

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
REGIONAL CATALÃO  
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE) EM ASSOCIAÇÃO AO  
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta laevigata* E EFEITO ALELOPÁTICO**

**JOSÉ HENRIQUE FALEIRO**

**CATALÃO – GO  
2017**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do autor: José Henrique Faleiro

Título do trabalho: ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE) EM ASSOCIAÇÃO AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta laevigata* E EFEITO ALELOPÁTICO

**3. Informações de acesso ao documento:**


Concorda com a liberação total do documento  Sim       Não

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:



\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 16 / 11 / 2017

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**JOSÉ HENRIQUE FALEIRO**

**ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE) EM ASSOCIAÇÃO AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta laevigata* E EFEITO ALELOPÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Área de concentração: Química

Linha de pesquisa: Química de Produtos Naturais e Biomoléculas

Orientadora: Profa. Dra. Richele Priscila Severino

Co-orientadora: Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa

**CATALÃO – GO**

**2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Faleiro, José Henrique  
ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE)  
EM ASSOCIAÇÃO AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS  
*Atta laevigata* E EFEITO ALELOPÁTICO [manuscrito] / José Henrique  
Faleiro. - 2017.  
xv, 119 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Richele Priscila Severino; co-orientadora  
Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade  
Acadêmica Especial de Física e Química, Química, Catalão, 2017.  
Bibliografia.  
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,  
lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Eugenia dysenterica*, cerrado, estudo fitoquímico. I. Priscila  
Severino, Richele , orient. II. Título.



Relatório de Defesa de Dissertação  
 Candidato: **José Henrique Faleiro**

Aos 22/09/2017 às 14:30 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: **“Estudo Químico do Extrato Etanólico das Flores de *Eugenia Dysenterica* DC. (Myrtaceae) em Associação ao Controle de Formigas Cortadeiras *Atta Laevigata* e Efeito Alelopático”**, apresentada pelo candidato: **José Henrique Faleiro**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	Função	Instituição
Profa. Dra. Richele Priscila Severino	Presidente	UFG – Catalão
Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero	Titular	UFG – Catalão
Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino	Titular	UFU – Uberlândia

Resultado Final: aprovado.

Parecer da Comissão Julgadora:

O candidato foi aprovado devendo realizar as pesquisas indicadas pela banca examinadora durante o prazo estabelecido pelo PPGQ.

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu Milana Jacob da Silva representante do Programa de Pós Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Richele Priscila Severino

Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino

Representante do PPG Milana Jacob da Silva

( ) Não houve alteração no título.

(X) Houve. O novo título passa a ser:

Estudo Químico de Eugenia dysenterica DC.  
(Myrtaceae) em Associação ao Controle de  
Formigas cortadeiras Atta laevigata  
e efeito alelopático



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado do candidato José Henrique Faleiro realizada em 22 de Setembro de 2017.*

Profa. Dra. Richele Priscila Severino

Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero

Prof. Dr. Francisco José Tôres de Aquino

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais José Romer e Luzia Aparecida, que são os meus maiores exemplos e os responsáveis por eu ser a pessoa que sou hoje ao meu irmão Marcos Vinícios pela amizade, incentivo e ensinamentos!*

*À todos os amigos e familiares.*

*À minha namorada Bianca, pelo incentivo e amor.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por todas as oportunidades a mim concedidas.

À minha orientadora Profa. Dra. **Richele P. Severino** por ter aceitado me orientar, me introduzindo na área de Química de Produtos Naturais. Agradeço por todo o apoio, paciência e incentivo.

À minha co-orientadora Profa. Dra. **Lorena R. Freitas de Sousa** pelo tempo dedicado na realização deste trabalho e pelos ensinamentos transmitidos.

À Profa. Dra. **Elaine R. Carbonero** pelo bom convívio ao longo do tempo e por suas contribuições muito enriquecedoras.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFG/RC: **Andréia, Dayane, Estefânia, Eliangela, Felipe, Geraldo, Maria, Renan, Romário e Ruberney** pelas experiências compartilhadas e os momentos de descontração. Em especial a **Evelise** pela troca de conhecimentos, ajuda e pelo prazer de trabalharmos e convivermos juntos desde a graduação.

Aos meus pais, obrigado por me proporcionarem a oportunidade de seguir meus estudos para que hoje eu pudesse estar aqui. Ao meu irmão pelo carinho e a minha namorada pela paciência e parceria. A toda a minha família, inclusive sogro e sogra, meus sinceros agradecimentos por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.

Aos bons amigos **Douglas** e **Felipe** pela paciência, parceria e as tantas conversas e reflexões que fizemos juntos. Muitas das quais ainda não foram encerradas.

Ao Laboratório Multiusuário de Química da Universidade Federal de Uberlândia e ao Prof. Dr. **Luciano Morais Lião**, do Laboratório de RMN do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, por fornecer o equipamento e o suporte técnico para os experimentos de RMN uni e bidimensionais.

À profa. Alcione da Silva Arruda, do laboratório BioGen – Cerrado, da Universidade Estadual de Goiás, pela realização dos experimentos inseticida e alelopático.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e contribuírem na avaliação da dissertação.

À todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

A **CAPES** pela bolsa concedida.

*“Os que desprezam os pequenos  
acontecimentos nunca farão  
grandes descobertas. Pequenos  
momentos mudam grandes rotas.*

*Augusto Cury*

## RESUMO

**ESTUDO QUÍMICO DE *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE) EM ASSOCIAÇÃO AO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta laevigata* E EFEITO ALELOPÁTICO** – O estudo descrito neste trabalho contribui para o conhecimento químico e biológico da espécie *E. dysenterica*, encontrada especialmente em região de Cerrado e conhecida popularmente como “cagaita”. Espécies do gênero *Eugenia* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças e *E. dysenterica* possui relatos de atividade antiviral, fungicida, citotóxica, entre outras. Este trabalho descreve o isolamento e identificação estrutural de sete metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das flores de *E. dysenterica*, assim como a avaliação biológica dos extratos etanólicos das flores, folhas, galhos e sementes frente a formigas cortadeiras da espécie *A. laevigata* e avaliação do efeito alelopático. O estudo das flores foi realizado utilizando diferentes técnicas cromatográficas e os compostos isolados foram identificados por experimentos uni e bidimensionais de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A investigação química do extrato das flores, realizada pela primeira vez, levou a identificação dos compostos ácido gálico, galato de etila, quercetina, miricetina, kaempferol, (-)-epicatequina e a juglanina. Os extratos etanólicos de *E. dysenterica* e as frações obtidas do extrato das flores, não apresentaram resultados significativos nos ensaios por ingestão frente às operárias *A. laevigata*. Já os ensaios alelopáticos realizados com os extratos etanólicos brutos das folhas, flores, galhos e sementes forneceram resultados satisfatórios, sendo que os extratos das flores e folhas (2 mg/mL) apresentaram os maiores valores de inibição, permitindo a germinação de menos de 5% das sementes avaliadas.

## ABSTRACT

**CHEMICAL STUDY OF *Eugenia dysenterica* DC. (MYRTACEAE) IN ASSOCIATION TO LEAF-CUTTING ANTS *Atta laevigata* CONTROL AND ALELOPATIC EFECT** – The study described in this work contributed to the chemical and biological knowledge of species *E. dysenterica*, found especially in Cerrado and popularly known as “cagaita”. Species of *Eugenia* are also used in folk medicine for various diseases and biological activities have been reported for *E. dysenterica* such as, antiviral, fungicidal, cytotoxicity, among others activities. This work describes the isolation and structural identification of seven secondary metabolites presente in the ethanolic extract of flowers of *E. dysenterica*, as well as the biological evaluation of the ethanolic extracts of flowers, leaves, stems and seeds against leaf-cutting ants *A. laevigata* and evaluation of allelopathic effect. The study of flowers was carried out using chromatographic technics and the isolated compounds were identified by 1D and 2D NMR experiments. The chemical investigation of flowers extract, first time investigated, led to identified the compounds ethyl gallate, gallic acid, kaempferol, quercetin, myricetin, (-)-epicatechin and juglanin. The ethanolic extracts of *E. dysenterica* and the fractions obtained from the flower extract didn't show significant results in the ingestion tests against the workers *A. laevigata*. The allelopathic assays performed with the crude ethanolic extracts of leaves, flowers, stems and seeds provided satisfactory results. The flowers and leaves extracts (2 mg/mL) showed the highest inhibition values, allowing the germination of less than 5% of seeds evaluated.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b> - Estruturas químicas de alguns inseticidas oriundos de plantas .....	17
<b>FIGURA 1.2</b> - Estruturas químicas de alguns representantes de terpeno ( $\alpha$ -tujona), derivado fenólico (ácido cafeico), flavonoide (apigenina) e tanino (aceritanino) .....	20
<b>FIGURA 1.3</b> - Compostos isolados da classe esteroidal em espécies do gênero <i>Eugenia</i> .....	22
<b>FIGURA 1.4</b> – Compostos fenólicos isolados em espécies do gênero <i>Eugenia</i> .....	23
<b>FIGURA 1.5</b> – Compostos flavonoídicos isolados em espécies do gênero <i>Eugenia</i> .....	24
<b>FIGURA 1.6</b> - A) Árvore de <i>E. dysenterica</i> ; B) Folhas; C) Flores; D) Ramos com frutos maduros .....	25
<b>FIGURA 1.7</b> - Estrutura básica de um flavonoide (designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono) .....	28
<b>FIGURA 1.8</b> - Classificação dos flavonoides por subclasse .....	28
<b>FIGURA 4.1</b> - Perfil cromatográfico dos extratos brutos de <i>E. dysenterica</i> (flores, folhas, sementes e galhos) por CLAE-DAD .....	51
<b>FIGURA 4.2</b> - Perfil cromatográfico dos extratos brutos de <i>E. dysenterica</i> (flores, folhas, sementes e galhos) por CG-EM .....	52
<b>FIGURA 4.3</b> - Perfil cromatográfico dos extratos brutos de <i>E. dysenterica</i> (flores, folhas, sementes e galhos) por RMN $^1\text{H}$ .....	53
<b>FIGURA 4.4</b> – Estutura química das substâncias isoladas com a origem de seus fracionamentos e as massas obtidas .....	54
<b>FIGURA 4.5</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ das substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 400 MHz) .....	61
<b>FIGURA 4.6</b> - Espectro de RMN DEPT-135 das substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 100 MHz) .....	62
<b>FIGURA 4.7</b> - Mapa de contorno do experimento HMBC para as substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 400 MHz) .....	63
<b>FIGURA 4.8</b> - Expansão do mapa de contorno do experimento HMBC para as substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 400 MHz) .....	64

<b>FIGURA 4.9</b> - Mapa de contorno do experimento HSQC para as substâncias <b>I</b> e <b>II</b> (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) .....	65
<b>FIGURA 4.10</b> - Cromatograma obtido por CLAE-DAD (360 nm) da mistura das substâncias <b>I</b> e <b>II</b> .....	66
<b>FIGURA 4.11</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>III</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) .....	69
<b>FIGURA 4.12</b> - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância <b>III</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) .....	70
<b>FIGURA 4.13</b> - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância <b>III</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz) .....	71
<b>FIGURA 4.14</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>IV</b> (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	76
<b>FIGURA 4.15</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C da substância <b>IV</b> (100 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	77
<b>FIGURA 4.16</b> Mapa de contorno do experimento HSQC para a substância <b>IV</b> (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	78
<b>FIGURA 4.17</b> - Mapa de contorno do experimento HMBC para a substância <b>IV</b> (400 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	79
<b>FIGURA 4.18</b> - Ampliação do mapa de contorno HMBC para a substância <b>IV</b> (100 MHz, acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	80
<b>FIGURA 4.19</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>V</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) .....	84
<b>FIGURA 4.20</b> - Mapa de contorno do experimento COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H para a substância <b>V</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) .....	85
<b>FIGURA 4.21</b> - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância <b>V</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) .....	86
<b>FIGURA 4.22</b> - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância <b>V</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) .....	87
<b>FIGURA 4.23</b> - Ampliação do mapa de contorno do experimento HMBC para a substância <b>V</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz) .....	88
<b>FIGURA 4.24</b> - Relação entre os valores das constantes de acoplamento <sup>3</sup> <i>J</i> do H-3 e o ângulo diedro $\Phi$ de hidrogênios vicinais do anel C da epicatequina e catequina .....	90

<b>FIGURA 4.25</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VI</b> (acetona- $d_6$ , 400 MHz) .....	92
<b>FIGURA 4.26</b> - Mapa de contorno do experimento COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ para a substância <b>VI</b> (acetona- $d_6$ , 400 MHz) .....	93
<b>FIGURA 4.27</b> - Espectro de RMN DEPT-135 da substância <b>VI</b> (acetona- $d_6$ , 100 MHz) .....	94
<b>FIGURA 4.28</b> - Mapa de contorno do experimento HSQC para a substância <b>VI</b> (acetona- $d_6$ , 400 MHz) .....	95
<b>FIGURA 4.29</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>VII</b> ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	98
<b>FIGURA 4.30</b> - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta laevigata</i> frente aos ensaios por ingestão dos extratos de <i>E. dysenterica</i> .....	100
<b>FIGURA 4.31</b> - Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta laevigata</i> frente aos ensaios por ingestão das frações do extrato etanólico das flores de <i>E. dysenterica</i> .....	101
<b>FIGURA 4.32</b> - Potencial de inibição dos extratos etanólicos das folhas e flores de <i>E. dysenterica</i> .....	105
<b>FIGURA 4.33</b> - Potencial de inibição dos extratos etanólicos dos galhos e sementes de <i>E. dysenterica</i> .....	106

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b> - Metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes ao gênero <i>Eugenia</i> .....	21
<b>TABELA 3.1</b> - Sistemas de eluentes utilizados no fracionamento da fração LA .....	40
<b>TABELA 4.1</b> - Massa do material vegetal seco e dos extratos obtidas .....	48
<b>TABELA 4.2</b> - Massa e rendimento das frações obtidas por partições líquido-líquido .....	49
<b>TABELA 4.3</b> - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a substância I (galato de etila) .....	59
<b>TABELA 4.4</b> - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a substância II (quercetina) .....	60
<b>TABELA 4.5</b> - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para a substância III (ácido gálico) .....	68
<b>TABELA 4.6</b> - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância IV (juglanina) .....	75
<b>TABELA 4.7</b> - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância V (kaempferol) .....	83
<b>TABELA 4.8</b> - - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância VI ((-)-epicatequina) .....	91
<b>TABELA 4.9</b> - Dados espectroscópicos de RMN de $^1\text{H}$ para a substância VII (mericetina) .....	97
<b>TABELA 4.10</b> - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta laevigata</i> frente ao ensaio por ingestão com extratos de <i>E. dysenterica</i> .....	100
<b>TABELA 4.11</b> - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta laevigata</i> frente ao ensaio por ingestão com as frações provenientes do extrato etanólico das flores de <i>E. dysenterica</i> .....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS/SÍMBOLOS/SIGLAS

Å	angstrom
atm	atmosfera física
AcOEt	acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna aberta
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE	Cromatografia por exclusão
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
<i>d</i>	dublete
DAD	detector de arranjo de diodos
<i>dd</i>	duplo dublete
CDB	Convenção da diversidade biológica
Dic	diclorometano
<i>dl</i>	dublete largo
DMSO	dimetilsulfóxido
EMBRAPA	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
eV	elétron volts
F.E.	fase estacionária
g	gramas
Glc	glucose
h	altura da fase estacionária
Hex	hexano
Hz	Hertz
IBAMA	Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos naturais
IE	impacto eletrônico
<i>J</i>	constante de acoplamento
LA	Fração acetato de etila
<i>m</i>	múltiplo
mg	milígrama
<i>m/z</i>	razão massa carga
MeOH	metanol
MHz	mega Hertz
mm	milímetros
mL	mililitro
MMA	Ministério do meio ambiente
nm	nanômetros
ppm	partes por milhão
<i>q</i>	quadruplo
<i>R<sub>f</sub></i>	fator de retenção
Rha	raminose
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	singleto
<i>s/</i>	singleto largo
<i>t</i>	triplo
UV	Ultravioleta
δ	deslocamento químico
Φ	diâmetro da coluna cromatográfica
μm	micrometro

**FLUXOGRAMAS**

<b>FLUXOGRAMA 3.1</b> – Fracionamento cromatográfico da fração (LA) .....	40
<b>FLUXOGRAMA 3.2</b> - Isolamento mistura das substâncias <b>I</b> e <b>II</b> .....	41
<b>FLUXOGRAMA 3.3</b> - Isolamento da substância <b>III</b> e <b>IV</b> .....	42
<b>FLUXOGRAMA 3.4</b> - Isolamento da substância <b>V</b> .....	43
<b>FLUXOGRAMA 3.5</b> - Isolamento da substância <b>VI</b> .....	45
<b>FLUXOGRAMA 3.6</b> - Isolamento da substância <b>VII</b> .....	46

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 - Produtos naturais no controle de insetos .....	16
1.2 - O Cerrado brasileiro e suas características .....	18
1.3 - A família Myrtaceae e o gênero <i>Eugenia</i> .....	19
1.4 - A espécie <i>E. dysenteria</i> .....	25
1.5 – Flavonoides .....	27
1.6 - Estudo Alelopático .....	29
1.7 - Formigas Cortadeiras .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	35
2.1. Objetivo Geral .....	35
2.2. Objetivo Específico .....	35
<b>3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	36
3.1 – Materiais e Equipamentos .....	36
3.1.1 – Solventes .....	36
3.1.2 – Reveladores empregados .....	36
3.1.3 – Fases Estacionárias .....	36
3.1.4 – Equipamentos .....	37
3.2 – Metodologia .....	38
3.2.1 – Coleta do material vegetal .....	38
3.2.2 – Obtenção dos extratos etanólicos de <i>E. dysenterica</i> .....	38
3.2.3 – Partição líquido-líquido dos extratos etanólicos de <i>E. dysenterica</i> .....	39
3.2.4 - Perfil químico dos extratos etanólicos de <i>E. dysenterica</i> .....	39
3.2.5 - Fracionamento cromatográfico da partição acetato de etila das flores (LA) de <i>E. dysenterica</i> .....	39
3.2.5.1 - Fracionamento da subfração LA 1.4-5 .....	40
3.2.5.2 - Fracionamento da subfração LA 1.6 .....	41
3.2.5.3 - Fracionamento da subfração LA 1.7 .....	42
3.2.5.3.1.2 - Fracionamento da subfração LA 1.7.6 .....	43
3.3 - Ensaio biológicos .....	46
3.3.1 - Ensaio por ingestão com as operárias de <i>Atta laevigata</i> .....	46
3.3.2 - Ensaio alelopático .....	47

3.4 - Análise Estatística .....	48
<b>4 - RESULTADO E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
4.1 - Substâncias isoladas .....	54
4.2 - Determinação estrutural das substâncias galato de etila e quercetina .....	56
4.3 - Determinação estrutural da substância ácido gálico .....	67
4.4 - Determinação estrutural da substância juglanina .....	72
4.5 - Determinação estrutural da substância kaempferol .....	81
4.6 - Determinação estrutural da substância (-)-epicatequina .....	89
4.7 - Determinação estrutural da substância miricetina .....	96
4.8 - Ensaio biológicos .....	99
4.8.1 - Efeito do extrato etanólico das flores de <i>E. dysenterica</i> e de suas frações frente às operárias de <i>Atta laevigata</i> - ensaios por ingestão .....	99
4.8.2 - Avaliação do efeito alelopático .....	102
<b>5 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>107</b>
<b>6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>108</b>

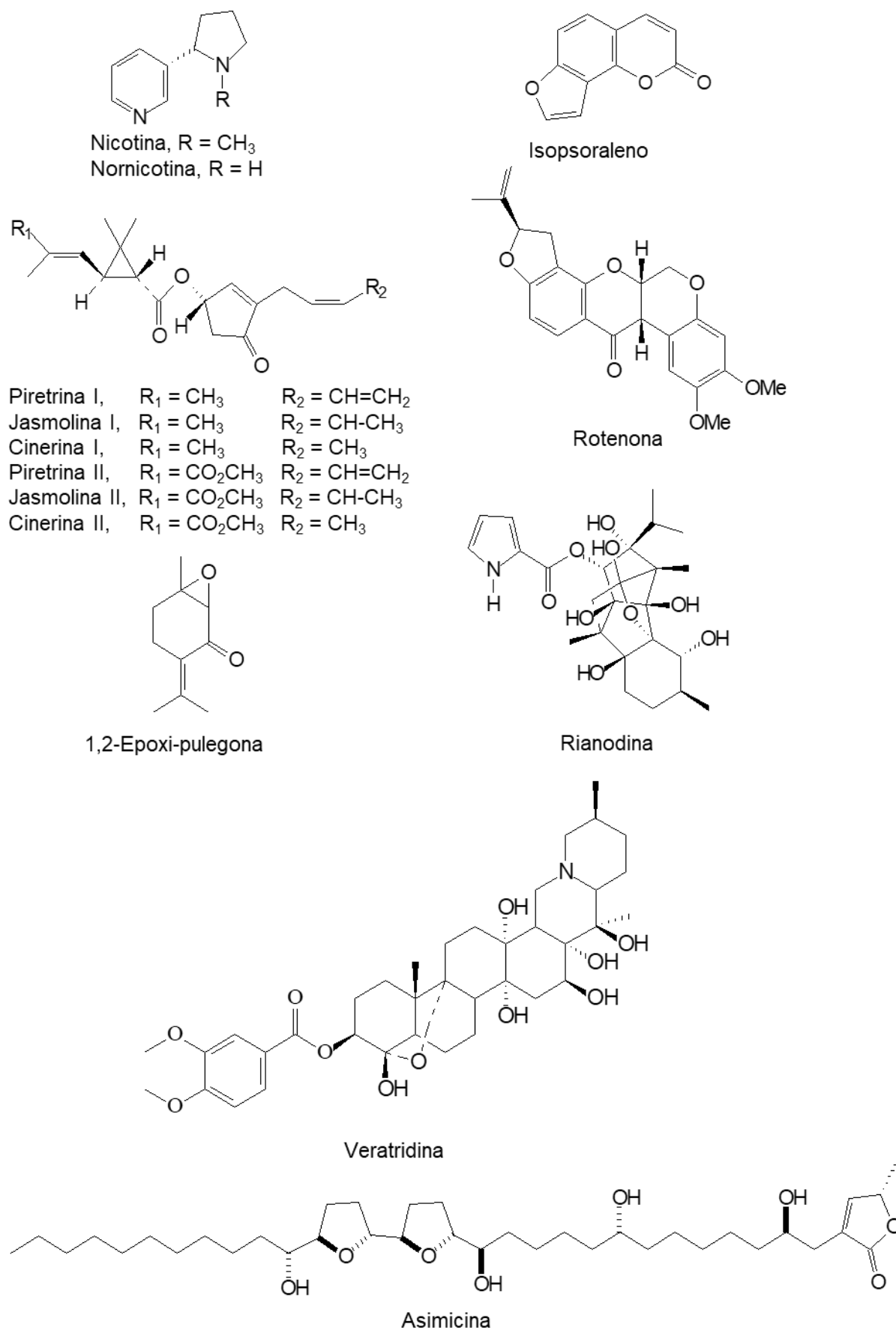
## **1 – INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Produtos naturais no controle de insetos**

A prática humana de utilizar plantas e produtos preparados a partir de seus constituintes, para o controle de insetos-praga, fungos fitopatogênicos e plantas daninhas é uma técnica milenar e universal tão antiga quanto à civilização humana (RATES, 2001). Atualmente substâncias de origem vegetal, sob a forma de pós, extratos e óleos essenciais, com propriedades pesticidas e fungicidas têm desempenhado papel importante em sistemas de manejo de pragas (SINGH et al., 2003; PAWAR & THAKER, 2006; ABAD et al., 2007).

No entanto, para um inseticida natural ser considerado viável comercialmente, ele necessita preencher uma série de requisitos, como eficácia, seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos e biodegradabilidade. Além de possuir matéria-prima abundante, baixo custo, potencial para patentear a tecnologia de obtenção dos compostos inseticidas e facilidade para padronização dos compostos ativos em variedades naturais da planta-fonte (CORRÊA et al., 2007). Podemos destacar na FIGURA 1.1. (p. 17) inseticidas naturais isolados de plantas dos quais alguns são atualmente ou foram muito utilizados e outros que ainda estão em fase de estudos (CORRÊA et al., 2007).

**FIGURA 1.1** - Estructuras químicas de alguns inseticidas oriundos de plantas.



## 1.2 - O Cerrado brasileiro e suas características

O Brasil possui uma extensão territorial de aproximadamente 8.500.000 km<sup>2</sup>, se tornando o quinto maior país do mundo e primeiro, no quesito, na América Latina. Este possui uma variedade de climas e ambientes propícios para o desenvolvimento de diferentes espécies de plantas e animais, os quais são distribuídos em cinco biomas característicos: Pantanal, Pampa, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (BEUCHLE et al., 2015).

De acordo com estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil abriga aproximadamente 20% de toda biodiversidade mundial, tornando-se assim, o maior do planeta em número de espécies endêmicas (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Essa biodiversidade é vista como fonte de substâncias biologicamente ativas e é fundamental sua preservação tanto pelo valor de suas riquezas biológicas como pelo seu potencial como fonte de novos fármacos. Entretanto, o número de espécies estudadas visando o descobrimento de propriedades terapêuticas é extremamente pequeno (BARREIRO & FRAGA, 2005).

Dentre os biomas brasileiros, encontra-se o Cerrado qual é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km<sup>2</sup>, cerca de 22% do território nacional. Sua área contínua incide nos estados de Goiás, Mato Grosso, Tocantins, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Rondônia, Piauí, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além dos enclaves em Roraima, Amapá e Amazonas. O mesmo apresenta extrema abundância de espécies endêmicas com potencial para descoberta de substâncias bioativas. No entanto, sofre uma excepcional perda de habitat levando este a ser considerado um dos “hotspots” mundiais. O Cerrado é o bioma que possui menor porcentagem de áreas sobre proteção integral (8,21%), sendo 2,85% unidades de conservação de proteção integral e 5,36% de unidades de conservação de uso sustentável (MMA, 2016).

Este bioma apresenta grande variedade de sistemas ecológicos, diferentes tipos de solos, relevo, altitude e clima tropical com uma longa estação seca. Sua vegetação rasteira, caracterizada principalmente por gramíneas, coexistindo com árvores esparsos, baixos, tortuosos, de casca grossa, folhas largas e sistema radicular profundo. Essas características são devidas

principalmente ao desequilíbrio no teor de micronutrientes do solo (GUIMARÃES et al., 2006; MEDEIROS, 2011).

Embora a diversidade fitoquímica do Cerrado seja muito ampla, ainda é pouco conhecida e explorada do ponto de vista químico e farmacológico. Mesmo com o aumento de pesquisas a respeito desta flora, ainda resta uma grande quantidade de espécies a serem estudadas, pois inúmeros metabólitos secundários foram isolados deste bioma e apresentaram atividade biológica relevante, o que justifica esse domínio como fonte promissora para a descoberta de substâncias bioativas (NASCIMENTO, 2014).

### **1.3 - A família Myrtaceae e o gênero *Eugenia***

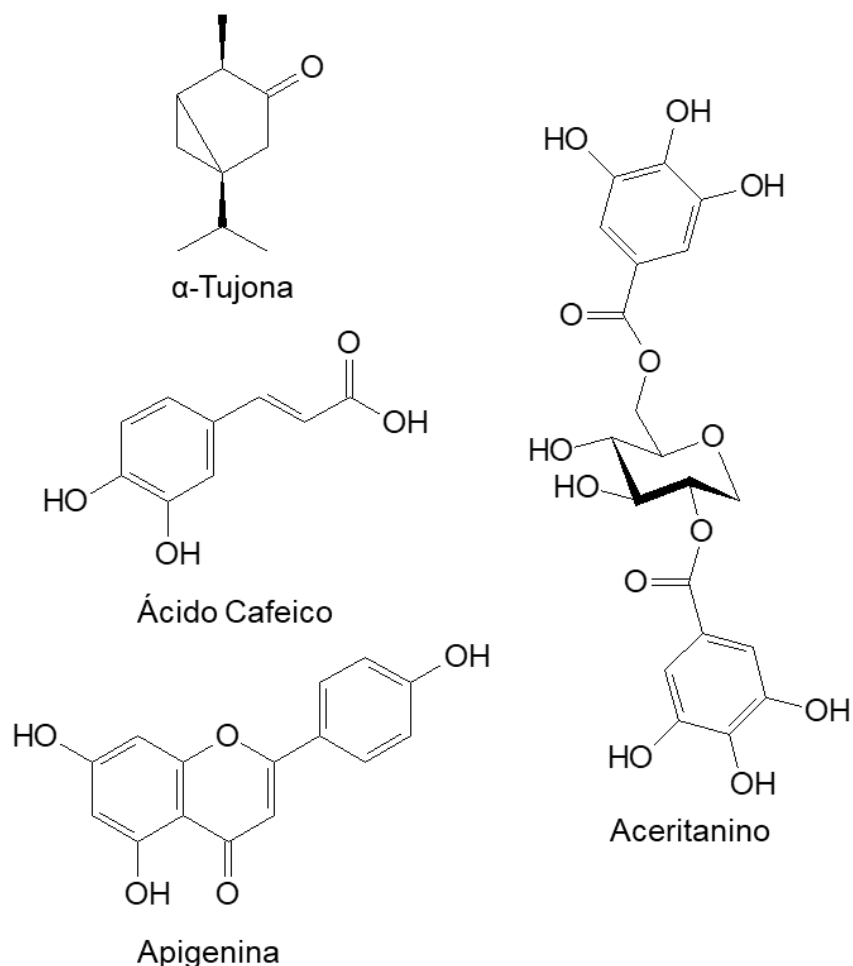
Neste cenário ainda pouco estudado, destaca-se a família Myrtaceae, nativa de regiões tropicais, principalmente América do Sul, Ásia e Austrália, com cerca de 5500 espécies distribuídas em aproximadamente 142 gêneros. No Brasil, podem ser encontrados em torno de 48 gêneros com cerca de 900 espécies (DA SILVA, et al., 2007; CANTANHEDE FILHO et al., 2017).

