hexil ftalato (**42**) [t_r = 74,4 min] cujos sinais apresentam-se em todos o cromatogramas com maior ou menor intensidade nestes extratos. Foram observados muitos outros sinais de média polaridade (20 – 60 min), caracterizando também como extratos ricos em varias substâncias.

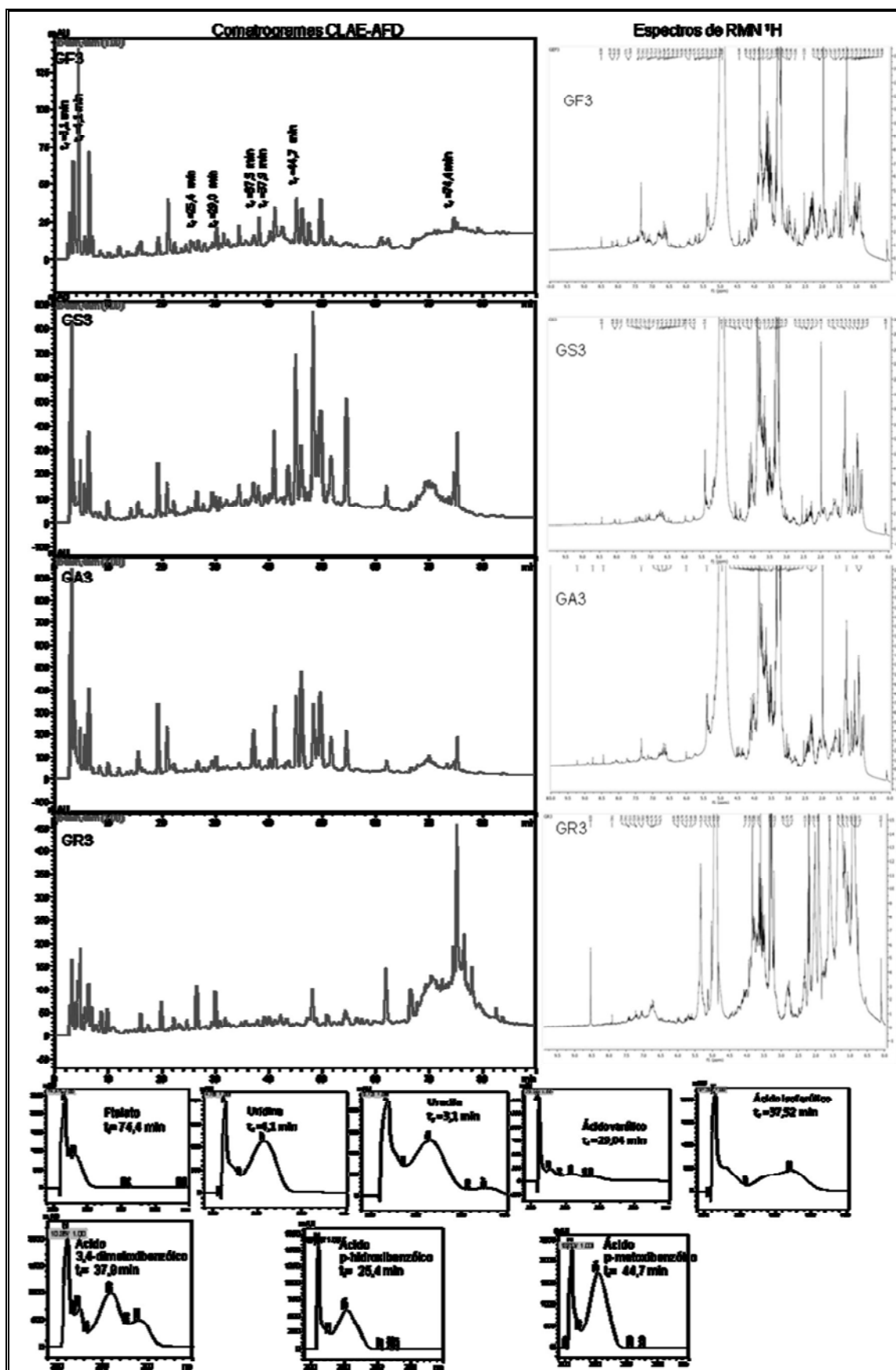


Figura 98. Cromatograma e RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD), obtido dos extratos metanólicos (folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia) de *G. elegans* (Col1).

Através da comparação entre cromatogramas obtidos para os extratos de GF4, GS4, GA4 e GR4 representado na Figura 99 foi possível verificar que no extrato GS4 há a presença de substância majoritária com $t_r = 10,9$ min, caracterizada pelo seu espectro de UV com sendo derivado de polissacarídeo, foram observadas também através de espectros característicos de UV as seguintes substâncias: uracila (**48**) [$t_r = 3,1$ min], uridina (**43**) [$t_r = 4,1$ min]. Nos outros extratos analisados percebe-se que possuem perfis cromatográficos similares. Sendo observada a diferença apenas entre as concentrações dos picos onde se verifica que o cromatograma de GF4, apresenta maior intensidade.

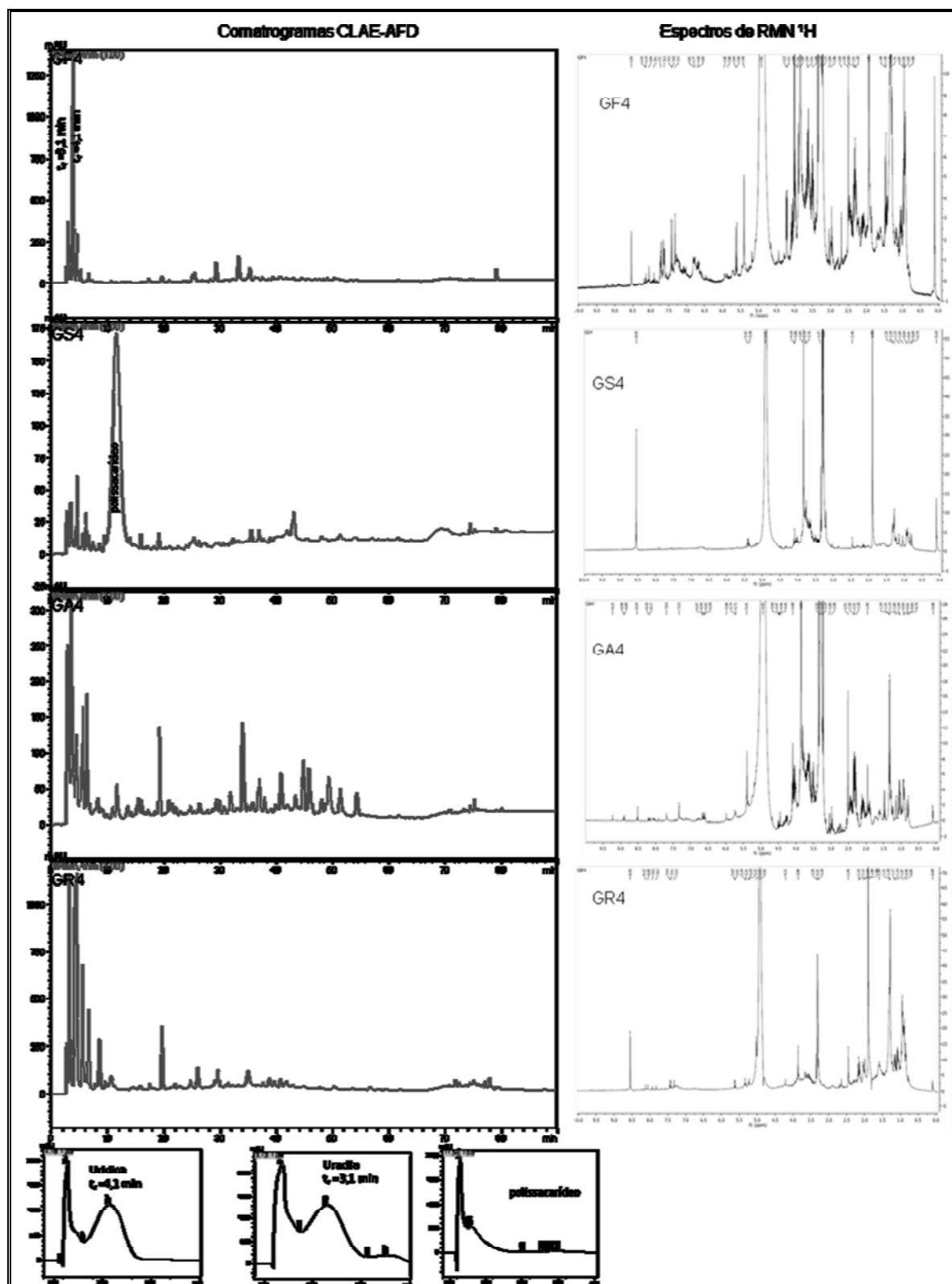


Figura 99. Cromatograma e RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD , D_2O) obtido extratos aquosos (folhas, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia) de *G. elegans* (Col1).

A análise dos cromatogramas dos extratos brutos obtidos de GF, GA, GS e GR mostram que ocorrem presenças de substâncias de alta polaridade eluindo na

Talal Suleiman Mahmoud

região de 3 à 10 min., substâncias de média polaridade eluídas entre 13 à 35 min o que não é verificado nos extratos clorofórmicos, que apresentam substâncias de baixa polaridade eluídas na região entre 20 à 25 min.

Analisando todos os extratos de cada órgão observaram-se sinais de substâncias com espectros no UV definidos, fornecendo um cromatograma, no qual constam sinais de substâncias com tempos de retenção que variam entre 2,8 e 79,2 min. Análises dos espectros de absorção no UV desses sinais revelam que eles apresentam padrão similaridade de absorção ao redor de 211-640 nm, confirmando que independentemente do órgão analisado eles apresentam substâncias com diferentes concentrações quando avaliadas pela intensidade de absorção, mas nos permitimos sugerir que as partes da planta possuem perfis comatográficos semelhantes.

4.6 Análise do efeito da sazonalidade no rendimento e composição química de *Gomphrena elegans*

4.6.1 Rendimento

A variação do rendimento dos extratos da espécie foi avaliada em função da variação dos dados meteorológicos (temperatura e precipitação, média mensal) obtidos com a Embrapa-Dourados-MS, para o período de fevereiro de 2007 a março de 2008 (Figura 100). Os extratos obtidos das folhas, caule submerso, caule emerso e raiz adventícia de *Gomphrena elegans* apresentaram uma variação significativa em massa nos rendimentos, e indicaram um padrão de variação em função dos dados meteorológicos.

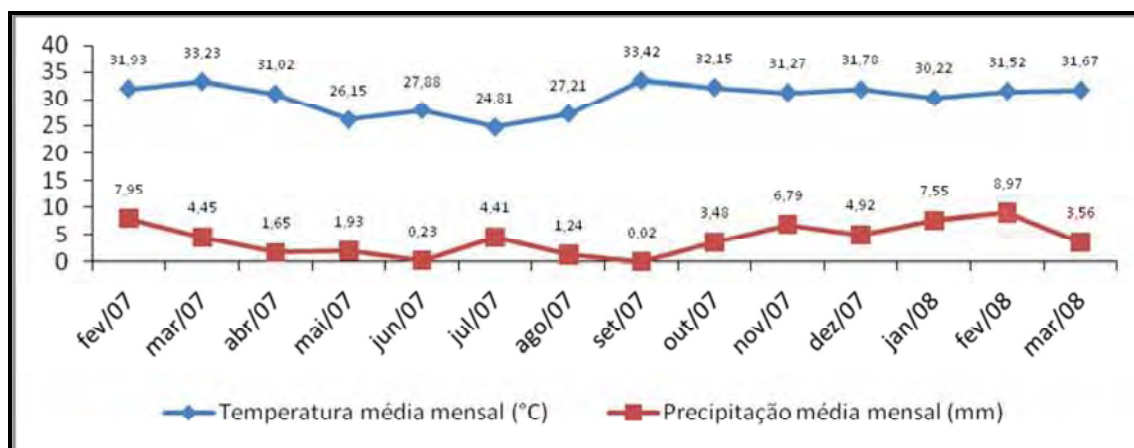


Figura 100. Parâmetros meteorológicos de precipitação média mensal e temperatura média mensal durante o período de coleta de *G. elegans*.

Conforme é apresentado na Figura 101, ocorreu uma variação na obtenção das massas durante o período analisado relativa aos extratos da terceira coleta (Col3), a qual apresentou maior rendimento no caule aéreo e caule submerso em relação as outras coletas, em relação a raiz adventícia e folhas mantiveram-se as médias das outras coletas.

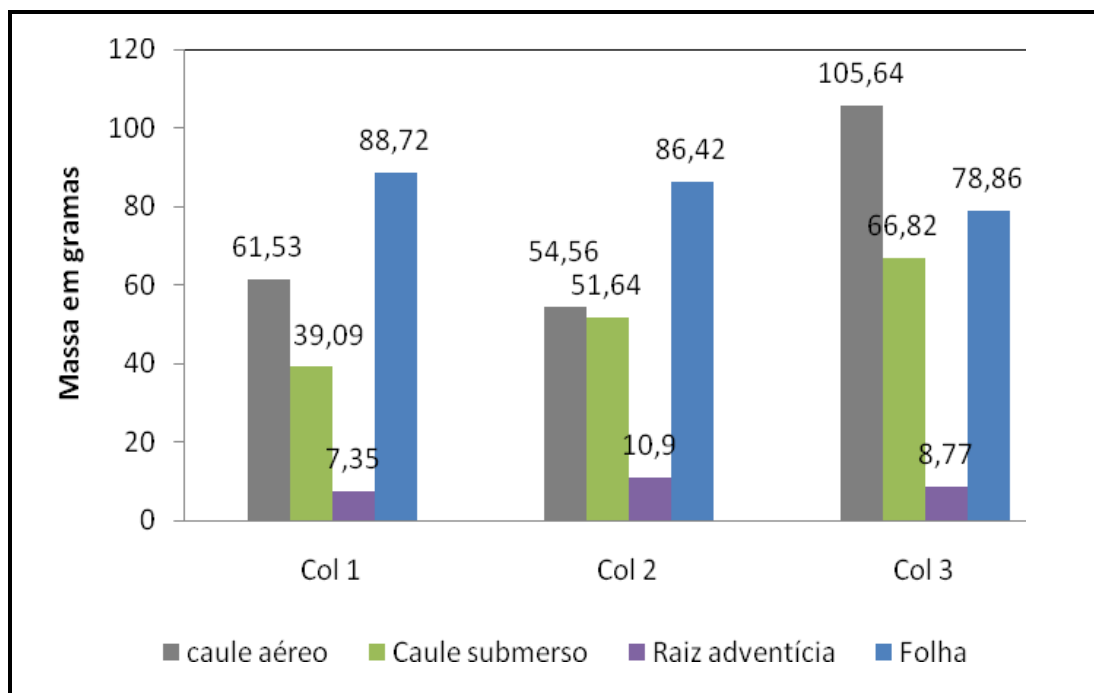


Figura 101: Massa total em gramas obtida nas três coletas (folhas, caule submerso, caule emerso e raiz adventícia), de *Gomphrena elegans*.

4.6.2 Composição química das três coletas de *G. elegans*

4.6.2.1 Composição química dos extratos GF1, GA1, GS1 e GR1 das três coletas de *G. elegans*

As concentrações das substâncias encontradas nos extratos GF1, GA1, GS1 e GR1 foram avaliados em função da variação da composição no período das coletas.

Nos extratos hexânicos das folhas de *G. elegans* foram identificadas 27 substâncias (Tabela 26). Entre o extrato hexânico obtidos a partir de folhas Col1, Col2 e Col3, não foram observadas variações qualitativas significativas, entretanto apresentaram 11 substâncias que não estão presentes nos extratos GF1 (Col1), sendo que a mesma apresentou 9 substâncias que não foram identificados nos extratos GF1 (Col2) e GF1 (Col3).

Foi possível verificar que a composição química de GF1 nas duas coletas Col2 e Col3 são muito semelhante, sendo notada diferença apenas entre as concentrações dos picos onde se verifica que o cromatograma (Figura 102) das folhas apresenta sinais com maior intensidade na região das substâncias menos voláteis (100 – 130 min).

Os extratos GF1 de Col2 e Col3 aparentemente possuem composição química mais rica em esteróides e triterpenos em relação ao extrato GF1 (Col1). Observou-se que ocorreu um aumento de concentração do esqualeno (**36**) da Col1 para a Col2 e redução dessa concentração na Col3 e ainda aumento da presença de substâncias menos voláteis entre de 100 – 130 min. É conhecido que a partir do seu derivado o 2,3-óxido de esqualeno são originados os fitosteróis e triterpenos, justificando com isso uma diminuição na concentração e um aumento das substâncias menos voláteis encontrados na Col3.

Tabela 26. Substâncias identificadas nos extratos hexânicos obtidos da folha das três coletas de *G. elegans*

Nº	Componente	IK	Área %		
			GF1		
			Col1	Col2	Col3
<u>1</u>	Pentadecano	1500	0,71	-	-
<u>2</u>	Dihidroactinidiolide	1516	2,96	-	-
<u>9</u>	7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadec-1-eno	1835	3,84	-	-
<u>10</u>	6,10,14-trimetil-pentadecan-2-ona	1840	0,95	-	-
<u>13</u>	1-Hexadecanol	1879	0,38	-	-
<u>17</u>	Palmitato de metila	1927	14,25	-	3,56
<u>19</u>	Palmitato de etila	1993	8,80	1,07	-
<u>21</u>	Linoleato de metila	2092	7,77	-	1,10
<u>22</u>	Linolenato de metila	2094	21,95	-	5,82
<u>23</u>	6-octadecenoato de metila ^a	2096	-	3,35	2,55
<u>24</u>	Laurenan-2-ona	2107	19,63	-	1,55
<u>25</u>	Linoleolato de etila	2157	1,15	1,73	-
<u>26</u>	Linolenato de etila	2162	1,77	-	-
<u>28</u>	Docoseno	2195	0,54	-	-
<u>35</u>	Heptacosano	2700	0,49	-	-
<u>36</u>	Esqualeno	2806	14,34	23,08	7,03
<u>37</u>	Nonacosano	2900	0,47	-	0,58
	Ni	3053	-	8,05	2,86
	Ni	-	-	4,87	-
	Ni	-	-	3,54	29,55
	Ni	-	-	20,29	-
	Ni	-	-	4,00	2,74
	Ni	-	-	-	0,34
	Ni	-	-	6,73	1,36
	Ni	-	-	-	0,09
	Ni	-	-	23,29	36,24
	Ni	-	-	-	4,63

Ni = não identificado

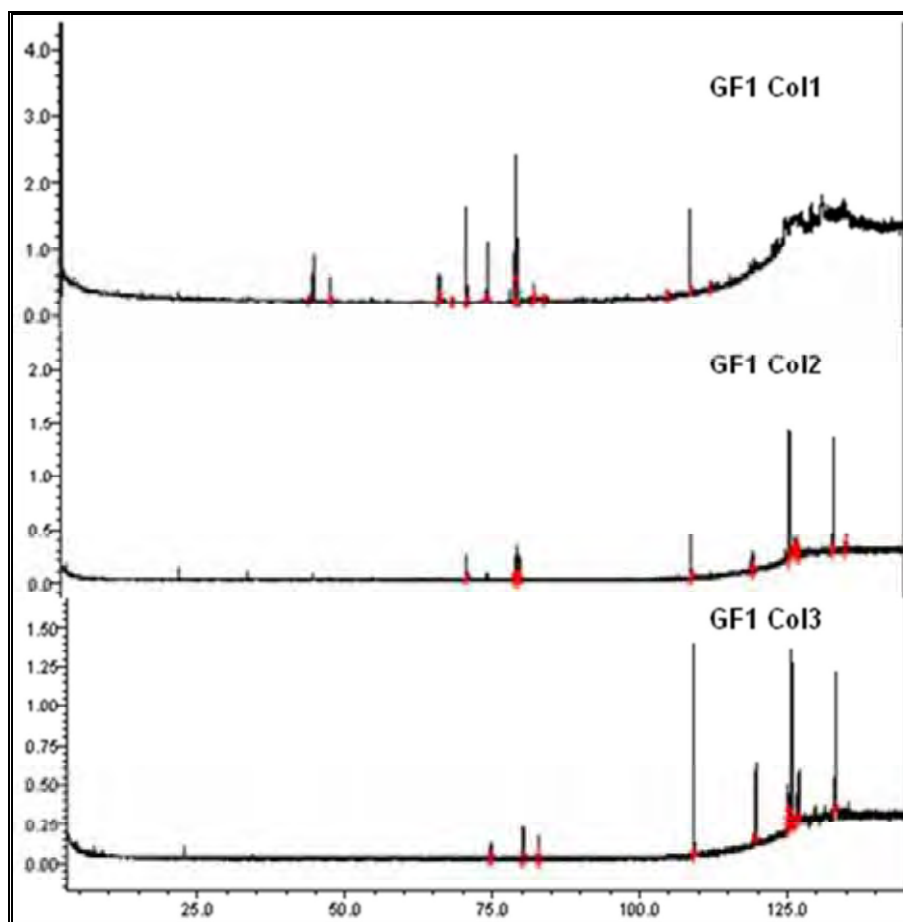


Figura 102: Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir de folhas das três coletas de *G. elegans*.

Nos extratos hexânicos do caule aéreo de *G. elegans* foram identificados a presença de 39 substâncias (Tabela 27). Foi observada (Figura 103) uma variação qualitativa significativa na região das substâncias menos voláteis (100 – 130 min). Os extratos GA1 da Col2 e Col3 aparentemente possuem uma composição química mais rica de esteróides e triterpenos em relação ao extrato GF1 (Col1).

Observou-se a presença da substância diisobutil ftalato (**12**) nas três coletas com uma concentração maior na Col2 (15,2 %).

Tabela 27. Substâncias identificadas nos extratos hexânicos do caule aéreo das três coletas de *G. elegans*

Nº	Componentes	IK	Área %		
			GA1		
			Col1	Col2	Col3
3	1-Hexadeceno	1592	0,72	0,61	0,70

<u>4</u>	Hexadecano	1600	2,64	-	0,09
	Ni	1662	-	0,44	0,15
<u>5</u>	Heptadecano	1700	0,35	-	0,73
	Ni	1720	-	8,32	0,29
<u>6</u>	1-octadeceno	1793	-	-	1,45
<u>7</u>	3-eicoseno	1794	2,70	-	-
<u>8</u>	Octadecano	1800	3,00	-	-
	Ni	1815	-	-	0,95
<u>9</u>	7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadec-1-eno	1835	4,88	-	0,19
	Ni	1836	-	-	0,32
	Ni	1837	-	-	1,48
<u>10</u>	6,10,14-trimetil-pentadecan-2-ona	1840	-	10,36	1,87
<u>11</u>	8-Metil-1-deceno	1841	0,42	43,41	14,03
<u>12</u>	Diisobutil ftalato	1853	2,90	15,20	0,12
	Ni	1855	-	-	1,04
<u>13</u>	1-Hexadecanol	1879	0,80	8,53	-
<u>15</u>	Nonadecano	1900	0,27	-	-
<u>17</u>	Palmitato de metila	1927	0,56	-	-
<u>19</u>	Palmitato de etila	1993	21,87	-	-
<u>20</u>	Eicosano	2000	1,76	-	-
<u>21</u>	Linoleato de metila	2092	0,19	-	-
<u>25</u>	Linoleolato de etila	2157	34,07	-	0,75
<u>26</u>	Linolenato de etila	2162	10,46	-	-
<u>27</u>	9-octadecenoato de etila	2164	6,89	-	-
<u>28</u>	Docoseno	2195	1,96	-	-
<u>29</u>	Docosano	2200	1,62	-	-
<u>31</u>	Tetracosano	2400	0,63	-	5,53
<u>34</u>	Hexacosano	2600	-	-	2,96
<u>35</u>	Heptacosano	2700	-	-	2,23
	Ni	2730	-	0,61	22,88
	Ni	2735	-	-	6,31
	Ni	2796	-	1,88	20,20
	Ni	2797	-	-	1,47

36	Esqualeno	2806	1,31	2,11	11,04
	Ni	2989	-	0,70	-
	Ni	3008	-	2,14	-
	Ni	3072	-	-	1,80
	Ni	3077	-	5,69	1,42

Ni = não identificado

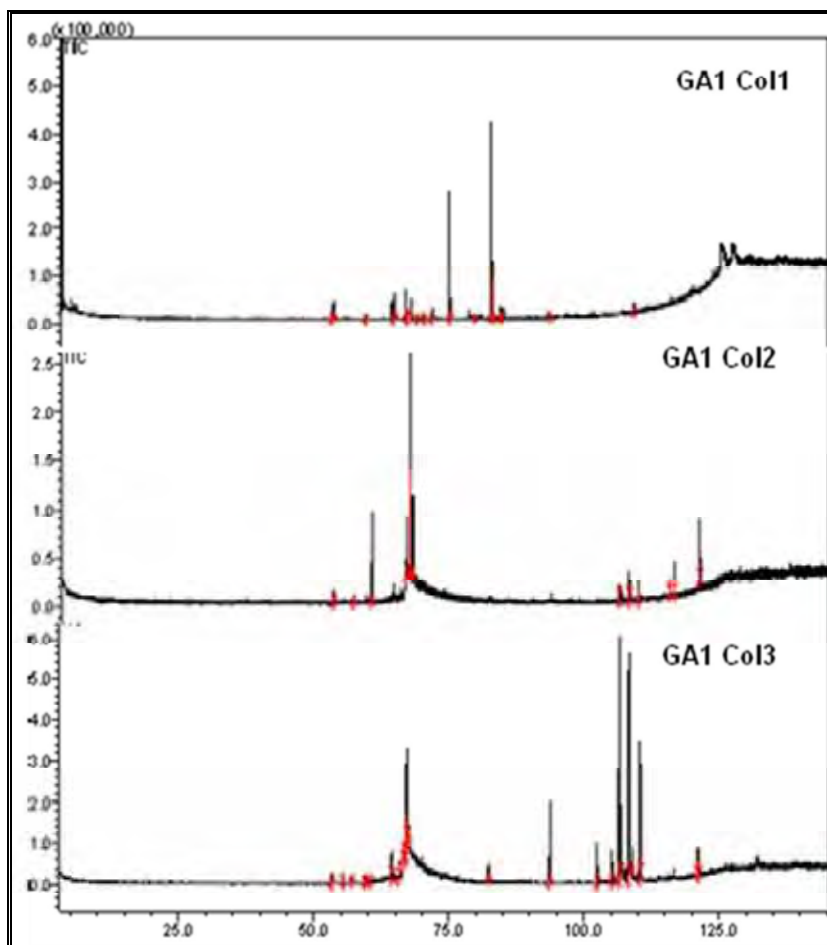


Figura 103. Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir do caule aéreo das três coletas de *G. elegans*.