Os principais gêneros desta família destacam-se devido a utilização de seus frutos: *Psidium* (goiabeira, araçá), *Martierea* (cambucá), *Campomanesia* (guabiroba), *Paivaea* (cambuci), *Syzigium* (jamelão) e *Eugenia* (cagaita) (COLLA, 2012).

O gênero *Eugenia* compreende cerca de 385 espécies presentes apenas no Brasil, distribuído em diferentes regiões, sendo um dos maiores gêneros da família Myrtaceae (SOBRAL et al., 2014). As espécies desse gênero são usadas na medicina popular para inúmeros tratamentos, por possuírem propriedades anestésica e analgésica (*E. caryophyllata*); antidiarreica (*E. axillaris*, *E. grandis*, *E. uniflora* e *E. dysenterica*); antidiabética (*E. jambolana* e *E. puniceifolia*); anti-hipertensiva (*E. uniflora*); laxativa (*E. dysenterica*); anticancerígena em glândulas mamárias (*E. sandwicensis*), dentre outras (GRANGEIRO et al. 2006; COLE et al. 2007). Também tem despertado a atenção da indústria farmacêutica, pois suas frutas são ricas em vitaminas e em substâncias antioxidantes (ISHIKAWA et al., 2008; FRANZON, 2009; STEFANELLO et al., 2011; HU et al., 2012). Desta forma sua composição química destaca-se a presença de terpenoides, derivados fenólicos, flavonoides

e taninos (LAGO et al., 2011). Na FIGURA 1.2 (p. 20) é possível observar alguns metabolitos secundários representantes destas classes.

**FIGURA 1.2** - Estruturas químicas de alguns representantes de terpeno ( $\alpha$ -Tujona), derivado fenólico (Ácido Cafeico), flavonoide (Apigenina) e tanino (Aceritanino).



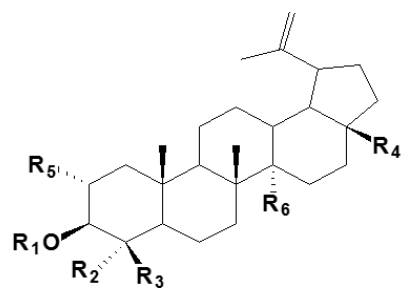
A investigação por atividades biológicas deste gênero, identificou atividades hipoglicemiante, anti-hiperlipidêmica (PEPATO et al., 2005; QI et al., 2010), alelopática (IMATORI et al., 2013), antidiabética, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antitumoral, que estão relacionados aos metabolitos secundários como os, flavonóis poliidroxilados, formados principalmente por aglicona quercetina, miricetina, canferol, mearnsetina e gossipetina (MAGINA, 2008; SINGH et al., 2012).

Destaca-se que menos de 10% das espécies desse gênero foram estudadas quimicamente e biologicamente (GILIOLI, 2010). Na TABELA 1.1, (p. 21) e nas FIGURAS 1.3 a 1.5, (p.22 a 24) são descritos alguns compostos isolados e/ou identificados em espécies de *Eugenia*.

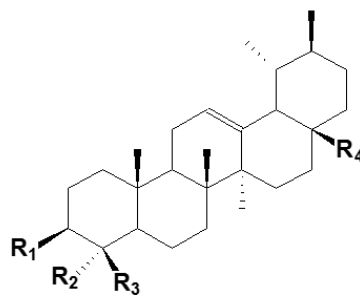
**TABELA 1.1** - Metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes ao gênero *Eugenia*.

<b>Espécie</b>	<b>Metabólitos secundários</b>	<b>Referência</b>
<i>E. flavescens</i>	Ácido betulínico (1), lupeol (2), quercitrina (3), catequina (4), miricitrina (5), ácido protocatecuico (6), ácido gálico (7), rutina (8), miricetina (9), quercetina (10), canferol (11)	CANTANHEDE FILHO et al., 2017
<i>E. brasiliensis</i>	$\alpha$ -amirina (12) e $\beta$ -amirina (13)	MAGINA et al., 2012
<i>E. uniflora</i>	Cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (14) e delfinidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (15)	EINBOND et al., 2004
<i>E. umbelliflora</i>	Petunidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (16), pelargonidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (17), peonidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (18) e malvidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo (19)	KUSKOSKI et al., 2003
<i>E. edulis</i>	Gossipetina-3,8-dimetiléter-5-O- $\beta$ -glicosídeo (20), gossipetina-3,5-dimetiléter (21), miricetina-3,5,3'-trimetiléter (22), ácido protocatéquico (6), epigalocatequina-3-O-galato (24), quercetina-3-O- $\beta$ -galactosídeo (25), quercetina-3-O- $\beta$ -(6''-galoilglicosídeo) (26), quercetina-3-O- $\alpha$ -arabinofuranosídeo (27), canferol-3-O- $\alpha$ -arabinofuranosídeo (28), miricetina-3-O- $\alpha$ -raminosídeo (miricitrina) (5) e quercetina (10)	HUSSEIN et al., 2003
<i>E. sandwicensis</i>	Ácido betulínico (1), ácido 3 $\beta$ - <i>cis-p</i> -cumaroiloxi-2 $\alpha$ , 23 diidroxiolean-12-en-28-óico (29), ácido 3 $\beta$ - <i>trans-p</i> -coumaroiloxi 2 $\alpha$ ,23-diidroxiolean-12-en-28-óico (30), ácido 23- <i>trans-p</i> -cumaroiloxi-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -diidroxiolean-12-en-28-óico (31), hederagenina (32), ácido maslínico (33), ácido alfitólico (34), ácido 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diidroxilup-20(29)-en-28-óico (35), ácido 3 $\beta$ ,23-diidroxilup-20(29)-en-28-óico (36) e $\beta$ -sitosteril 3-O- $\beta$ - <i>d</i> -glucopiranosídeo (37)	GU et al., 2001
<i>E. malaccensis</i>	Miricetina (9), mearnsetina (38), ácido gálico (7) e ácido 3-acetil ursólico (39)	OLIVEIRA et al., 2006
<i>E. catharinae</i>	Monometil-olivetol (40), $\beta$ -sitosterol (41), stigmasterol (42), uvaol (43), eritodiol (44), ácido rotundico (45), quercetina (10), catequina (4) e miricetrina (5)	MORESCO et al., 2016
<i>E. dysenterica</i>	Catequina (4), quercetina (10), epicatequina (46), ácido elágico (47), metil 3-hidroxi-4-metoxilbenzoato (48), metil 4-hidroxifenil propionato (49), <i>E</i> -metil-4-hidroxicinamato (50)	SILVA, 2016 VITEK et al., 2016
<i>E. aquea</i>	Cianidina-3-glucosídeo (51), miricitrina (5), europetin-3-O- $\alpha$ - <i>L</i> -raminosídeo (52), 4-hidroxibenzaldeído (53), floretina (54), mirigalona-G (55) e mirigalona-B (56)	LOWRY, 1976 MANAHARAN et al., 2013

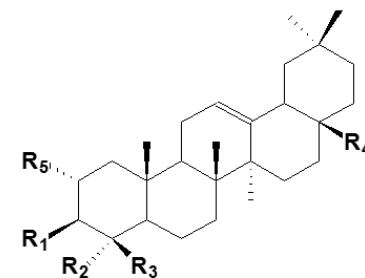
FIGURA 1.3 - Compostos isolados da classe esteroidal em espécies do gênero *Eugenia*.



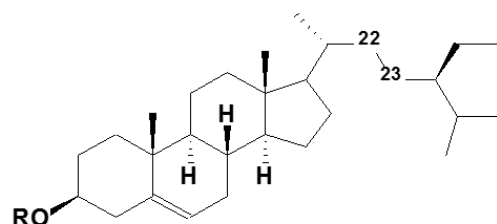
- (1): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = R<sub>6</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = COOH  
 (2): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = R<sub>6</sub> = CH<sub>3</sub>  
 (34): R<sub>1</sub> = H(β); R<sub>6</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = COOH; R<sub>5</sub> = OH  
 (35): R<sub>1</sub> = H(β); R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = COOH; R<sub>5</sub> = OH; R<sub>6</sub> = H  
 (36): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = R<sub>6</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub>OH; R<sub>4</sub> = COOH



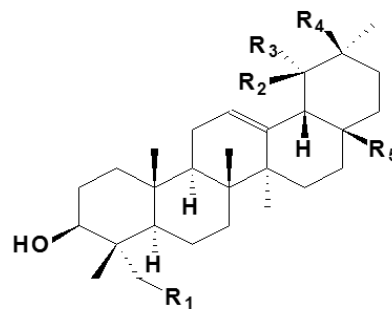
- (12): R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>  
 (39): R<sub>1</sub> = OCOCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = COOH



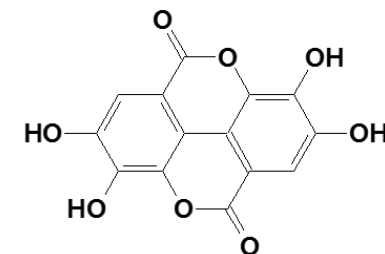
- (13): R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub> = H  
 (29): R<sub>1</sub> = *trans-p*-cumaroiloxi; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub>OH; R<sub>4</sub> = COOH; R<sub>5</sub> = OH  
 (30): R<sub>1</sub> = *cis-p*-cumaroiloxi; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub>OH; R<sub>4</sub> = COOH; R<sub>5</sub> = OH  
 (31): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = OH; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = *trans-p*-cumaroiloxi; R<sub>4</sub> = COOH  
 (32): R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub>OH; R<sub>4</sub> = COOH; R<sub>5</sub> = H  
 (33): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = OH; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = CH<sub>2</sub>OH; R<sub>4</sub> = COOH



- (37): R = O-Glucose; 22,23 - diidro  
 (41): R = H; 22, 23 - diidro  
 (42): R = H; Δ<sup>22,23</sup>

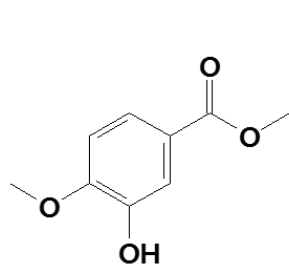


- (43): R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub> = CH<sub>3</sub>OH  
 (44): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H; R<sub>4</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub> = CH<sub>3</sub>OH  
 (45): R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub> = CH<sub>3</sub>OH

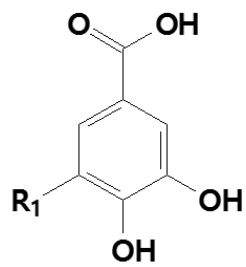


(47)

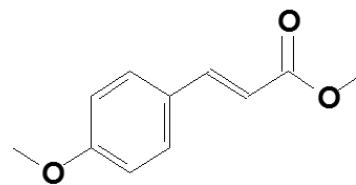
**FIGURA 1.4-** Compostos fenólicos isolados em espécies do gênero *Eugenia*.



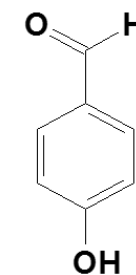
(48)



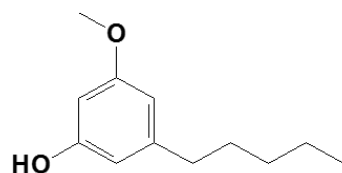
(6):  $R_1 = H$   
(7):  $R_1 = OH$



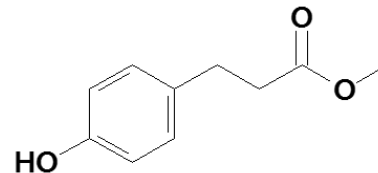
(50)



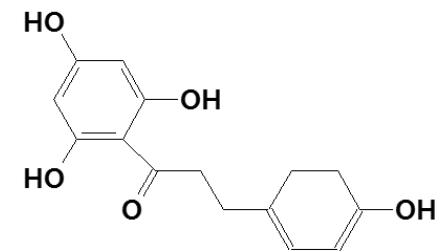
(53)



(40)

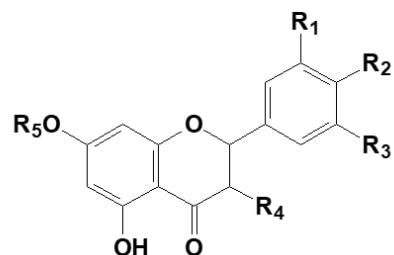


(49)

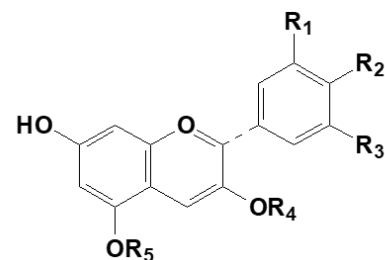


(54)

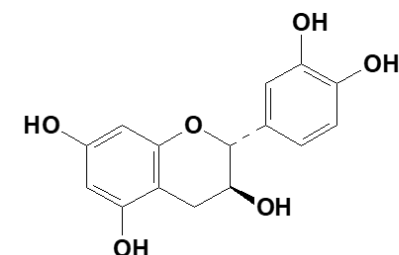
**FIGURA 1.5** - Compostos flavonoídicos isolados em espécies do gênero *Eugenia*.



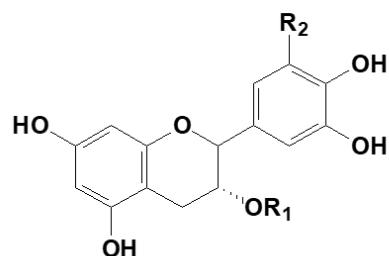
- (3): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>5</sub> = H; R<sub>4</sub> = O-raminose  
 (5): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>5</sub> = H; R<sub>4</sub> = raminose  
 (8): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>4</sub> = O- $\alpha$ -L-Glcp(1-6) $\beta$ -D-Ramp  
 (9): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH; R<sub>5</sub> = H  
 (10): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = OH; R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H  
 (11): R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = OH  
 (25): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = Galactose  
 (26): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = Galoiliglicosídeo  
 (27): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = Arabinose  
 (28): R<sub>1</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = O- $\alpha$ -Arabinose  
 (38): R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>5</sub> = H  
 (40): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = O- $\alpha$ -L-Ramp; R<sub>5</sub> = CH<sub>3</sub>



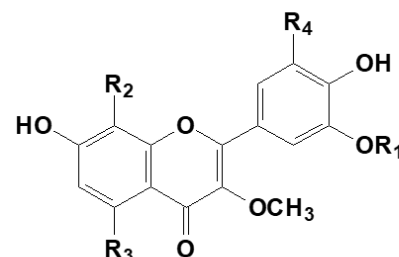
- (14): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH; R<sub>5</sub> = R<sub>3</sub> = H; R<sub>4</sub> = O-Glcp  
 (15): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>5</sub> = H; R<sub>4</sub> = O-Glcp  
 (16): R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = O- $\beta$ -Glcp; R<sub>5</sub> = H  
 (17): R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>4</sub> = O- $\beta$ -Glcp  
 (18): R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = R<sub>5</sub> = H; R<sub>4</sub> = O- $\beta$ -Glcp  
 (19): R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = O- $\beta$ -Glcp; R<sub>5</sub> = H  
 (51): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = OH; R<sub>4</sub> = Glcp; R<sub>5</sub> = H



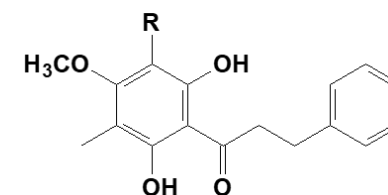
(4)



- (24): R<sub>1</sub> = Galato; R<sub>2</sub> = OH  
 (46): R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H



- (20): R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>3</sub> = O-Glucose  
 (21): R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H; R<sub>2</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>  
 (22): R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> = H; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> = OH



- (55): R = H  
 (46): R = CH<sub>3</sub>

#### 1.4 - A espécie *E. dysenteria*

A espécie *E. dysenteria*, conhecida popularmente como “cagaita” ou “cagaiteira”, é uma espécie da flora apícola do Cerrado e destaca-se principalmente pelos seus frutos (FIGURA 1.6 A-D, p.25). Está distribuída nos estados da Bahia, Tocantins, São Paulo, Goiás e Minas Gerais (NAVES et al., 1995). Esta árvore encontra-se bem adaptada a solos pobres, que são característicos do Cerrado brasileiro (OLIVEIRA et al., 2011). A população utiliza os frutos da cagaiteira *in natura* ou beneficiam o fruto em forma de picolés, sucos, sorvetes, geleias e licor, exibem características sensoriais ímpares (MARTINOTO et al., 2008; MAZUTI SILVA et al., 2015).

**FIGURA 1.6** - A) Árvore de *E. dysenterica*; B) Folhas; C) Flores; D) Ramos com frutos maduros.



(Fonte: Figura A e B o Autor; C e D PINTEREST, 2017).

Em relação à utilização medicinal, suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular como antidiabético, para problemas cardíacos e icterícia. Além disso, a infusão de folhas é usada para redução do colesterol (SILVA et al., 2010). O chá de suas folhas é empregado para problemas de coração e diarreia, enquanto que o chá de suas flores para o tratamento dos rins, além de haver relatos de flor e casca serem utilizadas para tratamento da bexiga e do ciclo menstrual (CHAVES, 2001; DUBOC et al., 2007). Seus frutos causam disenteria (que remete à origem de seu nome) quando ingeridos em excesso ou fermentados pelo sol, causando um mal-estar semelhante à embriaguez. Por outro lado, a infusão de folhas e da casca da árvore tem efeito contrário, sendo empregada pela medicina popular como antidiarreico (ISMAN 2006).

Já estudos científicos com *E. dysenterica* levou a observação de um alto potencial biológico, sendo relatada como inibidor da enzima tirosinase (SOUZA et al., 2012); agente antiviral (CECÍLIO et al., 2012); atividade genotóxica e citotóxica (VIEIRA et al., 2012); ação moluscicida (BEZERRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006); antileucêmica (VITEK et al., 2016); fungicida (COSTA et al., 2000; ROESLER et al., 2010) e ação antioxidante (JORGE et al., 2010).

De acordo com Cecílio e colaboradores (2012), o extrato etanólico de folhas de *E. dysenterica* inibe a replicação de rotavírus SA11 *in vitro* e não apresenta toxicidade na concentração de até 500 µg/mL. sugerindo que esta ação pode estar relacionada com flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas e terpenos presentes no extrato (CECÍLIO et al., 2012; MAZUTI SILVA et al. 2015). Já Carvalho (2009) determinou a capacidade antioxidante pela polpa que atingiu o máximo de atividade na concentração de 500 µg/mL, utilizando o método fotocolorimétrico do DPPH. Outro estudo avaliou o óleo essencial das folhas desta espécie o qual demonstrou atividade inibidora *in vitro* de fungos da espécie *Cryptococcus neoformans*, com uma concentração abaixo de 250 µg/mL, enquanto quatro cepas mostraram sensibilidade com valores abaixo de 125 µg/mL (COSTA et al., 2000).

Em contrapartida aos efeitos benéficos da espécie, alguns estudos realizados têm verificado efeitos tóxicos ou indesejáveis. Observaram a atividade tóxica em ratos machos com o consumo da prata triturada de *E. dysenterica*, mostrando redução no peso do timo, degeneração discreta do fígado e

diminuição dos níveis de creatinina. Também foi comprovada a atividade tóxica do extrato da semente de *E. dysenterica* sobre larvas de *Artemia salina* (FONSECA et al., 2013).

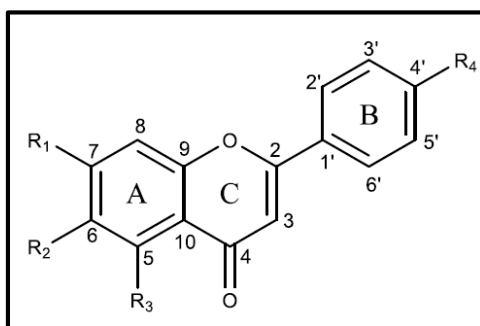
## 1.5 - Flavonoides

Os flavonoides são compostos com baixa massa molecular, derivados de fenilbenzopiranos, seu esqueleto base consiste em um esqueleto difenilpropano (C6-C3-C6) com dois anéis benzênicos (anel A e B) ligados a um anel pirano (C) FIGURA 1.7, (p. 28) (HICHIRI et al., 2011). A numeração da estrutura dos flavonoides é iniciada pelo sistema benzopirânico, sendo os átomos de carbonos individuais numerados com algarismos arábicos para os anéis A e C e números marcados com linha (') para o anel B e a numeração 9 e 10 podem ser substituídas por 8a e 4a, os substituintes recebem numeração de acordo com a posição e a subclasse flavonoídica.

Os flavonoides (termo derivado da palavra em latim “flavus”, que significa amarelo) constituem uma classe de compostos polifenólicos de ampla distribuição no reino vegetal. São encontrados naturalmente em plantas, frutas, vegetais e cereais principalmente na forma de glicosídeos, são os pigmentos amarelos, vermelhos azuis e laranjas das flores, responsáveis também pela cor amarela das folhas no outono. Possuem papel importante no crescimento normal, desenvolvimento e defesa das plantas. Atuam como atrativos visuais contribuindo com a polinização, como um mecanismo de defesa do ataque de microrganismos, insetos e como protetores da radiação ultravioleta por suas propriedades antioxidantes (ZHANG et al., 2008; HIDALGO et al., 2010; YUNES et al., 2012).

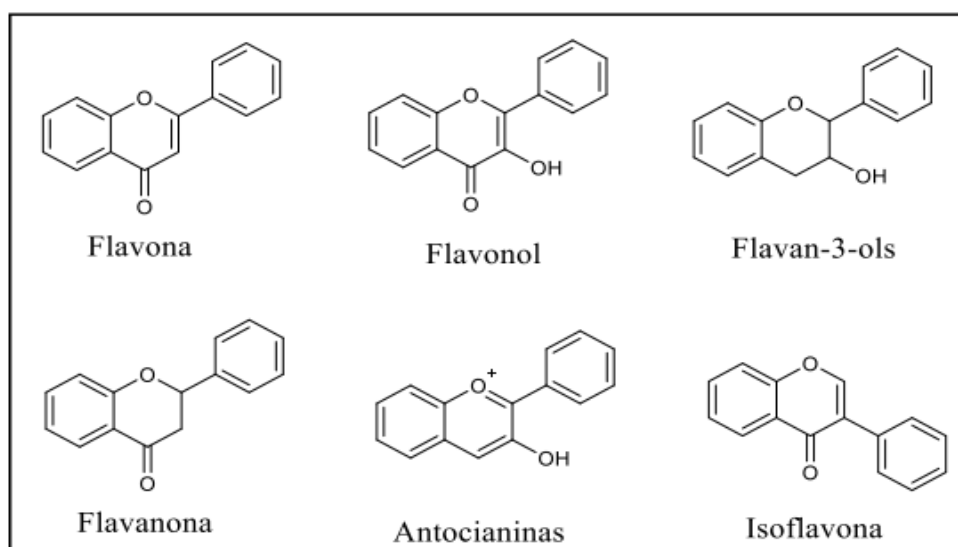
O organismo humano não produz essas substâncias e por isso possuem um papel importante na dieta humana, mesmo não sendo considerados nutrientes. Estima-se que a ingestão diária de flavonoides na dieta é de 50-800 mg/dia (PIETTA, 1999) e a eles são atribuídas uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas, tais como antioxidante, cardioprotetora, vasoprotetora, antitrombótica, ação antiviral e contra certas formas de câncer (HIDALGO et al., 2010; YUNES & CECHINEL, 2012).

**FIGURA 1.7** - Estrutura básica de um flavonoide (designação dos anéis e numeração dos átomos de carbono).



A biossíntese dos flavonoides ocorre por via mista, a via do ácido chiquímico (que origina o anel B e os três átomos de carbono que formam o anel C) e a do acetato (dá origem ao anel A), assim conhecida como via dos fenilpropanoides (sintetizado a partir do ácido chiquímico) que age como precursor na síntese de um intermediário ao qual adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estrutura. Apresentam seis subclasses majoritárias, de acordo com grau de oxidação do heterocíclico, em: flavonas, flavonóis, antocianinas, isoflavonas, flavanonas e flavan-3-ols (FIGURA 1.8, p. 28), (DEWICK, 2009; VUKICS et al., 2010). A combinação das subclasses com glicosilações em diferentes posições e a variedade de açúcares existentes, produz uma grande quantidade de diferentes compostos.

**FIGURA 1.8** - Classificação dos flavonoides por subclasse.



Os flavonoides são encontrados nas plantas como aglicona (flavonoide sem a unidade de açúcar), ou como derivados glicosilados. As moléculas de açúcar podem se unir às estruturas dos flavonoides, preferencialmente na posição 3 do anel C e com menor frequência na posição 7 do anel A, de forma que estes compostos são encontrados como *orto*-glicosídeos, sendo a glucose o resíduo de açúcar mais frequente. Outros açúcares também presentes nos compostos glicosilados são galactose, ramnose, arabinose e xilose (PIETTÁ, 2000; ALMEIDA, 2006).

### **1.6 - Estudo Alelopático**

Alelopatia é normalmente definida como o efeito que uma determinada planta causa no crescimento e desenvolvimento da vegetação adjacente através da liberação de compostos químicos para o ambiente (RICE, 1984). Essa interação acarreta uma resposta, positiva ou negativa na planta sensível a tais metabólitos chamados de aleloquímicos, que são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (INDERJIT & NILSEN, 2003; ALMEIDA et al., 2006). A liberação de substâncias químicas no meio ambiente pode ocorrer de diferentes formas, sendo que as rotas de liberação incluem a volatilização pelas partes aéreas do vegetal, exsudação pelas raízes, a lixiviação das superfícies do vegetal pela chuva, neblina, orvalho e principalmente pela decomposição de resíduos vegetais (ANAYA, 1999; MARASCHIN-SILVA & AQUILA, 2006).

A atividade alelopática envolve fatores bióticos como microrganismos e densidade vegetal, além de fatores abióticos, como incidência de raios UV, disponibilidade de água, temperatura, solo, entre outros. Fatores esses que podem afetar a liberação, composição química e o modo de atuar destes compostos (INDERJIT, 1996).

A forma de ação dos aleloquímicos pode ser de duas formas, sendo (a) “efeito indireto”, quando o composto alelopático modifica, primeiramente, algumas propriedades químicas e nutricionais do solo e também na população de organismos que habitam o mesmo; (b) “efeito direto”, que são quando a substância interfere no metabolismo vegetal (FERREIRA & AQUILA, 2000; MARASCHIN-SILVA & AQUILA, 2006), podendo assim afetar a concentração e

balanço hormonal, a estrutura celular, a permeabilidade das membranas, a absorção de minerais, influenciar a fotossíntese; a atividade enzimática; as relações hídricas e a condução de seiva, além de poder alterar DNA e RNA (RICE, 1984; RIZVI, 1992; MARASCHIN-SILVA & AQUILA, 2006).

Sabendo que não é possível descartar o uso de herbicidas sintéticos completamente, o manejo com herbicidas naturais que aja diretamente na planta invasora pode reduzir seu uso de forma que não prejudique a produção agrícola e minimize os danos ao meio ambiente (BHADORIA, 2011; CANTANHEDE FILHO et al., 2017).

Entre os aleloquímicos comumente citados como responsáveis por causarem efeitos diretos e indiretos estão os terpenos, alcaloides, taninos, flavonoides, esteroides, ácidos graxos de cadeia longa e lactonas insaturadas (MALHEIROS & PERES 2001; FORMAGIO et al., 2010; IMATORI et al., 2013).

Sendo assim, na busca de bioherbicidas, a espécie *E. dysenterica* foi selecionada para avaliação do potencial fitotóxico, associado sobretudo à inibição da germinação de sementes, do crescimento da radícula e do hipocótilo frente a três espécies de plantas, *Lactuca sativa* (alface) e duas espécies de plantas invasoras de pastagens *Emilia sonchifolia* (serralhinha) e *Bidens pilosa* (picão-preto).

## 1.7 - Formigas Cortadeiras

As formigas cortadeiras são representadas principalmente pelos gêneros mais evoluídos *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas). Estas formigas pertencem à classe Insecta, ordem Hymenoptera e estão reunidas na família Formicidae, subfamília Myracinae e tribo Attini. São principalmente conhecidas como pragas devido seu poder de destruição de um amplo número de espécies vegetais e pelo prejuízo econômico para à agricultura e silvicultura brasileira (BERTI et al., 1992; LEITE, 2005).

Estas formigas são consideradas “cortadeiras” porque elas cortam e carregam para o ninho diversos materiais vegetais ou utilizam das porções já despendidas como flores, folhas e galhos finos (FERNANDES et al, 2007; REIS FILHO et al., 2007; GIMENES, 2013). Estes insetos exibem características sociais, como cuidados e cooperação entre companheiras de ninho, separação

de tarefas em que cada casta realiza seu papel e ainda a sobreposição de gerações (MARINHO et al., 2006).

A população de um saúveiro é dividida em castas de trabalhadores, esses indivíduos se diferenciam morfológicamente de acordo com as funções que desempenham na colônia (DELLA LUCIA & VILELA, 1993). As formigas maiores, denominadas soldados, tem como função cortar as folhas e carregar para dentro do ninho, e por serem as mais fortes o seu principal dever é cuidar da defesa do ninho. As de médio porte, são denominadas operárias, têm a função de picar o material vegetal em pedaços menores. As menores, conhecidas como jardineiras, cuidam do crescimento do jardim de fungo, alimentando os ovos, larvas e pupas (JACCOUD, 2000; BOULOGNE et al., 2012; BATALHÃO, 2014).

No exterior dos ninhos das saúvas são observados montes de terras granuladas que são das escavações que geram inúmeras galerias que interligam as câmaras do formigueiro, responsáveis por acomodar a rainha, o jardim de fungo e até mesmo o lixo (JACCOUD, 2000).

As formigas Attini são restritas ao continente Americano e constituem um grupo unicamente de clima tropical. Sendo que sua distribuição geográfica vai desde a região sul dos Estados Unidos até a região central do Argentina, incluindo várias ilhas do Caribe e algumas ilhas das Antilhas, não ocorrendo no Chile e nas regiões transandinas da América do Sul (REIS et al., 2007; BICALHO, 2011).

O maior número de espécies de saúvas da América do Sul está no Brasil, são 10 espécies de um total de 15 do gênero, sendo a maior ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, seguindo da Argentina e do Paraguai (NORTH et al., 1997). Estas espécies quando se encontram em ambientes equilibrados ecologicamente, apresentam diversos benefícios a natureza, uma vez que fazem a poda de algumas plantas, exercem papel importante na aeração do solo, incorpora material orgânico a terra, é predadora de diversos artrópodes, entre outras utilidades (MOUTINHO et al., 2003; PETERNELLI et al., 2004; BATALHÃO, 2014).

Nos ambientes alterados pela atividade humana, a densidade dos ninhos de formigas cortadeiras pode aumentar de 5 a 10 vezes em relação a um ambiente equilibrado, gerando danos à agricultura e silvicultura, uma vez que é grande o número de culturas atacadas e danificadas por estes indivíduos

(ALMEIDA et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; GIMENES, 2013). Fato esse que faz com que as formigas sejam consideradas as mais sérias pragas das áreas agroflorestais do continente, sendo que seu controle é uma das maiores preocupações dos agricultores e dos silvicultores.

Saúvas da espécie *Atta laevigata*, conhecida popularmente como saúva cabeça de vidro, é praga de florestas e plantas cultivadas em geral, pastagens, eucaliptos, pinheiros, milho, coqueiros novos, cana-de-açúcar e mandioca. Esta espécie de formiga possui danos drásticos, visto sua grande demanda de ramos e folhas para utilização como substrato para o desenvolvimento dos fungos para alimentação da colônia (FRANCO et al., 2013).

Todas as espécies da tribo Atinni caracterizam-se por apresentarem uma relação indispensável de simbiose com fungo específico, cultivado em substrato de origem vegetal (MIYASHIRA et al., 2012). Estes gêneros, *Atta* e *Acromyrmex*, cortam partes vegetais e as utilizam para cultivar seu fungo.

As formigas cortadeiras vivem em simbiose com o fungo *L. gongylophorus*. Essa é uma relação interespecífica de mutualismo, havendo grande dependência entre ambos. O fungo cresce dentro do ninho, mais especificamente na câmara do jardim do fungo, onde é cultivado em substratos de origem vegetal coletados pelas formigas. O fungo, serve como alimento para a rainha e as larvas e metaboliza polissacarídeos derivados das plantas em nutrientes ingeríveis pelas formigas para alimentar as operárias adultas, em troca às formigas fornecem massa vegetal para seu desenvolvimento e defende o fungo de parasitas e possíveis competidores (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009).

A base alimentar da colônia é constituída pelo fungo simbiote, mas não é a única, uma vez que este representa apenas 9% da necessidade energética das operárias adultas. As operárias adultas ingerem seivas diretamente das plantas no momento do seu corte e complementam sua alimentação (SILVA et al., 2003; RICHARD et al., 2005).

Desta forma, as necessidades energéticas das operárias são supridas em grande parte pela energia obtida de carboidratos, principalmente polissacarídeos que representam a maior massa do material sólido vegetal

(WEBER, 1972; BICALHO, 2011;). O fungo possui enzimas que digerem celulose, xilana, amido, pectina e proteínas (MARICONI, 1974; FEBVAY & KERMARREC, 1981).

A relação existente entre as formigas e o fungo, possibilita uma maior adaptação devido a alimentação diversificada de vegetais, onde é refletido nos seus ninhos que são extremamente complexos e populosos, além de sua grande importância ecológica, uma vez que são considerados herbívoros dominantes em diferentes ecossistemas (HOLLDOBLER & WILSON, 1990).

É necessário o controle desses insetos, seja atacando diretamente as formigas com inseticidas ou pelo fungo simbiote. Entretanto, uma grande dificuldade encontrada no controle se deve à ocorrência delas o ano todo, facilidade de formação e estabilização de novas colônias e pela complexidade de um formigueiro adulto (WEBER, 1972).

Sabendo que as formigas cortadeiras também possui aspectos positivos e importantes para a natureza, como os já citados anteriormente, o controle seria a alternativa mais adequada e não o combate (BICALHO, 2011).

As principais formas de controle dos formigueiros são os métodos biológicos, mecânicos e químicos. No controle biológico utiliza-se de predadores, parasitoides e microrganismos (fungos, bactérias e vírus) que usa a formiga como hospedeira. Entretanto, ainda é necessário pesquisas para que este método pode ser utilizado com segurança, principalmente no meio ambiente. No controle mecânico é baseado na destruição do ninho até que a rainha seja localizada e morta. Este é um método pouco utilizado, uma vez que apresenta uma baixa viabilidade, somente para ninhos jovens. Já os métodos químicos são os mais empregados no campo, pois oferece maior segurança ao operador, dispensa mão de obra e equipamentos especializados e permite o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (BOARETTO & FORTI, 1997; PETERNELLI et al., 2008; BATALHÃO, 2014).

A utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos, que são em sua maioria compostos fosforados, halogenados e sulfurados, ocasiona problemas como aparecimento de resistência, contaminação do solo e lençóis freáticos, além da não especificidade atingir espécies não-alvo ocasionando desequilíbrio ecológico (BATALHÃO, 2014).

Sendo assim, a busca por métodos alternativos (extratos naturais e inimigos naturais) no controle de formigas cortadeiras tem crescido consideravelmente como medida para diminuir o emprego de inseticidas sintéticos (BATALHAO, 2014).

Neste contexto, visando à busca de inseticidas mais seletivas e menos prejudiciais ao meio ambiente, o Grupo de Produtos Naturais do DQ/UFG-RC, juntamente com a UEG de Ipameri-GO avaliou o efeito da *E. dysenterica* no controle de *A. laevigata*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo químico do extrato etanólico das flores de *E. dysenterica* (Myrtaceae), assim como avaliar o potencial inseticida e alelopático da espécie estudada.

### 2.2. Objetivo específico

- Fracionar o extrato etanólico das flores de *E. dysenterica* através de diferentes técnicas cromatográficas;
- Isolar, identificar e caracterizar os metabólitos secundários presentes no extrato, empregando técnicas de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais;
- Avaliar o efeito inseticida dos extratos etanólicos das folhas, flores, galhos e sementes frente à operárias de formigas cortadeira (*A. laevigata*), empregando técnica de dieta contaminada;
- Investigar, por meio do teste alelopático a capacidade herbicida dos extratos etanólicos das folhas, flores, galhos e sementes.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1. Materiais e equipamentos

##### 3.1.1. Solventes

- Solventes grau P.A.: hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, de diversas marcas.
- Solventes grau HPLC: Isopropanol, metanol e acetonitrila, marcas Panreac, Tedia J. T. Baker.
- Solventes deuterados para RMN: acetona, dimetilsulfóxido e metanol, marcas Sigma-Aldrich e Merck.

##### 3.1.2. Reveladores empregados

- Solução ácida de vanilina (3,0 g de vanilina, 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado).
- Solução de *Dragendorff* (1 mL de solução estoque do reagente, 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água destilada).
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz no comprimento de onda de 254 e 365 nm.
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, marca Espectroline, modelo CM-26 UV.

##### 3.1.3. Fases Estacionárias

- Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC): sílica gel (70-230 *mesh*) e sílica gel (230-400 *mesh*) denominadas respectivamente sílica comum e sílica *flash*, ambas Macherey-Nagel.

- Cromatografia de exclusão em coluna aberta (CE): *Sephadex* LH-20, Sigma-Aldrich.
- Cromatografia em camada delgada (CCD): fase estacionária: sílica gel 60 com F254 ( $\phi = 0,2$  mm), em folhas de alumínio, Fluka.
- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE): coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm).

#### 3.1.4. Equipamentos

- Evaporador Rotativo marca Fisatom, modelo 801, com banho de aquecimento redondo Fisatom, modelo 550 e bomba de hidrovácuo da marca VACUUBRAND GMBH + CO KG, modelo ME 1C.
- Agitador Vórtex marca IKA, modelo Genius 3.
- Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) da marca Agilent, modelo 7820 A – Series MSD 5975, equipado com coluna HP- 5 MS (30 m x 250  $\mu\text{m}$  e filme 0,25  $\mu\text{m}$ ).
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) - Sistema Analítico: Equipamento da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba quaternária, com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor manual e software *EZChrom Edition*.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) – Sistema Preparativo/Semi-Preparativo: Equipamento da marca Agilent, modelo 1260 *Infinity*, bomba preparativa com extensão gradiente, com detector de múltiplos comprimentos de onda (MWD), equipado com coluna LUNA C-18 (100 Å e 10  $\mu\text{m}$  – 250 x 7,0 mm), injetor manual e software *Chem Station*.

- Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear da marca Bruker, modelo Ascend 400'54 (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Experimentos realizados em colaboração com Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG.
- Equipamento da marca Bruker, modelo Avance III - 11,7 Tesla (500 MHz para  $^1\text{H}$  e 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Experimentos realizados em colaboração com o Prof. Dr. Luciano Morais Lião, Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO.

## **3.2. Metodologia**

### **3.2.1. Coleta do material vegetal**

As diferentes partes da espécie *E. dysenterica* foram coletadas nas dependências da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão (UFG/RC), município de Catalão – GO, sob a Autorização nº 010698/2013-2 CNPq e coordenadas de GPS (S18°09'16.4"; W47°55'43.2"), sendo esta parte do trabalho auxiliada pelo Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro (Instituto de Biotecnologia, UFG/RC), o qual realizou a identificação e a catalogação da espécie.

### **3.2.2. Obtenção dos extratos etanólicos de *E. dysenterica***

O material vegetal (folha, flor, galho e semente) foi seco a temperatura ambiente, moído em moinho de facas e submetido à maceração em etanol a temperatura ambiente, sendo realizadas três extrações de sete dias cada. Após cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado em rotaevaporador com temperatura de 40 °C, sendo obtidos os extratos brutos etanólicos de *E. dysenteria*.

### **3.2.3. Partição líquido-líquido dos extratos etanólicos de *E. dysenterica***

Realizou-se se partição líquido-líquido dos extratos etanólicos com a finalidade de minimizar a complexidade química dos mesmos. Cerca 20,0 g de cada um dos extratos brutos das flores (L), galhos (G), sementes (S) e folhas (F) foram individualmente solubilizados em 300,0 mL de uma mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7) e submetidos à extração sucessivas líquido-líquido com hexano (200,0 mL) e acetato de etila (200,0 mL), sendo cada uma das extrações realizadas em triplicata. Os solventes foram evaporados, obtendo-se as frações hexano (H), acetato de etila (A) e hidroalcóolica (W).

### **3.2.4. Perfil químico dos extratos etanólicos de *E. dysenterica***

O perfil cromatográfico dos extratos etanólicos de *E. dysenterica* foi realizado em coluna C18, utilizando acetonitrila/água em gradiente exploratório de 10-90% de acetonitrila durante 60 min, com fluxo de 1 mL/min e detector de UV/DAD (217, 220, 240, 254 e 365 nm).

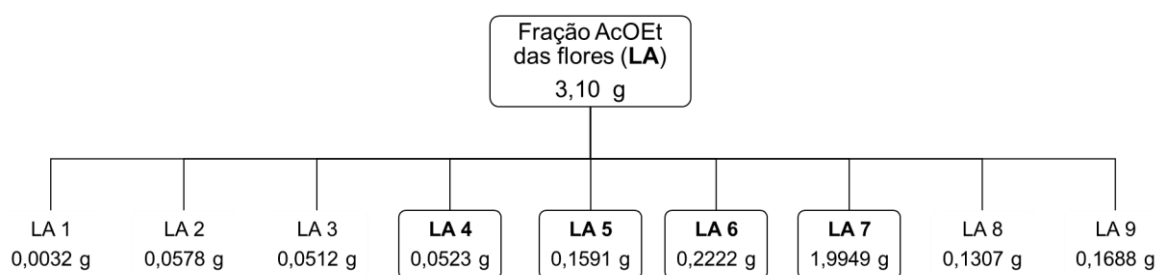
### **3.2.5. Fracionamento cromatográfico da partição acetato de etila das flores (LA) de *E. dysenterica***

A fração LA (3,10 g) foi fracionada por CC ( $\phi \times h = 6,0 \times 15,0$  cm), utilizando-se sílica gel (70-230 *mesh*) como fase estacionária e eluição gradiente em ordem crescente de polaridade (TABELA 3.1, p. 40), visando à separação dos constituintes químicos em grupos, de acordo com suas polaridades (FLUXOGRAMA 3.1, p. 40). Após fracionamento, as nove subfrações obtidas foram analisadas por CCD, reveladas sob radiação UV (254 e 365 nm) e com solução ácida de vanilina, além de seus perfis químicos analisados por CG-EM e CLAE-DAD. Selecionou-se para dar continuidade ao trabalho de isolamentos as subfrações 4, 5, 6 e 7 por apresentarem maior massa e perfil químico indicativo da presença de vários compostos. Devido a semelhança apresentada pelas subfrações 4 e 5, ambas foram reunidas para estudo em conjunto e denominadas subfração LA 1.4-5.

**TABELA 3.1** - Sistemas de eluentes utilizados no fracionamento da fração LA.

Frações	Sistema de eluente	Proporção
LA 1	Hex	100%
LA 2	Hex/AcOEt	1:1
LA 3	Hex/AcOEt	1:1
LA 4	AcOEt	100%
LA 5	AcOEt	100%
LA 6	AcOEt	100%
LA 7	AcOEt/MeOH	1:1
LA 8	MeOH	100%
LA 9	MeOH	100%

**FLUXOGRAMA 3.1** - Fracionamento cromatográfico da fração LA.

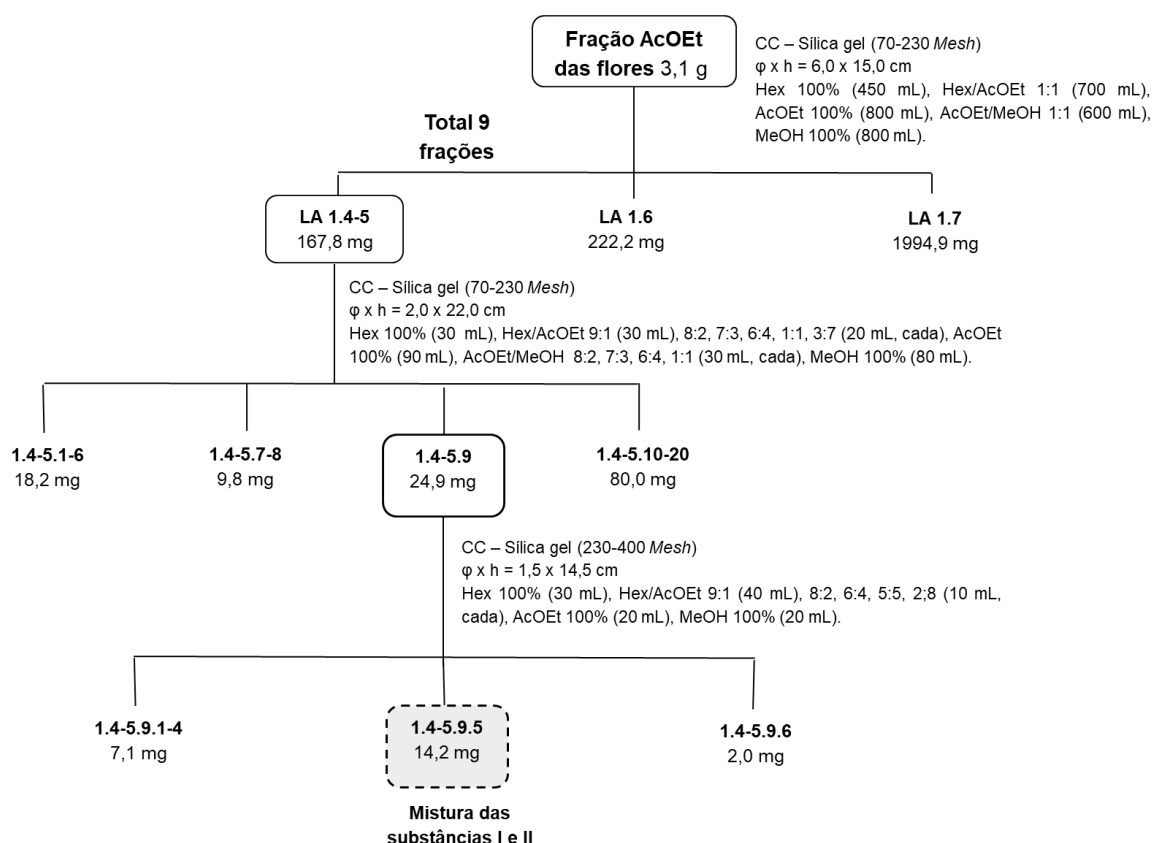


### 3.2.5.1. Fracionamento da subfração LA 1.4-5

A fração LA 1.4-5 (167,8 mg) foi fracionada utilizando CC com sílica gel e eluição gradiente em ordem crescente de polaridade. O fracionamento resultou em um total de vinte frações que foram analisadas por CCD e posteriormente reunidas pela similaridade nos valores de  $R_f$ . A subfração LA 1.4-5.9 apresentou manchas com valores de  $R_f$  entre 0,4 e 0,7, o que fez com que a mesma fosse escolhida para dar continuidade aos estudos. O fracionamento de LA 1.4-5.9 (24,9 mg) foi realizado empregado CC em sílica gel e eluição gradiente em ordem crescente de polaridade, originando seis frações que foram agrupadas após análise por CCD. Desta subfração foi isolada a mistura das substâncias I e II (FLUXOGRAMA 3.2, p. 41). Para confirmar a identificação da substância II, a amostra e um padrão foram submetidos à CLAE-DAD, sistema analítico nas seguintes condições: coluna Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (5

$\mu\text{m}$ , 150 x 4,6 mm). Loop: 20  $\mu\text{L}$ . Vazão constante 1,0 mL/min. Fase móvel: H<sub>2</sub>O (solvente A) e CH<sub>3</sub>CN (solvente B). Gradiente: 0 min - 10% de B; 3 min - 10% de B; 10 min - 30% de B; 15 min - 50% de B; 20 min - 80% de B; 25 min - 100% de B; 30 min - 100% de B.

### FLUXOGRAMA 3.2 - Isolamento da mistura das substâncias I e II.

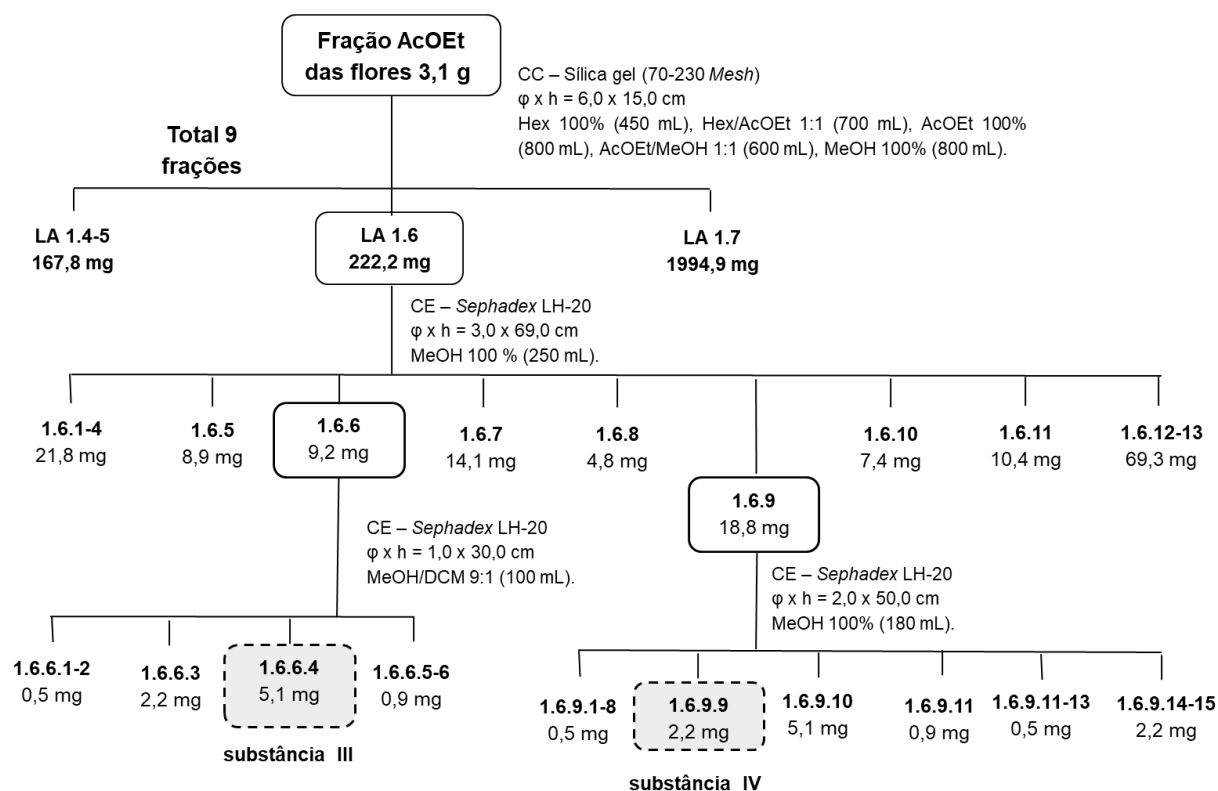


#### 3.2.5.2. Fracionamento da subfração LA 1.6

A subfração LA 1.6 (222,2 mg) foi fracionada por CE com fase estacionária *Sephadex* LH-20 e eluição em modo isocrático (FLUXOGRAMA 3.3, p. 42). Foram coletadas treze frações, as quais foram agrupadas em nove junções devido às similaridades químicas apresentadas via CCD. As subfrações LA 1.6.6 e 1.6.9 apresentaram manchas visíveis sob radiação UV, nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, e manchas amarelas intensas quando reveladas com solução ácida de vanilina. Sendo assim, estas foram selecionadas para novo fracionamento, com a finalidade de remoção dos

pigmentos presentes e separação dos constituintes químicos de interesse. A subfração LA 1.6.6 (9,2 mg) foi submetida a CE com *Sephadex* LH-20 e eluição em modo isocrático. Foram coletadas seis frações, na qual estas foram agrupadas em quatro junções devido as similaridades químicas observadas via CCD, e da subfração LA 1.6.6.4 foi isolada a substância III. A subfração LA 1.6.9 (18,8 mg) foi submetida a CE utilizando *Sephadex* LH-20 e eluição em modo isocrático. Foram coletadas quinze frações, as quais foram agrupadas em seis junções devido suas similaridades químicas, permitindo a obtenção da substância IV a partir da subfração LA 1.6.6.9 (FLUXOGRAMA 3.3, p. 42).

### FLUXOGRAMA 3.3 - Isolamento da substância III e IV.

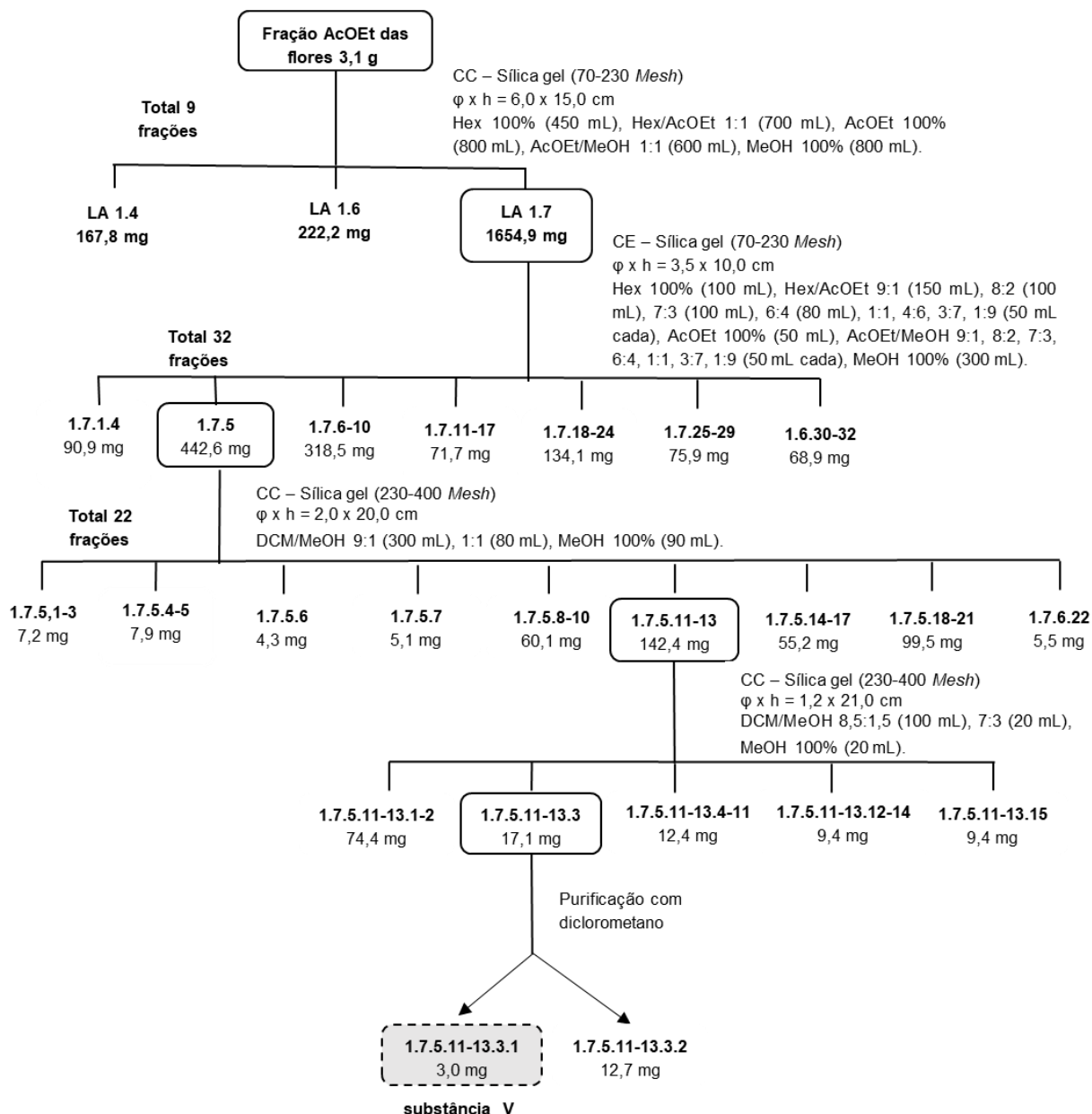


### 3.2.5.3 - Fracionamento da subfração LA 1.7

A subfração LA 1.7 (1,65 g) foi submetida à CC com sílica gel como fase estacionária e eluição gradiente. Este fracionamento originou trinta e duas frações, as quais foram agrupadas em sete junções quando analisadas por CCD. A subfração 1.7.5 (442,6 mg) foi submetida a diversos fracionamentos, conforme descrito no (FLUXOGRAMA 3.4, p. 43). A subfração 1.7.5.11-13.3 (17,1 mg) foi

submetida a um processo de recristalização com diclorometano, originando as subfrações 1.7.5.11-13.3.1 (fração solúvel em Dic) e 1.7.5.11-13.3.2 (porção insolúvel), isolando assim a substância V.