Nos extratos hexânicos do caule submerso de *G. elegans* foram identificados a presença de 33 substâncias distribuídas nas três coletas (Tabela 28). Foi observada na figura 104 uma variação qualitativa significativa na região das substâncias mais voláteis (1 – 80 min), a Col3 não apresentou possuir substâncias nesse intervalo de tempo de corrida. Observou-se a presença da substância diisobutil ftalato (**12**) na Col2 (1,14 %).

Tabela 28. Substâncias identificadas nos extratos hexânicos do caule submerso das três coletas de *G. elegans*

Nº	Substâncias	IK	Área %		
			GS1		
			Col1	Col2	Col3
<u>1</u>	Pentadecano	1500	0,75	-	-
<u>3</u>	1-Hexadeceno	1592	1,46	-	-
<u>4</u>	Hexadecano	1600	4,23	0,91	-
	Ni	1661	-	1,61	-
<u>5</u>	Heptadecano	1700	0,55	-	-
	Ni	1768	-	1,06	-
<u>6</u>	1-octadeceno	1793	3,57	8,76	-
<u>7</u>	3-eicoseno	1794	-	2,27	-
<u>8</u>	Octadecano	1800	5,71	1,14	-
<u>9</u>	7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadec-1-eno	1835	5,90	-	-
<u>12</u>	Diisobutil ftalato	1853	-	1,14	-
<u>15</u>	Nonadecano	1900	-	1,94	-
<u>17</u>	Palmitato de metila	1927	25,96	-	-
<u>19</u>	Palmitato de etila	1993	7,73	-	-
<u>20</u>	Eicosano	2000	4,46	-	-
	Ni	2029	-	1,97	-
<u>21</u>	Linoleato de metila	2092	25,36	-	-
<u>22</u>	Linolenato de etila	2094	2,76	-	-
<u>23</u>	6-octadecenoato de metila	2096	6,61	-	-
<u>25</u>	Linoleolato de etila	2157	1,96	1,49	-
<u>28</u>	Docoseno	2195	1,20	-	-
<u>29</u>	Docosano	2200	1,79	-	-
<u>31</u>	Tetracosano	2400	-	-	4,84
<u>34</u>	Hexacosano	2600	-	-	2,14
	Ni	2692	-	5,04	3,21
<u>35</u>	Heptacosano	2700	-	2,13	-
	Ni	2732	-	21,42	24,23
	Ni	2740	-	18,17	19,82

Ni	2746	-	2,88	-
36 Esqualeno	2806	-	25,03	37,23
37 Nonacosano	2900	-	-	-
Ni	3072	-	1,36	8,53
Ni	3078	-	1,68	-

Ni = não identificado

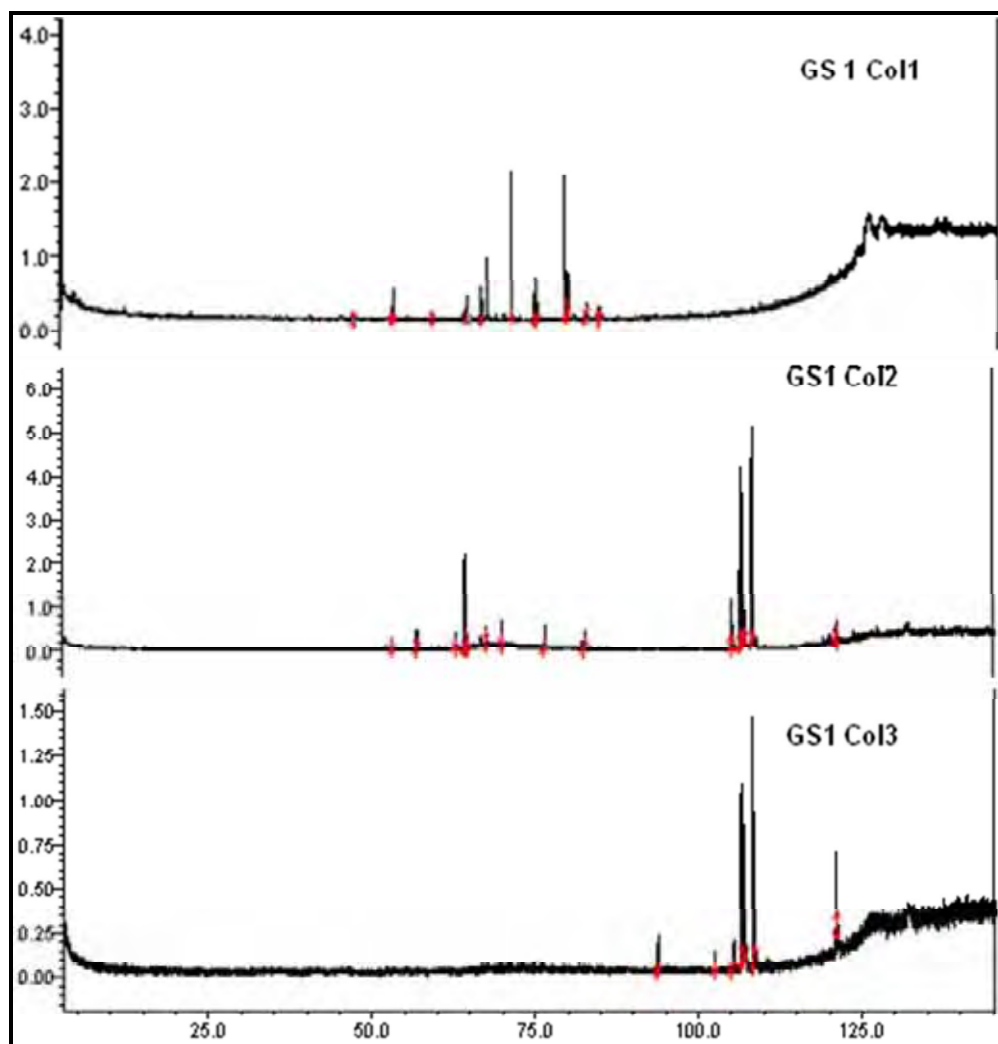


Figura 104. Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir do caule submerso das três coletas de *G. elegans*.

Nos extratos hexânicos da raiz adventícia de *G. elegans* foram identificados a presença de 44 substâncias distribuídas nas três coletas (Tabela 29).

Os extratos GR1 de Col2 e Col3 demonstraram possuírem uma composição química rica em substâncias menos voláteis (acima de 70%), do que o encontrado

na Col1. O aumento da presença de substâncias menos voláteis entre 100 – 130 min foram confirmadas conforme cromatograma Figura 105.

Tabela 29. Substâncias identificadas nos extratos hexânicos da raiz adventícia das três coletas de *G. elegans*

Nº	Substâncias	IK	Área %		
			GR1		
			Col1	Col2	Col3
<u>3</u>	1-Hexadeceno	1592	1,63		
<u>4</u>	Hexadecano	1600	4,43		
<u>5</u>	Heptadecano	1700	1,81		5,80
<u>6</u>	1-octadeceno	1793	9,50		
<u>8</u>	Octadecano	1800	12,15		
<u>10</u>	6,10,14-trimetil-pentadecan-2-one	1840	5,47		1,43
<u>11</u>	8-Metil-1-deceno	1841	-		0,77
<u>14</u>	7,9-di-tert-butyl-1-oxaspiro[4,5]deca-6,9-diene-2,8-dione	1894	1,59		
<u>15</u>	Nonadecano	1900	2,41		
<u>16</u>	3-etil-5-(2-etilbutil)-Octadecano	1906	0,88		
<u>18</u>	9-Eicoseno	1970	3,47		
<u>19</u>	Palmitato de etila	1993	13,38	0,37	
<u>20</u>	Eicosano	2000	8,38		
<u>24</u>	Laurenan-2-ona	2107	-		3,94
<u>25</u>	Linoleolato de etila	2157	4,03	0,53	
<u>26</u>	Linolenato de etila	2162	2,70		
<u>27</u>	9-octadecenoato de etila	2164	1,74		
<u>28</u>	Docoseno	2195	7,51		
<u>29</u>	Docosano	2200	4,83		
<u>30</u>	Tricosano	2300	1,71	0,51	
	Ni			4,02	
<u>31</u>	Tetracosano	2400	3,67		
<u>32</u>	Pentacosano	2500	3,66	1,12	
<u>33</u>	1-Hexacoseno	2595	1,19	-	
<u>34</u>	Hexacosano	2600	3,86	8,33	

<u>35</u>	Heptacosano	2700	-	2,16	
	Ni			47,15	
	Ni			4,85	
	Ni			8,64	
	Ni			12,61	
<u>36</u>	Esqualeno	2806	-	1,66	2,78
	Ni			2,23	
	Ni			2,31	
	Ni				16,37
	Ni			1,77	
	Ni			1,73	
	Ni				4,02
	Ni				3,72
	Ni				35,62
	Ni				3,26
	Ni				0,90
	Ni				7,26
	Ni				8,52
	Ni				5,61

Ni = não identificado

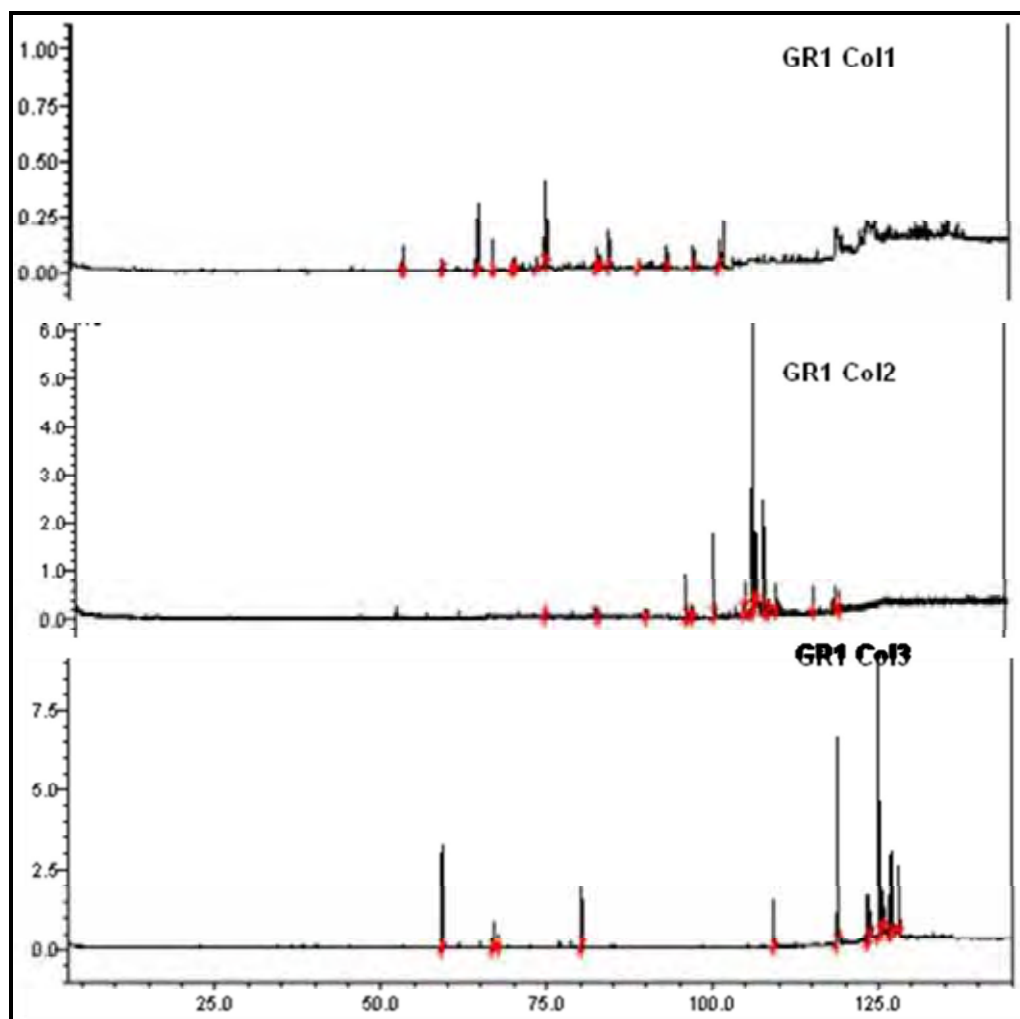


Figura 105. Cromatogramas das frações hexânicas obtidos a partir da raiz adventícias das três coletas de *G. elegans*.

4.6.2.2 Avaliação dos perfis cromatográficos dos extratos GF2, GF3, GF4, GS2, GS3, GS4, GA2, GA3, GA4, GR2, GR3, GR4 das três coletas de *G. elegans*

Neste trabalho, como foram fracionados os extratos dos órgãos das três coletas de *G. elegans*, optou-se em realizar uma comparação química entre esses extratos através do experimento por CLAE-AFD, as condições foram às mesmas utilizadas nas análises dos perfis *item 4.5* (condição utilizada descritas na parte experimental *item 3.6*). Nas Figuras 106 á 117 encontram-se os cromatogramas obtidos nestas condições.

A similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos para os diferentes órgãos da espécie foi avaliada através da comparação dos tempos de retenção dos sinais cromatográficos observados. A análise comparativa do perfil cromatográfico dos extratos clorofórmico, metanólicos e aquosos de folha, caule submerso, caule aéreo e raiz adventícia das três coletas de *G. elegans*, demonstraram que a planta apresenta perfis cromatográficos bastante semelhantes para cada órgão nos períodos analisado.

Observou-se que algumas substâncias estão presentes nos extratos metanólicos e também se encontram presentes nos extratos aquosos, principalmente os de alta polaridade que eluíram entre 3 à 10 min, e substâncias de média polaridade eluindo entre 13 à 35 min. Já nos extratos clorofórmicos, apresentam substâncias de baixa polaridade eluindo entre 20 e 25 min.

Foi notada diferença entre as concentrações, confirmando que independentemente do tempo de coleta realizada os órgãos apresentam as mesmas substâncias com diferentes concentrações quando avaliadas pela intensidade de absorção. Permitindo-nos sugerir que as partes da planta apresentam perfis com certa similaridade nos períodos analisados.

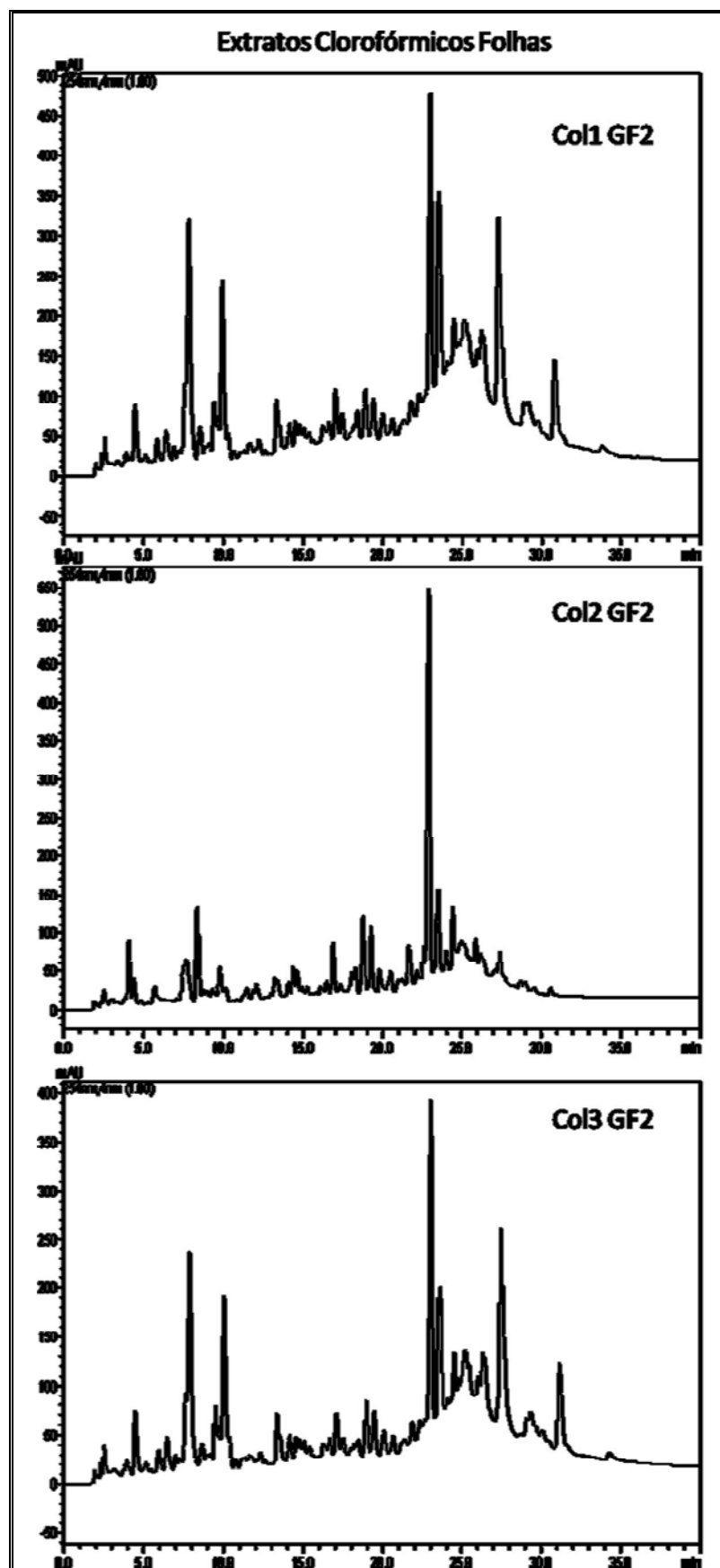


Figura 106. Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Folhas das três coletas de *G. elegans*.

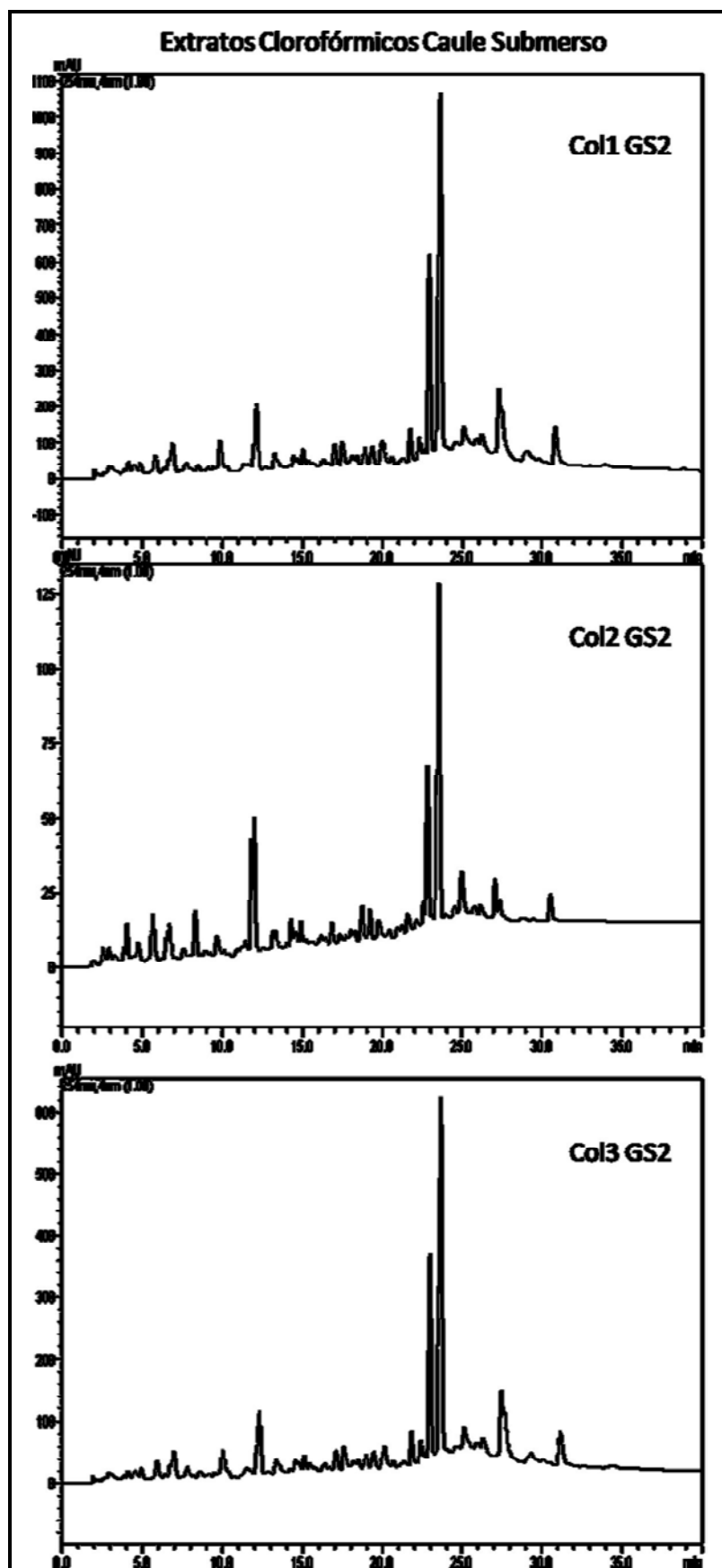


Figura 107. Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Caule Submerso das três coletas de *G. elegans*.

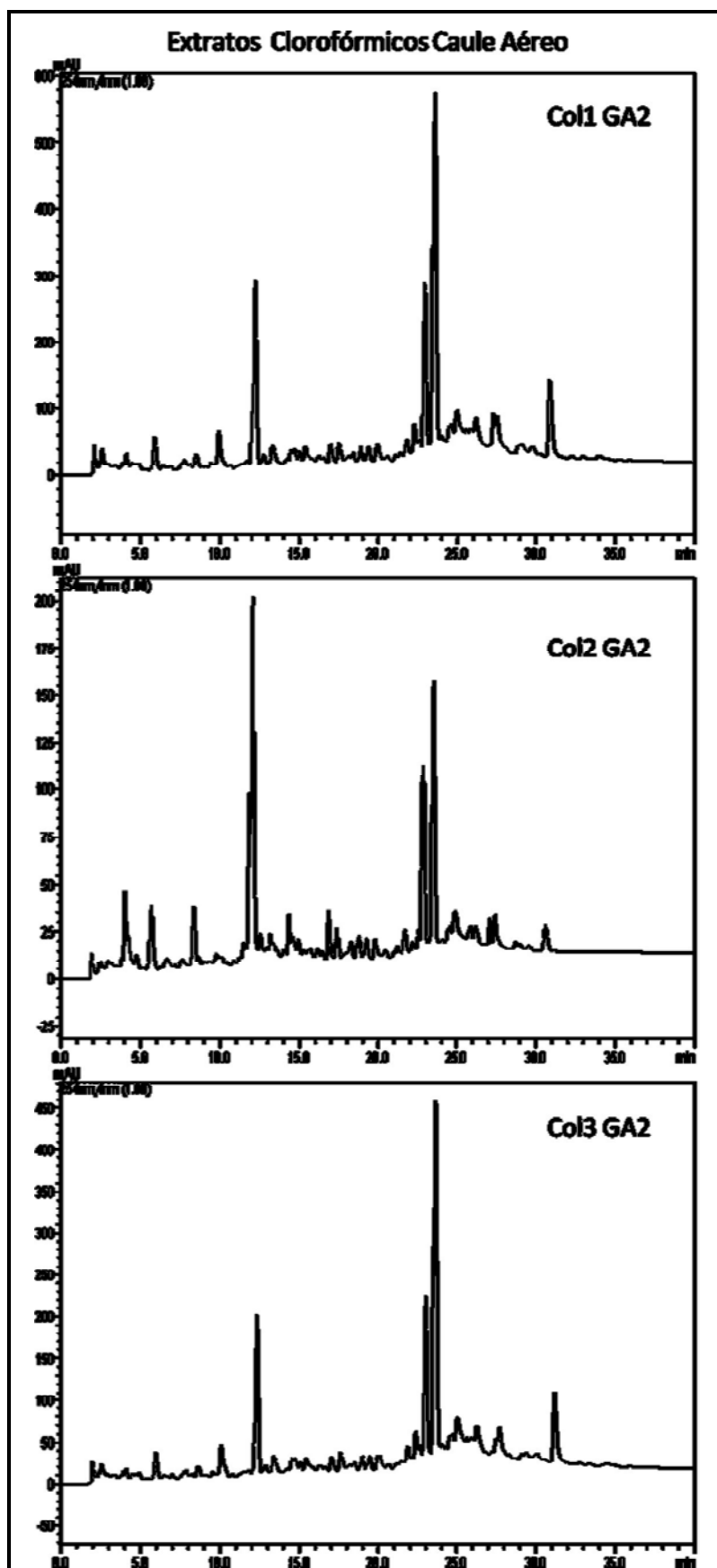


Figura 108. Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Caule Aéreo das três coletas de *G. elegans*.