**FLUXOGRAMA 3.4 - Isolamento da substância V.**



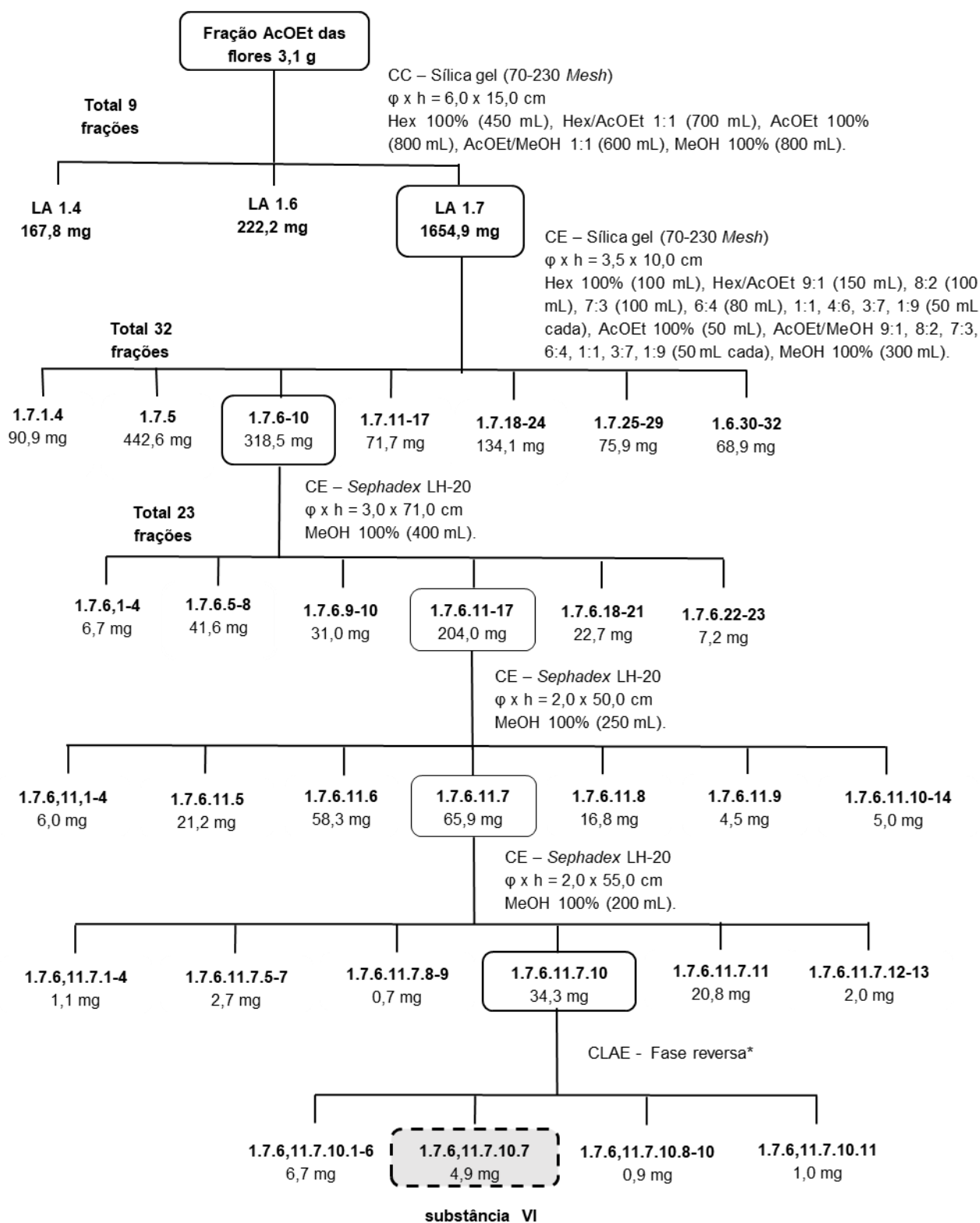
### 3.2.5.3.1- Fracionamento da subfração LA 1.7.6

A subfração 1.7.6 (318,5 mg) apresentou massa expressiva com potencial para isolamento de compostos. Inicialmente foi fracionada em CC utilizando como fase estacionária *Sephadex-LH 20* e modo de eluição isocrático,

originando vinte e três subfrações que foram analisadas por CCD e agrupadas de acordo com as similaridades químicas observadas. Realizou-se sucessivos fracionamentos conforme descrito no FLUXOGRAMA 3.5, (p. 45) e todas as subfrações foram analisadas em CCD e reveladas em luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, assim como em solução ácida de vanilina. Em alguns casos, as amostras também foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H. A subfração 1.7.6.11.7.10 (34,3 mg) foi analisada por CLAE-DAD no modo analítico e, posteriormente, à separação por CLAE- MWD no modo preparativo para isolamento do composto (substância **VI**). Condição CLAE-MWD: coluna C18 (Luna; 5 µm, 9,4 x 250 mm). Loop: 500 µL; vazão constante: 3 mL/min. Fase móvel: água:ácido acético (97:3) (Solvente A) e CH<sub>3</sub>CN (Solvente B). Gradiente: 0 min – 10% de B; 2 min – 10% de B; 14 min – 30% de B; 18 min 90% de B; 23 min – 100% de B; 25 min -100% de B. Detecção na região de 264 nm e 360 nm. A amostra (34,3 mg) foi solubilizada em 0,5 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1).

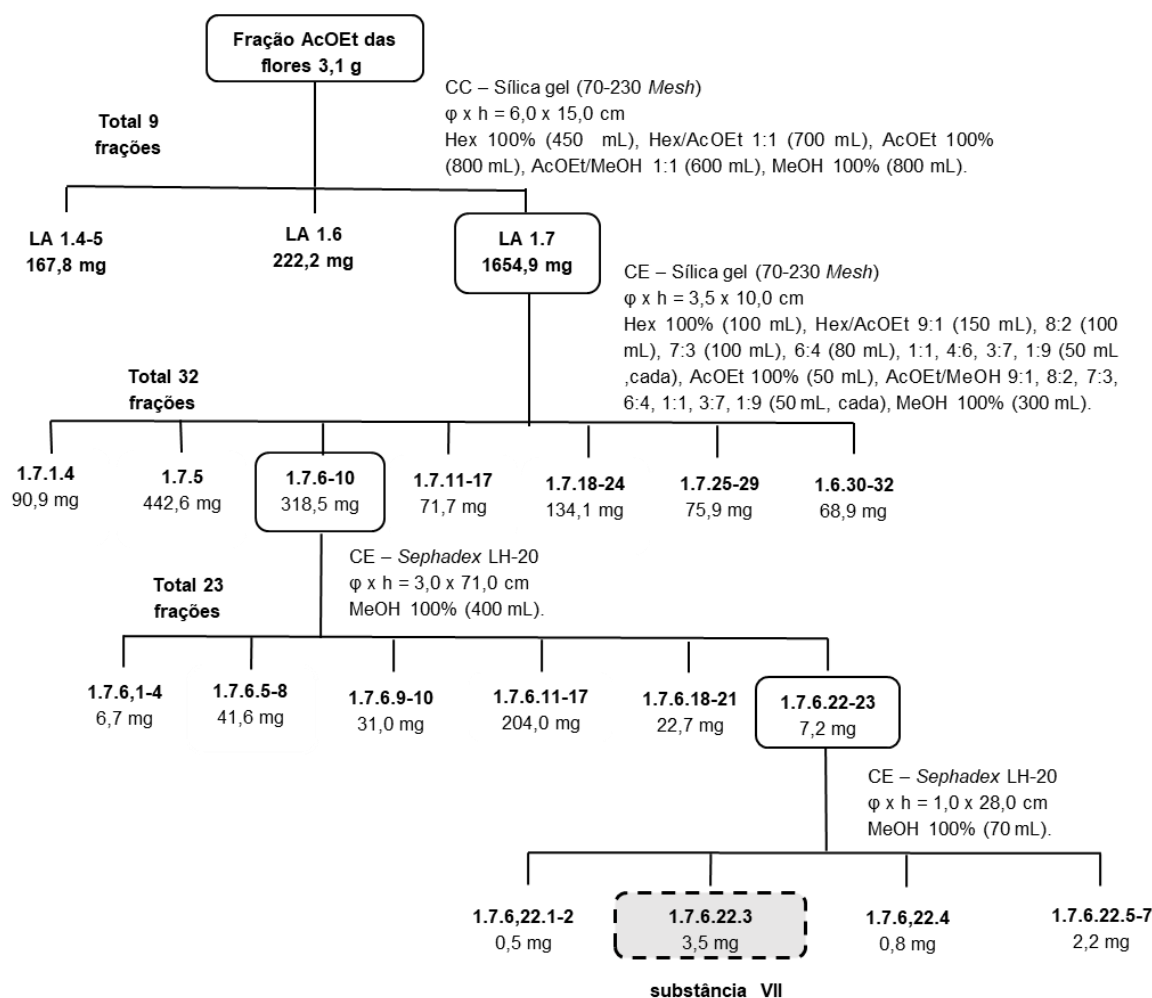
A subfração 1.7.6.22-23 (7,2 mg) foi submetida a CE com fase estacionária *Sephadex* LH-20 e eluição em modo isocrático (FLUXOGRAMA 3.6, p. 46). Foram coletadas sete frações, as quais foram agrupadas em quatro subfrações devido às similaridades químicas apresentadas em CCD, permitindo o isolamento da substância **VII**.

### FLUXOGRAMA 3.5 - Isolamento da substância VI.



\*Sistema CLAE analítico: coluna C18 Luna (5  $\mu$ m, 9,4 x 250 mm). Loop: 500  $\mu$ L; vazão constante: 3 mL/min. Fase móvel: água:ácido acético (97:3) (Solvente A) e CH<sub>3</sub>CN (Solvente B). Detector DAD região de 264 e 360 nm.

### FLUXOGRAMA 3.6 - Isolamento da substância VII.



### 3.3. Ensaios biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no laboratório BioGen – Cerrado, na Universidade Estadual de Goiás – *Campus Ipameri*, pelo aluno Marcos Vinícios Faleiro sob orientação da Prof. Dr. Alcione da Silva Arruda.

#### 3.3.1. Ensaios por ingestão com as operárias de *Atta laevigata*

Para a execução dos ensaios com formigas, coletou-se operárias de *Atta laevigata* na região relatada nas seguintes coordenadas geográficas: S 17°43'00" e W 48°08' 41" em latitude de 793 m. Com o auxílio de uma pinça coletaram-se no olheiro do formigueiro formigas adultas, que foram mantidas com uma dieta sólida artificial pré-estabelecida pelo grupo (BUENO et al., 1997),

constituída por: 5,0% glicose, 1,9% peptona bacteriológica, 0,1% extrato de levedura e 1,5% ágar bacteriológico dissolvidos em 100 mL de água destilada. A duração do experimento a base desta dieta foi de 25 dias, que é o tempo de vida médio de uma formiga. Os extratos e as frações foram submetidos ao ensaio com as operárias foram incorporadas na dieta na concentração de 2,0 mg/mL (extratos brutos *E. dysenterica*) e 1,0 mg/mL no caso das frações provenientes da partição líquido-líquido. Em seguida, essa mistura foi levada ao forno de micro-ondas por 4 min e então autoclavada por 15 min a uma temperatura de 120 °C e 1,0 atm. O meio de cultura ainda líquido foi transferida para placas de Petri de 10 cm de diâmetro, que após refrigeração e solidificação foram embrulhadas em papel filme e mantidas em geladeira, sendo utilizadas nos dias subsequentes durante o período do experimento. Foi estipulado um período máximo de 25 dias para a realização do experimento de toxicidade. A dieta para manutenção das formigas (controle) ou a dieta acrescida do substrato a ser testado (tratamentos) foi colocada em papel alumínio na quantidade de 0,4 a 0,5 g/placa. A cada 24 h a dieta foi renovada. As formigas foram distribuídas em lotes de 30 operárias para cada tratamento, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em 3 placas de Petri. Essas placas foram colocadas em estufa com temperatura de 25 °C e umidade relativa acima de 70% e examinadas diariamente para retirada e anotação do número de formigas mortas. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis (p 0,02), utilizando-se o software Action.

### 3.3.2 Ensaio alelopático

Avaliou-se a atividade alelopática de três espécies bioindicadoras, sendo que duas são plantas daninhas de áreas de pastagens, comuns no estado de Goiás: *Bidens alba* (picão preto), *Emilia sonchifolia* (serralhinha), além de *Lactuca sativa* cv. Branca Boston (alface). Foi empregado o experimento utilizando metodologia de CANTANHEDE FILHO e colaboradores, (2017). Foram analisados os efeitos alelopáticos sobre o percentual de germinação das sementes. A germinação das sementes foi realizada em câmara de germinação à temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, com acompanhamento por

seis dias, para verificação do aparecimento da radícula (germinação fisiológica). Utilizou-se 4 mL de água destilada com as concentrações de 4,0; 3,0; 2,0; 1,0 e 0,004 g dos extratos brutos de *E. dysenterica* e apenas água destilada para o controle negativo. Após a evaporação do solvente, adicionou-se água destilada e durante o período, foi adicionado água destilada sempre que necessário. A cada dia foram contadas e eliminadas as sementes germinadas. Foram utilizadas três repetições, sendo cada parcela experimental representada por 15 sementes de cada espécie, adicionadas em placas de Petri separadamente.

### 3.4. Análise Estatística

A mortalidade acumulada e a sobrevivência mediana foram calculadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (KW). Teste este não paramétrico que testa o rank das amostras, utilizado para comparar três ou mais populações. Este testa a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes não colocando nenhuma restrição sobre a comparação.

## 4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Na TABELA 4.1, (p. 48) estão descritos as massas das partes vegetais da planta em estudo e seu rendimento.

**TABELA 4.1** - Massa do material vegetal seco e dos extratos obtidas após extração.

Parte vegetal	Material seco (g)	Extrato etanólico	Massa de extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas	134,7	F	20,0	15,0
Flores	1300,0	L	73,3	5,6
Galhos	887,7	G	68,0	7,7
Sementes	2300,0	S	90,0	3,9

Já a TABELA 4.2, (p. 49) são descritos as frações obtidas da partição líquido-líquido, assim como as massas obtidas para cada uma e seus rendimentos calculados com base na massa dos extratos brutos.

**TABELA 4.2** - Massa e rendimento das frações obtidas por partições líquido-líquido.

<b>Extrato</b>	<b>Fração H (g) (rendimento)</b>	<b>Fração A (g) (rendimento)</b>	<b>Fração W (g) (rendimento)</b>
Folhas (F)	5,26 (26%)	3,06 (15%)	6,23 (31%)
Flores (L)	2,31 (12%)	3,73 (19%)	10,45 (52%)
Galhos (G)	1,10 (6%)	3,52 (18%)	10,38 (52%)
Sementes (S)	1,27 (6%)	1,62 (8%)	16,00 (80%)

Legenda: H: hexano; A: acetato de etila; W: metanol/água.

Realizou-se o perfil químico dos extratos brutos de *E. dysenterica* (folha, flor, galho e semente), utilizando técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (FIGURA 4.1, p. 51), Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) (FIGURA 4.2, p. 52) e Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) (FIGURA 4.3, p. 53).

Os perfis cromatográficos obtidos por CLAE-DAD sugerem uma vasta variabilidade de absorções, com diferentes tempos de retenção para cada extrato analisado, indicando que os extratos possuem substâncias diferentes em sua composição. Outro ponto importante observado no cromatograma dos galhos e sementes foi a baixa quantidade de substâncias que possuem cromóforos, característica esta observada quando a composição majoritária são substâncias terpênicas e esteroidais. Esta análise CLAE-DAD permitiu detectar a complexidade química dos extratos estudados, destacando que os extratos brutos das folhas e flores podem possuir muitas substâncias em comum, uma vez que é observado um número razoável de substâncias com o mesmo tempo de retenção (FIGURA 4.1, p. 51).

As análises realizadas por CG-EM levaram a cromatogramas e espectros de massas com alta complexidade, mostrando a necessidade de purificações das amostras estudadas. No entanto, os cromatogramas foram utilizados para comparar as similaridades entre os extratos brutos estudados, assim como para realizar o monitorando da composição do extrato estudado. Destaca-se que os extratos dos galhos e sementes sugere possuir o mesmo composto majoritário com tempo de retenção de 19,12 min. Já os compostos

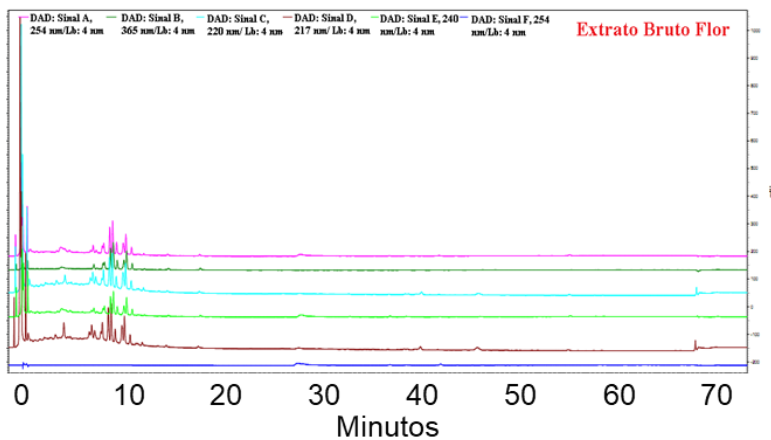
majoritários dos extratos das folhas e flores possuem tempos de retenção de 13,12 e 12,96 min, respectivamente (FIGURA 4.2, p. 52).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos extratos mostraram a presença de sinais com grande variedade de deslocamentos químicos, sugerindo que os extratos possuem composição química bastante distintas. Os espectros sugerem a presença de esteroides caracterizados pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,3-5,2 e  $\delta_{\text{H}}$  3,30, e um grande número de sinais intensos na região de  $\delta_{\text{H}}$  0,6-2,5, atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que caracterizam o esqueleto esteroidal. Observa-se também deslocamentos químicos na faixa de 4,5-7,5 ppm, característicos de hidrogênios olefínicos que sofrem efeito de desblindagem exercido pela nuvem eletrônica da dupla ligação. Sinais característicos de hidrogênios glicosídicos foram observados entre  $\delta_{\text{H}}$  3,0-4,0 sugerindo a presença de compostos glicosilados. Outro indício da presença de unidade glicosídica pode ser observado pelos sinais do hidrogênio anomérico em  $\delta_{\text{H}}$  5,5-5,1, que pode corresponder a glucose, galactose e outros. Os espectros apresentam ainda sinais em região de campo baixo com  $\delta_{\text{H}}$  6,5-8,5 correspondentes a compostos aromáticos, que compõem a estrutura química dos flavonoides. No caso do extrato bruto das sementes, o espectro apresentou baixa intensidade dos sinais referentes aos flavonoides, sugerindo composição química majoritária de ácidos graxos, terpenoides e esteroides (FIGURA 4.3, p. 53).

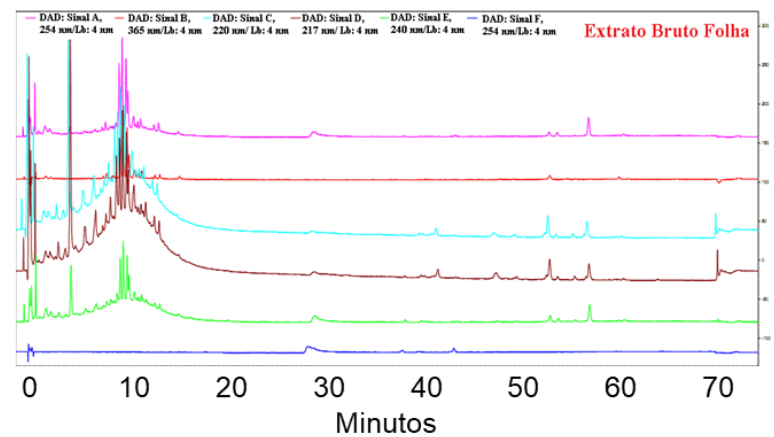
Analisando o conjunto dos dados, optou-se em trabalhar com o extrato etanólico das flores (L) porque observou-se uma quantidade significativa de bandas cromatográficas em CLAE-DAD e CG-EM, além de sinais bem resolvidos na região de hidrogênios desblindados, o que sugere a presença de compostos aromáticos. Aliado a estes fatores, na literatura existem poucos relatos de estudo químico das flores de *E. dysenterica*.

Após realizar partição líquido-líquido do extrato etanólico das flores, as frações em hexano (LH), acetato de etila (LA) e metanol/água (LW) foram analisadas por CCD, CLAE-DAD e RMN  $^1\text{H}$ , e em função da maior concentração de metabólitos com núcleo aromático, selecionou-se a fração LA para os estudos de isolamento e identificação de metabólitos secundários.

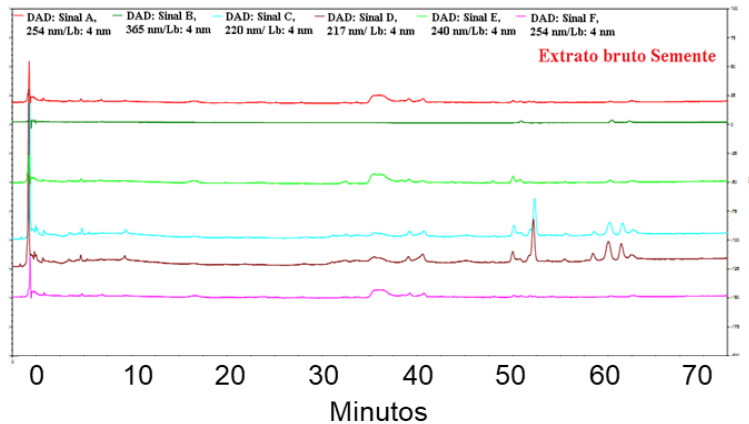
**FIGURA 4.1** - Perfil cromatográfico dos extratos brutos de *E. dysenterica* (flores, folhas, sementes e galhos) por CLAE-DAD.



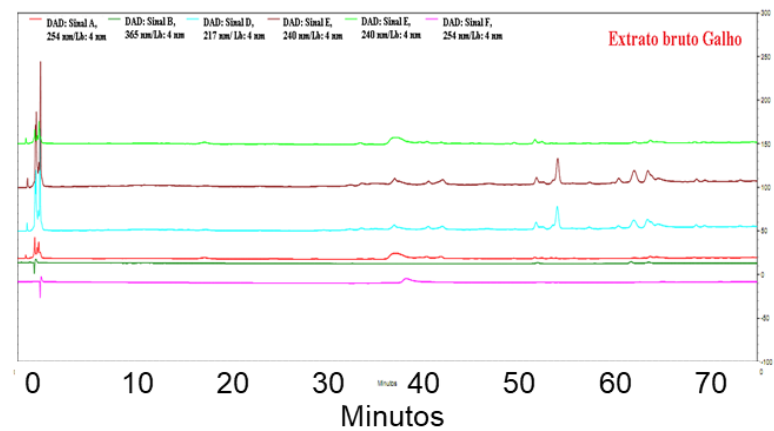
Cromatograma do extrato etanólico das flores.



Cromatograma do extrato etanólico das folhas.



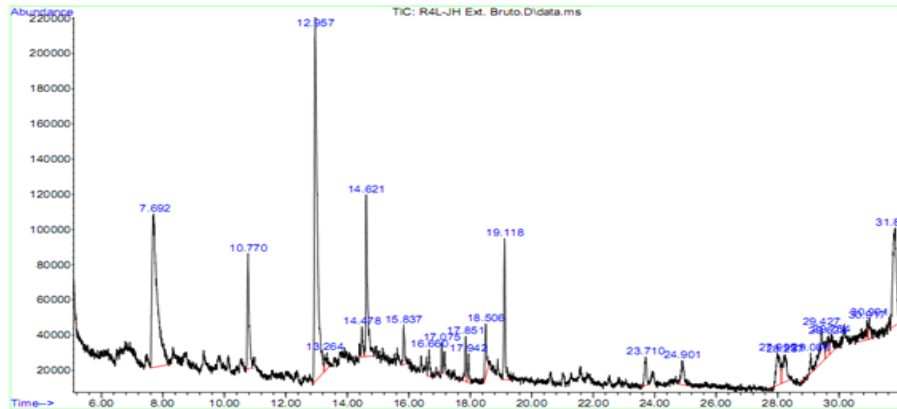
Cromatograma do extrato etanólico das sementes.



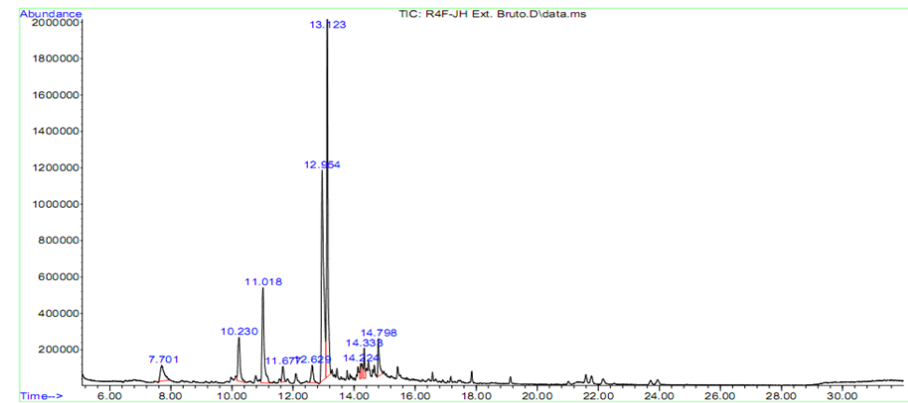
Cromatograma do extrato etanólico dos galhos.

**Condições cromatográficas:** fase estacionária C18 (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 5  $\mu$ m, 150 x 4,6 mm), fase móvel água/acetonitrila em gradiente exploratório de 10-90% de acetonitrila durante 60 min, com fluxo de 1 mL/min, detector DAD: 217, 220, 240, 254, 365 nm.

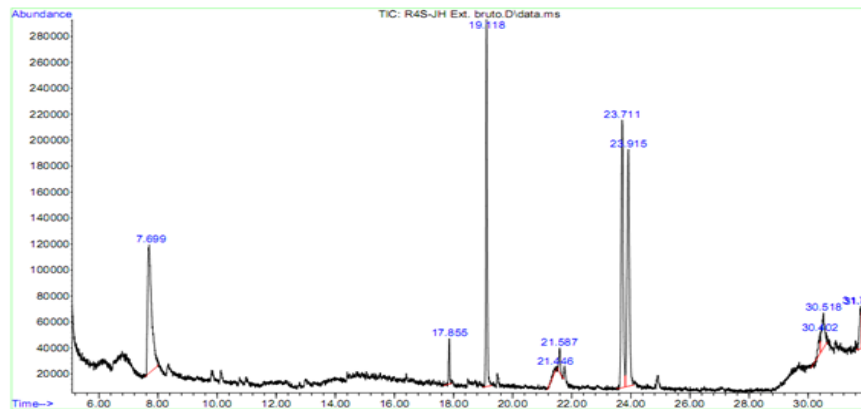
**FIGURA 4.2** - Perfil cromatográfico dos extratos brutos de *E. dysenterica* (flores, folhas, sementes e galhos) por CG-EM.



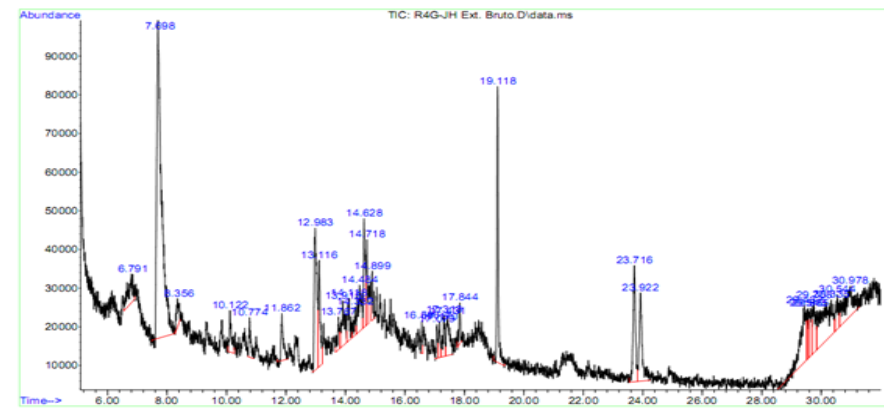
Cromatograma do extrato etanólico das flores.



Cromatograma do extrato etanólico das folhas.



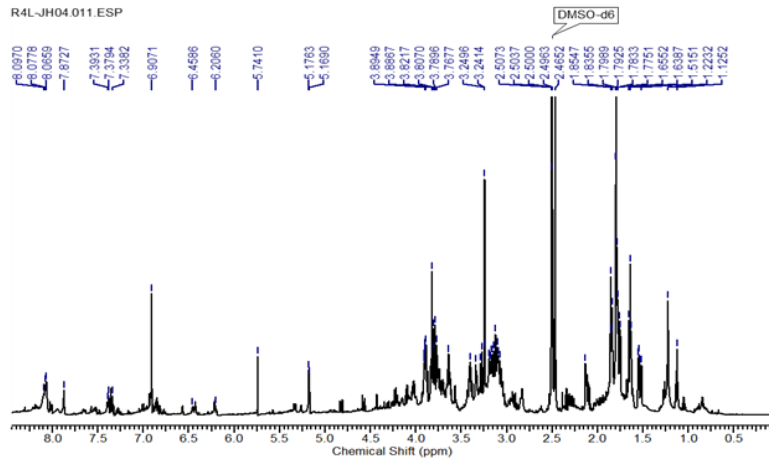
Cromatograma do extrato etanólico das sementes.



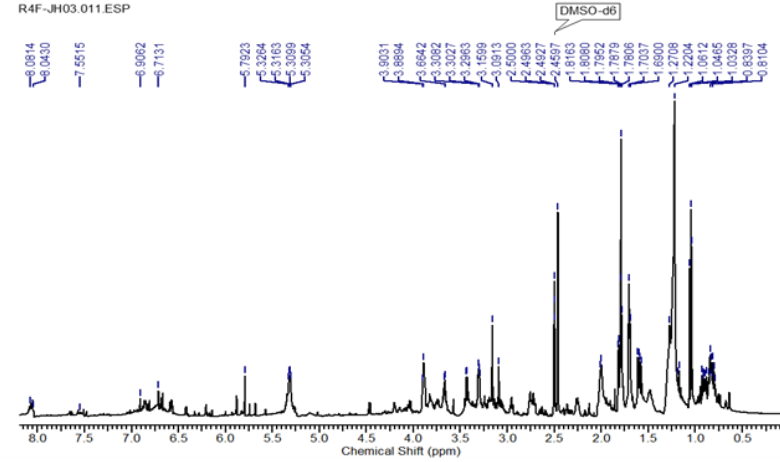
Cromatograma do extrato etanólico dos galhos

**Condições cromatográficas:** coluna capilar de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme e fase estacionária contendo 5% de difenil, 95% dimetilpolisiloxana (HP-5MS) da *Agilent Technology*. Programação de temperatura: 75 °C (1 min), 35 °C/min até 100 °C (5 min), 45 °C/min até 150 °C (5 min), 55 °C/min até 200 °C (15 min), 65 °C/min até 240 °C (2 min). O gás de arraste utilizado foi o hélio a um fluxo de 1,0 mL/min. O injetor operou a 250 °C no modo *splitless* e o espectrômetro de massas no modo positivo por impacto eletrônico (IE) com energia de 70 eV.

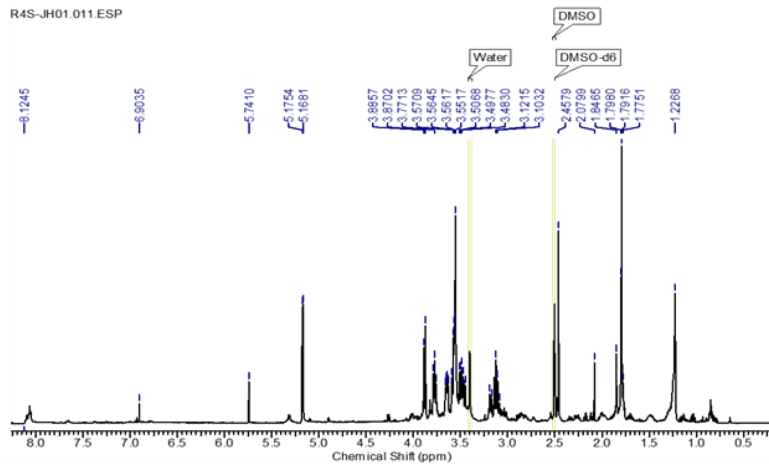
**FIGURA 4.3** - Perfil químico dos extratos brutos de *E. dysenterica* (flores, folhas, sementes e galhos) obtidos por RMN  $^1\text{H}$ .



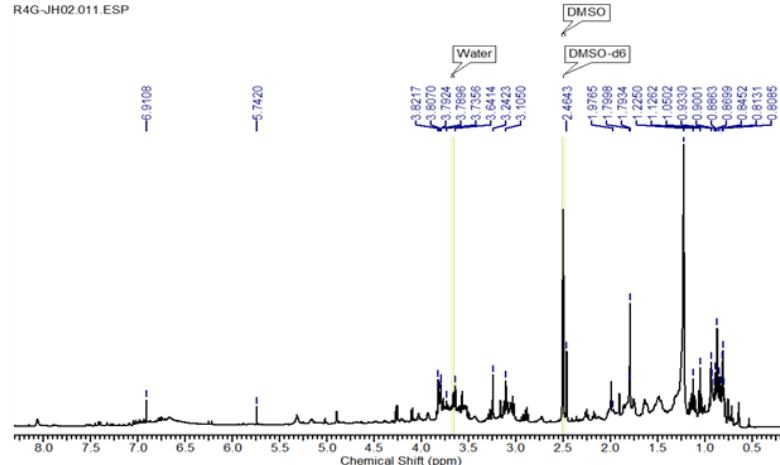
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*6) do extrato bruto das flores.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*6) do extrato bruto das folhas.



Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*6) do extrato bruto das sementes.

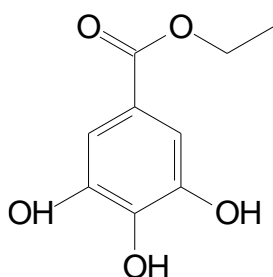


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO-*d*6) do extrato bruto dos galhos.

#### 4.1. Substâncias isoladas

O estudo químico da fração acetato de etila do extrato etanólico das flores de *E. dysenterica* resultou no isolamento e identificação de sete substâncias, sendo um ácido carboxílico aromático (III), um éster aromático (I) e cinco flavonoides: quercetina (II), juglanina (IV), kaempferol (V), (-)-epicatequina (VI) e miricetina (VII) (FIGURA 4.4, p. 54 e 55).

**FIGURA 4.4** – Estrutura química das substâncias isoladas com a origem de seu fracionamento e massa obtida.



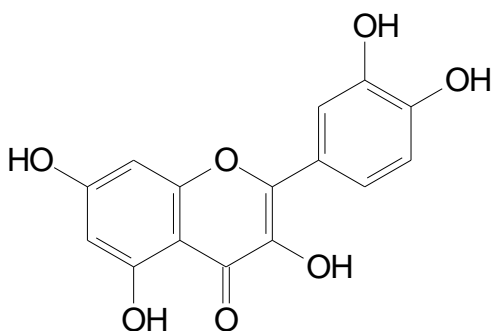
##### **galato de etila (I)**

Origem: subfração 1.4-5.9.5

Massa: 14,2 mg

Isolamento: p. 41

Identificação estrutural: p. 56-66



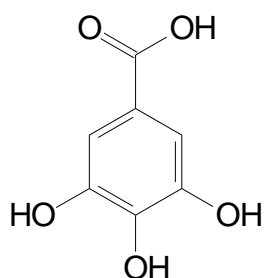
##### **quercetina (II)**

Origem: subfração 1.4-5.9.5

Massa: 14,2 mg

Isolamento: p. 41

Identificação estrutural: p. 56-66



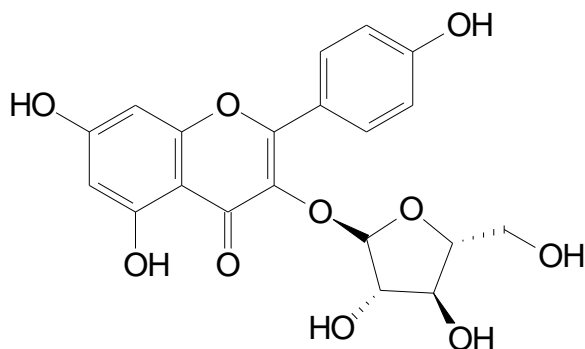
##### **ácido gálico (III)**

Origem: subfração LA 1.6.6.4

Massa: 5,1 mg

Isolamento: p. 42

Identificação estrutural: p. 67-71



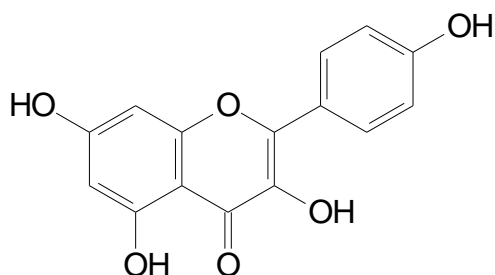
**juglanina (IV)**

Origem: subfração 1.6.9.9

Massa: 2,2 mg

Isolamento: p. 42

Identificação estrutural: p. 72-80



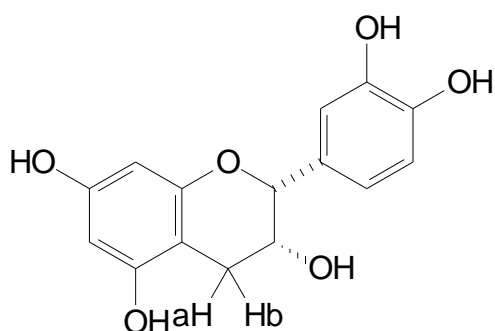
**kaempferol (V)**

Origem: subfração 1.7.5.11-13.3.1

Massa: 3,0 mg

Isolamento: p. 43

Identificação estrutural: p. 81-88



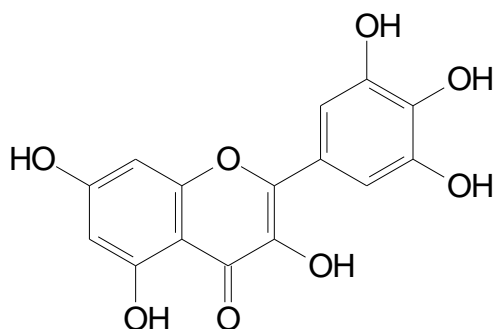
**(-)-epicatequina (VI)**

Origem: subfração 1.7.6.11.7.10.7

Massa: 4,9 mg

Isolamento: p. 45

Identificação estrutural: p. 89-95



**miricetina (VII)**

Origem: subfração 1.7.6.22.3

Massa: 3,5 mg

Isolamento: p. 46

Identificação estrutural: p. 96-98

## 4.2 - Determinação estrutural das substâncias galato de etila e quercetina

A mistura dos compostos fenólicos I (galato de etila) e II (quercetina) foi obtida na forma de um sólido amarelo (14,2 mg), a partir da CC da subfração LA 1.4-5.9.5 fluxograma 3.2 (p. 41). A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina apresentou uma intensa mancha amarela. Quando submetida a radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, apresentou uma mancha verde e outra verde-amarelada, respectivamente. Estes compostos foram caracterizados através de experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uni e bidimensionais e em comparação com dados da literatura (NUNES et al., 2008; KALEGARI et al., 2011).

Analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.5, p. 61), observam-se sinais integrando para um total de 12 hidrogênios, sendo estes distribuídos em campo baixo referentes aos hidrogênios aromáticos, e em campo alto referentes a hidrogênios metílicos e metilênicos.

Para a substância I foi atribuído o singleto em  $\delta_{\text{H}}$  7,10, referente a dois hidrogênios aromáticos equivalentes, H-2 e H-6. Também observou-se um quadrupeto em  $\delta_{\text{H}}$  4,24 (*q*,  $J = 7,10$  Hz) integrado para dois hidrogênios, e um tripleto em  $\delta_{\text{H}}$  1,30 (*t*,  $J = 7,10$  Hz) integrado para três hidrogênios.

Através do espectro de DEPT 135° (FIGURA 4.6, p.62), possibilitou a identificação dos hidrogênios metilênicos  $\delta_{\text{C}}$  60,71 (C-2'), uma vez que hidrogênios de grupos CH ou CH<sub>3</sub> terão sinais positivos, enquanto os sinais de grupos CH<sub>2</sub> geram sinais negativos (invertidos) (PAVIA, 2012).

No mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.7 e FIGURA 4.8, p. 63 e 64, respectivamente) foi possível observar correlações entre o sinal de H-2 e H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7,10) com C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  121,6), C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  168,5), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  109,3), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  145,4) e com o sinal C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  138,2). A comparação destes dados com a literatura (TABELA 4.3, p. 59) (NUNES et al.; 2008), levam à identificação da substância I como sendo o 3,4,5-triidroxibenzoato de etila, isolada pela primeira vez no gênero *Eugenia*.

Procedimentos utilizados na obtenção de extratos e para o isolamento de produtos naturais pode provocar ocorrência de reações envolvendo metabólitos secundários, que resulta na formação de artefatos de

isolamento. Entre os processos responsáveis pela formação destes artefatos, destacam-se as reações térmicas e reações de solvólise (ASFAW et al., 2001; BRITTON et al., 2001). Tal fato pode ter ocorrido para formação do 3,4,5-triidroxibenzoato de etila. O ácido gálico presente em grande quantidade pode ter reagido com o etanol, levando a uma reação de esterificação.

A substância II apresentou um singlete em  $\delta_H$  12,16 que integrou para um hidrogênio sugerindo a presença de uma hidroxila fenólica quelada. Quando a hidroxila está ligada a C3, o deslocamento químico do hidrogênio é de aproximadamente  $\delta_H$  10 enquanto o deslocamento químico do hidrogênio da hidroxila ligada a C5 é maior que  $\delta_H$  10 (ROSSI et al., 1997). Este dado sugere que a substância II possui uma hidroxila ligada a C5.

Na região dos hidrogênios aromáticos foi possível observar dois dubletos em  $\delta_H$  6,98 ( $J = 8,50$  Hz, 1H) e  $\delta_H$  7,81 ( $J = 2,20$  Hz, 1H), atribuídos respectivamente aos hidrogênios H-5' e H-2', e um duplo dubleto em  $\delta_H$  7,69 ( $J = 8,50$  e  $2,20$  Hz, 1H) atribuído a H-6'. A partir destes sinais observam-se acoplamentos *orto* entre H-5' e H-6', e *meta* entre H-2' e H-6', característico do anel B de flavonoides substituídos em C-3' e C-4' (FIGURA 4.5, p. 61).

O mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.9, p. 65) mostrou correlação dos hidrogênios H-2', H-6' e H-5' com os carbonos em  $\delta_C$  115,9 (C-2'),  $\delta_C$  121,2 (C-6') e  $\delta_C$  115,5 (C-5'). Já na análise do mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.7, p. 54 e FIGURA 4.8, p. 64) foi observado que o hidrogênio H-2' correlaciona com os carbonos em  $\delta_C$  121,2 (C-6'),  $\delta_C$  145,8 (C-3') e  $\delta_C$  147,2 (C-2), e que os sinais de hidrogênios H-2' e H-6' apresentam correlação com o carbono em  $\delta_C$  147,0 (C-4'), assim concluindo as atribuições do anel B.

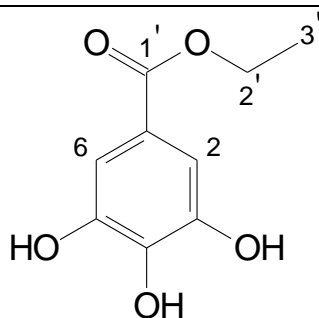
Foram observados ainda, dois dubletos em  $\delta_H$  6,25 ( $J = 2,20$  Hz, 1H) e  $\delta_H$  6,51 ( $J = 2,20$  Hz, 1H), característico do acoplamento *meta* do anel A (H-6 e H-8, respectivamente) de um núcleo básico flavonoídico (Figura 4.5, p. 61). Pela análise do mapa de correlações HSQC (FIGURA 4.9, p. 65) foi possível atribuir todos os carbonos aos quais esses hidrogênios estão ligados (TABELA 4.4, p. 60). Através da expansão do mapa de contorno HMBC (FIGURA 4.10, p. 55), foi possível atribuir os demais carbonos do anel A, pois observam-se correlações entre os sinais dos hidrogênios H-8 ( $\delta_H$  6,51) com os sinais dos carbonos em  $\delta_C$  98,9 (C-6),  $\delta_C$  103 (C-10),  $\delta_C$  156,9 (C-9) e  $\delta_C$  164,1 (C-7); e entre sinal do hidrogênio H-6 ( $\delta_H$  6,25) e com os sinais de carbonos em  $\delta_C$  94,2 (C-8),

$\delta_c$  103 (C-10),  $\delta_c$  161,0 (C-5) e  $\delta_c$  164,1 (C-7), concluindo assim as atribuições de hidrogênios e carbonos do anel A. Com a análise dos dados espectroscópicos, e em comparação com os dados da literatura, foi possível identificar a substância II como sendo o flavonoide quercetina.

Ainda foi possível confirmar que a amostra analisada estava em mistura a partir do cromatograma obtido por CLAE-DAD (detecção em 360 nm), onde foram observadas duas bandas de alta intensidade, com os tempos de retenção de 14,04 e 17,10 min (FIGURA 4.10, p. 66). Este experimento também colaborou para confirmar a identidade da substância II, uma vez que primeira banda possui o mesmo tempo de retenção (14,04 min) obtido para a quercetina padrão quando analisada nas mesmas condições cromatográficas.

O flavonoide quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona) já foi amplamente isolado de espécies do gênero *Eugenia*. Este é o principal flavonoide presente na dieta humana, representando cerca de 95% do total de flavonoides ingeridos. O seu consumo diário estimado varia entre 50 e 500 mg (DESCHNER et al., 1991; BEHLING et al., 2004). A cebola, maçã e brócolis são as fontes majoritárias da quercetina, e também é encontrado na couve, vagem, tomate, alface, pimenta, nozes entre outros (HERTOG et al., 1993; BEHLING et al., 2004). Suas propriedades terapêuticas se destacam principalmente pelo potencial antioxidante. Estudos têm demonstrado que a ingestão de quercetina está relacionada com a baixa incidência de doença cardiovascular, diversos tipos de câncer, diabetes do tipo 2 e asma. Além disso, destaca-se pelos seus efeitos protetores aos sistemas renal e hepático (KNEKT et al., 2000; BEHLING et al., 2004).

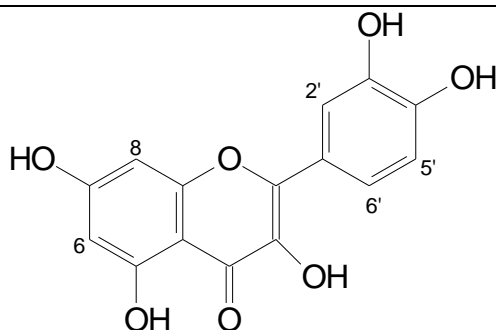
**TABELA 4.3** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância I (galato de etila).



I

Substância I				
H/C	Dados obtidos		NUNES et al., 2008	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)
1	-	121,60	-	121,63
2	7,10 (s)	109,30	7,04	109,93
3	-	145,41	-	146,33
4	-	138,25	-	139,56
5	-	145,41	-	146,33
6	7,10 (s)	109,30	7,04	109,33
1'	-	168,50	-	168,51
2'	4,24 (q, $J = 7,10$ Hz, 2H)	60,71	4,23 (q)	61,66
3'	1,30 (t, $J = 7,10$ Hz, 3H)	14,40	1,30 (t)	14,55

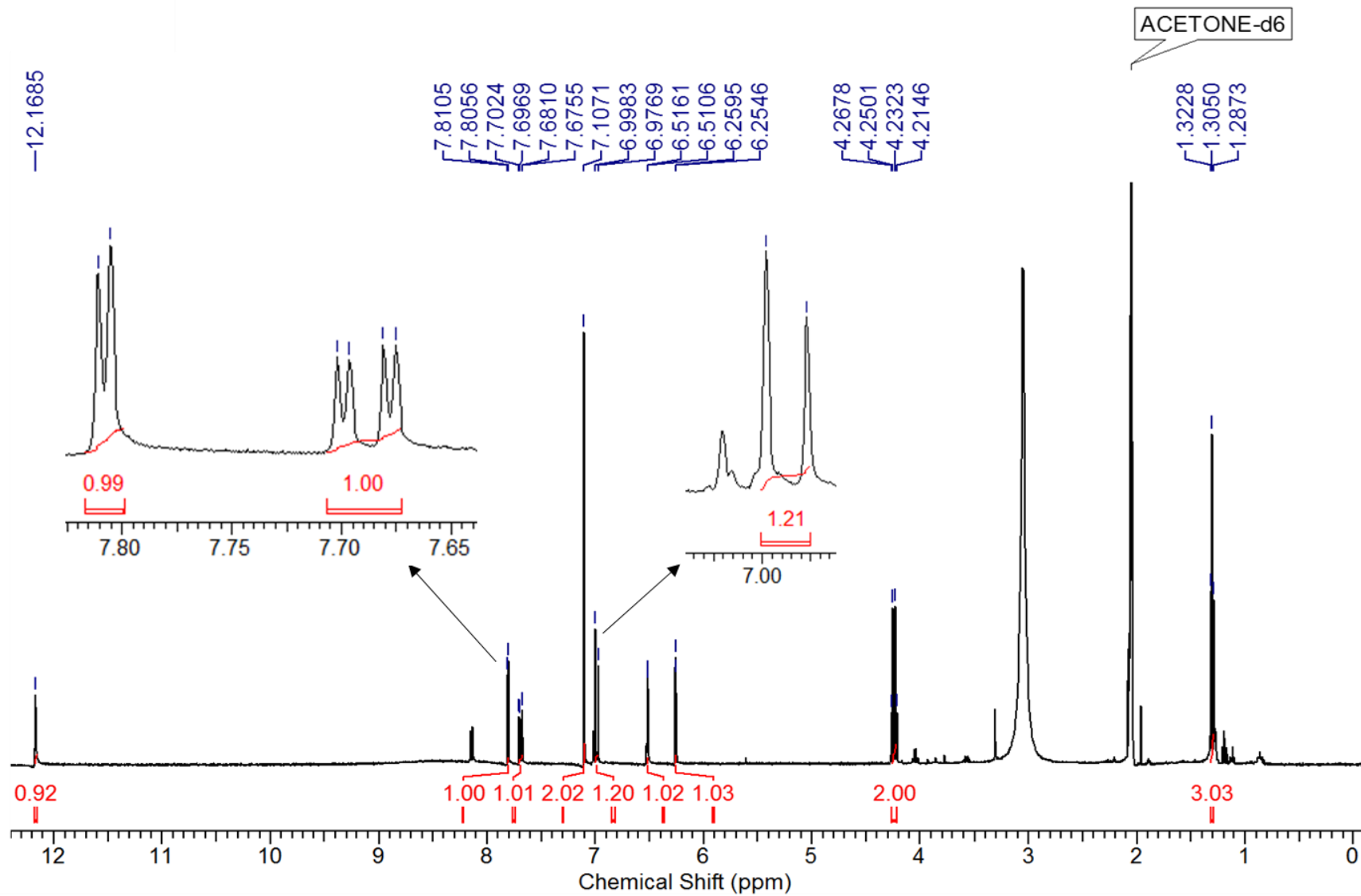
**TABELA 4.4** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância II (quercetina).



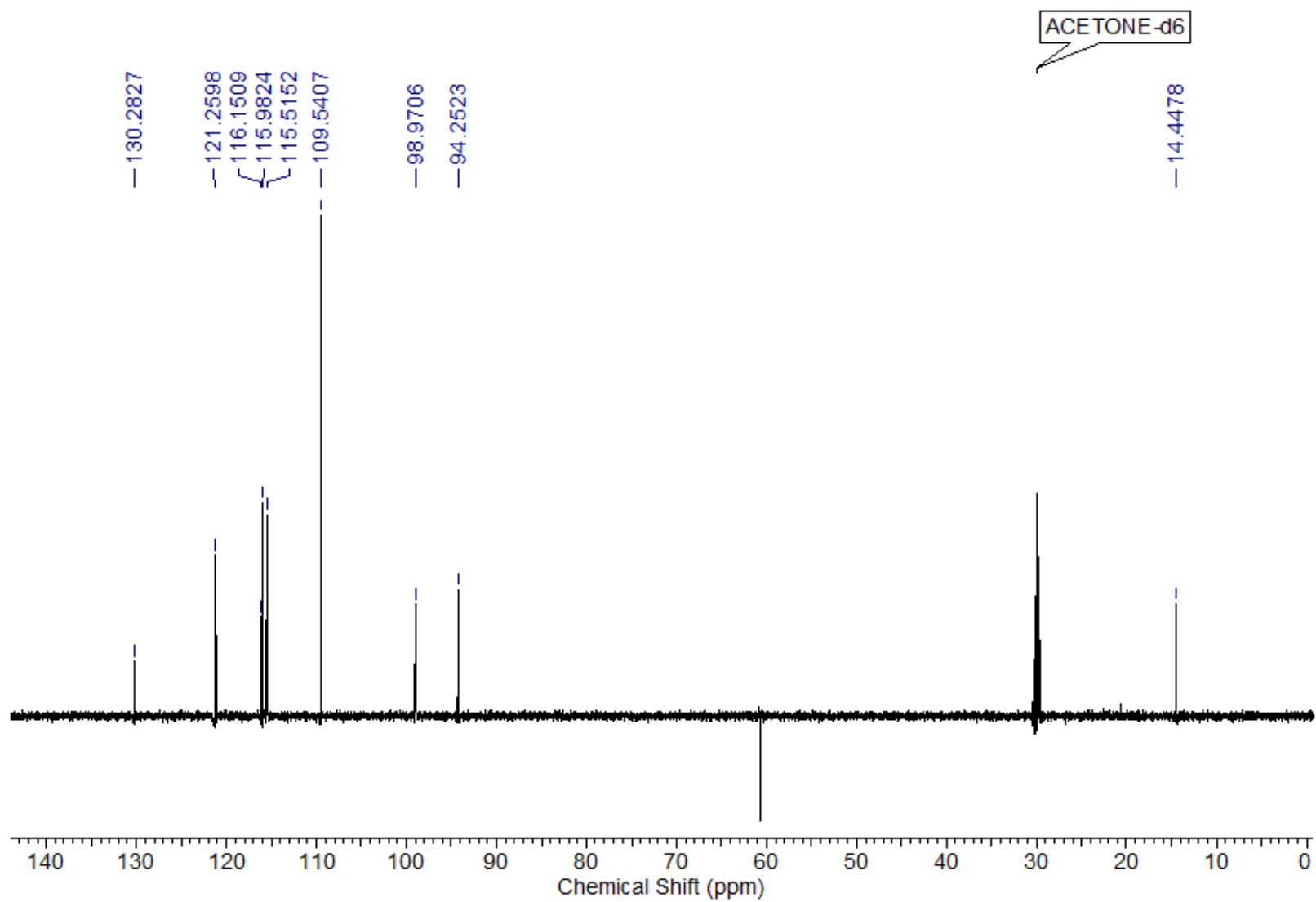
II

Substância II				
H/C	Dados obtidos		KALEGARI et al., 2011	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)
2	-	147,2	-	147,8
3	-	-	-	137,1
4	-	-	-	177,2
5	-	161,0	-	162,3
6	6,25 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz; 1H)	98,9	6,17 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz; 1H)	99,1
7	-	164,1	-	165,3
8	6,51 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz; 1H)	94,2	6,36 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz; 1H)	94,40
9	-	156,9	-	158,1
10	-	103,1	-	104,1
1'	-	-	-	124,0
2'	7,81 ( <i>d</i> , $J = 2,2$ Hz; 1H)	115,9	7,72 ( <i>d</i> , $J = 2,1$ Hz; 1H)	115,9
3'	-	145,8	-	148,5
4'	-	147,0	-	146,0
5'	6,98 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz; 1H)	115,5	6,80 ( <i>d</i> , $J = 8,4$ Hz; 1H)	116,1
6'	7,69 ( <i>dd</i> , $J = 8,5$ e 2,2 Hz; 1H)	121,2	7,6 ( <i>d</i> , $J = 8,7$ e 2,1 Hz; 1H)	121,6

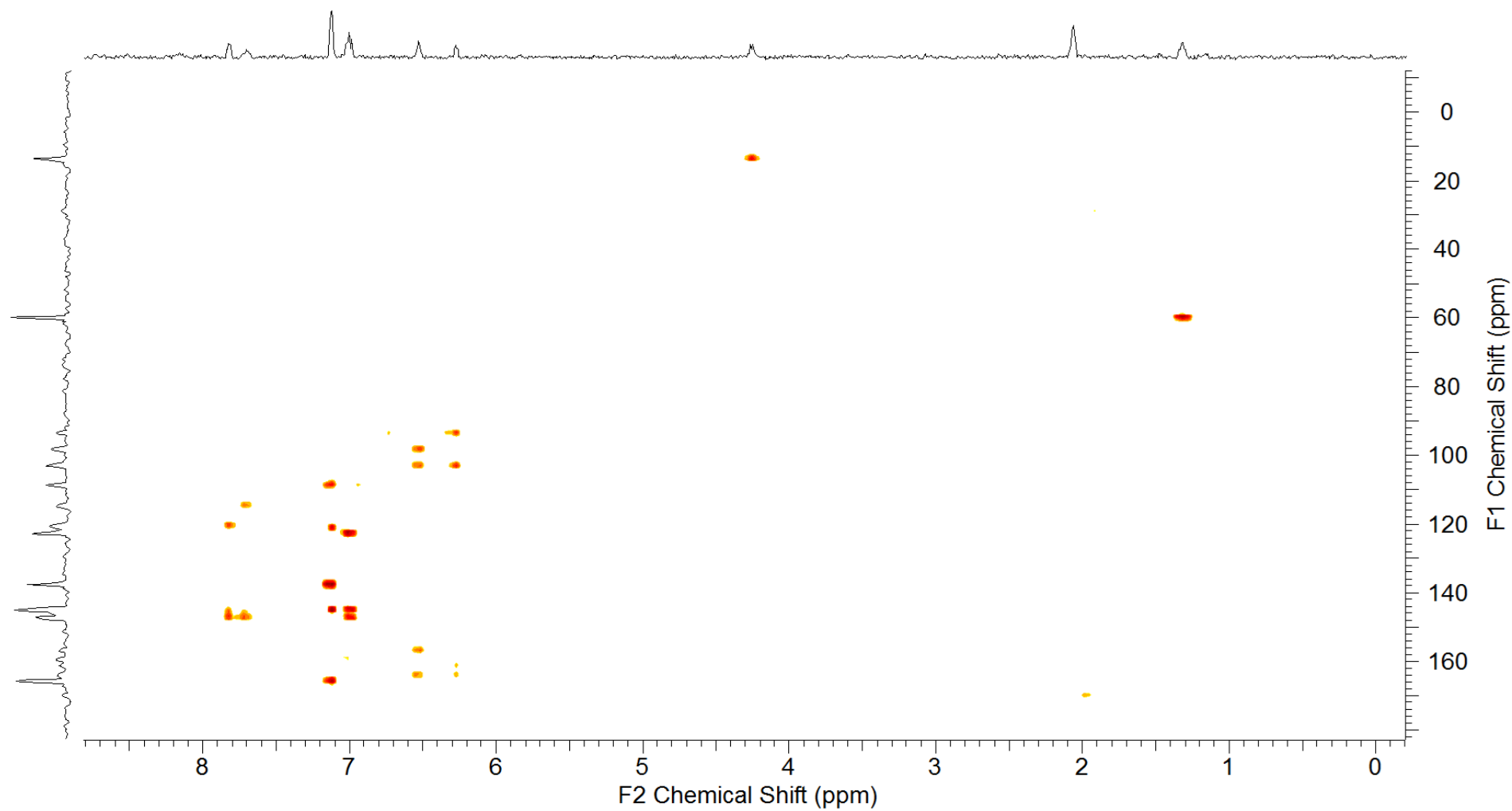
FIGURA 4.5 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 400 MHz).