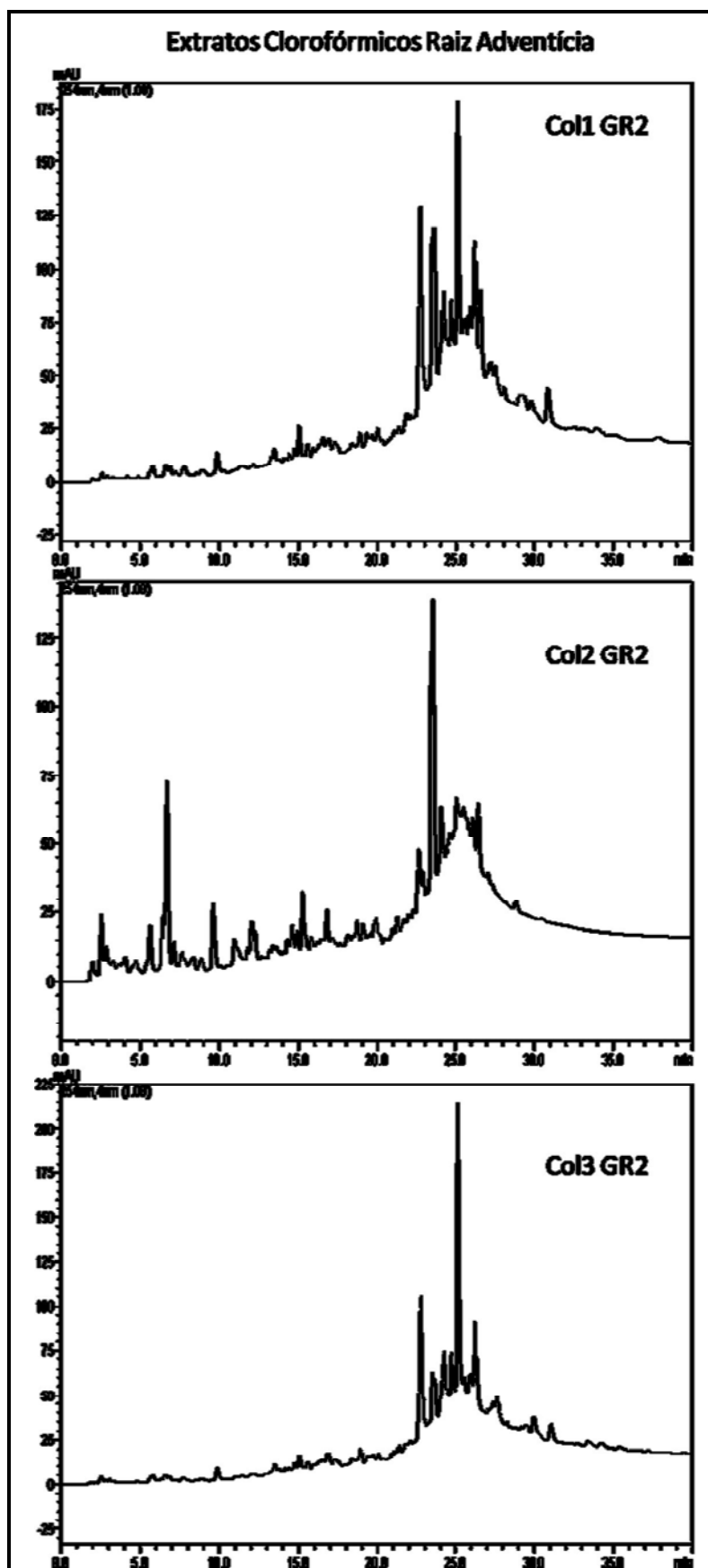


Figura 109. Cromatogramas obtidos dos extratos clorofórmicos Raiz Adventícias das três coletas de *G. elegans*.

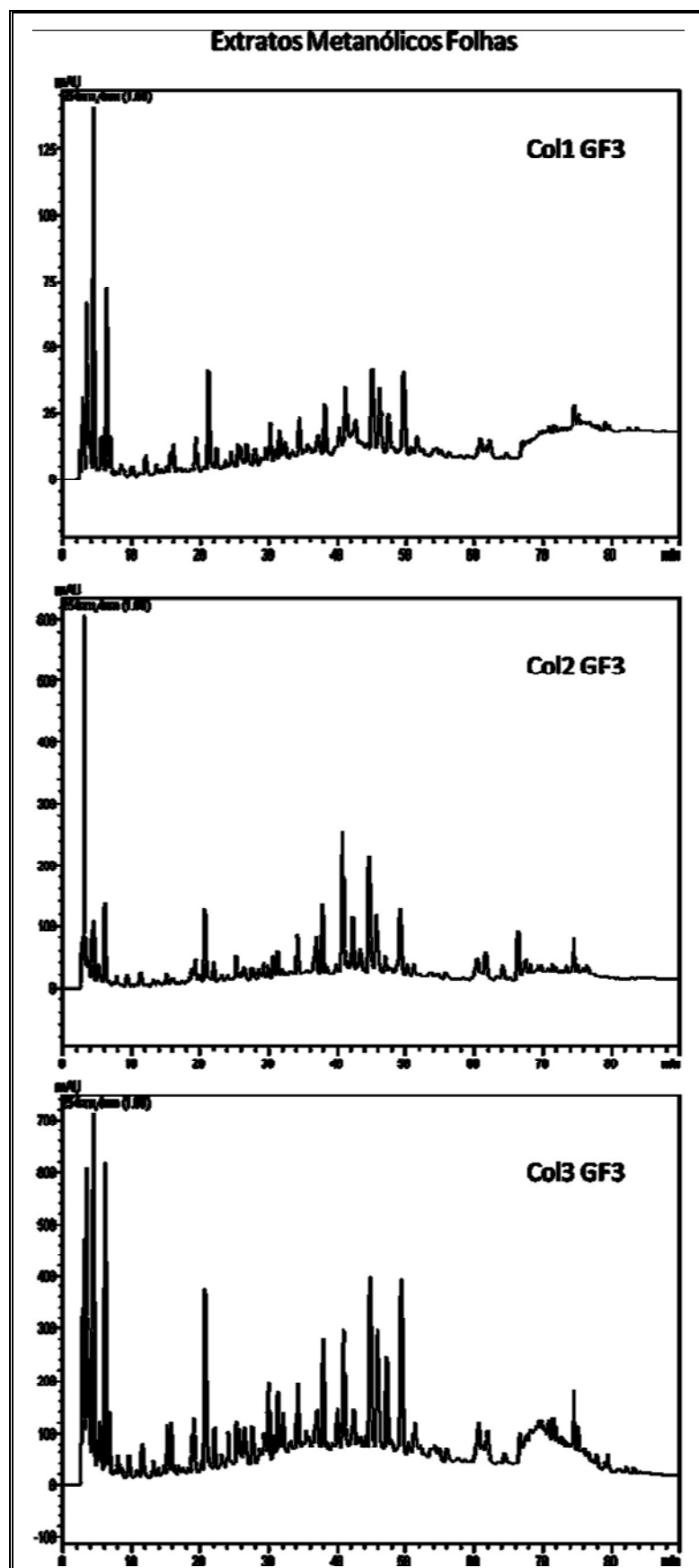


Figura 110. Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Folhas das três coletas de *G. elegans*.

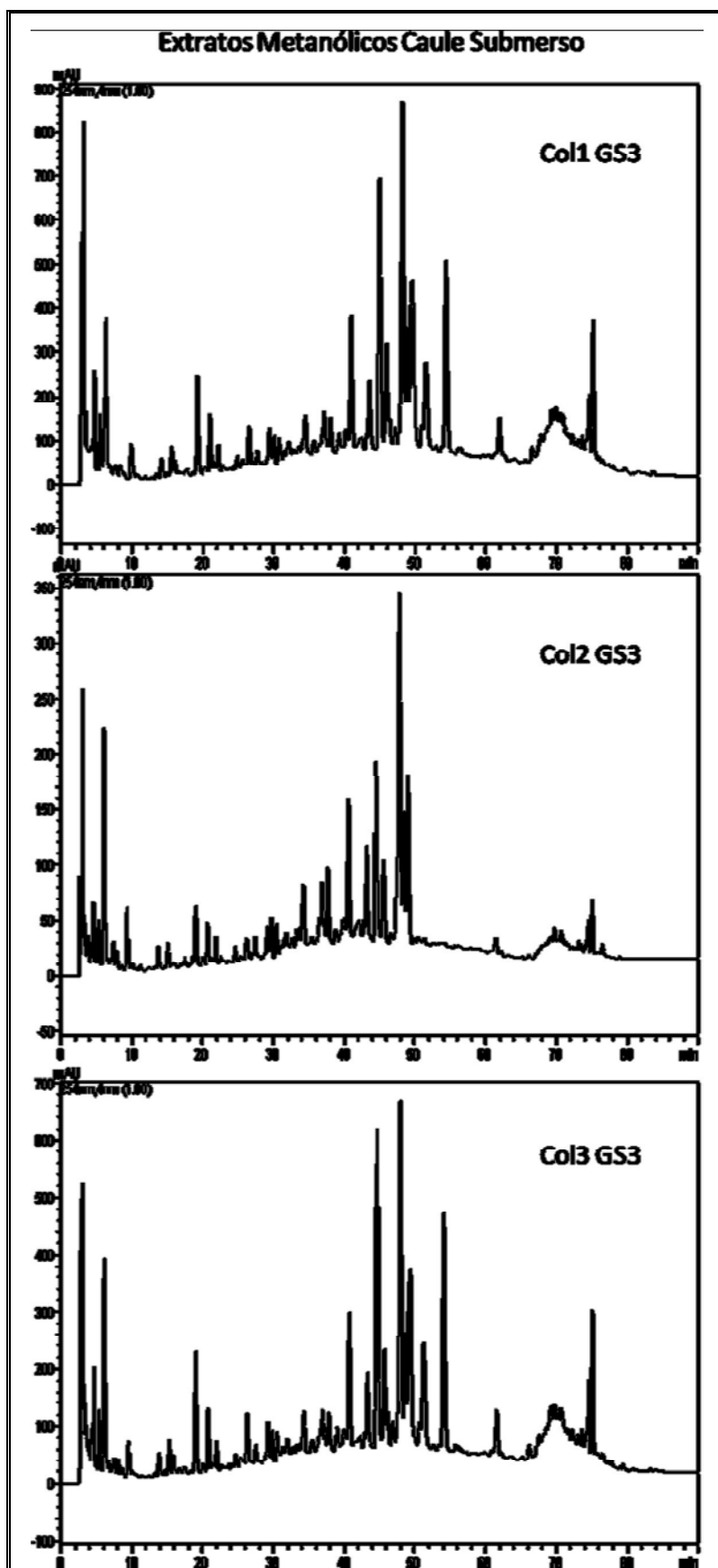


Figura 111. Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Caule Submerso das três coletas de *G. elegans*.

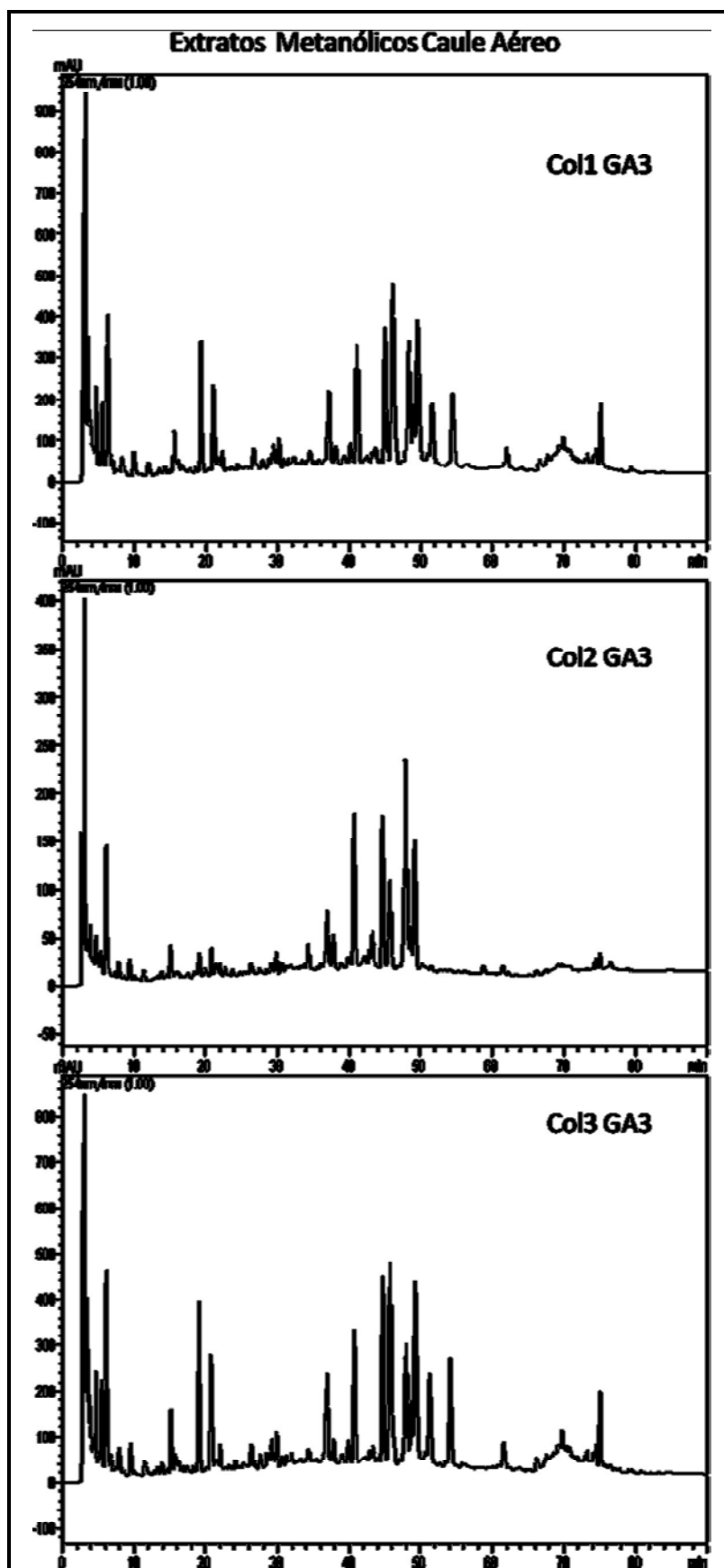


Figura 112. Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Caule Aéreo das três coletas de *G. elegans*.

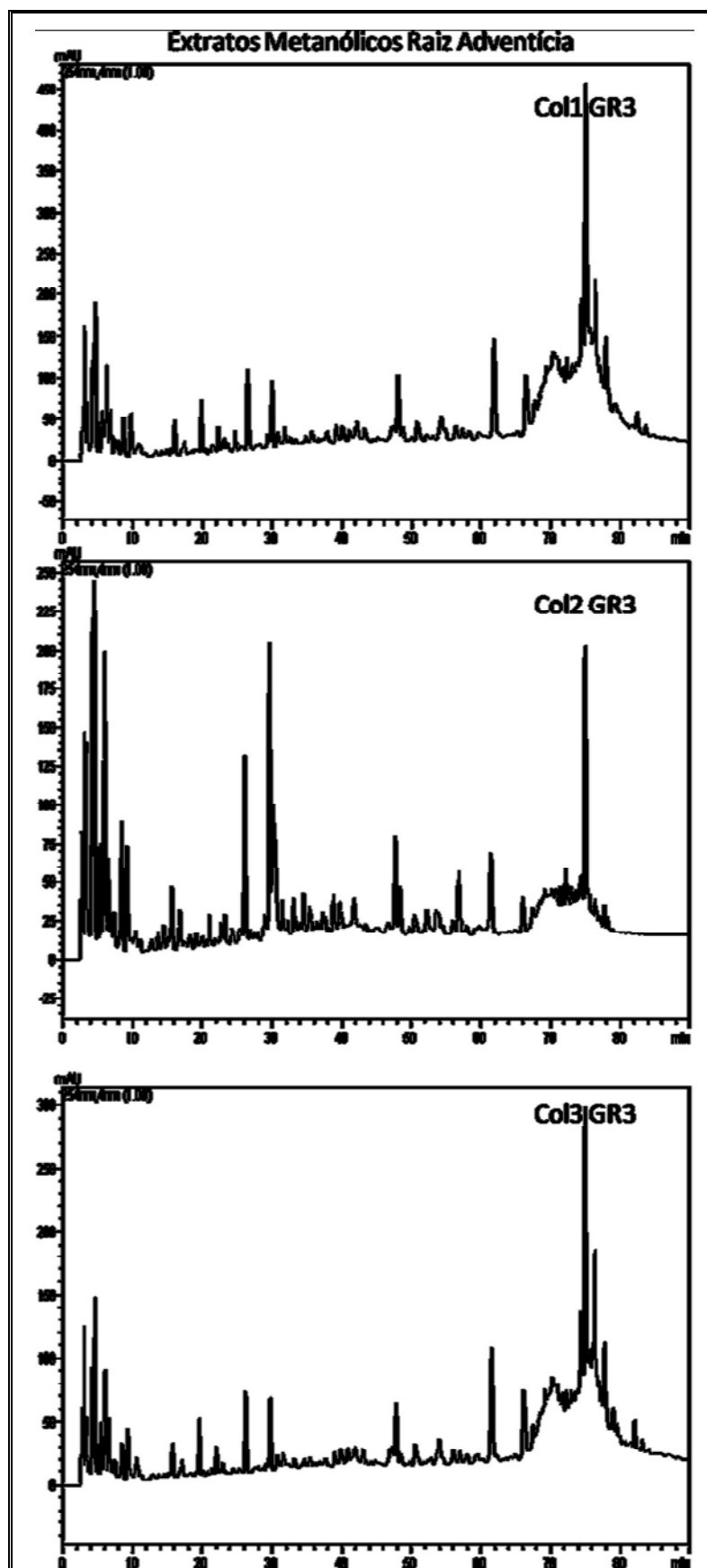


Figura 113. Cromatogramas obtidos dos extratos metanólicos Raiz adventícia das três coletas de *G. elegans*.

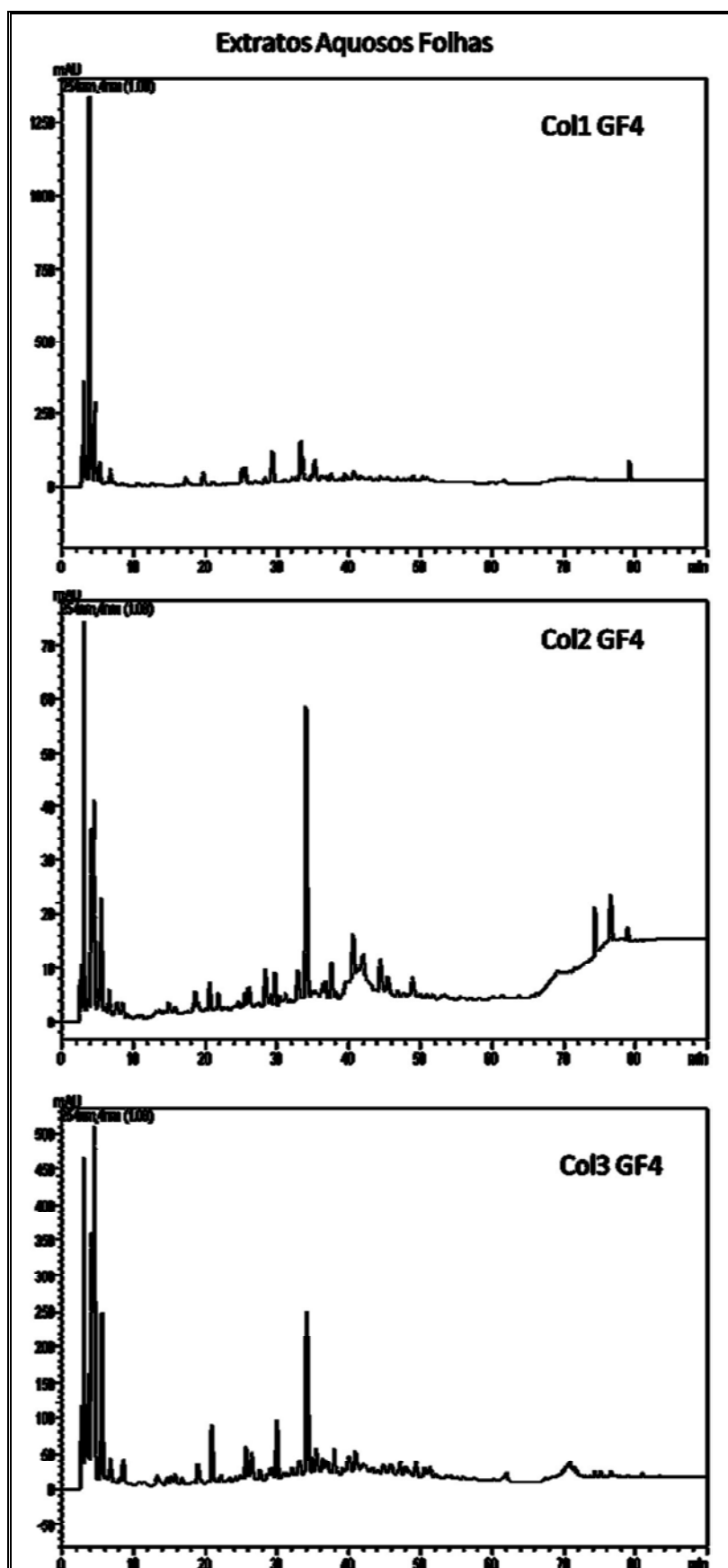


Figura 114. Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Folhas das três coletas de *G. elegans*.

Talal Suleiman Mahmoud

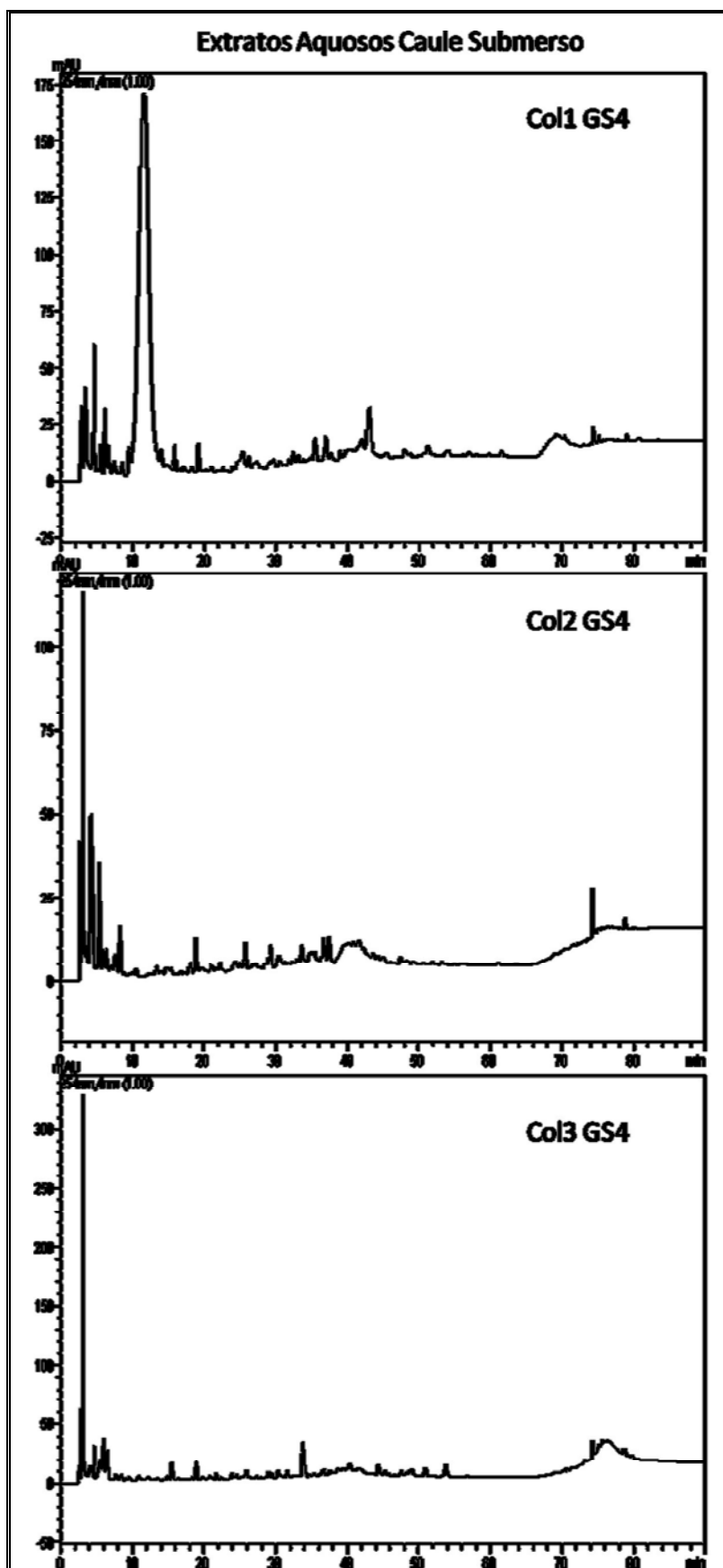


Figura 115. Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Caule Submerso das três coletas de *G. elegans*.