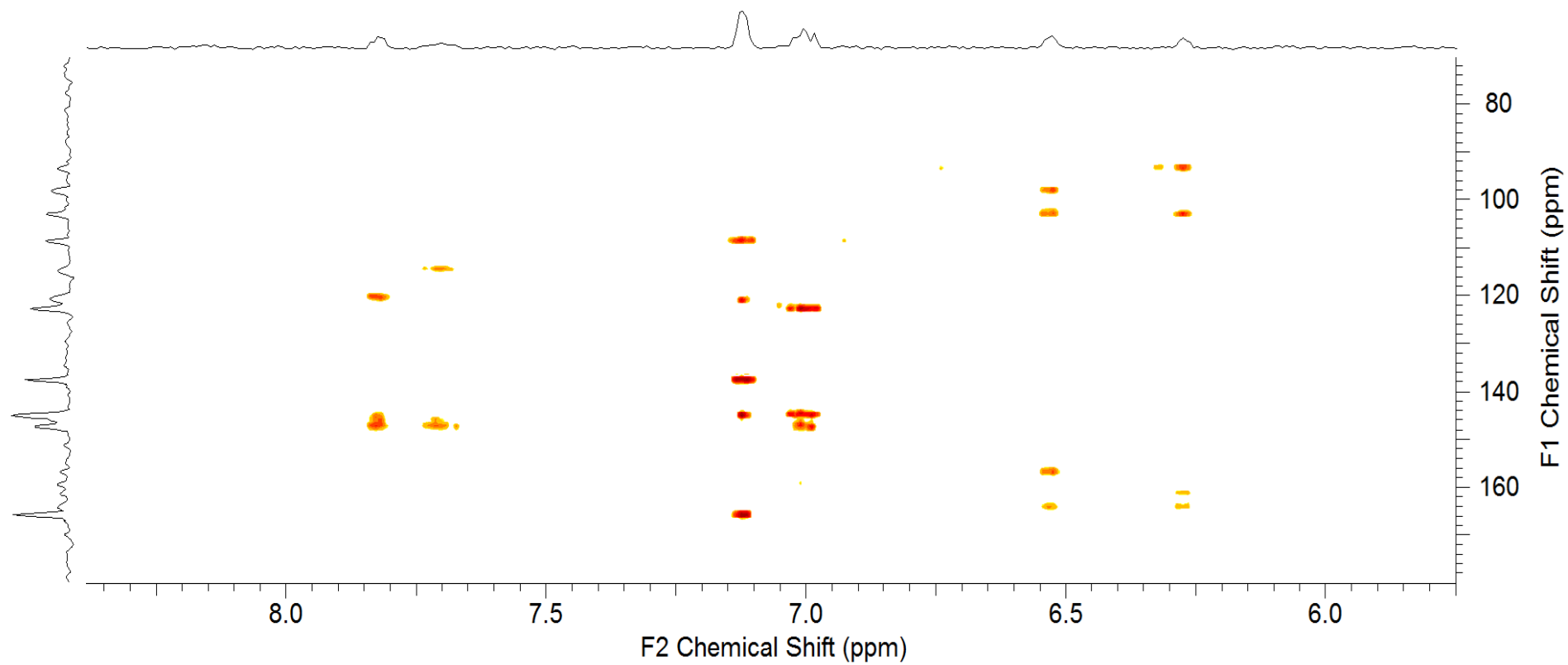
**FIGURA 4.6** - Espectro de RMN DEPT-135 das substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 100 MHz).



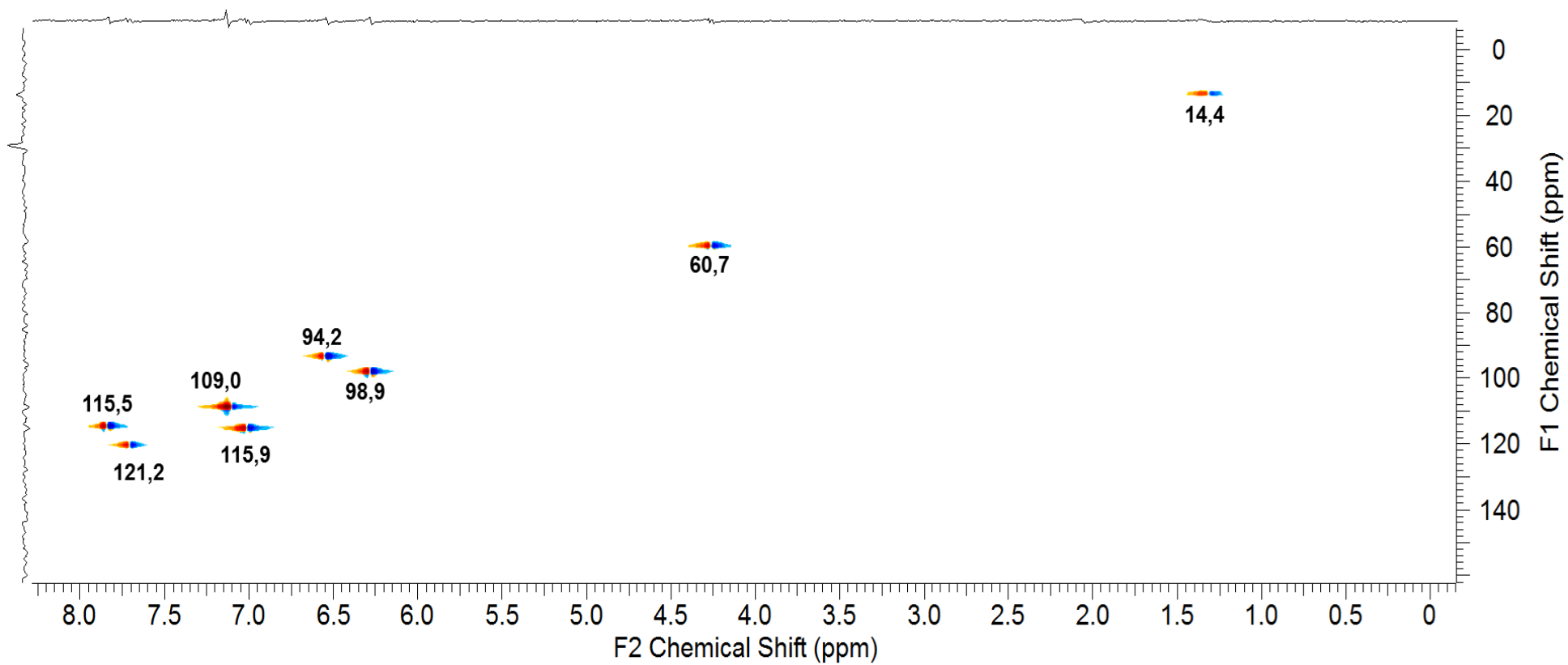
**FIGURA 4.7** - Mapa de contorno do experimento HMBC para as substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 400 MHz).



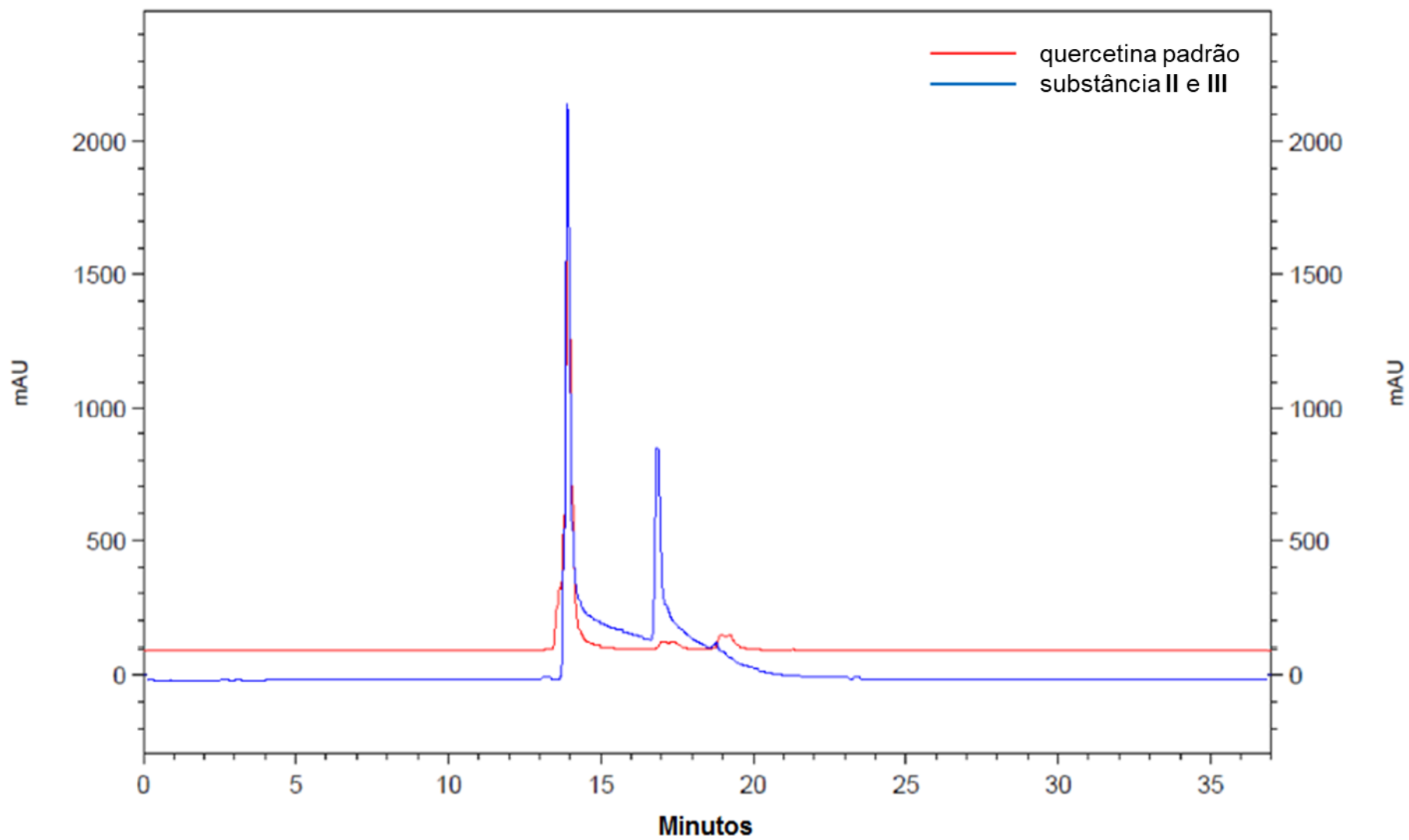
**FIGURA 4.8** - Expansão do mapa de contorno do experimento HMBC para as substâncias **I** e **II** (acetona- $d_6$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.9** - Mapa de contorno do experimento HSQC para as substâncias I e II (acetona- $d_6$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.10** - Cromatograma obtido por CLAE-DAD (360 nm) da mistura das substâncias I e II.



### 4.3. Determinação estrutural da substância ácido gálico

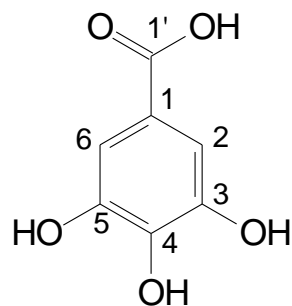
A substância **III** (ácido gálico) foi obtida na forma de cristais brancos (5,1 mg), a partir de CC da subfração LA 1.6.6.4 fluxograma 3.3, (p. 42). A amostra, quando analisada por CCD e revelada com solução ácida de vanilina apresentou uma mancha amarela e quando submetida à radiação UV em comprimento de onda 254 nm e 365 nm, apresentou, respectivamente, uma mancha verde e azul. A identificação estrutural foi feita utilizando as técnicas espectroscópicas uni e bidimensional de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC, em comparação com dados da literatura (OLIVEIRA et al., 2006; SOUZA FILHO et al., 2006; MOURA et al., 2011).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.11, p. 69) da substância **III** mostrou sinal na região de hidrogênios aromáticos, sendo apenas um intenso singlete em  $\delta_{\text{H}}$  7,03, que é atribuído aos dois hidrogênios equivalentes H-2 e H-6. Na análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.12, p. 70) da substância **III** observou-se que os hidrogênios H-2 e H-6 mostram correlações a  $J'$ , com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  109,1, atribuído aos C-2 e C-6.

Pelo mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.13, p. 71) observou-se a correlação entre o sinal de H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  7,03) com C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  123,1), C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  171,2), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  109,1), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  144,4) e com o sinal C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  136,8). Já o sinal de H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7,03) com C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  123,1), C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  171,2), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  109,1), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  144,0) e com o sinal C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  136,8). A comparação destes dados com a literatura (Tabela 4.5, p. 68) levaram à identificação da substância **III** como sendo o ácido gálico.

O ácido gálico também conhecido como ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, ocorre naturalmente em diversas espécies vegetais como nas folhas de chá preto, no sumagre, no súber do carvalho, entre outras. Apresenta atividade antifúngica, antioxidante, anticarcinogênica, antimutagênica, antialérgica, anti-inflamatória, alelopática, e inibidora da enzima conversora de angiotensina. Também é empregado na indústria farmacêutica para síntese de fármacos e na indústrias de tinturas para o desenvolvimento de cores (NEGI et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006 e SOUZA FILHO et al., 2006).

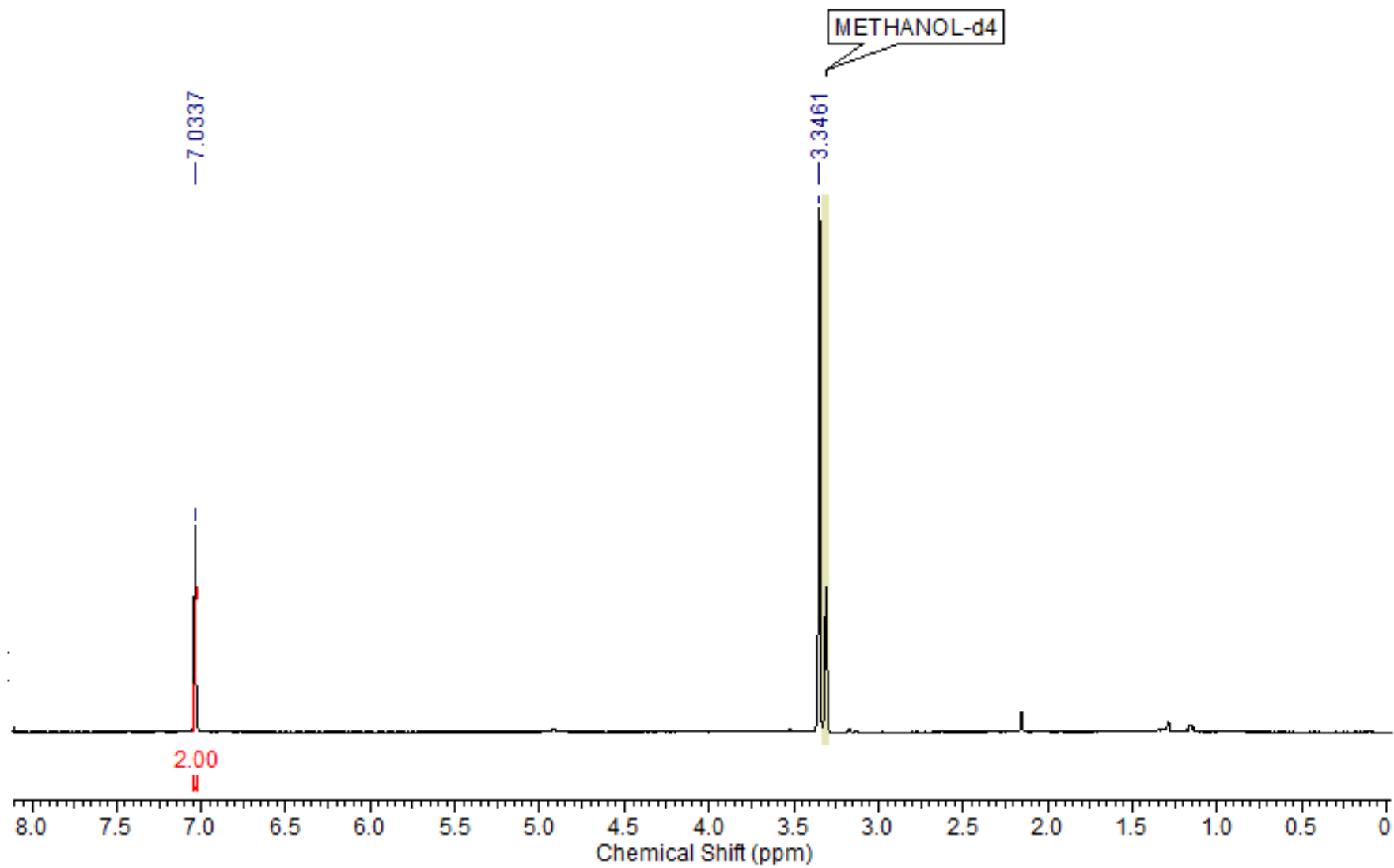
**TABELA 4.5** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a substância III (ácido gálico).



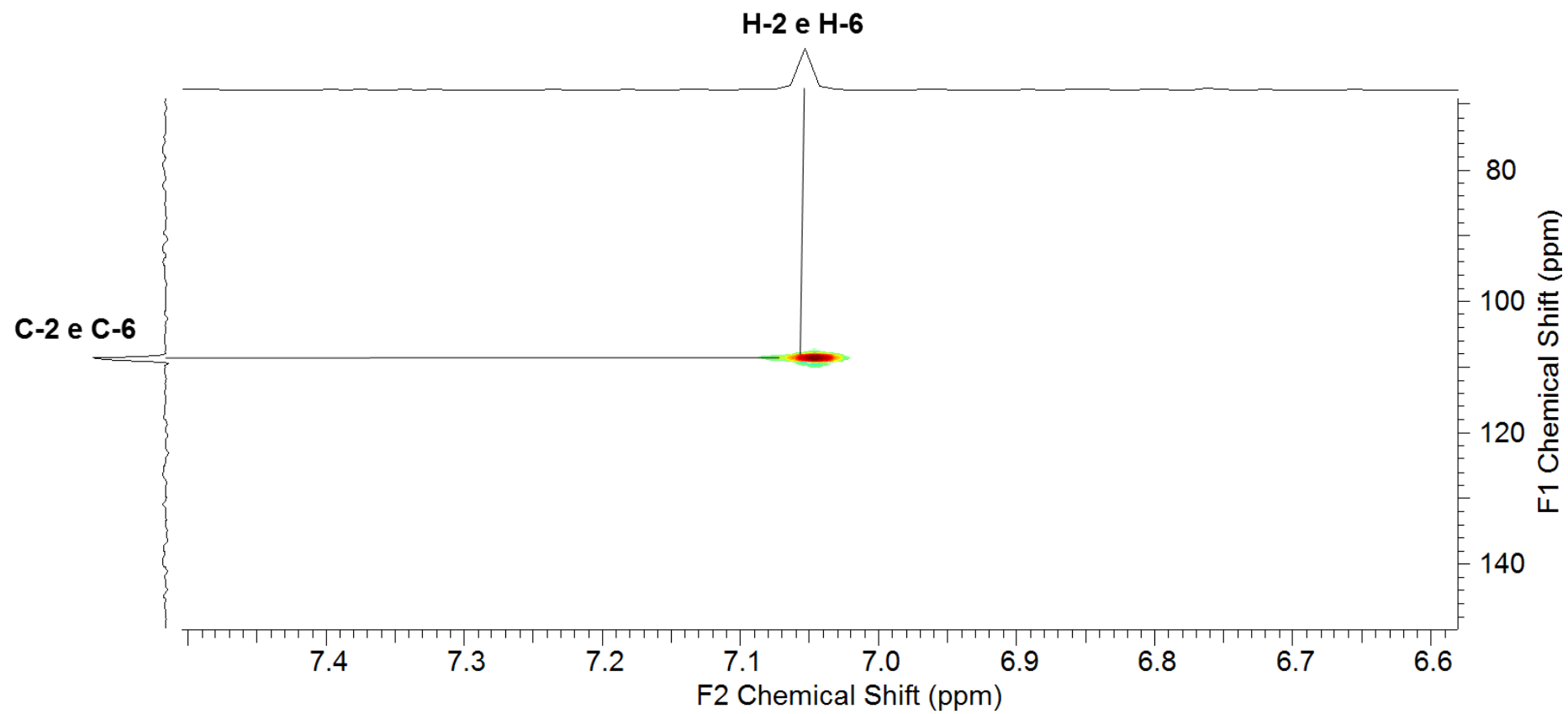
III

Substância III				
H/C	Dados obtidos		SOUZA FILHO et al., 2006	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)
1	-	123,1	-	121,9
2	7,03 (s)	109,1	7,05 (s)	110,3
3	-	144,1	-	146,4
4	-	136,8	-	139,6
5	-	144,0	-	146,4
6	7,03 (s)	109,1	7,05 (s)	110,3
1'	-	171,2	-	170,4

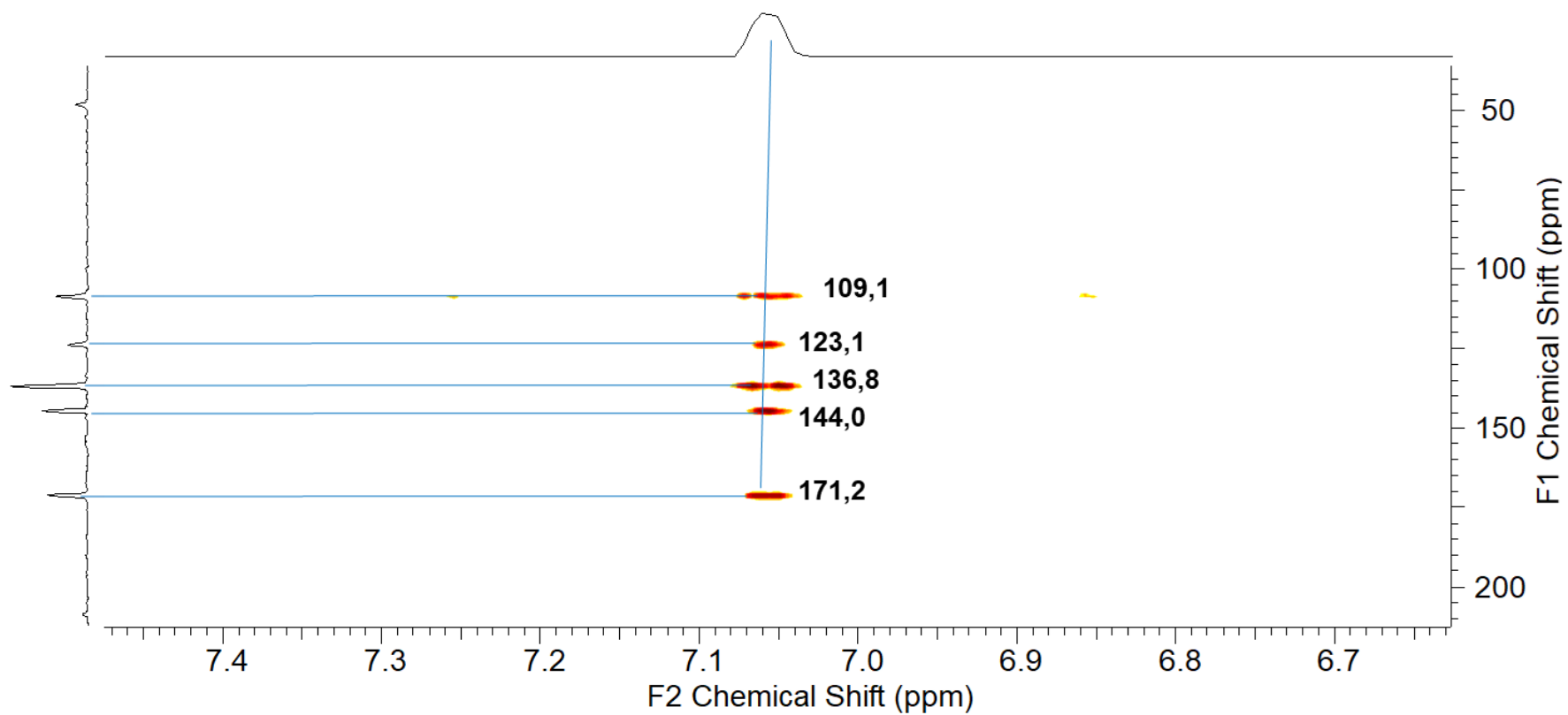
FIGURA 4.11 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância III ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.12** - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância III (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).



**FIGURA 4.13** - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância **III** (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).



#### 4.4. Determinação estrutural da substância juglanina

A substância **IV** (juglanina) foi isolado da subfração LA 1.6.9.9 (fluxograma 3.3, p. 42) na forma de cristais verdes (2,2 mg) e em CCD, quando revelada em solução ácida de vanilina, apresentou manchas de coloração amarela. Sua estrutura foi identificada através dos experimentos uni e bidimensionais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (TABELA 4.6, p. 75), em comparação com dados da literatura (CHANG, et al., 2009).

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.14, p. 76) apresentaram dois dubletos desblindados característicos de flavonoide em  $\delta_{\text{H}}$  8,07 (2H,  $J = 7,92$  Hz) e 7,01 (2H,  $J = 7,92$  Hz), referentes aos hidrogênios equivalentes do anel B aromático *para*-dissubstituído. Observou também dois singletos largos em  $\delta_{\text{H}}$  6,51(1H) e 6,27 (1H), com padrão de substituição comum 5,7-dioxi, em que o singlete H-6 aparece consideravelmente em campo mais blindado que o sinal referente a H-8 (CRUZ, 2013). Esse comportamento se deve ao fato dos hidrogênios do anel aromático sofrerem anisotropia diamagnética do anel, deixando-os relativamente desblindados (PAVIA, 2001; SILVERSTEIN, 2007).

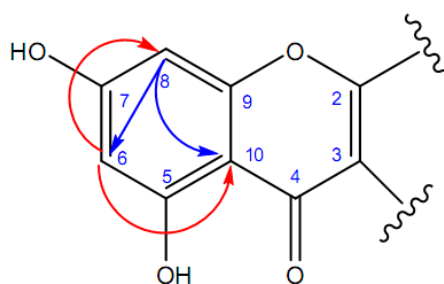
O singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  5,45 atribuído ao hidrogênio anomérico e os singletos largos integrados para um hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  4,28, 4,02 e 3,99 sugerem a presença de monossacarídeo. Além disso, um singlete integrando para dois  $\delta_{\text{H}}$  3,54 atribuído a um grupo  $\text{CH}_2$  também corrobora com a sugestão de um monossacarídeo do tipo pentose (NASCIMENTO, 2008).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.15, p. 77) mostra sinais referentes a 14 carbonos. O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  131,7 é referente aos carbonos C-2' e 6', enquanto que o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  116,5 foi atribuído a C-3' e C5', além da ausência dos carbonos quaternários (C-1') e (C-4') que confirmaram a existência do anel B dissusstituído. Já os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  99,7 (C-6) e 94,8 (C-8) são referentes ao anel A (CRUZ, 2013). A ocorrência de quatro sinais na região  $\delta_{\text{C}}$  62,6-89,6 referentes aos carbonos C-2'', C-3'', C-4'' e C-5'' e um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  109,3 (referente ao carbono anomérico C-1''), confirmam a existência de uma unidade de monossacarídeo ligado ao flavonoide. O esqueleto glicosilado de um flavonol foi confirmado através dos dados característicos, em comparação com dados da literatura (NASCIMENTO, 2008).

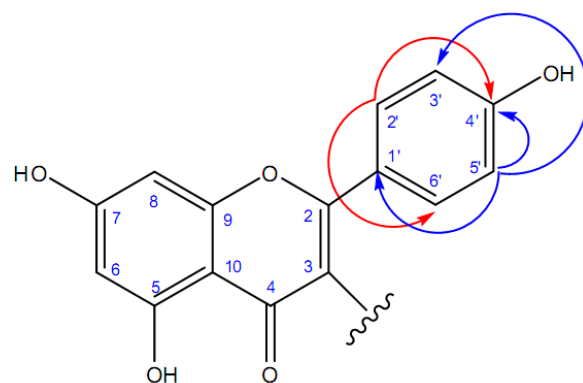
A configuração da unidade de glicosídica pode ser determinada a partir do valor da constante de acoplamento  ${}^3J_{1''2''}$ , cuja dependência com o ângulo diedro  $\Phi$  de átomos de hidrogênios vicinais, foi reconhecida pela primeira vez por Karplus. De acordo com Karplus, hidrogênios que apresentam configuração  $\beta$  (*trans*-diaxiais), com  $\Phi = 180^\circ$  têm uma constante de acoplamento elevada, enquanto o análogo com configuração  $\alpha$  (orientações *axial*-equatorial e equatorial-equatorial), ambas com  $\Phi = 60^\circ$ , têm constantes de acoplamento muito menores (SINNOTT, 2007). Diante deste contexto, determinou-se a configuração  $\alpha$  para o oxigênio ligado ao carbono anomérico C-1'', uma vez que neste caso é observado um singlete largo.

A análise do mapa de contorno de HSQC (FIGURA 4.16, p. 78) mostra as correlações dos hidrogênios com os carbonos diretamente ligados ( $J'$ ). Observou-se que o dubleto em  $\delta_H$  8,07 (H-2' e H-6'), possui correlação com o sinal em  $\delta_C$  131,7, assim como o dubleto em  $\delta_H$  7,01 (H-3' e H-5') com o sinal em  $\delta_C$  116,5. Já o singlete em  $\delta_H$  3,54 (H5'') apresentou correlação com o sinal em  $\delta_C$  62,6, sendo este atribuído ao grupo CH<sub>2</sub> ligado na posição C-5'' do monossacarídeo.

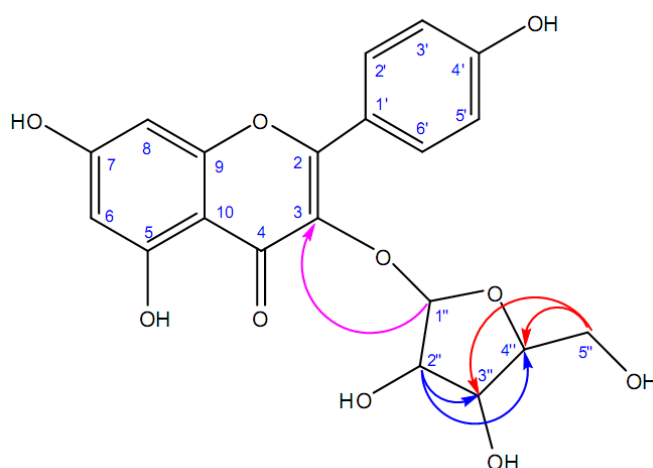
O mapa de contorno de HMBC (FIGURA 4.17, p. 79 e FIGURA 4.18, p. 80) mostra as correlações dos hidrogênios com carbonos a uma, duas e três ligações ( $J^{1,2}$  e  ${}^3$ ). Foi possível observar correlações de H-6 ( $\delta_H$  6,27) com C-10 ( $\delta_C$  105,6) e C-8 ( $\delta_C$  94,8), além da correlação de H-8 ( $\delta_H$  6,51) com C-10 ( $\delta_C$  105,6) e C-6 ( $\delta_C$  99,7).



O sinal referente a H-2' e H-6' ( $\delta_H$  8,07) mostra correlação com os sinais referentes a C-2' e C-6' ( $\delta_C$  131,7), C-2 ( $\delta_C$  158,2) e C-4' ( $\delta_C$  161,2). O sinal referente a H-3' e H-5' ( $\delta_H$  7,01) mostrou correlação com os sinais dos carbonos C-3' e C-5' ( $\delta_C$  116,5), também com o C-1' ( $\delta_C$  122,8) e ainda com C-4' ( $\delta_C$  161,2).

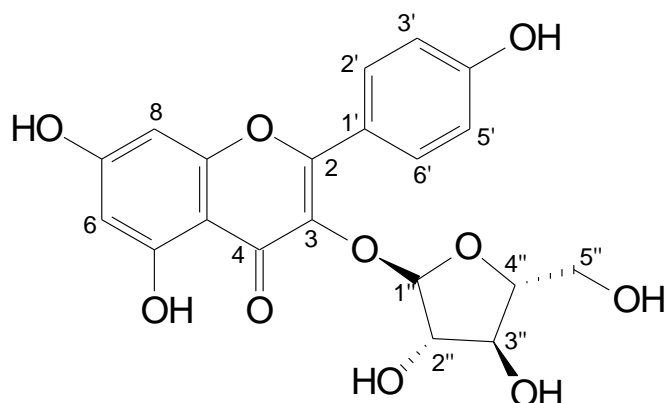


A posição exata da unidade de açúcar em C-3-O foi determinada com base na correlação observada entre o hidrogênio anomérico H-1'' ( $\delta_H$  5,45) e o carbono C-3 ( $\delta_C$  134,8). Outras correlações também podem ser observadas como H-2'' ( $\delta_H$  4,28) e H-5'' ( $\delta_H$  3,54) com C-4'' ( $\delta_C$  89,6) e C-3'' ( $\delta_C$  78,8).



As análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e os mapas de contorno da substância **IV**, em comparação com os dados da literatura, levaram a identificação do flavonol glicosilado juglanina (CHANG et al., 2009), conhecida por exercer atividade antioxidante, atividade neuroprotetora contra toxicidade induzida por glutamato em células HT22, atividade citotóxica contra células HepG2 e atividade anti-senescência (YANG, et al., 2014).

**TABELA 4.6** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **IV** (juglanina).



**IV**

Substância IV				
H/C	Dados obtidos		CHANG et al., 2009	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (Acetona- $d_6$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (Acetona- $d_6$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (DMSO, 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (DMSO, 125 MHz)
2	-	158,2	-	156,3
3	-	134,8	-	133,4
4	-	-	-	177,6
5	-	-	-	161,2
6	6,27 (s, 1H)	99,7	6,19 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	98,8
7	-	165,5	-	164,2
8	6,51 (s, 1H)	94,8	6,42 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H)	93,6
9	-	158,0	-	156,7
10	-	105,6	-	103,9
1'	-	122,8	-	120,7
2'	8,07 (d, $J = 7,92$ Hz, 2H)	131,7	8,02 (d, $J = 8,04$ Hz, 2H)	130,8
3'	7,01 (d, $J = 7,92$ Hz, 2H)	116,5	6,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H)	115,4
4'	-	161,6	-	159,9
5'	7,01 (d, $J = 7,92$ Hz, 2H)	116,5	6,89 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H)	115,4
6'	8,07 (d, $J = 7,92$ Hz, 2H)	131,7	8,02 (d, $J = 8,04$ Hz, 2H)	130,8
1''	5,45 (s, 1H)	109,3	5,63 (s, 1H)	108,0
2''	4,28 (s, 1H)	82,2	-	82,1
3''	3,99 (s, 1H)	78,8	-	77,1
4''	4,02 (s, 1H)	89,6	-	86,3
5''	3,54 (s, 2H)	62,6	3,54 (s, 2H)	60,8

FIGURA 4.14 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância IV (400 MHz, acetona- $d_6$ ).

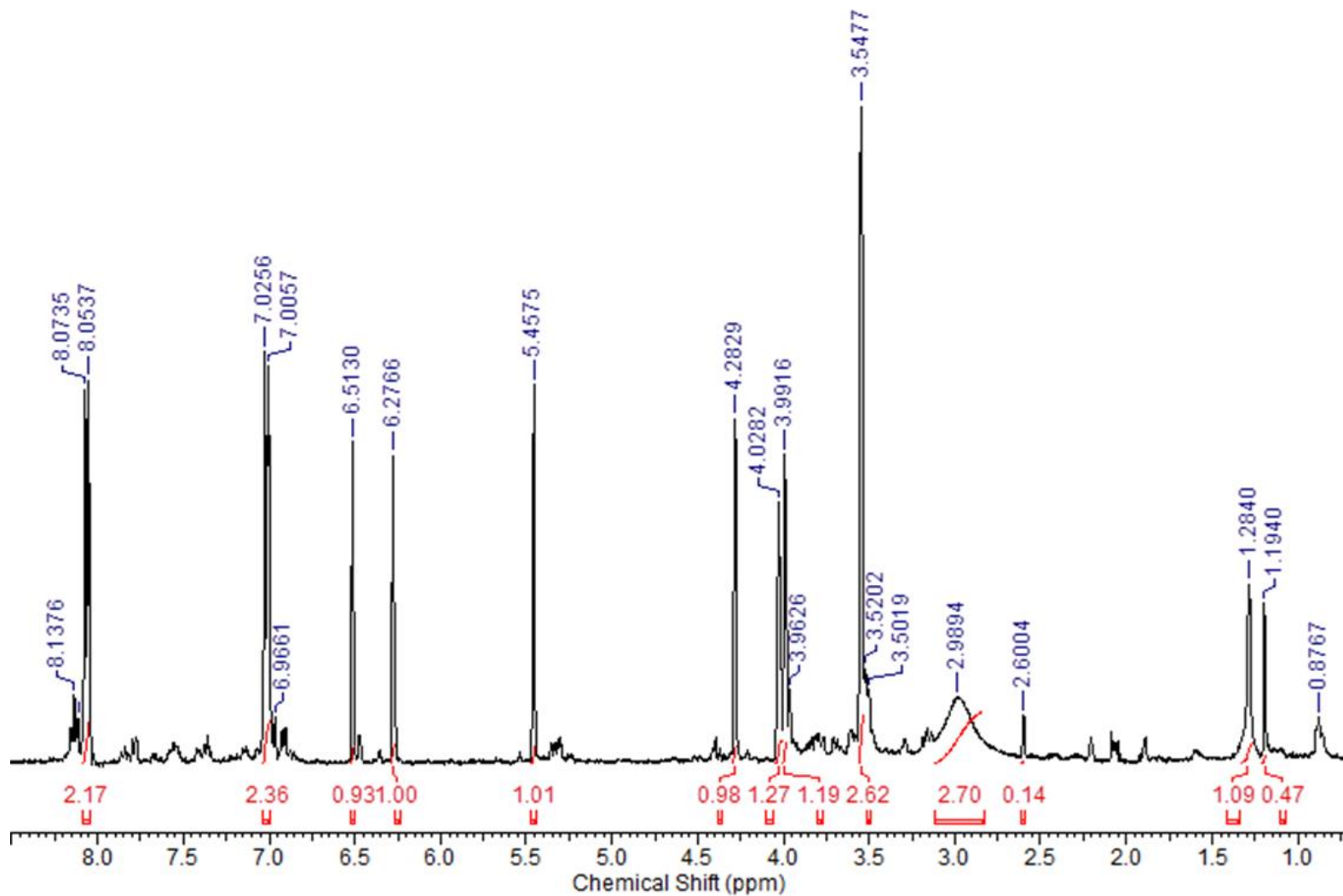
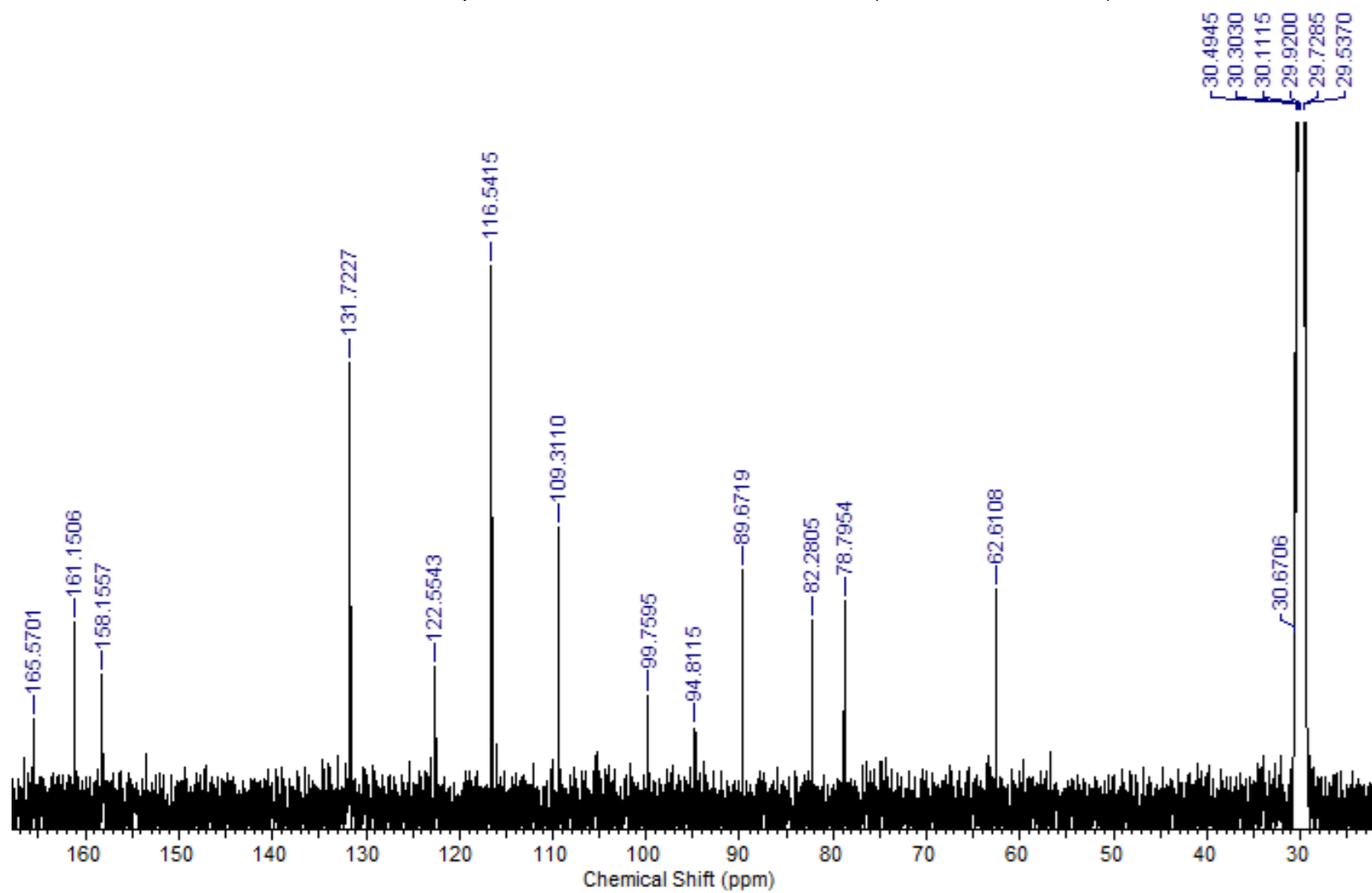


FIGURA 4.15 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância IV (100 MHz, acetona- $d_6$ ).



**FIGURA 4.16** - Mapa de contorno do experimento HSQC para a substância **IV** (400 MHz, acetona- $d_6$ ).

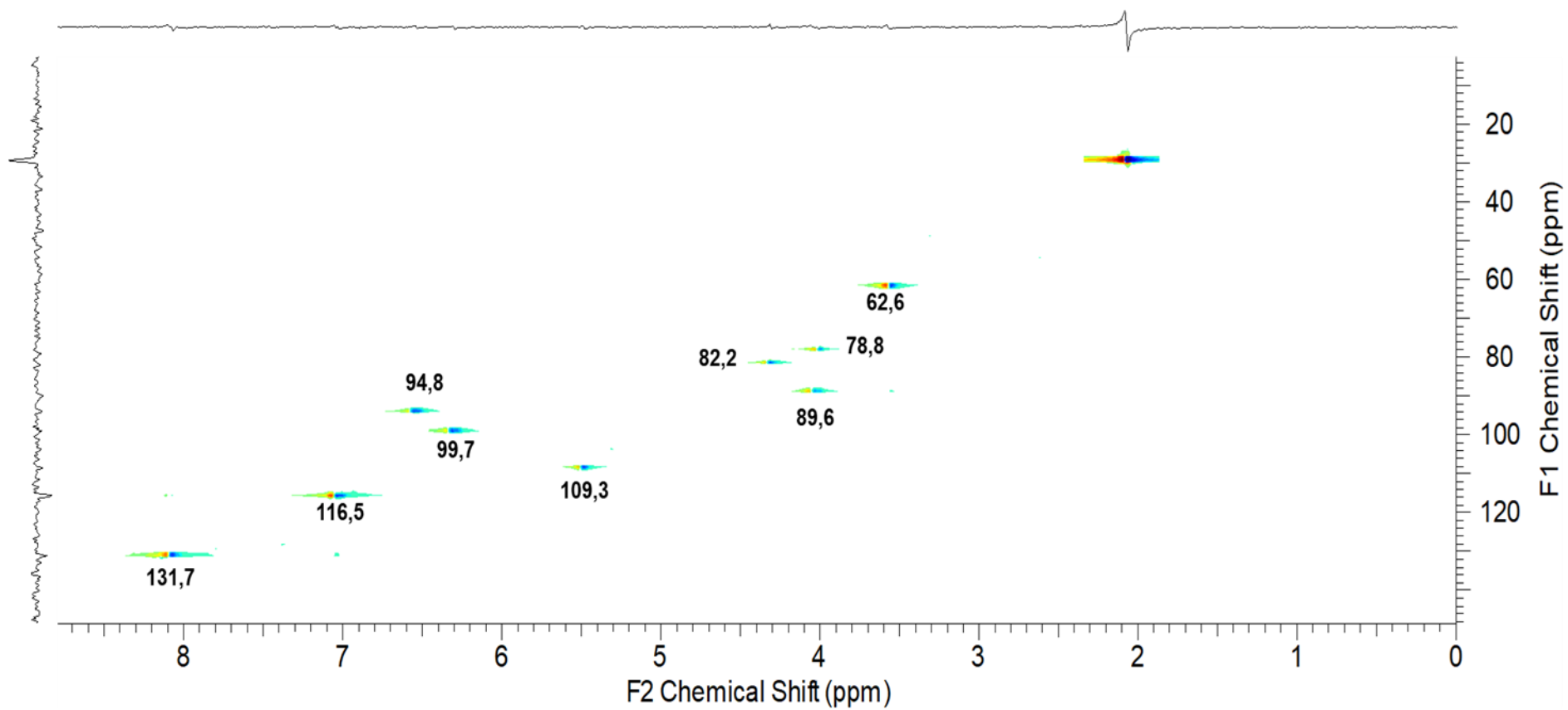
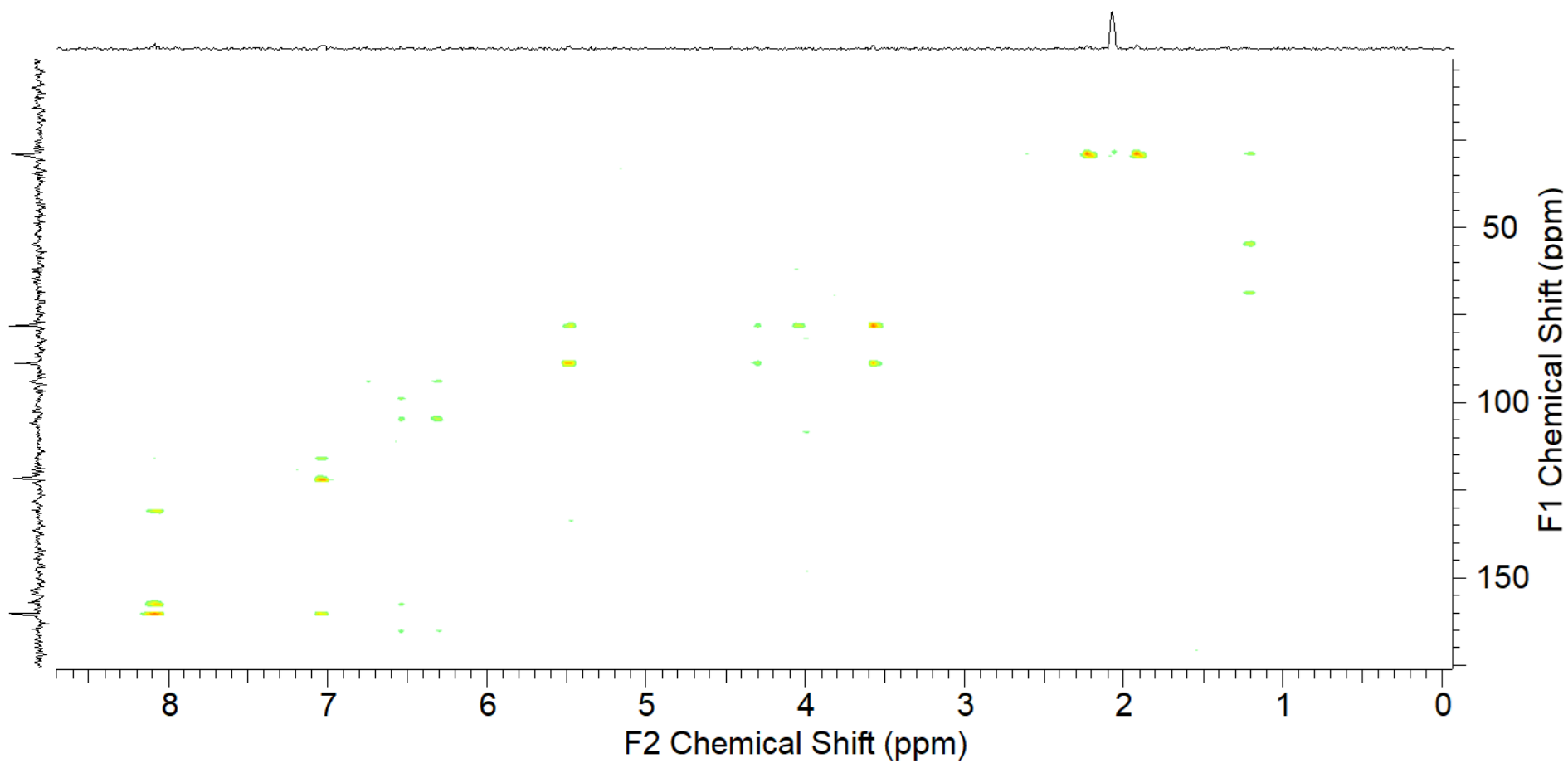
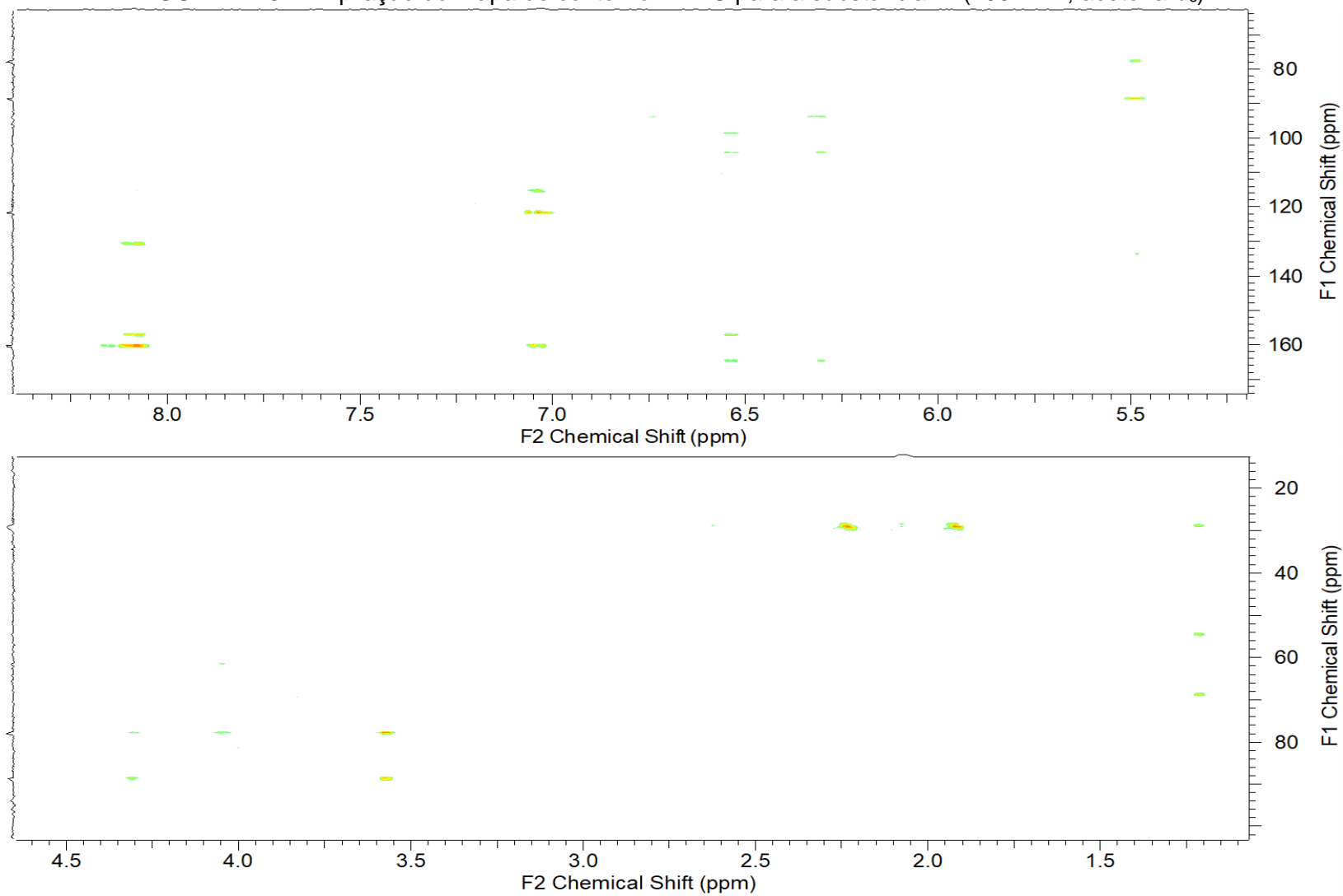


FIGURA 4.17 - Mapa de contorno do experimento HMBC para a substância IV (400 MHz, acetona- $d_6$ ).