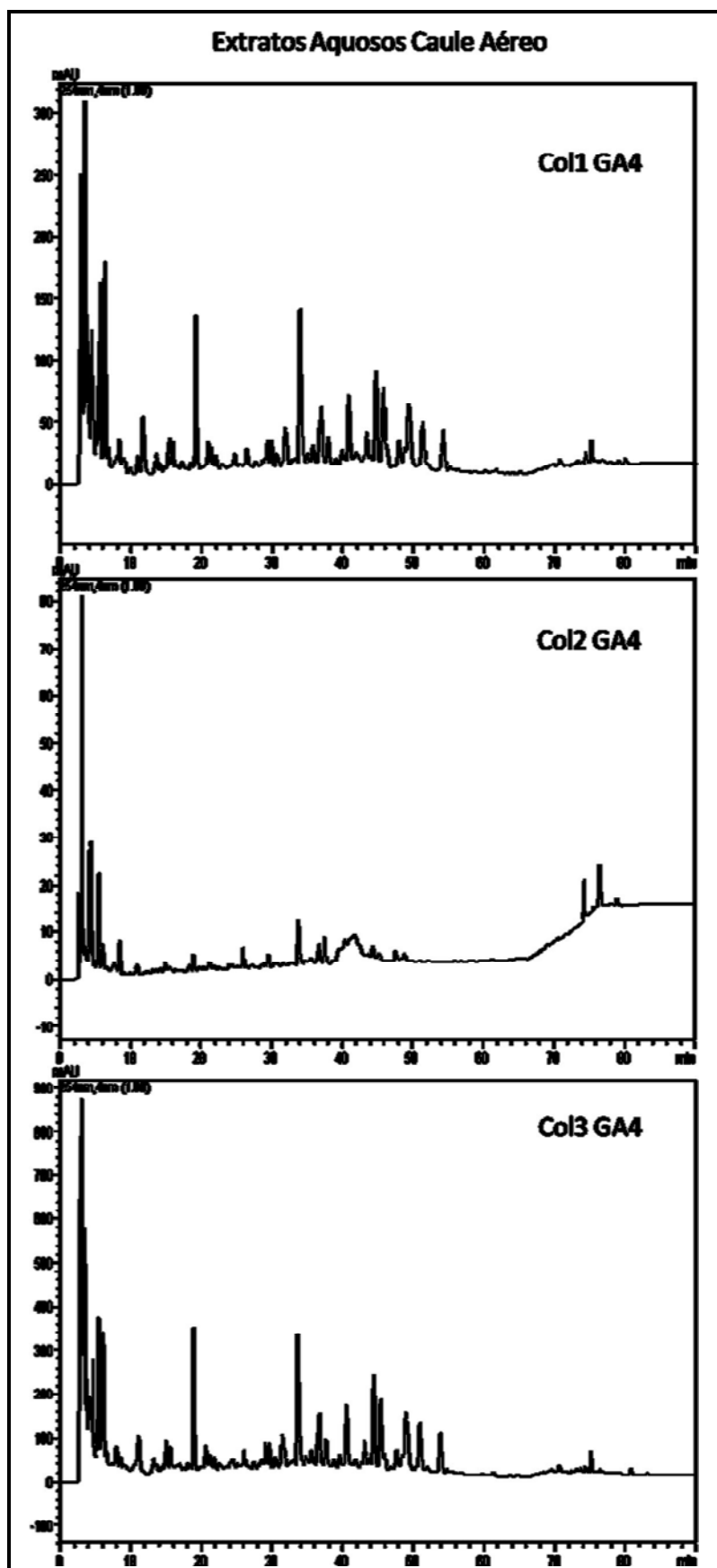


Figura 116. Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Caule aéreo das três coletas de *G. elegans*.

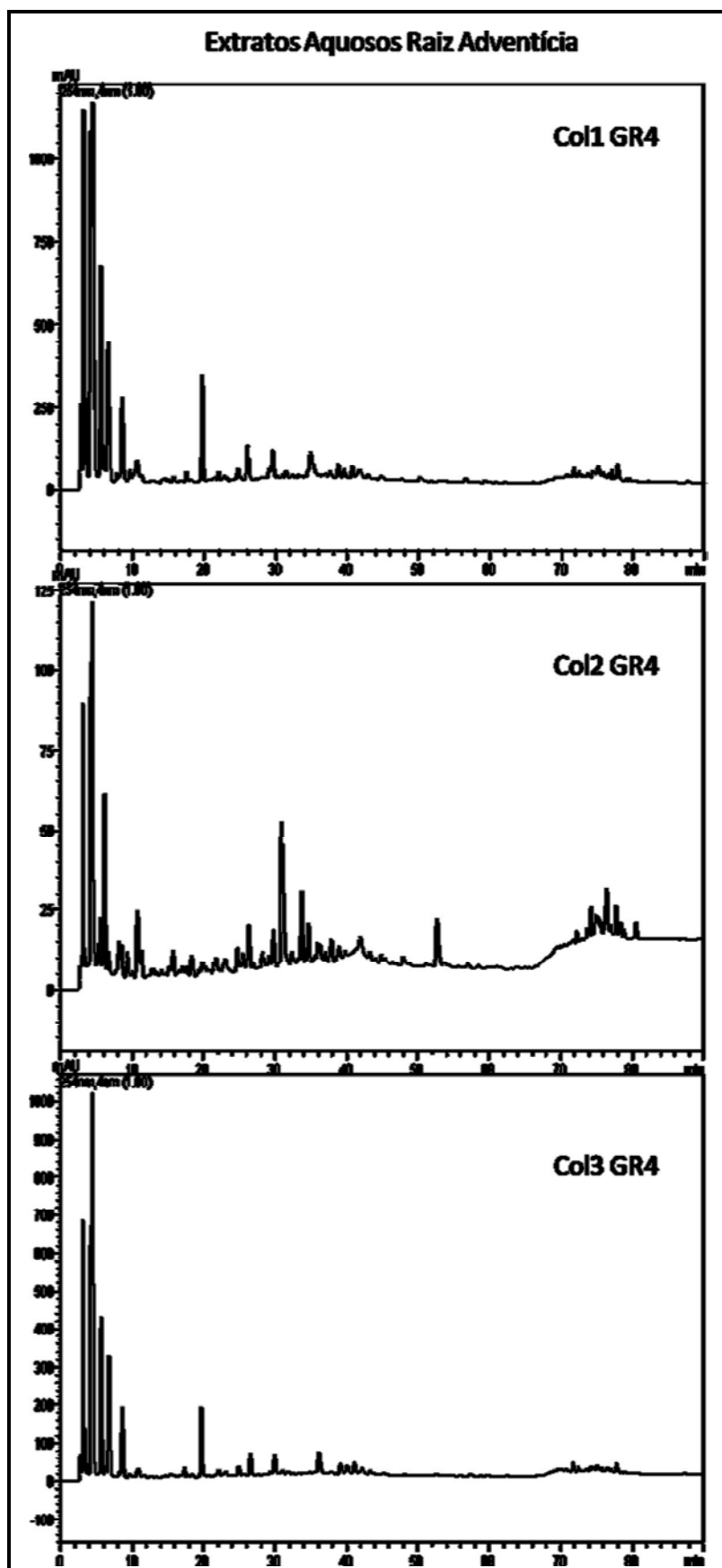


Figura 117. Cromatogramas obtidos dos extratos aquosos Raiz adventícia das três coletas de *G. elegans*.

4.7 Bioensaios para verificação da atividade antifúngica

Os resultados obtidos para os extratos na bioautografia com os fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* estão apresentados na tabela 30.

Tabela 30 Resultados da Inibição do crescimento dos esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum* observado nos extratos de *Gomphrena elegans*

Extratos	Rf	Potencial/CIM
GS4	0,98	+++/(100 µg)
GA4	0,98	+++/(100 µg)
GR4	0,70, 0,98	+++/(100 µg), +++/(100 µg)
GF4	0,98	+++/(100 µg)
GS2	0,24	+/(100 µg)
GA2	0,24	+/(100 µg)
GR2	0,24	+/(100 µg)
GF2	0,26	+/(100 µg)
GS1	origin	+/(100 µg)
GA1	origin	+/(100 µg)
GR1	origin	+/(100 µg)
GF1	i	i
GS3	i	i
GA3	i	i
GR3	i	i
GF3	i	i

i = inativo; + = fraco; ++ = moderado; +++= forte; CIM=concentração inibitória mínima

As atividades antifúngicas avaliada por bioautografia direta dos extratos GA1, GA2, GS1, GS2, GR1, GR2 e GF2 apresentaram atividade fraca (CIM de 100 µg) frente a *C. sphaerospermum*. Somente os extratos GA4, GS4, GR4 e GF4 exibiram atividade forte (CIM de 100 µg), quando comparado com o padrão nistatina (1,0 µg)

4.8 Bioensaios para verificação da atividade Alelopática sobre Sementes de *Lactuca sativa* L.

As Tabelas 31 à 35 mostram os resultados obtidos nos ensaios de atividade alelopática dos extratos de *G. elegans* sobre *Lactuca sativa*. De modo geral, os extratos foram pouco ativos sobre a germinação das sementes de alface, bem como sobre o índice de velocidade de germinação (IVG) das mesmas. As exceções foram os extratos hexânicos de folhas e caule emerso, que causaram uma inibição de 38% e 59% sobre a germinação e de 37% e 58% sobre o IVG, respectivamente e o sal inorgânico (KNO_3) que inibiu a germinação em 100% na concentração de 5.00 mg/mL.

O crescimento dos hipocótilos foi o processo fisiológico mais afetado pelos extratos de *G. elegans*. Quase todos os extratos, principalmente os hexânicos, clorofórmicos e aquosos inibiram o crescimento dos hipocótilos alguns de forma moderada, outros com alto poder de inibição, como é o caso dos extratos de raízes adventícias de *G. elegans*.

Com relação ao crescimento das raízes primárias de *L. sativa*, observa-se que a maioria não causou inibição significativa, ou por outro lado, desencadearam um processo acelerado de formação de tecido radicular, funcionando como estimuladores eficazes do crescimento. Muitas vezes um mesmo extrato atuou como inibidor em uma concentração mais alta e como estimuladora em menores concentrações. An et al. (1993) e Reigosa et al. (1999) sugerem que os efeitos dos aleloquímicos nos diferentes processos fisiológicos de uma planta são dependentes da concentração, funcionando como estimuladores em baixas concentrações e como inibidores em altas concentrações. Além disso, cada processo fisiológico sofre alterações específicas dependentes da concentração de cada aleloquímico em particular. No geral, os extratos de *G. elegans* testados foram mais ativos sobre o crescimento de plântulas. Foi apontado que os testes de germinação são menos sensíveis aos aleloquímicos do que aqueles que avaliam o desenvolvimento das plântulas, como por exemplo, comprimento da raiz ou parte aérea (Ferreira & Áquila, 2000).

Os resultados referentes aos estímulos de germinação e crescimento de plântulas são pouco freqüentes, e explicações detalhadas sobre esses efeitos são escassas. Alguns trabalhos mostram que aleloquímicos causaram alguma interferência sobre fitormônios como auxina e giberelinas ou sobre reguladores de crescimento como brassinoesteróides, que induziram a germinação e crescimento de *L. sativa* (AQUILA, 1999). Além disso, foram encontrados aumentos significativos no tamanho dos hipocótilos de *L. sativa* em bioensaios com extratos de *Erythroxylum argentinum*, *Luehea divaricata* e *Myrsine guianensis* (MARASCHIN-SILVA, AQUILA, 2006).

Dos extratos analisados quanto à atividade alelopática, aqueles obtidos de folhas e raiz adventícia de *G. elegans* foram os mais ativos. A maioria das plantas terrestres já estudadas armazena a maior parte dos aleloquímicos em folhas e raízes. Em ambos os órgãos há maior probabilidade de contato com o solo, as folhas por exsudação e quando caem no solo após a senescência (PUTNAM, TANG, 1986). Desta forma, é sugerido que os aleloquímicos de folhas de *G. elegans* são liberados quando as mesmas se desligam da planta na senescência e ficam acumuladas entre as ramificações submersas.

A maior atividade inibitória dos extratos apolares deve-se, provavelmente, ao fato de que as substâncias ativas não solubilizam em água, mantendo-se em maior concentração ao redor do vegetal. Alcalóides na forma básica, compostos fenólicos e terpenóides são exemplos de substâncias apolares que geralmente apresentam atividade alelopática.

Tabela 31. Efeito dos extratos de folhas de *Gomphrena elegans* sobre a germinação, IVG^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de *Lactuca sativa*

Tratamento	Germinação (%)		IVG		Hipocótilo (%)		Raiz primária (%)	
	F _{14,44} =13,84; P=0,0001		F _{14,44} =14,16; P=0,0001		F _{14,44} =5,47; P=0,0001		F _{14,44} =15,82; P=0,0001	
Tampão	97,33 ± 2,30 a		8,11 ± 00,19 a		100,00 ± 1,63 a		100 ± 3,06 abcd	
Caféina 24,00 mg/mL	0 ± 0,00 d		0,00 ± 0,00 d		0,00 ± 0,00 d		0,00 ± 0,00 f	
Solvente	90,66 ± 4,61 ab		7,55 ± 00,38 ab		95,35 ± 2,34 ab		93,32 ± 2,55 bcd	
GF1 5,00 mg/mL	37,33 ± 22,03 c		3,11 ± 1,83 c		37,09 ± 4,25 cd		83,89 ± 1,11 cde	
GF1 2,50 mg/mL	76,00 ± 10,58 ab		6,33 ± 0,88 ab		42,78 ± 2,93 bcd		148,68 ± 0,79 ab	
GF1 1,25 mg/mL	88,00 ± 4,00 ab		7,33 ± 0,33 ab		50,54 ± 0,61 abcd		151,15 ± 1,04 a	
GF2 5,00 mg/mL	54,66 ± 23,43 bc		4,55 ± 1,95 bc		57,66 ± 1,45 abc		127,41 ± 1,30 abc	
GF2 2,50 mg/mL	62,66 ± 15,14 abc		5,22 ± 1,26 abc		56,07 ± 1,76 abc		149,77 ± 0,83 a	
GF2 1,25 mg/mL	78,66 ± 16,65 ab		6,55 ± 1,38 ab		83,84 ± 3,46 abc		113,85 ± 1,91 abcd	
GF3 5,00 mg/mL	84,00 ± 8,00 ab		7,00 ± 0,66 ab		49,56 ± 3,83 abcd		73,49 ± 1,22 cde	
GF3 2,50 mg/mL	89,33 ± 6,11 ab		7,44 ± 0,50 ab		51,50 ± 1,99 abcd		99,98 ± 0,78 abcd	
GF3 1,25 mg/mL	97,33 ± 2,30 a		8,11 ± 0,19 a		52,65 ± 2,03 abcd		93,11 ± 0,86 cd	
GF4 5,00 mg/mL	84,00 ± 21,16 ab		7,00 ± 1,76 ab		53,09 ± 1,28 abcd		35,59 ± 2,36 ef	
GF4 2,50 mg/mL	97,33 ± 4,61 a		8,11 ± 0,38 a		60,32 ± 0,46 abc		65,96 ± 1,29 de	
GF4 1,25 mg/mL	86,66 ± 2,30 ab		7,22 ± 0,19 ab		52,11 ± 1,98 abcd		70,96 ± 0,30 de	

(*) IVG: índice de velocidade de germinação calculado segundo Maguire (1962). As médias ± desvio padrão seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 32. Efeito dos extratos de raiz adventícias de *Gomphrena elegans* sobre a germinação, IVG^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de *Lactuca sativa*

Tratamento	Germinação (%)		IVG		Hipocótilo (%)		Raiz primária (%)	
	F _{14,44} =25,84; P=0,0001		F _{14,44} =25,84; P=0,0001		F _{14,44} =6,94; P=0,0001		F _{14,44} =11,30; P=0,0001	
Tampão	81,33 ± 15,14 a		6,77 ± 1,26 a		100,00 ± 6,08 a		100,00 ± 4,56 c	
Caféina 24,00 mg/mL	0,00 ± 00,00 c		0,00 ± 00,00 c		0,00 ± 0,00 d		0 ± 0,00 e	
Solvente	84,00 ± 4,00 a		7,00 ± 00,33 a		99,56 ± 3,38 a		102,90 ± 5,09 c	
GR1 5,00 mg/mL	85,33 ± 9,23 a		7,11 ± 00,76 a		16,86 ± 0,83 cd		118,36 ± 0,29 c	
GR1 2,50 mg/mL	84,00 ± 4,00 a		7,00 ± 00,33 a		15,55 ± 2,95 cd		129,23 ± 0,54 bc	
GR1 1,25 mg/mL	76,00 ± 12,00 ab		6,33 ± 01,00ab		20,59 ± 0,38 cd		170,46 ± 1,19 a	
GR2 5,00 mg/mL	57,33 ± 2,30 b		4,77 ± 00,19 b		31,08 ± 3,05 bcd		41,53 ± 3,74 d	
GR2 2,50 mg/mL	72,00 ± 8,00 ab		6,00 ± 00,66 ab		20,15 ± 3,33 cd		135,31 ± 1,41 abc	
GR2 1,25 mg/mL	76,00 ± 4,00 ab		6,33 ± 00,33 ab		29,16 ± 2,62 bcd		167,71 ± 1,41 ab	
GR3 5,00 mg/mL	88,00 ± 10,58 a		7,33 ± 00,88 a		61,54 ± 4,12 abcd		96,25 ± 2,91 c	
GR3 2,50 mg/mL	89,33 ± 4,61 a		7,44 ± 00,38 a		87,50 ± 0,66 ab		122,55 ± 4,09 c	
GR3 1,25 mg/mL	80,00 ± 8,00 ab		6,66 ± 00,66 ab		87,97 ± 3,49 ab		96,35 ± 2,22 c	
GR4 5,00 mg/mL	77,33 ± 2,30 ab		6,44 ± 00,19 ab		55,01 ± 1,29 abcd		47,87 ± 4,29 d	
GR4 2,50 mg/mL	89,33 ± 4,61 a		7,44 ± 00,38 a		60,46 ± 2,69 abcd		111,46 ± 4,73 c	
GR4 1,25 mg/mL	84,00 ± 8,00 a		7,00 ± 00,66 a		68,95 ± 0,29 abc		130,76 ± 3,68 bc	

(*) IVG: índice de velocidade de germinação calculado segundo Maguire (1962). As médias ± desvio padrão seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 33. Efeito dos extratos de caule submerso de *Gomphrena elegans* sobre a germinação, IVG^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de *Lactuca sativa*

Tratamento	Germinação (%)		IVG		Hipocótilo (%)		Raiz primária (%)	
	F _{14,44} =7,67; P=0,0001		F _{14,44} =7,67; P=0,0001		F _{14,44} =7,70; P=0,0001		F _{14,44} = 39,25; P=0,0001	
Tampão	58,66 ± 14,04 a		4,88 ± 1,17a		100,00 ± 2,24 a		100,00 ± 02,22 cdef	
Cafeína 24,00 mg/mL	0,00 ± 0,00 b		0,00 ± 0,00 b		0,00 ± 0,00 d		0,00 ± 0,00 h	
Solvente	68,00 ± 10,58 a		5,66 ± 0,88 a		90,06 ± 01,81 ab		102,90 ± 01,88 cde	
GS1 5,00 mg/mL	50,66 ± 4,61 a		4,22 ± 0,38 a		40,33 ± 01,15 cd		155,89 ± 00,31 bc	
GS1 2,50 mg/mL	62,66 ± 12,85 a		5,22 ± 1,07 a		39,35 ± 00,12 cd		34,95 ± 00,12 fgh	
GS1 1,25 mg/mL	64,00 ± 18,33 a		5,33 ± 1,52 a		47,43 ± 00,54 bcd		42,12 ± 00,54 fgh	
GS2 5,00 mg/mL	57,33 ± 8,32 a		4,77 ± 0,69 a		47,78 ± 02,47 bcd		217,66 ± 00,57 ab	
GS2 2,50 mg/mL	69,33 ± 2,30 a		5,77 ± 0,19 a		45,42 ± 02,55 bcd		262,79 ± 00,53 a	
GS2 1,25 mg/mL	65,33 ± 2,30 a		5,44 ± 0,19 a		57,09 ± 03,23 abc		231,94 ± 00,74 a	
GS3 5,00 mg/mL	68,00 ± 10,58 a		5,66 ± 0,88 a		70,25 ± 01,16 abc		62,39 ± 01,16 efgh	
GS3 2,50 mg/mL	70,66 ± 4,61 a		5,88 ± 0,38 a		72,90 ± 00,84 abc		64,74 ± 00,84 efgh	
GS3 1,25 mg/mL	68,00 ± 20,00 a		5,66 ± 1,66 a		92,09 ± 01,14 ab		81,78 ± 01,14 defg	
GS4 5,00 mg/mL	60,00 ± 14,42 a		5,00 ± 1,20 a		36,18 ± 00,51 cd		32,13 ± 00,51 gh	
GS4 2,50 mg/mL	70,66 ± 11,54 a		5,88 ± 0,96 a		71,85 ± 01,78 abc		92,77 ± 01,65 cdefg	
GS4 1,25 mg/mL	73,33 ± 8,32 a		6,11 ± 0,69 a		78,93 ± 00,56 abc		130,99 ± 01,39 cd	

(*) IVG: índice de velocidade de germinação calculado segundo Maguire (1962). As médias ± desvio padrão seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 34. Efeito dos extratos de caule emerso de *Gomphrena elegans* sobre a germinação, IVG^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de *Lactuca sativa*

Tratamento	Germinação (%)		IVG		Hipocótilo (%)		Raiz primária (%)	
	F _{14,44} =21,47; P=0,0001		F _{14,44} =21,47; P=0,0001		F _{14,44} =745; P=0,0001		F _{14,44} =25,93; P=0,0001	
Tampão	93,33 ± 2,30 a		7,77 ± 0,19 a		100,00 ± 02,08 a		100,00 ± 01,25 bcd	
Caféina 24,00 mg/mL	0,00 ± 0,00 c		0,00 ± 0,00 c		0,00 ± 00,00 d		0,00 ± 00,00 h	
Solvente	89,33 ± 6,11 a		7,44 ± 0,50 a		92,41 ± 02,36 ab		102,90 ± 01,98 bcd	
GA1 5,00 mg/mL	54,66 ± 14,04 b		4,55 ± 1,17 b		36,93 ± 01,96 cd		50,18 ± 00,39 fg	
GA1 2,50 mg/mL	76,00 ± 18,33 ab		6,33 ± 1,52 ab		44,35 ± 00,43 cd		106,25 ± 00,19 bcd	
GA1 1,25 mg/mL	90,66 ± 10,06 a		7,55 ± 0,83 a		57,56 ± 03,15 abc		167,07 ± 00,66 a	
GA2 5,00 mg/mL	73,33 ± 12,85 ab		6,11 ± 1,07 ab		39,67 ± 02,10 cd		90,53 ± 00,20 cdef	
GA2 2,50 mg/mL	77,33 ± 6,11 ab		6,44 ± 0,50 ab		49,53 ± 00,84 bc		137,68 ± 00,13 ab	
GA2 1,25 mg/mL	84,00 ± 12,00 a		7,00 ± 1,00 a		50,47 ± 01,00 bc		124,01 ± 00,57 bc	
GA3 5,00 mg/mL	85,33 ± 10,06 a		7,11 ± 0,83 a		71,29 ± 00,69 abc		77,23 ± 00,92 defg	
GA3 2,50 mg/mL	93,33 ± 4,61 a		7,77 ± 0,38 a		63,71 ± 00,94 abc		82,42 ± 01,01 defg	
GA3 1,25 mg/mL	96,00 ± 6,92 a		8,00 ± 0,57 a		67,06 ± 01,82 abc		88,33 ± 00,94 gdef	
GA4 5,00 mg/mL	93,33 ± 6,11 a		7,77 ± 0,50 a		58,54 ± 02,33 abc		44,21 ± 01,06 g	
GA4 2,50 mg/mL	97,33 ± 2,30 a		8,11 ± 0,19 a		58,33 ± 02,85 abc		57,66 ± 00,41 efg	
GA4 1,25 mg/mL	92,00 ± 6,92 a		7,66 ± 0,57 a		65,88 ± 02,98 abc		97,80 ± 01,09 bcde	

(*) IVG: índice de velocidade de germinação calculado segundo Maguire (1962). As médias ± desvio padrão seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 35. Efeito do sal inorgânico (KNO₃) obtidos de *G. elegans* sobre a germinação, IVG^(*) e crescimento de hipocótilos e raízes primárias de *Lactuca sativa*

Tratamento	Germinação (%)		IVG	Hipocótilo (%)	Raiz primária (%)
	F _{5,17} =31,47; P=0,0001			F _{5,17} =9,45; P=0,0001	F _{5,17} =213,93; P=0,0001
Tampão	96,74 ± 1,20 a		7,77 ± 0,19 a	100,00 ± 02,08 a	100,00 ± 01,25 a
Cafeína 24,00 mg/mL	0,00 ± 0,00 b		0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 00,00 b	0,00 ± 00,00 b
Solvente	89,33 ± 6,11 c		7,44 ± 0,50 c	92,41 ± 02,36 c	102,90 ± 01,98 a
KNO ₃ 5,00 mg/mL	0,00 ± 0,00 b		0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 00,00 b	0,00 ± 00,00 b
KNO ₃ 2,50 mg/mL	79,39 ± 18,33 dc		4,34 ± 2,51 d	34,35 ± 00,43 d	6,25 ± 00,19 c
KNO ₃ 1,25 mg/mL	90,24 ± 10,06 a		3,95 ± 1,83 ed	59,56 ± 03,15 e	7,07 ± 00,66 dc

(*) IVG: índice de velocidade de germinação calculado segundo Maguire (1962). As médias ± desvio padrão seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

4.9 Bioensaios para verificação da atividade antitumoral

Dos 16 extratos testados de *G. elegans*, dois apresentaram citotoxicidade considerável, sendo eles, GF1 e GF4 (Tabela 36), apresentando atividade citotóxica acima de 75%.

Algumas espécies da família Amaranthaceae estão sendo investigados por possuírem diversas propriedades biológicas. Atividade antitumoral contra melanomas foi detectado em *Pfaffia paniculata* (TAKEMOTO et al., 1983), outros trabalhos descrevem a presença de atividade antitumoral no gênero *Gomphrena* possivelmente associados à produção de saponinas e fitoecdisteroides (POMILIO et al,1992; YOUNG et al,1997; SAVCHENKO et al 1998). Essa atividade é relatadas em artigo submetido à periódico especializado conforme anexo A

Tabela 36. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos de *Gomphrena elegans* contra linhagens de células medido pelo ensaio MTT^a

Amostra	Linhagens de células ^b IC ₅₀ (µg/mL)		
	SF-295	HCT-8	MDA-MB-435
GA1	24,38	12,74	24,38
GA2	9,78	79,08	9,78
GA3	16,43	15,49	16,43
GA4	18,38	26,90	18,38
GS1	14,47	11,61	5,69
GS2	19,33	16,89	0,33
GS3	31,00	11,28	23,74
GS4	22,00	-0,06	47,35
GR1	22,47	16,85	13,96
GR2	19,20	16,11	19,51
GR3	1,13	9,01	11,90
GR4	3,80	3,57	3,11
GF1	96,35	101,16	96,35
GF2	23,60	11,90	-14,29
GF3	11,53	0,43	33,80
GF4	97,39	99,68	97,39
Doxorubicina	87,79	101,40	90,92

^a Resultados apresentados pela media das triplicatas, ^bSF-295 (glioblastoma); HCT-8 (cancer de colón humano) and MDA-MB-435 (melanoma),

4.10 Bioensaios para verificação da atividade Inseticida sobre *Sitophilus zeamais* Mots, (Coleoptera: Curculionidae)

Nos testes de atividade inseticida sobre *Sitophilus zeamais* verificou-se que até o quinto dia, nenhum dos extratos mostrou efeito de mortalidade significativa sobre os indivíduos testados, (Tabela 37). Somente a partir do décimo dia o efeito de mortalidade pode ser observado. Destacaram-se os extratos aquosos, os quais provocaram mortalidade superior a 35%, sendo que os extratos GA4 e GF4 causaram mais de 50% de mortalidade. Os extratos clorofórmicos também causaram efeito inseticida moderado; GA2 causou 40,5% de mortalidade no décimo dia seguido do extrato GR2 com 32% de mortalidade. Os extratos metanólicos não provocaram efeitos deletérios significativos no decorrer dos dez dias.

Conforme relatado por Souza et al. (2008), cujo artigo sou colaborador e faz parte desta pesquisa (Anexo B) juntamente com outro artigo aceito (Anexo C), atividade semelhante foi obtida com extratos de caule de *G. elegans*, que conduziram a taxas de mortalidades de 36% a 46,5% após o décimo dia de estudo. É também relatado por Saito et al. (2004) a existência de saponinas e cumarinas em folhas de *G. elegans*, Cumarinas possuem efeito inseticida similar a rotenona, causando o bloqueio do transporte de elétrons durante o processo respiratório (NICHOLSON et al, 1995), Dadang e Oshawa (2001) testaram a atividade inseticida de extratos de *Gomphrena globosa* (L.), sobre *Plutella xylostella* (L.) e *Crociodolomia binotalis* (Zeller) e observaram uma redução significativa nas larvas viáveis de ambas as espécies de insetos. Os mesmos extratos quando aplicados sobre plantas atacadas reduziram com grande eficiência sua infestação, tendo se mostrado mais potentes do que inseticida comercial.

Tabela 37. Efeitos inseticidas de extratos de *Gomphrena elegans* sobre adultos de *Sitophilus zeamais*

Tratamentos (extratos)	Efeito inseticida sobre adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	
	Taxa de mortalidade ¹ (% $\pm$ DP)	
	5 ^o dia	10 ^o dia
Teste 1 ($F_{4,49}=18,61$, $P=0,0001$)		
Controle	0,00 $\pm$ 0,00 b	1,50 $\pm$ 0,48 b
GS4	14,50 $\pm$ 3,21 ab	41,00 $\pm$ 3,25 a
GA4	12,50 $\pm$ 4,00 ab	50,50 $\pm$ 3,03 a
GR4	5,50 $\pm$ 0,99 b	39,50 $\pm$ 4,35 a
GF4	22,00 $\pm$ 3,53 a	50,50 $\pm$ 2,92 a
Teste 2 ($F_{4,49}=10,24$, $P=0,0001$)		
Controle	1,00 $\pm$ 0,42 b	1,00 $\pm$ 0,42 c
GS2	16,50 $\pm$ 02,11 a	25,00 $\pm$ 3,39 b
GA2	14,50 $\pm$ 01,52 a	40,50 $\pm$ 4,50 a
GR2	9,00 $\pm$ 01,13 ab	32,00 $\pm$ 4,27 ab
GF2	9,50 $\pm$ 01,66 ab	23,50 $\pm$ 2,16 b
Teste 3 ($F_{4,49}=9,77$, $P=0,0001$)		
Controle	1,00 $\pm$ 0,42 c	1,00 $\pm$ 0,42 d
GS1	11,50 $\pm$ 2,86 b	19,50 $\pm$ 2,18 c
GA1	23,00 $\pm$ 1,95 a	25,00 $\pm$ 2,26 b
GR1	6,00 $\pm$ 1,22 c	23,00 $\pm$ 2,36 bc
GF1	20,00 $\pm$ 2,82 a	32,50 $\pm$ 3,20 a
Teste 4 ($F_{4,49}=1,66$, $P=0,0001$)		
Controle	1,00 $\pm$ 0,42a	1,50 $\pm$ 0,67 c
GS3	1,00 $\pm$ 0,42 a	1,50 $\pm$ 0,67 c
GA3	1,50 $\pm$ 0,48a	7,00 $\pm$ 2,27 a
GR3	0,00 $\pm$ 0,00a	5,00 $\pm$ 1,63 b
GF3	1,00 $\pm$ 0,42 a	2,50 $\pm$ 1,26 c

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferiram uma da outra pelo teste de Tukey em 5% de significância,* Controle.

4.11 Bioensaios para verificação da atividade Inseticida sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

Os extratos de *G. elegans* não foram ativos sobre larvas de *Aedes aegypti*, os resultados não diferiram daqueles obtidos no controle positivo com DMSO (Tabela 38).

Tabela 38. Efeitos inseticidas de extratos de *Gomphrena elegans* sobre *Aedes aegypti*

Tratamento (extratos)	Efeito inseticida sobre larvas de <i>Aedes aegypti</i>		
	Mortalidade ¹ (% $\pm$ DP)		
	24 h	48 h	72 h
Teste ($F_{17,143} = 2,47$; $P = 0,0001$)			
DMSO	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
Controle	100,00 $\pm$ 0,00 a*	-	-
GS4	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GA4	2,40 $\pm$ 1,57b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GR4	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GF4	2,40 $\pm$ 1,57 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GS2	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GA2	5,00 $\pm$ 1,22 b	6,70 $\pm$ 1,56 b	2,50 $\pm$ 1,78 b
GR2	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GF2	2,00 $\pm$ 1,47 b	3,70 $\pm$ 1,37 b	1,30 $\pm$ 0,53 b
GS1	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GA1	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GR1	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GF1	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GS3	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,40 $\pm$ 0,32 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GA3	6,00 $\pm$ 1,43 b	1,20 $\pm$ 0,51 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GR3	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b	0,00 $\pm$ 0,00 b
GF3	1,00 $\pm$ 0,48 b	1,20 $\pm$ 0,51 b	0,00 $\pm$ 0,00 b

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferiram uma da outra pelo teste de Tukey em 5% de significância.* Controle=Bt; DP =desvio padrão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ A utilização de um planejamento de experimentos possibilitou a determinação da melhor condição de extração dos compostos orgânicos da *G. elegans*. As condições mais favoráveis, entre as estudadas para extração por ultrassom, foram: solvente de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, metanol e água) [SHCMA], com tempo total de 120 minutos de extração, temperatura ambiente e usando-se 1,0 g de amostra para 100 mL de solvente. A eficiência da extração utilizando-se a técnica de ultrassom tem ainda como vantagens a alta repetitividade, a possibilidade de utilização de vários tamanhos de amostra, a rapidez de processamento da amostra e o baixo custo.
- ✓ O estudo fitoquímico dos extratos hexânicos, clorofórmico, metanólico e aquoso, das folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia de *G. elegans* efetuado na primeira coleta (Col1), resultou a identificação de 54 substâncias naturais pertencentes a classes distintas.
 - A partir de análises por CG-EM, através da co-injeção de padrões de *n*-alcanos, da comparação dos índices de retenção calculados pelo índice de Kovats experimental com aqueles publicados em literatura e pela similaridade dos espectros de massas dos extratos hexânicos, obtidos das folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia foram identificadas 37 substâncias sendo: 14 alcanos, 7 alcenos, 8 ésteres, 1 aromático, 4 terpenos (oxigenados e não), 1 álcool e 2 cetonas. As ceras epicuticulares encontram-se na superfície dos órgãos aéreos das plantas e são usualmente compostas por misturas de longas cadeias alifáticas de *n*-alcanos, ésteres, aldeídos, cetonas, alcoóis e ácidos. Ceras são importantes por que repelem água e controlam o balanço de gás entre a planta e o meio ambiente, outra possível função é de

proteger as células da epiderme contra feridas e inibição de fungos ou ataque de insetos.

- Do estudo da primeira coleta (Col1) realizado com os extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos obtidos a partir de folhas, caule aéreo, caule submerso e raiz adventícia de *G. elegans* foram isoladas, 20 substâncias sendo 3 já identificadas nos extratos hexânicos. As substâncias compreendem diferentes classes sendo elas: esteróides, terpenos (triterpeno e diterpeno), ésteres, ácido, alcalóides e compostos da classe C₆-C₁ e C₆-C₃.
- ✓ De acordo com o descrito na literatura (MUSSURY et al., 2006), *G. elegans* apresenta em sua composição oxalato, mas não foi detectado nesse estudo tal substância, o que foi detectado, isolado e identificado estando presente em todos os órgãos estudados foi o sal KNO₃ em grande quantidade, sendo ele considerado a substância majoritária na espécie *G. elegans*.
- ✓ Os estudos biológicos realizados com os extratos da Col1, onde foram avaliadas através de ensaios das atividades antineoplásica, atividade alelopática, atividade inseticida e bioautografia permitiram observar:
 - No estudo antifúngico somente os extratos GA4, GS4, GR4 e GF4 exibiram atividade forte, na concentração de 100 µg, frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*. Nesse caso a atividade pode ser justificada pela presença das bases nitrogenadas presentes nesses extratos como é relatado por Guiraud et. al., (1994).
 - No estudo alelopático frente à germinação, somente os extratos GA1, GF1 apresentaram inibição moderada de germinação e o sal KNO₃ *apresentou uma forte inibição* de germinação podendo explicar assim o alto desempenho da *G. elegans*, quanto a capacidade de sobrevivência e reprodução, competindo com

sucesso com outras espécies aquáticas, Segundo Miller (1996), heterotoxicidade ocorre quando substâncias fitotóxicas são liberadas pela lixiviação, exsudação e decomposição de resíduos de uma espécie sobre a outra impedindo a germinação de suas sementes e o seu crescimento.

- No ensaio de citotoxicidade, apesar dos resultados não serem promissores quanto ao emprego farmacológico dos extratos, eles mostraram que os extratos GA1 e GF4 apresentaram atividade forte.
- No ensaio de atividade inseticida sobre larvas de *Aedes aegypti*, os extratos não apresentaram nenhuma atividade. Já sobre *Sitophilus zeamais*, os extratos GA2, GA4, GR2 e GF4 apresentaram atividade moderada após o décimo dia.
- ✓ Apesar de todas as substâncias identificadas e isoladas serem conhecidas, nenhuma havia ainda sido descrita na espécie *G. elegans*.
- ✓ A análise dos componentes ao longo das diferentes estações demonstrou que os rendimentos dos extratos apresentaram uma variação significativa em função das diferenças climáticas neste período.
- ✓ Quanto a composição química, quando se analisou por CG-EM os perfis dos extratos de GF1, GA1, GS1 e GR1 das três coletas ficou evidenciado que os extratos GF1, GA1, GS1 e GR1 de Col2 e Col3 possuem uma composição química mais rica de esteróides e triterpenos em relação aos extratos da Col1, apresentando uma variação qualitativa significativa na região das substâncias menos voláteis (100 – 130 min). Vale ressaltar que foi detectada a presença da substância ftalato de diisobutila (**12**) nas três coletas.
- ✓ Ao se analisar, através da comparação dos tempos de retenção, os sinais cromatográficos observados dos extratos clorofórmio, metanólico e aquoso dos órgãos provenientes das três coletas de *G. elegans*,

através do experimento por, CLAE-AFD nas condições de: gradiente de eluição exploratório para os extratos clorofórmicos: MeOH:H₂O acidificado com ácido acético 1%, 40:60 (5 min), 60:60 (5min), 70:80 (5 min), 80:100 (5 min), 100:0 (20 min), e para os extratos metanólicos e aquoso com o gradiente de eluição exploratório: MeOH:H₂O acidificado com ácido acético 1%, 5:95 (5 min), 5:40 (25 min), 40:60 (30 min), 60:100 (10 min), 100:0 (20 min), foi observado que os tempos de retenção relacionadas com os espectros de ultravioleta das substâncias, presentes, confirmaram existirem pequenas diferenças em relação à produção de metabolitos pela espécie nos diferentes períodos de coleta. Foram observadas algumas substâncias presentes nos extratos metanólicos que também estão presentes nos extratos aquosos, principalmente os de alta polaridade. Já os extratos clorofórmicos, apresentam bastante similaridade com relação à presença de substâncias de baixa polaridade. Foi notada, diferença apenas entre as concentrações, confirmando que independentemente do tempo de coleta realizada os órgãos apresentam as mesmas substâncias com diferentes concentrações quando avaliadas pela intensidade de absorção.

- ✓ A análise comparativa do perfil cromatográfico permitiu sugerir que as partes da planta apresentam perfis com certa similaridade nos períodos analisados.
- ✓ Portanto, os estudos desse trabalho constituem-se em um ponto de partida para outros, que poderão auxiliar na compreensão sobre a ocorrência, distribuição, regulação da biossíntese bem como para a realização de estudos quimiossistemáticos da espécie *Gomphrena elegans*.

REFERÊNCIAS

- AN, M.; JOHNSON, I. R.; LOVETT, J. V. Mathematical modeling of allelopathy: biological response to allelochemicals and its interpretation. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n.10, p. 2379-2389, 1993.
- ANDRÉ, A. C. G. M.; DIAS, D. A.; PEREIRA, P. S.; ABREU, L. C. P.; FRANÇA, S. C. Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta in natura de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmagnosia**, v. 13, p. 22-24, 2003. Suppl. 2.
- AQUILA, M. E. A.; UNGARETTI, J. A. C.; MICHELIN, A. Preliminary observation on allelopathic activity in *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Acta Horticulturae**, v. 502, n. 1, p. 383-388, 1999.
- ARDREY, R. E. **Liquid chromatography-mass spectrometry**: an introduction. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.
- BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2002. 377 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1999. 399 p.
- BUCHI, G.; POPPER, T. L.; SAUFFACHER, D. Terpenes. XIV. The structure of valerenic acid. **Journal of American Chemical Society**, v. 82, n. 11, p. 2962-2963, 1960.
- CAI, Y.; SUM, M.; WU, H.; HUANG, R.; CORKE, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 2063-2070, 1998.
- CARVALHO, M. S. L.; CALDAS, E. D. C.; DEGALLIER, N.; VILARINHOS, P. T. R.; SOUZA, L. C. K. R.; YOSHIKAWA, M. A. C.; KNOX, M. B.; OLIVEIRA, C. Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to the insecticide temephos in the Federal District, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 5, p. 623-629, 2004.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CIOLA, R. **Introdução à cromatografia em fase gasosa**. São Paulo: Ed. USP, 1973. 231 p.
- COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia**. 3. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1988. 236 p.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006. 453 p.

CORDELL, G. A. Natural products as medicinal and biological agents: potentiating the resources of the rain forest. In: SEID, P. R.; GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, A. C. (Ed.). **Chemistry of Amazon**. Washington: American Chemical Society, 1995. v. 588, cap. 2, p. 8-18.

CROTEAU, R.; KUTCHA, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUÍSSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: America Society of Plant Physiologist, 2000. Cap. 24, p. 1250-1317.

DADANG, S.; OHSAWA, K. Efficacy of plant extracts for reducing larval populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) and cabbage webworm, *Crociodolomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), and evaluation of cabbage damage. **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, n. 1, p. 143-149, 2001.

DE SANT'ANA, P. J. P. **Bioprospecção no Brasil**: contribuições para uma gestão ética. Brasília: Paralelo 15, 2002. 335 p.

DICTIONARY of natural products. Version 7: 2. London: Chapman & Hall, 1999. 1 CD-ROM.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.

DIXON, R. A.; STRACK, D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 815-816, 2003.

DOBREMEZ, J. F.; GALLET, C.; PELISSIER, F. Guerre chimique chez les végétaux. **La Recherche**, v. 279, n. 26, p. 912-920, 1995.

DOBSON, A. P. **Conservation and biodiversity**. New York: Scientific American Library, 1996. 264 p.

EDWARDS, D. I. **Chromatography**: principles and techniques. London: Butterworths, 1970. 83 p.

FERREIRA, E. O.; DIAS, D. A. Phytochemical investigation of *Gomphrena claussenii* moq. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 9, p. 823-827, 2004.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plants metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 347-354, 2005.

GOULART, M. O. F.; SANTT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos diterpenos Jatofolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

- GRANJA, A. F.; BARROS, P.; VARELLA, M. D. Acesso a recursos genéticos, transferência de tecnologia e bioprospecção. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 42, n. 2, p. 81-89, 1999.
- GREGÓRIO, G.; ALBANO, O.; MARQUES, L. C.; AYALA, S.; CARVALHO, J. E.; COZZOLINO, S.; YARIWAKE, J. H. Soyfemme a isoflavona contra o climatério. **Phytociência**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2006.
- GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS TAKAKI, G. M.; SEIGLE-MURANDI, E.; SIMEON, B. M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone. **Planta Medica**, v. 60, n. 4, p. 373, 1994.
- HANDRO, W. Contribuição ao estudo da venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 36, n. 4, p. 479-499, 1964.
- HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 5, p. 196-198, 1999.
- HOMANS, A. L.; FUCHS, A. J. Direct bioautography on thin-layer chromatograms for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography A**, v. 51, p. 327-329, 1970.
- JAMES, C. S. **Analytical chemistry of foods**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 178 p.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; ETEVENS, P. F.; DONEGHUE, M. J. **Plant systematics. A Phylogenetic approach**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002. 576 p.
- JUNKUSZEW, M.; OLESZEK, W.; JURZYSTA, M.; PIANCENTE, S.; PIZZA, C. Triterpenoid saponins from the seeds of *Amaranthus cruentus*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 195-198, 1998.
- KURODA, M.; AOSHIMA, T.; HARAGUCHI, M.; YOUNG, M. C. M.; SAKAGAMI, H.; MIMAKI, Y. Oleanane and taraxerane glycosides from the roots of *Gomphrena macrocephala*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1606-1610, 2006.
- LAMONTAGNE, B.; SEMOND, F.; ROY, D. X-ray photoelectron spectroscopic study of Si(111) oxidation promoted by potassium multilayers under low O_2 pressures. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 73, n. 1, p. 81-88, 1995.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 4. ed. São Carlos: Rima, 2004. 93 p.
- LEÓN, B.; MONSALVE, C.; SAGÁSTEGUI, A.; SÁNCHEZ, I. Amaranthaceae endémicas del Perú. **Revista Peruana de Biología**, v. 13, n. 2, p. 31-32, 2006.

- LINO, C. M.; TANAKA, M. O.; SCREMIN-DIAS, E. Resposta de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) à perturbação: subsídio para manejo no Rio Sucuri, Bonito, MS. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 6., 2003, Fortaleza. **Anais ...** Fortaleza: Expressão Gráfica, 2003, p. 32.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000. 624 p.
- LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAGALHÃES, H. G.; MONTEIRO, N. H.; OLIVEIRA, B. A. D. de; GIL, F. S.; GUIMARÃES, L. A. de S.; WIGG, M. D. Contribuição ao conhecimento de plantas medicinais brasileiras: *Gomphrena officinalis*, Mart. – Amaranthaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 64, n. 1, p.17-31, 1986.
- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MAHMOUD, T. S. **Estudo químico da casca do caule de um espécime de *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae) que ocorre no Pantanal – MS**. 2005. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2005. v. 1.
- MARASCHIN-SILVA, F. M.; AQÜILA, M. E. A. Contribuição ao estudo do potencial alelopático de espécies nativas. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 547-555, 2006.
- MARTIN-TANGUY, J.; CABANNE, F.; PERDRIZET, E.; MARTIN, C. The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. **Phytochemistry**, v. 17, n. 11, p.1927-1928, 1978.
- MILLER, D. A. Allelopathy in forage crop systems. **Agronomy Journal**, v. 88, n. 6, p. 854-859, 1996.
- MUSSURY, R. M.; SCALON, S. P. Q.; GOMES, A. A.; BARROS, S. S. U. Characterization of seedlings morphology and anatomy of *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 87-93, 2006.
- NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. Pfaffosides, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1703-1705, 1984.

- NEFEDOV, V. I.; YA, V.; LEONHARDT, G.; SCHEIBE, R. A comparison of different spectrometers and charge corrections used in X-ray photoelectron spectroscopy. **Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena**, v. 10, n. 2, p. 121-124, 1977.
- NICHOLSON, R. A.; ZHANG, A.; SURNAGIN, B. Insecticidal properties and mechanisms underlying its transmitter releasing action in nerve terminal fractions isolated from mammalian brain. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 3, p. 152-163, 1995.
- NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. Pfsfosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 1, p. 139-142, 1984.
- NISHIMOTO, N.; SHIOBARA, Y.; FUJINO, M.; INOUE, S-S.; TAKEMOTO, T.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G.; TANAKA, O.; KASAI, R.; MATSUURA, H. Ecdysteroids from *Pfaffia iserinoides* and reassignment of some ¹³C NMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2505-2507, 1987.
- OHSAWA, D.; OHSAWA, K. Efficacy of plant extracts for reducing larval populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) and cabbage webworm, *Crocicidolomia binotalis* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), and evaluation of cabbage damage. **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, n.1, p. 143-149, Mar. 2001.
- PAIVA, S. R.; FONTOURA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R. Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbagniaceae: *Plumbago scandens* L. e *Plumbago auriculata* LAM. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 717-721, 2002.
- PALMA, M. S.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. Biodiversidade: preservação e bioprospecção. **Revista Com Ciência**, n. 21, p. 1-5, 2001.
- PECSOK, R. L.; SHIELDS, L. D. **Modern methods of chemical analysis**. Nova York: John Wiley & Sons, 1968. 480 p.
- POMILIO, A. B.; BUSCHI, C. A.; TOMES, C. N.; VIALE, A. A. Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 155-161, 1992.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 320 p.
- POTT, V. J.; POTT, A. Subsídio à conservação da vegetação aquática dos rios de Bonito, MS – Caso do rio Sucuri. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICO DO PANTANAL, 3., 2000, Corumbá. **Anais...** Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 2000a. 12 p.
- POTT, V. J.; POTT, A. Distribuição de macrófitas aquáticas no Pantanal. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICO DO PANTANAL, 3., 2000, Corumbá. **Anais...** Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 2000b. 26 p.

- POUCHERT, C. J.; BEHKE, J. **The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra**. Milwaukee: Aldrich Chemical Company, 1993. v. 2.
- PUTNAM, A. R.; TANG, C. S. Allelopathy state of the science. In: _____. **The science of allelopathy**. New York: John Wiley & Sons Putnam, 1986. Cap. 1, p. 1-19.
- RAO, G. N.; KUMAR, P. M.; DHANDAPANI, V. S.; KRISHNA, T. R.; HAYASHI, T. Constituents of *Cassia auriculata*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 82-83, 2000.
- REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.
- ROBARDS, K. Strategies for the determinations of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1/2, p. 657-691, 2003.
- SALVADOR, M. J.; PERREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; CANDIDO, R. C.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adult plants extracts from *Althernanthera marítima* (Amaranthaceae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 131-136, 2004.
- SAVCHENKO, T.; WHITING, P.; SARKER, S. D.; DINAN, L. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 26, n. 3, p. 337-346, 1998.
- SCREMIN-DIAS, E.; POTT, V. J.; HORA, R. C.; SOUZA, P. R. **Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região**. Campo Grande: Ed. UFMS, 1999. 160 p.
- SCHÜTZ, K.; KAMMERER, D.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4090-4096, 2004.
- SAITO, M. L.; POTT, A.; FERRAZ, J. M. G.; NASCIMENTO, R. S. **Avaliação da atividade inseticida em espécies de plantas do pantanal matogrossense**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 19 p.
- SHARAPIN, N.; ROCHA, L. M.; CARVALHO, E. S.; SANTOS, E. W. M.; ALBURQUERQUE, E. M. R. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santa-fé de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento, 2000. 248 p.
- SHIOBARA, Y.; INOUE, S. S.; KATO, K.; NISHIGUCHI, Y.; OISHI, Y.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1527-1530, 1993.

SHIOBARA, Y.; INOUE, S. S.; NISHIGUCHI, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; OLIVEIRA, F. de; AKISUE, G.; AKISUE, M. K.; HASHIMOTO, G. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*, **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1737-1740, 1992.

SILVA, A. L. **Análise química de espécies de Valeriana Brasileiras**. 2009. 205 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SILVA, A. L.; RECH, S.; VON POSER, G. L. Quantitative determination of valepotriates from *Valeriana* native to South Brazil. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 570-572, 2002.

SILVA, V. C. **Estudos químico e biológico de espécie de Rubiaceae**. 2007. 330 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SIQUEIRA, J. C. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) nos cerrados do Brasil. **Acta Biologica Leopoldinensia**, v. 6, n. 2, p. 183-194. 1984.

SIQUEIRA, J. C. Importância alimentícia e medicinal das amarantáceas do Brasil. **Acta Biológica Leopoldinensia**, v. 9, n. 1, p. 99-110, 1987.

SIQUEIRA, J. C. Flora do Estado de Goiás. In: _____ RIZZO, J. A. **Amaranthaceae**. Goiânia: Ed. UFG, 1989. v. 12, p. 1-44.

SIQUEIRA, J. C. O gênero *Gomphrena* L. (Amaranthaceae) no Brasil. **Pesquisas – Botânica**, v. 43, p. 5197. 1992.

SIQUEIRA, J. C. Amaranthaceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G., GIULIETTI, A. M. (Org.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP-HUCITEC, 2002. v. 2, p. 11-30.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NUMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. The analysis of real samples. In: _____. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996. Cap. 31, p. 725-735.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

SOARES, L. V. **Curso básico de instrumentação para analistas de alimentos e fármacos**. Barueri: Manole, 2006. 337 p.

SOUZA, A. P.; MARQUES, M. R.; MAHMOUD, T. S.; CAPUTO, B. A.; CANHETE, G. M.; LEITE, C. B. Bioprospecting insecticidal compounds from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 1136-1140, 2008.

- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias dos Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. 640 p.
- SUÁREZ, B.; PICINELLI, A.; MANGAS, J. J. Solid-phase extraction and highperformance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders. **Journal of Chromatography A**, v. 727, n. 2, p. 203-209, 1996.
- SUN, B.; LEANDRO, C.; SILVA, J. M. R.; SPRANGER, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1390-1396, 1998.
- TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; ADA, S. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 10, p. 1057-1060, 1983.
- TREUTTER, D. Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various *Prunus* tissues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 436, n. 1, p. 490-496, 1988.
- YOUNG, M. C. M.; POTOMATI, A.; CHU, E. P.; HARAGUCHI, M.; YAMAMOTO, M.; KAWANO, T. ¹³C NMR analysis of monodesmosidic saponins from *Gomphrena macrocephala*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1267-1270, 1997.
- WELLUM, D. A.; KIRBY, W. High-performance liquid chromatographic assay for teaflavins. **Journal of Chromatography A**, v. 206, n. 2, p. 400-406, 1981.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert committee on resistance of vectors and reservoirs of diseases to pesticides**: instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva, 1980. 82 p.

ANEXOS

ANEXO A

In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts

Talal Suleiman Mahmoud^{1*}, Maria Rita Marques², Cláudia do Ó Pessoa³, Leticia V. C. Lotufo³, Hemerson I. F. Magalhães³, Manoel O. de Moraes³, Dênis P. de Lima⁴, Aristeu G. Tininis⁵, José Eduardo de Oliveira¹

¹ Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Rua Francisco Degni, s/n CP 355, CEP 14801-970 - Araraquara - SP, Brazil

² Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Laboratório de Bioquímica Vegetal (CCBS), CEP 79070-900 - Campo Grande-MS, Brazil

³ Universidade Federal do Ceará, Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, CEP 60431-970 – Fortaleza-CE, Brazil

⁴ Fundação Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Departamento de Química- SINTMOLB-LP4 (CCET), CEP 79070-900 - Campo Grande-MS, Brazil

⁵ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Campus de Sertãozinho. Rua Eugênio Tonieelo, s/n, CEP14169-150 – Sertãozinho - SP - Brazil

*Corresponding author: Av. Filinto Müller, 1555 - Departamento de Química (CCET) - Laboratório de Pesquisa 4 - LP-4 - CEP: 79074-460 - Campo Grande – MS – Brazil Tel.: +55 67 3345 3578/3676; fax: +55 67 3345 3552. E-mail address: talalsuleiman@iq.unesp.br (Talal S. Mahmoud).

RESUMO: “Atividade citotóxica in vitro de extratos de plantas do Centro-Oeste Brasileiro.” A atividade citotóxica de extratos obtidos a partir de oito espécies de plantas nativas do Centro Oeste Brasileiro, compreendendo Cerrado, Pantanal e floresta semidecídua foi avaliada sobre as linhagens de células tumorais MDA-MB-435, SF-295, HCT-8. Foi empregada uma dose única de $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada extrato, durante 72 h de incubação para todas as células. A doxorubicina ($1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizada como controle positivo e o método do MTT foi empregado para detectar a atividade. A citotoxicidade foi observada em 30 extratos (46%) de polaridades distintas e de diferentes partes das seguintes espécies: *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), *Tapirira guianensis*, *Myracrodruon urundeuva*, *Schinus terebenthifolius* (Anacardiaceae), *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae), *Attalea phalerata* (Palmae), *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) e *Annona dioica* (Annonaceae). Estabeleceu-se altamente ativo os extratos que inibiram acima de 75% de pelo menos duas linhagens de células.

Unitermos: Plantas do Centro-oeste brasileiro, Citotoxidade, linhagens de células cancerosas

ABSTRACT: Cytotoxic activity of eight plant extracts, native from the Mid-West of Brazil comprising Cerrado, Pantanal and semideciduous forest, was evaluated for MDA-MB-435, SF-295, and HCT-8 cancer cell strains. A single $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ dose of each extract was employed with 72 h of incubation for all tests. Doxorubicin ($1\ \mu\text{g mL}^{-1}$) was used as the positive control and the MTT method was used to detect the activity. Cytotoxicity of distinct polarities was observed in 30 extracts (46%), from different parts of the following species: *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae), *Tapirira guianensis*, *Myracrodruon urundeuva*, *Schinus terebenthifolius* (Anacardiaceae), *Gomphrena elegans* (Amaranthaceae), *Attalea phalerata* (Palmae), *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) and *Annona dioica* (Annonaceae). Extracts of at least two tested cell strains were considered to be highly active since their inhibition rate was over 75%.

Keywords: Brazilian Middle-West plants, Cytotoxicity, Cancer cell lines

INTRODUCTION

Brazil is one of the few megadiversity countries in the world but investigations of its flora have barely revealed the present phytochemical diversity. The newly discovered molecules have substantial scientific, economic and social interest. Furthermore, they may contribute to the development of interactive disciplines as well as show potential industrial uses for the improvement of health and the quality of life (Braz, 1999).

In order to carry out this work, the following plant species *Tabebuia heptaphylla* (Vell.)Tol. (Bignoniaceae), *Tapirira guianensis* Aubl., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Schinus terebenthifolius* Raddi. (Anacardiaceae), *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae), *Attalea phalerata* Mart. Ex. Spreng (Palmae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) and *Annona dioica* St. Hill (Annonaceae) were selected. All species are native to the Middle-West region of Brazil and are found in Cerrado, Pantanal and the semideciduous forest biomes in the state of Mato Grosso do Sul. Their selection was mainly based upon the use of these plants in traditional medicine.

People native to the Cerrado and Pantanal regions make use of a large variety of plants for medicinal purposes. A considerable part of their acquired knowledge was received from several indigenous ethnic groups living in this region far before the colonization of South America by the Europeans (Maciel et al., 2002; Nunes et al., 2003).

EXPERIMENTAL

Plant Material and Extraction Procedure

The vegetal material was collected in March 2007. The voucher specimen was deposited at the CGMS Herbarium of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), MS, Brazil. *Gomphrena elegans* was collected in the Sucuri and Baía Bonita rivers in the Bonito district, the MS (21°15'36.4"S and 56°32'58.1"W) and voucher number CGMS 17715, *Tabebuia heptaphylla* voucher number CGMS 118999 and *Attalea phalerata* voucher number CGMS 24772 were collected in the Pantanal region, Miranda-Abobral, subregion, around the Base of Studies of the Pantanal-UFMS (19°34'37"S and 57°00'42"W), *Tapirira guianensis* voucher number CGMS

22907, *Myracrodruon urundeuva* voucher number CGMS 17659, *Schinus terebinthifolius* voucher number CGMS 22945, *Annona dioica* voucher number CGMS 17980 and *Eugenia uniflora* voucher number CGMS 25433 were collected in the Biological Reserve of the UFMS (20°30'25.5"S and 54°36'46"W).

Leaves, stems bark and heartwood collection was performed in plants with natural injury. 100 g of each vegetal material (leaves and stems) was dried under air and cut into small pieces. They were crushed on Wiley type mill and the resulting matter was extracted with ethanol during seven days with occasional stirring, followed by the filtration and concentration of the filtrate by rotaevaporation. The filtrate was placed into desiccators for dehydration. Then, it was submitted to a process of liquid-liquid partition with solvents of increasing polarities: n-hexane, dichloromethane or chloroform, ethyl acetate, n-butanol or methanol and hydroalcohol or aqueous to obtain the respective fractions. All solvents were of analytical grade.

The choice of partition methods was based on pilot-experiments for each studied species, according to adapted methodology from Cechinel Filho & Yunes (1998).

The following parts were submitted to a partition system with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and hydroalcoholic: stem bark from *Tabebuia heptaphylla*; leaves and stem bark from *Tapirira guianensis*; stem bark of *Myracrodruon urundeuva*; leaves from *Schinus terebenthifolius*; leaves from *Attalea phalerata*; and leaves and stem from *Gomphrena elegans*.. By this method, a residue containing more polar compounds – called polar fraction - is usually formed at the end of the partition process. Leaves, heartwood, stem bark, subterranean heartwood and subterranean stem bark from *Annona dioica* were submitted to partition system with hexane, chloroform, methanol and aqueous. In this method, the partition does not produce an insoluble residue. The crude extract of leaves from *Eugenia uniflora* and heartwood of *Myracrodruon urundeuva* was not submitted to partition. Therefore, only the ethanol extract of this species was tested.

The extracts and fractions obtained from each plant, along with their weight, are shown in Table 1.

Table 1.

Cytotoxicity studies

The extracts cytotoxicity was tested against HCT-8 (human colon carcinoma), SF-295 (glioblastoma) and MDA-MB-435 (melanoma) tumor cell strains (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). Cells were cultured in RPMI-1640 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin and 100 U mL^{-1} penicillin at 37 °C with 5% CO_2 . For experiments, cells were plated in 96-well plates (10^5 cells/well for adherent cells or 0.3×10^6 cells/well for suspended cells in 100 μL of medium). After 24 h, the extracts at 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, or in serial dilution dissolved in DMSO (1%) were added to each well and incubated for three days (72 h). Control groups received the same amount of DMSO. Doxorubicin (0.01–0.58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was used as positive control. Growth of tumoral cells was quantified by the ability of living cells to reduce the yellow dye 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to a blue formazan product (Mosmann, 1983; Skehan et al., 1990; Berridge et al., 1996). At the end of 72 h incubation, the medium in each well was replaced by fresh medium (200 μL) containing 0.5 mg mL^{-1} of MTT. Three hours later, the formazan product of MTT reduction was dissolved in DMSO, and absorbance was measured using a multi-plate reader (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Drug effect was quantified as the percentage of control absorbance of reduced dye at 590 nm (Zani et al., 1991; Da Silva et al., 2003; Correia et al., 2003). In our screening program to the discovery and development of potential anticancer natural compounds, we adopted the criteria of the American National Cancer Institute to consider a crude extract promising for further purification based on the IC_{50} values lower than 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Suffness & Pezzuto, 1990).

In this context, we first assessed the extracts in a single concentration of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to select those that inhibited cell growth in at least 75%. The percentage of cell growth (%G) was

calculated by comparing the absorbance of test samples with the control (100%), zero-time (0%) and the cytotoxic standard etoposide (-100%). The percentage of cell lethality was obtained by the formula $[100 \times (T-T_0) / (C-T_0)]$, where T= test, T₀= cell growth before addition of the extracts. The fractions were classified as possessing no activity (blank space), low activity (up to 50% growth inhibition), moderate activity (between 51% and 75% growth inhibition) and high activity (over 75% growth inhibition) for each cell strain tested. Through this approach, the number of “false positive” extracts assessed were reduced.

The experiments were assessed according to the Mean $\pm$ S.E.M. of percentage inhibition of cell growth using the GRAPHPAD program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA)

RESULTS AND DISCUSSION

The extracts activities are shown in Table 2. The tested cell strains were selected due to their resistance to different drugs. Samples were classified according to their cytotoxic potency as: no activity, low activity (growth inhibition ranging from 1 to 50%), moderate activity (growth inhibition ranging from 51 to 75%) and high activity (over 75%).

All analyzed species showed cytotoxic activity. Among the 65 tested extracts from eight plant species, 30 showed considerable cytotoxicity, corresponding to 46% of all extracts as follows: *Tabebuia heptaphylla*: dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol of the stem bark; *Tapirira guianensis*: all fractions of the leaves, with the exception of n-hexane; *Tapirira guianensis*: n-hexane and hydroalcohol of the stem bark; *Myracrodunon urundeuva*: ethyl acetate, n-butanol, hydroalcohol and ethanol of the stem bark; *Myracrodunon urundeuva*: ethanol of heartwood; *Schinus terebenthifolius*: ethyl acetate of the leaves; *Gomphrena elegans*: n-hexane and n-butanol of the leaves; *Attalea phalerata*: n-hexane, dichloromethane, ethyl acetate and hydroalcohol of leaves; *Eugenia uniflora*: ethanol of stem bark; *Annona dioica*: n-hexane, chloroform, methanol and aqueous of the heartwood; *Annona dioica*: n-hexane, chloroform, methanol and aqueous of the Stem bark; *Annona dioica*: n-hexane, chloroform, methanol and aqueous of the heartwood subterranean; *Annona dioica*: n-hexane, chloroform, methanol and aqueous of the stem bark

subterranean; *Annona dioica*: n-hexane, chloroform, methanol and aqueous of leaves, presented high cytotoxic activity (over 75%) .

Table 2.

By evaluating the families or the selected species one can clearly observe that they have medicinal properties.

The species *Tabebuia heptaphylla* (Bignoniaceae) is popularly known as “piúva” and is native to the Pantanal region. In traditional medicine, including indigenous people, the bark extract is used against cancer, as a stomach depurative and a bactericide (Hoehne, 1939; Pott & Pott 1994). Although we have not found any report on phytochemical analysis of the leaves and fruits, the isolation of the lignans cycloolivil and secoisolariciresinol, three lapachones, two naphthofuranes and one naphthalene derivative from the stem bark of this species have been reported previously (Schmeda-Hirschmanna & Papastergiou 2003). In the Bignoniaceae family, naphthoquinones is the principal group of secondary metabolites. There are reports dealing with the following activities for these compounds: antimalarial (Pérez & Medina, 1997), antitumor (Ueda et al., 1994), anticancer (Abbott et al., 1967), antifungal (Guiraud et al., 1988), antibacterial and anti-inflammatory (Zani et al., 1991). Among the naphthoquinones, studies performed with lapachol and beta-lapachone showed important *in vitro* antitumor activity and they were thus clinically tested by NCI (EUA) (Da Silva et al., 2003).

Tapirira guianenses (Anacardiaceae) is popularly known as “tatapiririca” or “cedroí”. People use different parts of the plant to treat diarrhoea and syphilis. The aqueous extract of the bark presents a uterus-stimulant effect (Correia et al., 2003). No published phytochemical study was found for this species.

In Brazilian traditional medicine, *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) has achieved popularity and a reputation. It is still largely used in the states of Mato Grosso do Sul (MS) and Mato Grosso (MT) by indigenous and riverside people. Properties such as anti-inflammatory and wound healing in gynecological illnesses are attributed to the plant. Its leaves are utilized to prepare

plaster casts for broken bones, and as bactericidal and first-aid medicine for snake bites. In addition, the plant is also used as an antidiarrhoeic, astringent and antisyphilis (Martins et al., 2000). Souza et al. (2006) evaluated the anti-inflammatory and antiulcer properties of the tannin-enriched fraction isolated from the stem bark of *M. urundeuva*. They disclosed that these activities are partly due to its antioxidant action, known to be linked to the presence of polyphenols, including tannins (Morais et al., 2005). Botelho et al. (2007) examined the effect of topical herbal gel from *Lippia sidoides* 0.5% (v/w) and *M. urundeuva* 5% (w/w) in experimental periodontal disease in rats showing potential as a treatment for reducing tissue lesions (Souza et al., 2006). The chalcone dimers urundeuquina A and B were isolated from the inner bark of a specimen of *M. urundeuva* (Botelho et al., 2007) together with the antioxidant compounds cicloeucalenol and cicloeucalenona (Bandeira et al., 1994).

Fruits of *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae) are spices used to increase flavor in food worldwide (Viana et al., 2003). In folk medicine, bark, leaves and fruits are used as antidiarrhoeic, astringent, anti-inflammatory, depurative, diuretic and febrifuge. The essential oils are used to treat respiratory distress (Cerks et al., 2007). Moreover, triterpenes with an inhibitory effect on phospholipase A2 were isolated from the plant and its extracts showed antibacterial, antifungal and antiradical activities (Degáspari et al., 2005; Jain et al., 1995).

It is worth mentioning that species of Anacardiaceae family are known for presenting compounds with alkyl and alkenyl groups attached to catechol, resorcinol and phenol rings. These compounds, named as phenolic lipids, show nematocidal (Velásquez et al., 2003), antioxidant (Valcic et al., 2002), antifungal, and cytotoxic activities (Queiroz et al., 2003; Davis et al., 1997; Correia et al., 2001).

Some species from the Amaranthaceae family are being investigated for their varied biological properties. Antitumor activity against melanomas was detected in *Pfaffia paniculata* (Takemoto et al., 1983), and this property was accredited to the presence of anabolic agents such as β -ecdysterone and ecdysteroids glycoside. Phytochemical studies with in the genera *Amaranthus*

account for the presence of saponins (Takemoto et al.,1983; Nishimoto et al.,1984; Oleszek et al., 1999), sapogenins (Escudero et al.,1998), rutin (Xaziev et al., 1992), steroids (Ologunde et al., 1992) and hydroxycinnamic esters of isocitric acid (Strack et al., 1987). Several works describe the antitumor activity of the genera *Gomphrena*, possibly associated to the production of saponins and phytoecdisteroids (Pomilio et al., 1994; Sarker et al., 1996; Young et al., 1997; Savchenko et al., 1998). *Gomphrena. elegans* Mart. Var. *elegans* is a herbaceous species frequently found in locations called “carandazais”, “espinheirais” (thorn scrub), “vazantes” (drainage channels), ciliar vegetation, wetlands and clayed soil. Its distribution is restricted to tropical and subtropical South America as a hygrophytic plant in fields near rivers Sucuri and Baía Bonita (Bonito-MS) [Prance & Schaller, 1982]. No phytochemical study was found for this species.

The Palmae family has special economical and ecological importance. Millions of animal species make use of palm trees not only as a source of food, but also for protection and reproduction area (Vormisto et al., 2004). A considerable number of people in the tropics depend on these plants for their daily survival. Acuri (*Attalea phalerata*), coconut palm (*Cocos nucifera*), palm kernel (*Elaeis guienensis*), date palm (*Phoenix dactylifera*), açai (*Euterpe oleraceae*), pejibaye (*Bactris gasipaes*), babassu (*Attalea speciosa*), piassava (*Attalea funifera*) and the carnauba (*Copernicia prunifera*) are some examples (Vormisto et al., 2004). The limited chemical studies of this plant family are focused on the investigation of *Cocos nucifera* biological activity . Alviano et al. (2004), detected analgesic and free radical scavenging properties in the aqueous extract of stem bark fibers. In addition, we also detected effects such as leishmanicide, antioxidant and antiviral (Mendonça et al., 2004; Kirszberg et al., 2003; Esquenazi et al., 2002) when analyzing the same extract. The *Attalea phalerata* (acuri) is a palm tree from the Pantanal region known as “acurizais” (Pott & Pott, 1994). In some areas, the fruit seems to be a key source of energy for animals (Terborgh, 1986; Guedes & Harper, 1995). It was selected because of its abundance and lack of available phytochemical data even though there is no literature register on popular medicinal use for this species.

Another promising source of bioactive compounds is the Annonaceae family comprising about 120 genera and over 2.300 species. From a phytochemistry point of view, this family is worth studying due to several types of structural compounds classes that can be found such as: alkaloids, amides, diterpenes, steroids, flavonoids and acetogenins (Pontes et al., 2004). The use of Annonaceae plants in folk medicine has been widely reported associated with varied biological activities such as antimicrobial, antiemetic, pesticide, abortive, antitumor, cytotoxic, anorexic and antimalarial (Leboeuf et al., 1982). Many of these activities are assigned to acetogenins that have been a target of intense investigation in the last years (Rupprecht et al., 1990).

Therefore, as a part of our research program on bioactive plants native to the Brazilian Mid-West region, this study aimed to perform a preliminary investigation of not fully studied vegetal species extracts in order to obtain a scaffold for more detailed chemical analysis in the future.

The good results of cytotoxic activity in wild *Tapirira guianensis*, *Attalea phalerata* and *Myracrodruon urundeuva* front cell lines tested (MDA-MB-435, HCT-8 and SF-295); clearly indicate the importance of continuing phytochemical studies aimed at identify the active compounds present in extracts.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank PROPP UFMS, FINEP and FUNDECT MS for scholarship and financial support. The authors are also in debt with all technicians of UFMS and UFC involved in this research.

REFERENCES

- Abbott BJ, Hartwell JL, Leiter J, Perdue RE JR, Schepartz SA 1967. Screening Data from the Cancer Chemotherapy National Service Center Screening Laboratories. XL. Plant Extracts. *Cancer Res.* 27:190-345.
- Alviano DS, Rodrigues KF, Leitão SG, Rodrigues ML, Matheus ME, Fernandes PD, Antonioli AR, Alviano CS 2004. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *J. of Ethnopharmacology* 92:269-273.
- Bandeira MAM, Matos FCA, Braz-Filho R 1994. New Chalconoid Dimers from *Myracrodruon urundeuva*. *Nat. Prod. Res.* 4:113-120.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4:14-19.
- Botelho MA, Rao VS, Carvalho CBM, Bezerra-Filho JG, Fonseca SGC, Vale ML, Montenegro D, Cunha F, Ribeiro RA, Brito GA 2007. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J. Ethnopharmacology* 113:471-478.
- Braz-Filho R 1999. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. *Pure Appl. Chem.* 71:1663-1972.
- Cechinel Filho V & Yunes RA 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim. Nova* 21:99-105.
- Ceruks M, Romoff P, Fávero AO, Lago JHGU 2007. Constituintes Fenólicos Polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim. Nova* 30:597-599.
- Correia SJ, David JM, David JP, Chai HB, Pezzuto JM, Cordell GA 2001. Alkyl phenols and derivatives from *Tapirira obtusa*. *Phytochemistry* 56:781-784.

- Correia SJ, David JP, David JM 2003. Constituintes das cascas de *Tapirira guianensis* (Anacardiaceae). *Quim. Nova* 26:36-38.
- Da Silva MN, Ferreira VF, De Souza MCBV 2003. An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on beta-lapachone and derivatives. *Quim. Nova* 26:407-416.
- Davis RG, Whaler KA, Rivero-Cruz, JF, Chavez D, Hernandez BB, Anaya AL, Mata R 1997. Separation and characterization of *Metopium brownei* urushiol components. *Phytochemistry* 45:1003-1008.
- Degáspari CH, Waszczynskyj N, Prado MRM 2005. Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Ciência e Agrotecnologia Lavras* 29:617-622.
- Escudero N, Mucciarelli S, Rossomando P 1998. Sapogenin from leaves of *Amaranthus cruentus*. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 17:225-228.
- Esquenazi D, Wigg MD, Miranda MMFS, Rodrigues HM, Tostes JBF, Rozental S, Da Silva A JR, Alviano CS 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res. in Microbiol.* 153:647-652.
- Guedes NMR, Harper LH 1995. Hyacinth macaws in the Pantanal. In *The large macaws: their care, breeding and conservation* (Abramson J, Speer BL, Thomsen JB, eds.), Raintree Publications, Fort Bragg, California, p.163-174.
- Guiraud M, Kindack D, Dawson BA, Ethier JC, Awang DVC, Entry AH 1988. Naphtoquinone constituents of *Tabebuia* spp. *J. Nat. Prod.* 51:1023-1024.
- Hoehne FC 1939. Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais. Graphicar, São Paulo, p. 355.
- Jain MK, Yu BZ, Rogers JM, Smith AE, Boger ET, Ostrander RL, Rheingold AL 1995. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry* 39:537-47.

- Kirszberg C, Esquenazi D, Alviano CS, Rumjanek VM 2003. The effect of a catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on lymphocytes proliferation. *Phytotherapy Res.* 17:1054-1058.
- Leboeuf M, Cavé A, Bhaumik PK, Mukerjee B, Mukherjee R 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21(12):2783-2813.
- Maciel MA, Pinto AC, Veiga-Júnior VF 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. *Quim. Nova* 25:429-438.
- Martins ER, De Castro DM, Castellani DC, Dias JE 2000. Plantas Medicinais. UFV, Viçosa, p.15.
- Mendonça RR, Rodrigues IA, Alviano DS, Santos, ALS, Soares RMA, Alviano CS, Lopes AHCS, Rosa MDSS 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Res. Microbiol.* 155:136-143.
- Morais SM, Dantas JDP, Silva ARA, Magalhães EF 2005. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Braz. J. Pharmacognosy* 15:169-177.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 16:55–63.
- Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Takemoto T, Odashima S, Kizu H, Wada Y 1984. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. *Phytochemistry* 23:139–42.
- Nunes GP, Da Silva MF, Resende UM, De Siqueira JM 2003. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Braz. J. Pharmacognosy* 13:83-92.
- Oleszek W, Junkuszew M, Stochmal A 1999. Determination and toxicity of saponins from *Amaranthus cruentus* seeds. *J. Agric. Food Chem.* 47:3685-3687.
- Ologunde MO, Ayorinde FO, Shepard RL, Afolabi OA, Oke OL 1992. Sterols of seed oils of *Vernonia galamensis*, *Amaranthus cruentus*, *Amaranthus caudatus*, *Amaranthus hybridus* and *Amaranthus hypochondriacus* grown in the humid tropics. *J. Sci. Food Agric.* 58:221-225.
- Pérez H, Diaz F, Medina JD 1997. Chemical investigation and in vitro antimalarial activity of *Tabebuia ochracea* ssp *neochrysantha*. *Int. J. Pharmacology* 35:227-231.

- Pomilio AB, Sola G, Mayer AMS, Rumi LS 1994. Antitumor and Cytotoxic Screen of 5,6,7-Trisubstituted Flavones From *Gomphrena martiana*. *J. Ethnopharmacology* 44:25-33.
- Pontes AF, Barbosa MRV, Maas PJM 2004. Flora paraibana: Annonaceae Juss. *Acta Botanica Brasilica* 18(2):281-293.
- Pott A, Pott VJ 1994. Plantas do Pantanal. Embrapa-CNPQC, Campo Grande, p.33.
- Prance GT, Schaller GB 1982. Preliminary study of some vegetation types of the Pantanal, Mato Grosso. Brazil. *Brittonia* 34:228-251.
- Queiroz EF, Kuhl C, Terreaux C, Mavi S, Hostettmann K 2003. New dihydroalkylhexenone from *Lannea edulis*. *J. Nat. Prod.* 66:578-580.
- Rupprecht JK, Hui YH, MacLaughlin JL 1990. Annonaceous Acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.* 3(2):237-278.
- Sarker SD, Girault JP, Lafont R, Dinan LN 1996. Ecdysteroids from *Gomphrena haageana* (Amaranthaceae). *Biochem. Sys. Ecol.* 24:177-178.
- Savchenko T, Whiting P, Sarker SD, Dinan L 1998. Distribution and identity of phytoecdysteroids in *Gomphrena* spp. (Amaranthaceae). *Biochem. Sys. Ecol.* 26:337-346.
- Schmeda-Hirschmanna G, Papastergiou F 2003. Naphthoquinone Derivatives and Lignans from the Paraguayan Crude Drug “TayĩPyta” (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). *Z. Naturforsch.* 58:495-501.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J. Nat. Cancer Inst.* 82:1107-1112.
- Souza SMC, Aquino LCM, Milach Jr AC, Bandeira MAM, Nobre MEP, Viana GSB 2006. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. *Phytotherapy Res.* 21:220-225.

- Strack D, Leicht P, Bokern M, Wray V, Grotjahn L 1987. Hydroxycinnamic acid esters of isocitric acid: Accumulation and enzymatic synthesis in *Amaranthus cruentus*. *Phytochemistry* 26:2919-2922.
- Suffness M, Pezzuto JM 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity, (Hostettmann, K., eds.), Academic Press, London, 6, p. 71–133
- Takemoto T, Nishimoto N, Nakai S, Takagi N, Hayashi S, Odashima S, Wada Y 1983. Pfaffic acid, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze. *Tetrahedron Lett.* 24:1057–1060.
- Terborgh J 1986. Keystone plant resources in the tropical forest. In: Conservation Biology: the science of scarcity and diversity Sunderland, (ME Soulé, ed.), Sinauer p.330-344.
- Ueda S, Umemura T, Dohguchi K, Matsuzaki T, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A 1994. Production of anti-tumor-promoting furanonaphthoquinones in *Tabebuia avellaneda* cell-cultures. *Phytochemistry* 36:323-325
- Valcic S, Wächter GA, Eppler CM, Timmermann BN 2002. Nematicidal alkylen resorcinols from *Lithraea molloides*. *J. Nat. Prod.* 65:1270-1273.
- Velázquez E, Tournier HA, Buschiazzi PM, Saavedra G, Schinella GR 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74:91-94.
- Viana GSB, Bandeira MAM, Matos FJA 2003. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. *Phytomedicine* 10:189-195.
- Vormisto J, Svenning JC, Hall P, Balslev H 2004. Diversity and dominance in palm (Arecaceae) communities in *terra firme* forests in the western Amazon basin. *J. Ecol.* 92:577–588.
- Xaziev RS, Garusov AV, Oficharov EN 1992. Rutin concentration in *Amaranthus cruentus* L. grown in Tatarstan. *Rastitel'nye Resursy* 28:63-66.
- Young MCM, Potomati A, Chu EP, Haraguchi M, Yamamoto M, Kawano T 1997. C-13 NMR analysis of monodesmosidic saponins from *Gomphrena macrocephala*. *Phytochemistry* 46:1267-1270.

Zani CL, De Oliveira AB, De Oliveira GG 1991. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*.
Phytochemistry 30:2379-2381.

Table 1. Vegetal extracts obtained for testing citotoxic activity against cell strains measured by the MTT assay.

Species (part of the plant)	Extracts (g)	Fractions (g)							
		Et	h	D	C	Ea	B	H	M
<i>Tabebuia heptaphylla</i> (Stem bark)	-	0.320	0.170	-	0.580	0.300	0.015	-	-
<i>Tapirira guianensis</i> (Leaves)	2.489	0.873	0.389	-	0.460	0.652	0.065	-	-
<i>Tapirira guianensis</i> (Stem bark)	1.470	0.260	0.114	-	0.470	0.735	0.211	-	-
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Stem bark)	1.760	0.330	0.387	-	0.354	0.609	0.030	-	-
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (Heartwood)	0.954	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schinus terebenthifolius</i> (Leaves)	-	0.630	0.743	-	0.840	0.517	0.110	-	-
<i>Attalea phalerata</i> (Leaves)	-	0.760	0.700	-	0,400	0.900	0.060	-	-
<i>Eugenia uniflora</i> (Stem bark)	0.420	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gomphrena elegans</i>	-	0.090	0.110	-	0.034	0.380	0.256	-	-

(Leaves)

<i>Gomphrena elegans</i> (Stem)	-	0.102	0.090	-	0.243	0.212	0.045	-	-
<i>Annona dioica</i> (Leaves)	-	0.870	-	0.670	-	-	-	0.850	0.097
<i>Annona dioica</i> (Heartwood)	-	0.434	-	0.320	-	-	-	0.680	0.045
<i>Annona dioica</i> (Stem bark)	-	0.643	-	0.576	-	-	-	0.345	0.064
<i>Annona dioica</i> (heartwood subterranean)	-	0.123	-	0.280	-	-	-	0.290	0.023
<i>Annona dioica</i> (stem bark subterranean)	-	0.230	-	0.245	-	-	-	0.310	0.033

Solvents used in extraction: Et:Ethanol, h:hexane, D:Dichloromethane, C:Chloroform, Ea:Ethyl acetate, B:Butanol, H:Hydroalcohol, M:Methanol, A:Aqueous

Table 2. Cytotoxic activity of fractions from vegetal extracts against tumor cell lines measured by the MTT assay*.

Sample	* Lethality (%)		
	MDA-MB-435	HCT-8	SF-295
Stem bark of <i>Tabebuia heptaphylla</i>			
Hexane	62.80	69.12	53.60
Dichloromethane	97.80	100.00	100.00
Ethyl acetate	59.72	100.00	98.00
Butanol	99.45	78.91	76.37
Hydroalcohol	89.87	61.19	48.65
Leaves of <i>Tapirira guianensis</i>			
Hexane	46.51	48.14	49.17
Dichloromethane	86.13	88.00	79.67
Ethyl acetate	100.00	100.00	100.00
Butanol	97.36	99.88	100.00
Hydroalcohol	97.69	96.27	99.13
Ethanol	64.78	76.69	86.36
Stem bark of <i>Tapirira guianensis</i>			
Hexane	77.11	77.11	77.11
Dichloromethane	36.72	36.72	36.72
Ethyl acetate	31.32	31.32	31.32
Butanol	37.93	37.93	37.93
Hydroalcohol	100.00	100.00	100.00
Ethanol	41.12	41.12	41.12
Heartwood of <i>Myracrodruon urundeuva</i>			
Ethanol	95.60	95.60	95.60

Stem bark of <i>Myracrodruon urundeuva</i>			
Hexane	94.28	49.42	60.12
Dichloromethane	99.45	58.75	56.21
Ethyl acetate	96.81	93.71	75.24
Butanol	94.28	100.00	94.27
Hydroalcohol	82.83	97.90	90.79
Ethanol	98.24	97.67	89.83
Leaves of <i>Schinus terebenthifolius</i>			
Hexane	36.61	28.33	19.28
Dichloromethane	43.76	84.62	35.70
Ethyl acetate	94.83	97.44	100.00
Butanol	28.35	14.00	34.31
Hydroalcohol	30.38	54.14	27.27
Leaves of <i>Gomphrena elegans</i>			
Hexane	96.35	100.00	96.35
Dichloromethane	19.17	13.80	19.17
Ethyl acetate	10.04	0.91	10.04
Butanol	97.39	99.68	97.39
Hydroalcohol	10.43	18.24	10.43
Stem of <i>Gomphrena elegans</i>			
Hexane	24.38	24.38	24.38
Dichloromethane	9.78	9.78	9.78
Ethyl acetate	16.43	16.43	16.43
Butanol	18.38	18.38	18.38
Hydroalcohol	19.95	19.95	19.95
Leaves of <i>Attalea phalerata</i>			

Hexane	100.00	100.00	100.00
Dichloromethane	100.00	100.00	100.00
Ethyl acetate	94.72	81.35	65.77
Butanol	73.81	56.88	57.95
Hydroalcohol	100.00	100.00	100.00
Stem bark of <i>Eugenia uniflora</i>			
Ethanol	95.60	84.85	75.24
Heartwood of <i>Annona dioica</i>			
Hexane	43.19	35.74	52.87
Chloroform	100.00	95.63	100.00
Methanol	54.89	26.58	55.27
Aqueous	4.50	7.49	1.00
Stem bark of <i>Annona dioica</i>			
Hexane	53.57	53.57	53.57
Chloroform	100.00	100.00	100.00
Methanol	4.76	4.76	4.76
Aqueous	3.64	3.64	3.64
Heartwood subterranean of <i>Annona dioica</i>			
Hexane	63.29	58.59	47.93
Chloroform	100.00	100.00	100.00
Methanol	92.46	82.84	80.73
Aqueous	29.83	2.54	9.80
Stem bark subterranean of <i>Annona dioica</i>			
Hexane	91.53	91.53	91.53
Chloroform	100.00	100.00	100.00
Methanol	38.69	38.69	38.69

Aqueous	29.23	29.23	29.23
Leaves of <i>Annona dioica</i>			
Hexane	39.88	35.74	44.53
Chloroform	96.89	89.44	80.40
Methanol	36.38	41.60	38.33
Aqueous	13.89	10.33	11.93

* Results are represented by means of three replicates.

ANEXO B

PLANT EXTRACTS

Insecticidal Effect of Extracts from Native Plants to Mato Grosso do Sul, Brazil, on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)

ANTONIO P. SOUZA¹, MARIA R. MARQUES¹, TALAL S. MAHMOUD², VANDERLAN S. BOLZANI², BRUNO A. CAPUTO¹,
GABRIEL M. CANHETE¹, CARLA B. LEITE¹, DÉNIS P. DE LIMA³

¹Department of Morphophysiology, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, Brazil; e-mail: mapsouza@nin.ufms.br. ²Laboratory of Chemistry, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

³Department of Chemistry, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil.

BioAssay 5:1 (2010)

Efeito Inseticida de Extratos de Plantas Nativas do Mato Grosso do Sul, Brasil, sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)

RESUMO – A pesquisa e o uso de plantas inseticidas têm aumentado nos últimos anos. Sua compatibilidade com outros métodos de controle de insetos e a menor toxicidade aos mamíferos são algumas das vantagens que têm estimulado seu uso. Neste trabalho foram investigadas algumas espécies vegetais nativas de Mato Grosso do Sul quanto a seu potencial inseticida sobre *Sitophilus zeamais* Mots. Foram avaliados extratos de caules de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (Bignoniaceae) e *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae). Os grãos de trigo foram tratados com os extratos e distribuídos em caixas de acrílico contendo 20 indivíduos adultos não-sexados de *S. zeamais*, de 10 a 20 dias de idade. No controle os grãos de trigo foram tratados somente com solventes. A avaliação foi conduzida até o décimo dia contando o número de adultos mortos. Os tratamentos com extratos de *T. heptaphylla* e *G. elegans* apresentaram efeito inseticida desde o quinto dia, enquanto os demais extratos só o exibiram no décimo dia. Os seguintes extratos causaram mortalidade dos insetos: *n*-butanol, hexano e diclorometano de *T. guianensis*; etanol, acetato de etila, hexano e diclorometano de *S. terebinthifolius*; acetonitrila-clorofórmio, etanol, e hexano de *T. heptaphylla*; etanol, hexano, diclorometano, hidroalcoólico e acetato de etila de *G. elegans*. A última espécie vegetal foi mais efetiva.

PALAVRAS-CHAVE – Planta inseticida, *Gomphrena elegans*, biopesticida, gorgulho-do-milho, bioprospecção.

ABSTRACT – Research on insecticidal plants has increased in recent years, as has their utilization. Their compatibility with other methods of insect control and their lower toxicity to mammals are some of the advantages that have fostered their use. In the present study, selected plant species native to the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, were investigated for their insecticidal potential against *Sitophilus zeamais* Mots. The extracts assayed were obtained from stems of *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (Bignoniaceae), and *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae). Wheat grains were treated with the extracts and distributed into acrylic containers, each holding 20 unsexed 10- to 20-day-old *S. zeamais* adults. For the control the wheat grains were treated solely with solvents. The number of dead insects was counted daily until the tenth day. *T. heptaphylla* and *G. elegans* extracts exhibited insecticidal effect since the fifth day of treatment, whereas the effect of the other extracts was not observed before the tenth day. Insect death was caused by the following extracts: *T. guianensis* in *n*-butanol, hexane, and dichloromethane; *S. terebinthifolius* in ethanol, ethyl acetate, hexane, and dichloromethane; *T. heptaphylla* in acetonitrile-chloroform, ethanol, and hexane; and *G. elegans* in ethanol, hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and as hydroalcoholic extract. *G. elegans* extracts had the strongest insecticidal effect of all the species tested.

KEYWORDS – Insecticidal plant, *Gomphrena elegans*, biopesticide, maize weevil, bioprospection.

The maize weevil, *Sitophilus zeamais* Mots., is one of the pests that most affects stored grains in Brazil, given its bioecological features of cross infestation, high biotic potential, capability to invade stored grain mass, high number of host species, and the fact that both larvae and adult insects can cause injury to grains (Gallo et al. 2002).

The utilization of plants to control insect pests is a relatively ancient practice. Some of the earliest products used for this purpose were nicotine, extracted from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae); ryanodine, from *Ryania speciosa* Vahl. (Flacourtiaceae); sabadille, from *Schoenocaulom officinale* A. Gray. (Liliaceae); pyrethrin, from *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis. (Asteraceae); and rotenone, extracted from *Derris* spp. and *Lonchocarpus* spp. (Fabaceae) (Jacobson 1989).

A number of factors appear to limit the success of insecticidal plants, including the availability of competitive products (new synthetic compounds, materials derived from microbial fermentation) that are not only viable, but also somewhat safer than earlier synthetic insecticides. In the context of Integrated Pest Management (IPM), plant-derived insecticides constitute an alternative now widely used in organic production in industrialized countries. Their role, however, may be more relevant in the production and protection of stored grains in developing countries, because of their lower cost (Isman 2006).

Knowledge on the negative impacts of the indiscriminate use of chemicals and the requirements of consumers on the quality of foodstuffs have motivated the search for new alternatives to control insects with lower environmental impact. Botanical insecticides for the control of stored grain pests are particularly promising, given the ease of management of treated materials (Tavares & Vendramim 2005).

Considering these aspects and the need for conducting improved investigations on the phytochemical potential of native plant species of the state of Mato Grosso do Sul, the Biochemical Laboratory of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) has been carrying out laboratory tests of the insecticidal activity of plant extracts obtained from selected species native to the Pantanal and Cerrado regions of the state.

Material and Methods

Biological material. The experiments were performed at 25 ± 2.2 °C, under relative humidity of $60 \pm 10\%$ and natural photoperiod—the same conditions under which the *S. zeamais* colony on wheat grains was maintained. *G. elegans* Mart., vulgar name ‘gonfrena,’ was collected along the rivers Sucuri and Baía Bonita (Bonito county, MS). *T. guianensis* Aubl., ‘tapirira,’ *S. terebinthifolius* Raddi, ‘aroeira-mansa,’ and *T. heptaphylla* (Vell.) Toledo, ‘ipê-rosa,’ were collected

from the Biological Reserve of UFMS, located in the Cerrado biome. Plant identification was performed by Ubirazilda Rezende, MSc., of UFMS, and exsiccates have been deposited at the UFMS Herbarium.

Preparation of plant extracts. Plant materials, ranging in weight from 0.8 to 1.4 kg for each species, were air-dried, cut into small pieces, and powdered in a Wiley-type mill. The resulting matter was extracted with ethanol for seven days, with occasional stirring. The procedure was followed by filtration and concentration of the filtrate by rotaevaporation, and the residues were placed in a desiccator for dehydration. The solvents employed for extraction, partition, and chromatography were of analytical grade.

The ethanolic extract was sequentially partitioned with hexane / dichloromethane / ethyl acetate / hydroalcoholic solution / *n*-butanol / acetonitrile-chloroform, leaving an insoluble residue. For each species and fraction, an amount of extract equivalent to that obtained from 10 g of dried stems was reserved for the experiments.

Biological assays of plant extracts. Using a laminar flow hood and a glass nebulizer coupled to a vacuum pump, wheat grains were nebulized with an amount of each extract fraction corresponding to 10 g of dried plant material. The fractions were prepared by diluting 10 g of extract with the appropriate solvents for every 100 g of wheat grains. To evaluate the insecticidal effect of the solvents alone, preliminary tests were conducted in which wheat grains were left for about 72 h in a hood at 38 °C after nebulization with solvents (methanol, ethanol, chloroform, and hexane). The procedure did not affect insect survival. The temperature at 38 °C was chosen because it preserves the chemical characteristics of organic compounds in plant extracts.

After drying, 10 g of grains each were transferred to round acrylic containers. Controls consisted of untreated grains. Twenty unsexed 10- to 20-day-old adults of *S. zeamais* were placed in each acrylic container. Evaluations were done on the first, second, fifth, and tenth days by counting the number of dead insects. The extract fractions were distributed according to a random experimental planning of ten repetitions for each treatment. For the purpose of analysis, data were cumulative from the first to the tenth day.

The results were subjected to analysis of variance (F-test). Whenever a significant difference was found between the means at the 5% level of error probability, the analysis was supplemented by applying Tukey's test to compare the means.

Results and Discussion

Results of extracts obtained from 10 g of dried stems, tested for insecticidal activity against *S. zeamais* are in Table 1.

Table 1. Extracts obtained from 10 g of dried stems, tested for insecticidal activity against *S. zeamais*.

Species	Extracts (g)							
	Hexane	Acetonitrile-chloroform	Dichloromethane	Ethyl acetate	N-butanol	Ethanol	Hydro-alcoholic	Residue
<i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	0.015	-	0.020	0.130	0.680	1.100	-	0.030
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	0.098	-	0.064	0.280	1.410	2.700	-	0.850
<i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell.)	0.030	0.100		1.040	0.010	1.900	-	-
<i>Gomphrena elegans</i> Mart.	0.041	-	0.031	0.141	-	0.360	0.010	-

Because no mortality attributable to any of the extracts was observed during the first two days of the experiment, the corresponding data were not included in the analysis. From the fifth day onward, significant differences from controls were observed for some extracts. Only on the tenth day did these differences become more pronounced (Tables 2-5). Insect death caused by extracts of *G. elegans* was observed only after the fifth day (Table 5) - a reason why the experiment was carried out for ten days, given the likelihood that a cumulative insecticidal effect may have occurred which was not obvious until the fifth day.

The dichloromethane, hexane, and *n*-butanol extracts from *T. guianensis* stems exhibited weak

activity (below 20%) on the fifth day ($F = 22.08$, $df = 6$, $P = 0.0001$) and tenth day ($F = 44.26$, $df = 6$, $P = 0.0001$) (Table 2). No previous data were available on the insecticidal activity of this species, although the presence of tannins, flavonoids, and triterpenoids has been reported for several parts of this plant (Jardim *et al.* 2005). These classes of compounds are generally associated with antifeedant activity against insects, being thus defined as deterrents (Sharma & Norris 1994, Murthy *et al.* 1998, Prasad *et al.* 1998, Park *et al.* 2000, Calcagno *et al.* 2002, Morimoto *et al.* 2002, Piubelli *et al.* 2003).

Table 2. Mortality rates (% $\pm$ EP) in *S. zeamais* adults feeding on wheat grains treated with extracts of *T. guianensis* stems.

Treatment (extracts)	Mortality rates			
	1st day ¹	2nd day ¹	5th day ²	10th day ²
Dichloromethane	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	13.00 $\pm$ 03.50 a	13.00 $\pm$ 03.50 a
Hexane	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	12.50 $\pm$ 02.64 a	12.50 $\pm$ 02.64 a
N-butanol	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	12.00 $\pm$ 04.83 a	12.00 $\pm$ 04.83 a
Ethyl acetate	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	05.00 $\pm$ 04.08 b	05.00 $\pm$ 04.08 b
Ethanol	00.00 $\pm$ 00.00	05.00 $\pm$ 01.58	04.50 $\pm$ 04.38 b	04.50 $\pm$ 04.38 b
Residue	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	01.50 $\pm$ 03.50 b	01.50 $\pm$ 03.50 b
Controls	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	01.00 $\pm$ 02.11 b	01.00 $\pm$ 02.11 b

¹ Means not analyzed.

² Means followed by the same letter in the same row do not differ significantly (Tukey's test, 5% significance).

Tannins are inhibitors of proteases, affecting insect growth and survival, since they inactivate digestive enzymes and form a tannin-protein complex not easily degradable (Strong *et al.* 1984, Mello & Silva-Filho 2002). Flavonoids may act as feeding inhibitors at high concentrations and as phagostimulants at low concentrations, as demonstrated for *Heliothis zea* Boddie and *Helicoverpa armigera* (Hubner) in the final stages of development (Simmonds 2001). Terpenoids are toxic and deterrent to many insects and herbivorous mammals. The best known examples are pyrethroids, which are monoterpene esters with strong insecticidal activity, and essential oils with recognizable repellent action. Phytoecdisonones are terpenes that share a basic

chemical structure with hormones of juvenile insects, affecting their growth. Azadirachtin, a terpenic compound, is also highly effective, thanks to its low toxicity to mammals and its noxious effect on insects. It is extracted from a species native to India, *Azadirachta indica*, popularly known as 'neem' (Viegas Júnior 2003, Taiz & Zeiger 2006).

Although the results of most treatments with *S. terebinthifolius* differed from those of controls, mortality was considerably low, not achieving 20% ($F = 23.87$, $df = 6$, $P = 0.0001$) (Table 3). The dichloromethane and hexane fractions were the most effective. Other species of this genus have demonstrated insecticidal activity against dipterans (Laurent *et al.* 1998).

Table 3. Mortality rates (% $\pm$ EP) in *S. zeamais* adults feeding on wheat grains treated with extracts of *S. terebinthifolius* stems.

Treatment (extracts)	Mortality rates			
	1st day ¹	2nd day ¹	5th day ¹	10th day ²
Dichloromethane	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	18.00 $\pm$ 03.50 a
Hexane	00.50 $\pm$ 1.58	00.50 $\pm$ 01.58	00.50 $\pm$ 01.58	16.50 $\pm$ 05.80 b
Ethyl acetate	00.00 $\pm$ 00.00	00.50 $\pm$ 01.58	01.50 $\pm$ 03.37	14.00 $\pm$ 03.94 c
Ethanol	00.00 $\pm$ 00.00	00.50 $\pm$ 01.58	02.50 $\pm$ 04.25	13.00 $\pm$ 05.38 c
Residue	00.00 $\pm$ 00.00	00.50 $\pm$ 01.58	00.50 $\pm$ 01.58	10.00 $\pm$ 01.50 d
<i>N</i> -butanol	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	02.00 $\pm$ 03.50	05.00 $\pm$ 02.36 e
Controls	00.50 $\pm$ 01.58	00.50 $\pm$ 01.58	00.50 $\pm$ 01.58	01.50 $\pm$ 02.42 f

¹ Means not analyzed.² Means followed by the same letter in the same row do not differ significantly (Tukey's test, 5% significance).

With regard to *T. heptaphylla*, only its hexanic extract showed insecticidal effect (23%) on the fifth day ($F = 7.26$, $df = 6$, $P = 0.0001$). The ethanolic and hexanic extracts led to similar mortality rates, of nearly 35%, on the tenth day ($F = 6.23$, $df = 6$, $P = 0.0001$) (Table 4). The ethyl acetate, *n*-butanol, and acetonitrile-chloroform fractions caused mortality rates of intermediate value (Table 4). Other species of the genus *Tabebuia* are known for their insecticidal effect (Dória *et al.* 2004, Singh & Saratchandra 2005).

All extracts of *G. elegans* stems led to mortality rates ranging from 36% to 46.55% only on the tenth day, though not differing from controls before that time point ($F = 97.34$, $df = 5$, $P = 0.0001$) (Table 5). No phytochemical data for this species were found in the

literature. Studies of this type have been conducted at the Biochemistry Laboratory of UFMS.

The mortality effect observed in the extracts of the plants selected for this study can be attributed to the presence of secondary metabolites, thus termed for not playing a direct role in essential metabolic processes such as photosynthesis, respiration, transport of solutes, translocation, or protein and lipid synthesis. Moreover, they occur in restricted families, and diversely from primary metabolites (Taiz & Zeiger 2006).

The results achieved in the present investigation warrant more extensive studies to be conducted with *G. elegans*, with the purpose of isolating compounds with insecticidal activity.

Table 4. Mortality rates (% $\pm$ EP) in *S. zeamais* adults feeding on wheat grains treated with extracts of *T. heptaphylla* stems.

Treatment (extracts)	Mortality rates			
	1st day ¹	2nd day ¹	5th day ²	10th day ²
Hexane	00.50 $\pm$ 01.58	2.50 $\pm$ 02.63	23.00 $\pm$ 13.58 a	35.50 $\pm$ 15.54 a
Ethanol	00.50 $\pm$ 01.58	2.00 $\pm$ 02.58	10.00 $\pm$ 11.30 b	35.50 $\pm$ 27.73 a
Acetonitrile-chloroform	00.50 $\pm$ 01.58	01.50 $\pm$ 02.41	10.00 $\pm$ 09.72 b	24.00 $\pm$ 12.43 ab
<i>N</i> -butanol	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	06.50 $\pm$ 05.30 b	20.00 $\pm$ 14.91 ab
Ethyl acetate	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	02.00 $\pm$ 03.50 b	12.50 $\pm$ 15.14 b
Controls	00.50 $\pm$ 01.58	00.50 $\pm$ 01.58	00.50 $\pm$ 01.58 b	00.50 $\pm$ 01.58 b

¹ Means not analyzed.² Means followed by the same letter in the same row do not differ significantly (Tukey's test, 5% significance).Table 5. Mortality rates (% $\pm$ EP) in *S. zeamais* adults feeding on wheat grains treated with extracts of *G. elegans* stems.

Treatment (extracts)	Mortality rates			
	1 ^{o1}	2 ^{o1}	5 ^{o1}	10 ^{o2}
Dichloromethane	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	46.50 $\pm$ 05.30 a
Hexane	00.00 $\pm$ 00.00	01.00 $\pm$ 02.11	01.00 $\pm$ 02.11	40.00 $\pm$ 04.08 a
Ethyl acetate	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	39.50 $\pm$ 04.97 a
Hydroalcoholic	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	39.00 $\pm$ 06.15 a
Ethanol	00.00 $\pm$ 00.00	05.00 $\pm$ 01.58	05.00 $\pm$ 01.58	36.00 $\pm$ 06.58 a
Controls	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	00.00 $\pm$ 00.00	02.00 $\pm$ 02.58 b

¹ Means not analyzed.² Means followed by the same letter in the same row do not differ significantly (Tukey's test, 5% significance).

Acknowledgments

The authors wish to thank Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-MS, Brazil) for the financial support provided (grant 41/100217/2005) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq, Brazil) for the scholarship awarded to the first author.

References

- Calcagno, M.P., J. Coll, J. Lloria, F. Faini & A.M.E. Alonso. 2002. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. J. Chem. Ecol. 28:175-191.
- Dória, H.O.S., N.M.M.S. Albergaria, S.A. Bortoli & V. Arthur. 2004. Influência de pós de diferentes espécies de madeira na viabilidade de ovos de *Acanthocelides obtectus* (say, 1831) (Coleoptera: Bruchidae), em testes sem chance de escolha. Arq. Inst. Biol. 71:259-261.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002. Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Annu. Rev. Entomol. 51: 45-66.
- Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.). Insecticides of plant origin. Washington: American Chemical Society, p.110-119.
- Jardim, M. A. G. ; Silva, J. C. da & Costaneto, S. V. 2005. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodoal, município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil - Resultados preliminares. Revista Brasileira de Farmácia, 86: 117-118.
- Laurent, D., L.A., Vilaseca, Chantraine, J.M., Ballivian, C., Saavedra, G. & Ibañez, R. 1998. Insecticidal Activity of Essential Oils on *Triatoma infestans*. Phytother. Res., 11:285-290.
- Mello, M.O. & M.C. Silva-Filho. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. Braz. J. Plant Physiol., 14: 71-81.
- Morimoto, M., K. Tanimoto, A. Sakatani & K. Komai. 2002. Antifeedant activity of an anthraquinone aldehyde in *Galium aparine* L. against *Spodoptera litura* F. Phytochemistry, 60:163-166.
- Murthy, S.S., K. Amarjit, B. Sreenivasulu & P.N. Sarma. 1998. Antifeedant activity of some new Schiff's bases and dicoumarins against the larvae of *Spodoptera litura* F. I. J. Exp. Bio., 36: 724-727.
- Park, I.K., H.S. Lee, S.G. Lee, J.D. Park & Y.J. Ahn. 2000. Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids identified in *Coptis japonica* roots against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae). J. Econ. Entomol. 93: 331-335.
- Piubelli, G.C., C.C.B. Hoffmann, I.C. Arruda, J.C. Franchini & F.M. Lara. 2003. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. J. Chem. Ecol. 20: 1223-1233.
- Prasad, C.V.S.S., S. Deepika, G.M. Ram, B. Sreenivasulu & D. Saraswat. 1998. D. Effect of certain distyryl coumarins against the larvae of *Spodoptera litura* (Fabricius). I. J. Plant Prot. 26: 75-77.
- Sharma, H.C. & D.M. Norris. 1994. Biochemical mechanisms of resistance to insects in soybean: extraction and fractionation of antifeedants. Ins. Sci. Appl. 15: 31-38.
- Singh, R.N., B. Saratchandra. 2005. The development of botanical products with special reference to seric-ecosystem. J. Env. Sci. 3: 1-8.
- Simmonds, M.S.J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. Phytochemistry 56: 245-252.
- Strong, D.R., J.H. Lawton & T.R.E. Southwood. 1984. Insects on plants: community patterns and mechanisms. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 313p.
- Taiz L. & E. Zeiger. 2006. Fisiologia Vegetal. Artmed Editora, Porto Alegre, 690p.
- Tavares, M.A.G.C. & J.D. Vendramim. 2005. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Neot. Entomol, 34: 31-323.
- Viegas Júnior, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. Quim. Nova, 26: 390-400.

ANEXO C

Bioprospecting insecticidal compounds from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil

Antonio P. Souza^{1,2}, Maria R. Marques¹, Talal S. Mahmoud¹, Bruno A. Caputo¹, Gabriel M. Canhete¹, Carla B. Leite¹ e Dênis P. de Lima¹

Received: July 11, 2007. Accepted: April 25, 2008

RESUMO – (Bioprospecção de substâncias inseticidas de plantas nativas de Mato Grosso do Sul, Brasil). No presente trabalho foi avaliada a atividade inseticida de extratos de limbos foliares de *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), *Attalea phalerata* (Mart. ex Spreng.) Burret (Arecaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) e *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) e de caules de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae). Foram testados quatro extratos e 18 frações, com diferentes polaridades. Dez gramas de grãos de trigo foram pulverizados com 1 mL de cada extrato a 10% (p/v). Após a evaporação do solvente a 38 °C, os grãos foram acondicionados em recipientes juntamente com 20 indivíduos adultos de *Sitophilus zeamais* não sexados, com 10 a 20 dias de idade. As avaliações foram feitas no quinto e no décimo dia, contando-se o número de insetos mortos e descartando-os. Os extratos foliares de *G. elegans* ocasionaram mortalidade de 27% a 60% até o quinto dia, enquanto os demais extratos testados, quando ativos, não ultrapassaram a faixa de 20% de mortalidade no mesmo período. No décimo dia, os extratos mais ativos foram o proveniente de *A. phalerata* (hexânico, 36,5%) e todos os de *G. elegans* (52% a 80,5%), enquanto os demais extratos causaram até 30% de mortalidade.

Palavras-chave: metabólitos secundários, plantas inseticidas, gorgulho-do-milho, *Sitophilus zeamais*

ABSTRACT – (Bioprospecting insecticidal compounds from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil). This paper reports on an evaluation of the insecticidal activity of extracts prepared from leaves of *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), *Attalea phalerata* (Mart. ex Spreng.) Burret (Arecaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), and *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) and from stems of *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae). Four extracts and 18 fractions with a range of polarities were tested. Ten-gram batches of wheat grains were each nebulized with 1 mL of a separate extract at 10% w/v. After solvent evaporation at 38 °C, the grains were placed into flasks along with 20 unsexed 10- to 20-day old adult individuals of *Sitophilus zeamais*. The assessment was carried out on the fifth and tenth day by counting and discarding the dead insects. Leaf extracts of *G. elegans* showed an insecticidal effect ranging from 27% to 60% by the fifth day, whereas the effect of the remaining extracts tested (if active at all) did not exceed 20% in the same period. By the tenth day, the most active extracts were those of *A. phalerata* (hexanic, 36.5%) and all those of *G. elegans* (52-80.5%), whereas the effect of the other extracts did not exceed 30%.

Key words: secondary metabolites, insecticidal plant, maize weevil, *Sitophilus zeamais*

Introduction

From the academic point of view, plants represent a vast storehouse of potentially useful natural products, and in fact many laboratories worldwide have screened thousands of species of higher plants, not only in search of pharmaceuticals, but also of pest control products (Van Beek & Breteler 1993). Botanical insecticides have long been heralded as attractive alternatives to synthetic chemical insecticides for pest management because botanicals reputedly pose little threat to the environment or to human health. The body of scientific literature documenting bioactivity of plant derivatives on arthropod pests continues to expand, yet only a handful of botanicals are currently used in agriculture in the industrialized world,

and few are the prospects for commercial development of new botanical products (Isman 2006).

A major motivation to promote research on and use of pest control methods at low environmental cost is the demand of consumers searching for healthier products, a social behavior reflected in product registration laws that favor the use of low-cost insecticides having minimal environmental impact. Another reason is that botanicals have been a focus of interest of chemists and biologists because of their structural complexity, potency, and selectivity. Pyrethrum has been the most important botanical for almost two centuries (Isman 2000). Rotenone, ryanodine, veratridine, and azadirachtin, active ingredients of *ryania* (*Ryania speciosa*), *sabadilla* (*Schoenocaulon officinale*), and

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Department of Morphophysiology, Laboratory of Biochemistry, C. Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil

² Corresponding Author: apsouza@nin.ufms.br, apsouza2004@hotmail.com

neem (*Azadirachta indica*), respectively, have been widely used for their effectiveness and low toxicity to mammals. The most vigorous development program in recent years has been that for expanded uses of neem seed extract (Casida & Quistad 1998; Isman 2000).

Over 200,000 metabolites are currently known, which are estimated to account for roughly 10% of the possible number of these compounds in nature (Croteau *et al.* 2000; Dixon & Strack 2003). Their structures, functions, and uses have not been sufficiently evaluated. In general these compounds do not take part in basic metabolism, but are essential to the plant by mediating plant–plant and plant–herbivore interactions. They also play a role in aspects such as flower coloration and scent and food color and taste, in addition to granting resistance against pests and diseases (Verpoorte *et al.* 1999; Dixon 2001).

Plants native to the Pantanal and Cerrado regions of the southwestern state of Mato Grosso do Sul, in Brazil, have been poorly studied, despite being a rich source of promising molecules for insect control. To evaluate the insecticidal effect of these plants we have selected the maize weevil *Sitophilus zeamais* Motsch. (Curculionidae) as a model, since it is the main insect pest of stored wheat in Brazil. Furthermore, it has a great number of hosts, high biotic potential, and high capacity for grain mass penetration and cross-infestation, causing damage particularly to corn, rice, and wheat stocks (Santos *et al.* 1990; Gallo *et al.* 2002). These features led us to select several plant species in order to prepare extracts and carry out an evaluation of their insecticidal activity against *S. zeamais*.

Material and methods

Biological material – The colony of *S. zeamais* on wheat grains was kept at 25 ± 2.2 °C, at relative humidity of $60 \pm 10\%$ and natural photoperiod. The experiments were conducted under the same conditions. *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae) was collected from the rivers Sucuri and Baía Bonita, in Bonito county, Mato Grosso do Sul. *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae), *Attalea phalerata* (Mart. ex Spreng) Burret (Arecaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) were collected from the UFMS Biological Reserve, located in Cerrado landscape. Plant identification was based on the collected material. Exsiccates were deposited in the UFMS Herbarium. Selection of species, extracts, and fractions was based on previous chemical ecology studies conducted at the UFMS Laboratory of Biochemistry, where additional biological activities had been tested. The present investigation is an effort to

further understand the ecology of these native plants.

Preparation of plant extracts – The solvents used in extraction, partition, and chromatography procedures were of analytical grade.

Plant material was collected in May 2006. Plants exhibiting natural injury were selected for leaf and stem collection. Each batch (10 g of leaves and stems) was air-dried, cut in small pieces, and then crushed in a Wiley-type mill. The resulting material was extracted with ethanol for seven days, with occasional stirring, and filtrated. The filtrate was concentrated by rotaevaporation and placed in a desiccator for dehydration. As a semi-purification step, it was submitted to liquid-liquid partition with solvents of increasing polarity. Choice of partition methods was based on pilot experiments conducted for each species, applying methodology adapted from Cechinel Filho & Yunes (1998).

Leaves of *T. guianensis* and stems of *M. urundeuva* were submitted to partition with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and n-butanol. This method usually yields a final residue containing mostly polar compounds (the so-called polar fraction). Leaves of *Attalea phalerata* (Mart. ex Spreng) Burret and *G. elegans* were submitted to partition with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and hydroalcoholicm a method that does not yield an insoluble residue at the end of partition. Because the crude extract of *E. uniflora* leaves was not subjected to partition, only the ethanolic extract of this species was tested.

Insecticidal activity assay – Wheat grains were nebulized in a laminar-flow hood using a glass nebulizer coupled to a vacuum pump. The weight of the extracts and phases employed in the assays are discriminated in Table 1. The extracts were diluted with 10 mL of an appropriate solvent for each 100 g of wheat grains. Preliminary tests were conducted to evaluate the insecticidal effect of the solvents alone, revealing that when wheat grains were left for about 72 h in a hood at 38 °C after solvent spraying (ethanol, n-butanol, ethyl acetate, dichloromethane, hexane), insect survival was not affected. A temperature of 38 °C was chosen because it preserves the chemical characteristics of organic compounds present in vegetal extracts. The grains were subjected to the same treatment, whether with extracts or fractions.

After drying, the grains were transferred to plastic round-bottom flasks (10 g per flask). Control flasks held untreated grains. Twenty 10- to 20-day-old adult specimens of *S. zeamais* (unsexed) were placed in each flask. Evaluations were carried out on the fifth and tenth day by counting the number of dead insects and discarding them. The extract fractions were distributed

Table 1. Plant extracts tested for insecticidal activity against *Sitophilus zeamais*.

Species (plant part)	Weight (g)						
	Ethanolic extract	Dichloro methane	Ethyl acetate	Phase			
				n-Butanol	Hexanic	Hydro alcoholic	Polar fraction
<i>Tapirira guianensis</i> (leaves)	-	0.032	0.170	0.580	0.300	-	0.015
<i>Attalea phalerata</i> (leaves)	2.544	0.760	0.700	-	1.300	0.060	-
<i>Eugenia uniflora</i> (leaves)	0.420	-	-	-	-	-	-
<i>Gomphrena elegans</i> (leaves)	0.920	0.090	0.110	-	0.380	0.256	-
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (stems)	1.740	0.025	0.360	0.845	0.260	-	0.005

according to a random experimental planning of ten repetitions for each treatment. To meet analysis purposes, data from the first to the tenth day were cumulative. The data were subjected to variance analysis (F test). When a significant difference was detected between means at 5% level of significance, a supplementary analysis was performed by comparing means using Tukey's test.

Results and discussion

Experiments for evaluating the effect that plant extracts have on the mortality of adult coleopters usually do not extend beyond the fifth day (Tapondjou *et al.* 2002; Mazzonetto & Vendramim 2003; Silva *et al.* 2003; Tavares & Vendramim 2005). In the present investigation, the effect on mortality was actually observed from the fifth day, but discrimination among the various fractions was facilitated by collecting data until the tenth day (Table 2).

Of the *T. guianensis* preparations tested, only the n-butanol fraction from leaves affected the survival of *S. zeamais* adults by the fifth day. By the tenth day the dichloromethane, hexane, and polar fractions also caused mortality (Table 2, test 1). Even though some extracts led to insect death, the effect was below 20%. No data were found in the literature concerning the insecticidal activity of *T. guianensis* on other insects. The plant species, however, contains tannins, flavonoids, and terpenoids (Jardim *et al.* 2005), which are compounds associated with insect antifeedant activity (Sharma & Norris 1994; Simmonds 2001; Park *et al.* 2000; Calcagno *et al.* 2002; Morimoto *et al.* 2002; Piubelli *et al.* 2003).

With regard to *A. phalerata* leaf extracts, the hexanic phase led to 19.0% and 36.5% of mortality by the fifth and tenth day, respectively. The other fractions showed very low insecticidal activity (Table 2, tests 1 and 2). In addition to its medicinal properties, the species is attractive to bees, is grazed by cattle, and has edible fruits and seeds (Guarim Neto & Moraes

2003; Pott & Pott 2003).

The ethanolic extract of *E. uniflora* leaves did not exhibit insecticidal activity on *S. zeamais* (Table 2, test 2), although tannins and alkaloids have already been detected in the leaves of this plant (Lee *et al.* 1997; Matsumura *et al.* 2000). Alkaloids are classified as qualitative toxics, as they act even in small amounts and are deleterious to most insects (Strong *et al.* 1984; Mello & Silva Filho 2002).

Of the *M. urundeuva* preparations, the effects of the n-butanol phase and the polar fraction on the insects differed from the controls starting on the fifth day. By the tenth day all treatments differed from controls, but values were below 30% (Table 2, test 3), despite the presence of tannins and alkaloids in this species (Cavalcante *et al.* 2006).

From the fifth day onward all fractions prepared from leaves of *G. elegans* had effects that diverged from controls. The ethyl acetate phase was particularly noteworthy, as it led to a 60% rate of mortality. By the tenth day the rate for the hydroalcoholic phase (76%) was similar to that for ethyl acetate (80.5%). The dichloromethane and hexanic phases and the ethanolic extract caused an intermediate level of mortality (71.5%, 69%, and 52%, respectively) (Table 2, test 4). *G. elegans* leaves are known to contain saponins and coumarins (Saito *et al.* 2004). Coumarins have insecticidal effects similar to that of rotenone, generating transport blockage of electrons during the respiratory process (Nicholson *et al.* 1995).

Gomphrena elegans is an aquatic plant native to the Bonito region of Mato Grosso do Sul. Its overgrowth, mainly on shores of the rivers Sucuri and Baía Bonita, has been an object of concern to environmentalists. No data are available in the literature on the phytochemical profile of the species. Considering its high capacity for survival and reproduction, which allow it to compete successfully with other aquatic species, *G. elegans* may have genetic potential to produce defense compounds against a vast range of herbivores.

Table 2. Adult mortality (%) by the fifth and tenth day in *Sitophilus zeamais* feeding on wheat grains treated with extracts and fractions prepared from plants native to Mato Grosso do Sul, Brazil.

Treatment	Mortality*	
	5 th day	10 th day
Test 1 ($F_{7,79} = 17.20$, $P = 0.0001$)		
Leaves of <i>Tapirira guianensis</i>		
N-butanol	12.00 ± 04.83 a	18.00 ± 06.32 a
Dichloromethane	05.50 ± 04.38 b	12.50 ± 05.40 abc
Hexanic	05.00 ± 04.71 b	09.50 ± 06.85 bc
Polar fraction	04.50 ± 04.38 b	08.50 ± 04.12 bc
Ethyl acetate	01.00 ± 02.11 b	05.00 ± 04.71 cd
Leaves of <i>Attalea phalerata</i>		
Ethanollic	04.50 ± 05.50 b	13.50 ± 07.09 ab
Ethyl acetate	04.50 ± 04.97 b	05.50 ± 05.50 cd
Control	01.00 ± 02.11 b	01.00 ± 02.11 d
Test 2 ($F_{4,49} = 47.55$, $P = 0.0001$)		
Leaves of <i>Attalea phalerata</i>		
Hexanic	19.00 ± 18.97 a	36.50 ± 20.15 a
Dichloromethane	07.00 ± 05.87 b	10.50 ± 09.26 b
Hydroalcoholic	03.00 ± 07.89 b	05.50 ± 08.32 bc
Leaves of <i>Eugenia uniflora</i>		
Ethanollic	05.00 ± 08.50 b	08.00 ± 10.50 bc
Control	01.00 ± 02.11 b	01.00 ± 02.11 c
Test 3 ($F_{6,69} = 5.76$, $P = 0.0001$)		
Stems of <i>Myracrodruon urundeuva</i>		
N-butanol	15.00 ± 09.72 a	28.50 ± 16.84 a
Polar fraction	13.50 ± 13.34 a	27.50 ± 19.61 a
Hexanic	12.50 ± 09.79 ab	24.50 ± 15.71 ab
Ethanollic	12.00 ± 10.85 ab	18.00 ± 15.13 ab
Ethyl acetate	07.50 ± 12.96 ab	18.00 ± 22.88 ab
Dichloromethane	09.00 ± 09.66 ab	14.00 ± 10.22 b
Control	01.00 ± 02.11 b	01.00 ± 02.11 c
Test 4 ($F_{5,59} = 42.34$, $P = 0.0001$)		
Leaves of <i>Gomphrena elegans</i>		
Ethyl acetate	60.00 ± 08.82 a	80.50 ± 10.92 a
Hydroalcoholic	39.00 ± 08.76 b	76.00 ± 09.66 a
Dichloromethane	33.50 ± 04.74 b	71.50 ± 07.47 ab
Hexanic	41.50 ± 07.84 b	69.00 ± 06.99 ab
Ethanollic	27.00 ± 04.22 b	52.00 ± 09.78 ab
Control	03.00 ± 02.58 c	03.50 ± 03.38 c

* Means followed by the same letter in the same column do not differ significantly (Tukey's test, $P \geq 0.05$).

Although *T. guianensis*, *A. phalerata*, and *M. urundeuva* exhibited some insecticidal effect on *S. zeamais*, *G. elegans* was the most promising species, with an insecticidal effect of up to 80%, a finding that may help to explain its successful establishment in the field. Further studies using additional fractions prepared from this last species are warranted, so that its insecticidal compounds can be identified and their effects on other biological parameters of *S. zeamais* can be evaluated.

Acknowledgments

The authors thank Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT-MS) for financial support and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the grant awarded to the first author. They are also indebted to Ubirazilda Rezende, MSc., for identification of the plant species.

References

- Calcagno, M.P.; Coll, J.; Lloria, J.; Faini, F. & Alonso, A.M.E. 2002. Evaluation of synergism in the feeding deterrence of some furanocoumarins on *Spodoptera littoralis*. **Journal of Chemical Ecology** **28**: 175-191.
- Casida, J.E. & Quistad, G.B. 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annu. Rev. Entomol.** **43**: 1-16.
- Cavalcante, G.M.; Moreira, A.F.C. & Vasconcelos, S.D. 2006. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **41**: 9-14.
- Cechinel Filho, V. & Yunes, R.A. 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova** **21**: 99-105.
- Croteau, R.; Kutcha, T.M. & Lewis, N.G. 2000. Natural products (secondary metabolites). Pp. 1250-1317. In: B. Buchanan *et al.* (eds.). **Biochemistry & Molecular biology of Plants**. Rockville, American Society of Plant Physiologists.
- Dixon, R.A. 2001. Natural products and plant disease resistance. **Nature** **411**: 843-847.
- Dixon, R.A. & Strack, D. 2003. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond. **Phytochemistry** **62**: 815-816.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S. & Omoto, C. 2002. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, FEALQ.
- Guarim Neto, G. & Morais, R. G. 2003. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica** **17**: 561-584.
- Isman, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection** **19**: 603-608.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology** **51**: 45-66.
- Jardim, M.A.G.; Silva, J.C. & Costa Neto, S.V. 2005. Fitoterapia popular e metabólitos secundários de espécies vegetais da Ilha de Algodão, Município de Maracanã, Estado do Pará, Brasil. Resultados preliminares. **Revista Brasileira de Farmácia** **86**: 117-118.
- Larsson, S.; Lundgren, L.; Ohmart, C.P. & Gref, R. 1992. Weak responses of pine sawfly larvae to high needle flavonoid concentrations in scots pine. **Journal of Chemical Ecology** **18**: 271-282.
- Lee, M.I.; Nishimoto, S.; Yang, L.L.; Yen, K.Y.; Hatano, T.; Yoshida, T. & Okuda, Y. 1997. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry** **44**: 1343-1349.
- Matsumura, T.; Kasai, M.; Hayashi, T.; Arisawa, M.; Momose, Y.; Arai, I.; Amagaya, S. & Komatsu, Y. 2000. A-glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Ñangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. **Pharmaceutical Biology** **38**: 302-307.
- Mazzonetto, F. & Vendramim, J.D. 2003. Efeito de Pós de Origem Vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em Feijão Armazenado. **Neotropical Entomology** **32**: 145-149.
- Mello, M.O. & Silva Filho, M.C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology** **14**: 71-81.
- Morimoto, M.; Tanimoto, K.; Sakatani, A. & Komai, K. 2002. Antifeedant activity of an anthraquinone aldehyde in *Galium aparine* L. against *Spodoptera litura* F. **Phytochemistry** **60**: 163-166.
- Nicholson, R.A.; Zhang, A. & Surnagin B. 1995. Insecticidal properties and mechanisms underlying its transmitter releasing action in nerve terminal fractions isolated from mammalian brain. **Pesticide Biochemistry and Physiology** **53**: 152-163.
- Park, I.K.; Lee, H.S.; Lee, S.G.; Park, J.D. & Ahn, Y.J. 2000. Antifeeding activity of isoquinoline alkaloids identified in *Coptis japonica* roots against *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) and *Agelastica coerulea* (Coleoptera: Galerucinae). **Journal of Economic Entomology** **93**: 331-335.
- Piubelli, G.C.; Hoffmann, C.C.B.; Arruda, I.C.; Franchini, J.C. & Lara, F.M. 2003. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect-feeding preference. **Journal of Chemical Ecology** **29**: 1223-1233.
- Pott, A. & Pott, V.J. 2003. **Plantas do Pantanal**. Corumbá, EMBRAPA-CPAP.
- Saito, M.L.; Pott, A.; Ferraz, J.M.G. & Nascimento, R.S. 2004. Avaliação da Atividade Inseticida em Espécies de Plantas do Pantanal Matogrossense. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente.
- Santos, J.P.; Maia, J.D.G. & Cruz, I. 1990. Efeito da infestação pelo gorgulho-do-milho e traça sobre a germinação de sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **25**: 1687-1692.
- Sharma, H.C. & Norris, D.M. 1994. Biochemical mechanisms of resistance to insects in soybean: extraction and fractionation of antifeedants. **Insect Science and its Application** **15**: 31-38.
- Silva, G.; Lagunes, A. & Rodríguez, J. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) com polvos vegetais solos y em mesclas com carbonato de cálcio em maíz almacenado. **Ciencia e Investigacion Agrária** **30**: 153-160.
- Simmonds, M.S.J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. **Phytochemistry** **56**: 245-252.
- Strong, D.R.; Lawton, J.H. & Southwood, T.R.E. 1984. **Insects on plants: community patterns and mechanisms**. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Tapondjou, L.A.; Adler, C.; Bouda, H. & Fontem, D.A. 2002. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored products beetles. **Journal of Stored Products Research** **38**: 395-402.
- Tavares, M.A.G.C. & Vendramim, J.D. 2005. Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology** **34**: 319-323.
- Van Beek, T.A. & Breteler, H. 1993. **Phytochemistry and agriculture**. Oxford, Clarendon Press.
- Verpoorte, R.; Van Der Heijden, R.; Ten Hoopen, H.J.G. & Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. **Biotechnology Letter** **21**: 467-479.