**FIGURA 4.18** - Ampliação do mapa de contorno HMBC para a substância **IV** (100 MHz, acetona- $d_6$ ).



#### 4.5. Determinação estrutural da substância kaempferol

A substância **V** (kaempferol) (3,0 mg) foi obtida em mistura na forma de um sólido amarelo, a partir de CC da subfração 1.7.5.11-13.3.1. A identificação estrutural foi feita utilizando técnicas espectroscópicas uni e bidimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (TABELA 4.7, p. 83), em comparação com dados da literatura (ROHDIANA et al., 2014).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.19, p. 84), foi observado a presença de sinais desblindados, característicos de hidrogênios aromáticos, sendo dois dubletos, um em  $\delta_{\text{H}} 8,04$  ( $J = 8,50$  Hz) e outro em  $\delta_{\text{H}} 6,92$  ( $J = 8,50$  Hz), ambos integrando para dois hidrogênios cada. Este conjunto de sinais é característico de acoplamento *para*-dissubstituído, típico de um sistema AA'BB' do anel B de flavonoides, logo atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6' e H-3', H-5' (KALEGARI et al., 2011). Observou-se ainda dois dubletos,  $\delta_{\text{H}} 6,44$  ( $J = 1,4$  Hz) e  $\delta_{\text{H}} 6,18$  ( $J = 1,4$  Hz), ambos integrando para um único hidrogênio, sendo estes atribuídos aos hidrogênios do anel A, típicos de um sistema de acoplamento AX. Verificou-se ainda a presença de um singlete em  $\delta_{\text{H}} 12,47$  atribuído ao sinal de um hidrogênio quelado entre a carbonila e o grupo hidroxila da posição 5, para esqueletos básicos flavonoídicos.

No mapa de contorno COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (FIGURA 4.20, p. 85), não foi possível observar as correlações dos hidrogênios blindados com os hidrogênios aromáticos, mostrando assim que a amostra possuía impurezas.

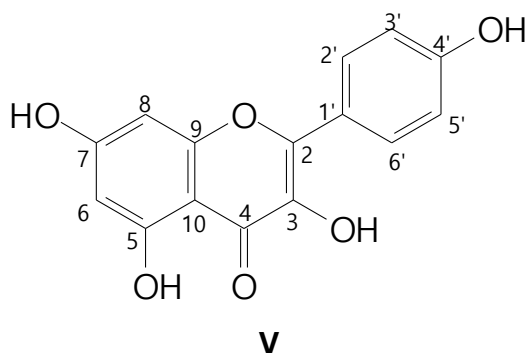
O mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.21, p. 86), apresenta correlações dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 8,04$  com o carbono em  $\delta_{\text{C}} 129,8$  (C-2' e C-6') e os hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 6,93$  com o carbono  $\delta_{\text{C}} 116,1$  (C-3' e C-5') em sistema aromático de flavonoides. Também apresenta correlação dos sinais dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}} 6,43$  e  $\delta_{\text{H}} 6,18$  com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 98,6$  (C-6) e  $\delta_{\text{C}} 93,5$  (C-8), respectivamente.

A análise do mapa de correlações HMBC (FIGURA 4.22 e FIGURA 4.23, p. 87 e 88), indicou a correlação do sinal em  $\delta_{\text{H}} 8,04$  com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 129,8$  (C-2' e C-6'),  $\delta_{\text{C}} 146,5$  (C-2) e  $\delta_{\text{C}} 159,7$  (C-4'). Já o sinal em  $\delta_{\text{H}} 6,92$  apresentou correlação com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 116,1$  (C-3' e C-5'),  $\delta_{\text{C}} 122,3$  (C-1'),  $\delta_{\text{C}} 146,5$  (C-2) e  $\delta_{\text{C}} 159,7$  (C-4'). Observou-se ainda a correlação do sinal do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}} 6,44$  com os carbonos em  $\delta_{\text{C}} 98,6$  (C-6),  $\delta_{\text{C}} 102,9$  (C-10),  $\delta_{\text{C}}$

156,9 (C-9) e  $\delta_c$  164,1 (C-7). O sinal do hidrogênio em  $\delta_H$  6,18 apresentou correlação com os carbonos em  $\delta_c$  93,5 (C-8),  $\delta_c$  102,9 (C-10) e  $\delta_c$  162,2 (C-5). Com esses dados, pode-se concluir a identidade dos hidrogênios 6 e 8 do anel A e a ausência de um singlete entre  $\delta_H$  6,39-6,94, sugere que esta substância seja um flavonol.

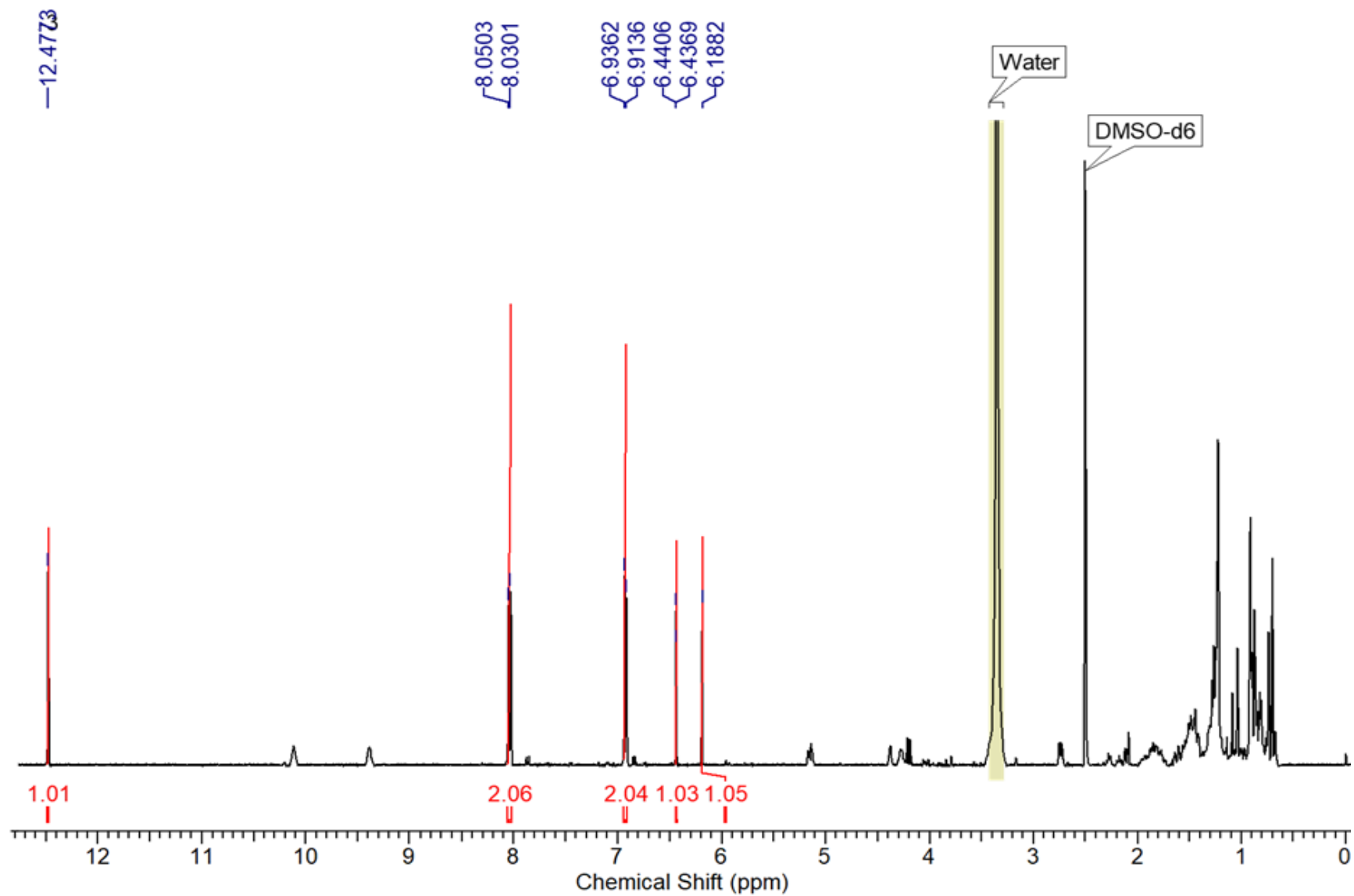
O conjunto de dados descrito acima, corroboraram para confirmar que a substância **V** se trata do kaempferol, um flavonol comum neste gênero.

**TABELA 4.7** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **V** (kaempferol).



Substância V				
H/C	Dados obtidos		ROHDIANA et al., 2014	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 125 MHz)
2	-	146,5	-	146,9
3	-	138,0	-	136,5
4	-	-	-	176,5
5	-	162,2	-	163,2
6	6,18 ( <i>d</i> , $J = 1,4$ Hz)	98,6	6,25 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	99,1
7	-	164,1	-	164,9
8	6,44 ( <i>d</i> , $J = 1,4$ Hz)	93,5	6,50 ( <i>d</i> , $J = 2,0$ Hz)	94,4
9	-	156,9	-	157,7
10	-	102,9	-	104,1
1'	-	122,3	-	123,2
2'	8,0 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	129,8	8,13 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	130,3
3'	6,93 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	116,1	6,99 ( <i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	116,2
4'	-	159,7	-	160,0
5'	6,93 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	116,1	6,99 ( <i>d</i> , $J = 9,0$ Hz)	116,2
6'	8,0 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	129,8	8,13 ( <i>d</i> , $J = 8,5$ Hz)	130,3

FIGURA 4.19 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **V** ( $\text{DMSO-}d_6$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.20** - Mapa de contorno do experimento COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para a substância **V** (DMSO- $d_6$ , 400 MHz).

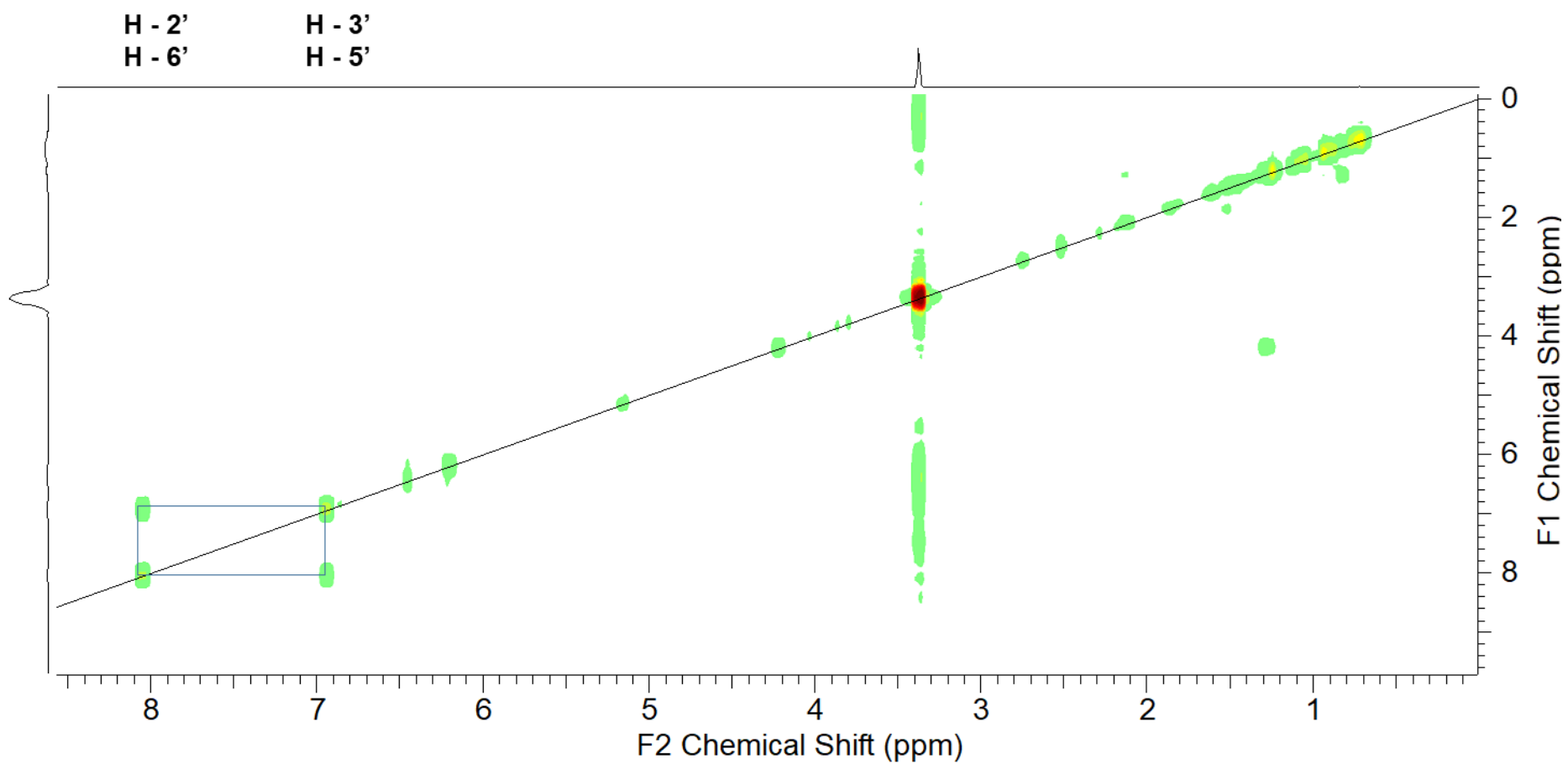


FIGURA 4.21 - Mapa de contorno do experimento HSQC da substância V (DMSO- $d_6$ , 400 MHz).

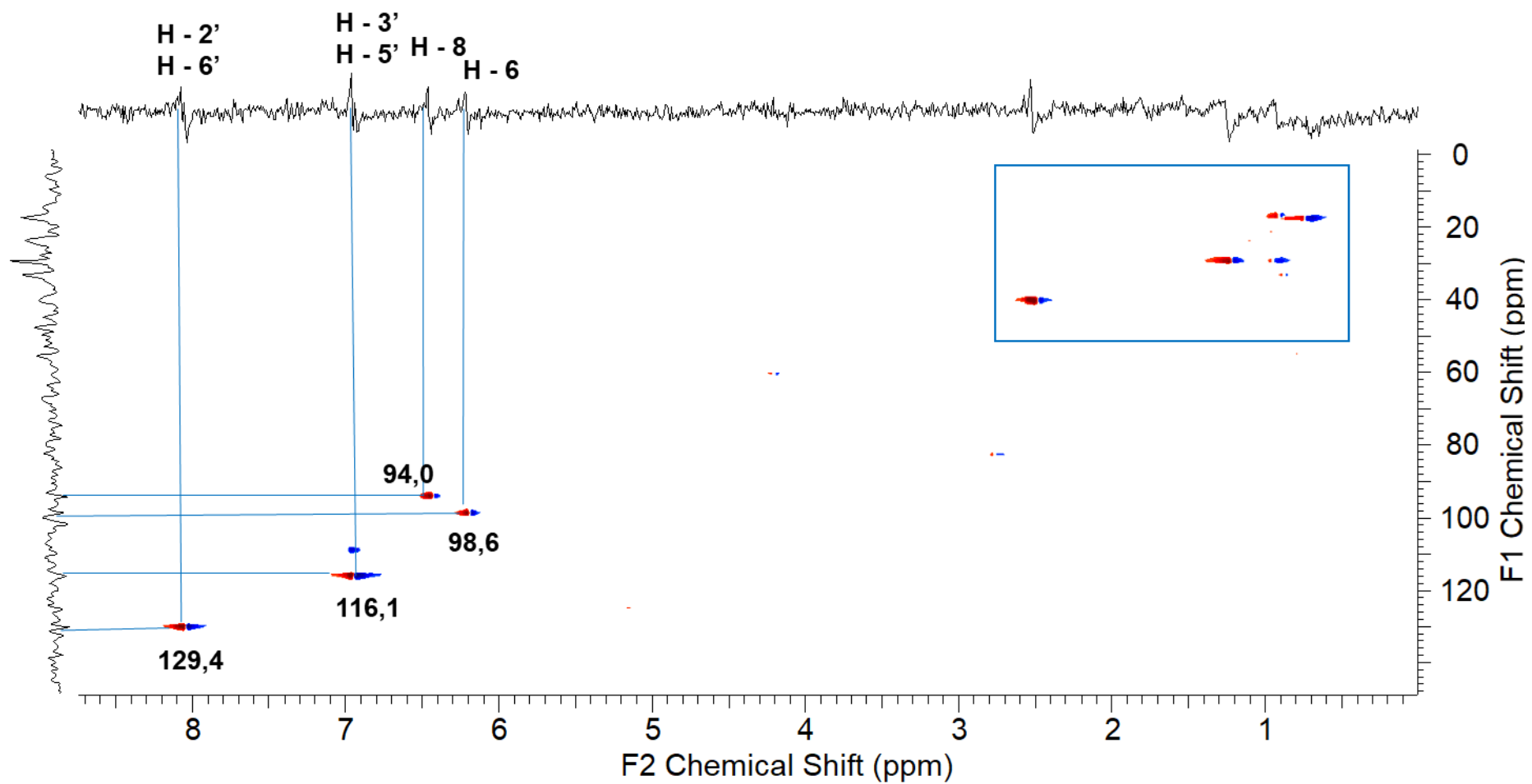


FIGURA 4.22 - Mapa de contorno do experimento HMBC da substância V (DMSO- $d_6$ , 400 MHz).

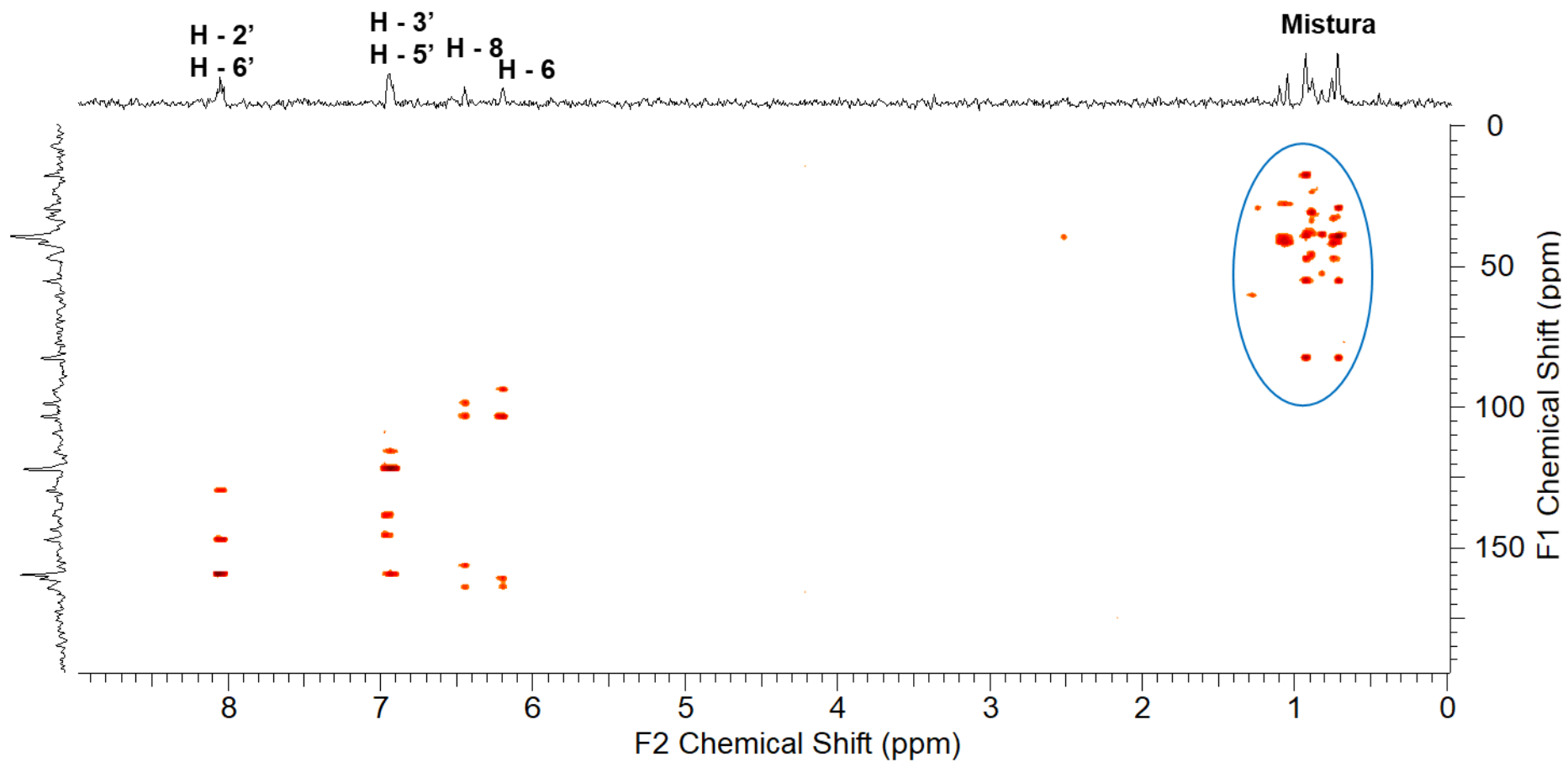
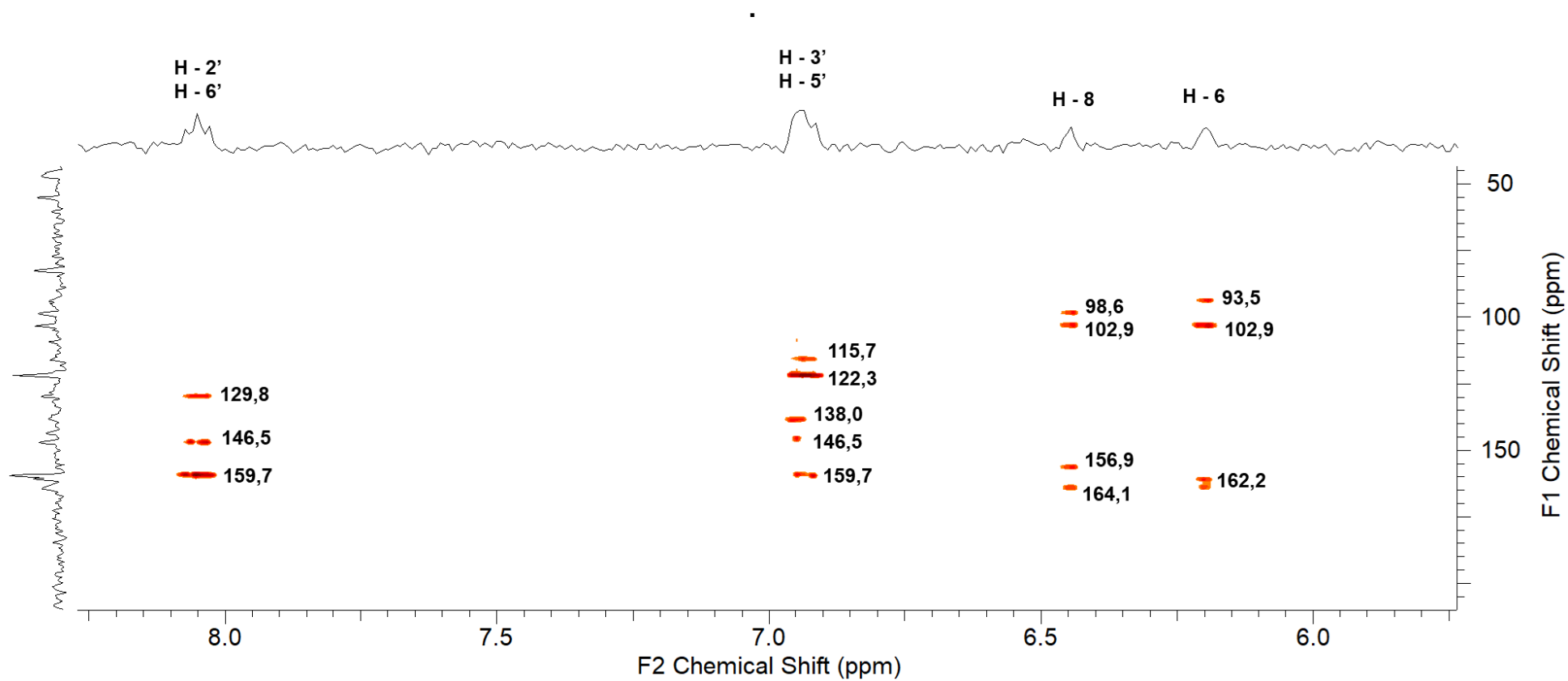


FIGURA 4.23 - Ampliação do mapa de contorno do experimento HMBC para a substância V (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz).



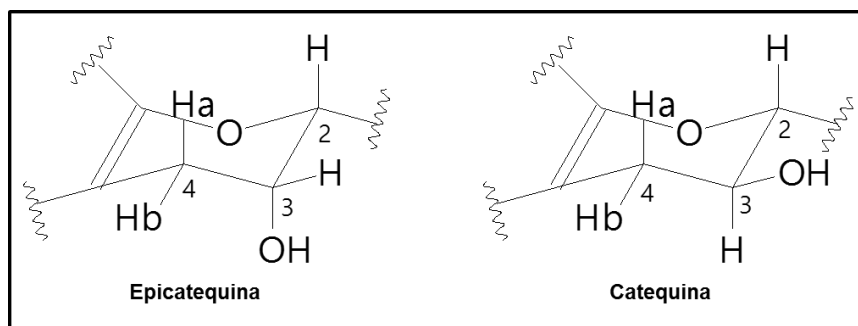
#### 4.6. Determinação estrutural da substância (-)-epicatequina

A substância **VI** (-)-epicatequina foi isolada da subfração LA 1.7.6.11.7.10.7 como um sólido amorfo incolor (4,9 mg) e foi caracterizada através dos experimentos de RMN unidimensionais  $^1\text{H}$  e DEPT-135, além dos bidimensionais COSY e HSQC (TABELA 4.8, p. 91), além de comparação com dados da literatura (LÔBO et al., 2008).

Ao analisar o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.25, p. 92), verificou-se a presença de quatro sinais na região de hidrogênios alifáticos. Em  $\delta_{\text{H}}$  2,85 ( $J = 16,70$  e  $4,60$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  2,74 ( $J = 16,70$  e  $3,40$  Hz), foram observados dois duplos dubletos, ambos integrando para um hidrogênio, característicos de hidrogênios de grupo metilênico; dois singletos largos, um em  $\delta_{\text{H}}$  4,87 característicos de hidrogênio oximetínico-benzílico, e o segundo em  $\delta_{\text{H}}$  4,19 atribuído a um hidrogênio ligado a carbono oximetínico. Esse conjunto de sinais é típico do anel C de epicatequina, composto este que possui dados espectrais muito parecido com a catequina, por se tratarem de epímeros. Destaca-se apenas algumas pequenas diferenças, tanto no deslocamento químico como no padrão de acoplamento, em consequência da mudança de estereoquímica do carbono C-3 (LÔBO et al., 2008).

Essa diferença no padrão de acoplamento ocorre devido ao fato do H-3 estar em diferente configuração para a catequina e para epicatequina (FIGURA 4.24, p. 90). Na epicatequina o acoplamento vicinal do H-2 (axial) com o H-3 (equatorial) gera um singleto largo com diferentes deslocamentos químicos para ambos os casos. Isso se justifica porque configurações  $\alpha$  (orientações axial-equatorial e equatorial-equatorial), ambas com  $\Phi = 60^\circ$ , têm constantes de acoplamento menores que configurações  $\beta$  (*trans*-diaxiais), com  $\Phi = 180^\circ$ , a catequina possui um dubleto referente ao acoplamento vicinal do H-2 com o H-3 ( $J = 7,6$  Hz) e um multipletto referente aos acoplamentos vicinais do H-3, com o H-2, H-4a e H-4b (PAVIA, 2001; LÔBO et al., 2008).

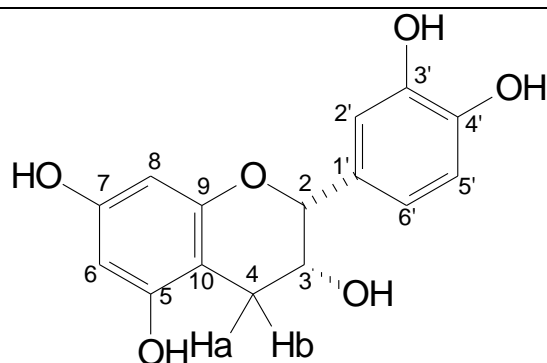
**FIGURA 4.24** - Relação entre os valores das constantes de acoplamento  $^3J$  do H-3 e o ângulo diedro  $\Phi$  de hidrogênios vizinhos do anel C da epicatequina e catequina.



Na região dos hidrogênios aromáticos, pode se observar sinais em  $\delta_H$  7,04 (*d*,  $J = 1,94$  Hz),  $\delta_H$  6,78 (*d*,  $J = 8,05$  Hz) e  $\delta_H$  6,83 (*dd*,  $J = 8,05$  e  $1,94$  Hz) que são referentes aos H-2', H-5' e H-6' do anel B, respectivamente. Já o modo de oxidação do anel A foi definido por apresentar dois dubletos com constante típica de acoplamento *meta* ( $J = 2,44$  Hz) em  $\delta_H$  6,01 e  $\delta_H$  5,91, relativos a H-6 e H-8 da epicatequina. O espectro de correlação COSY  $^1H$ - $^1H$  (FIGURA 4.26, p. 93) foi utilizado para confirmar as interações *spin-spin* dos átomos de hidrogênios presentes no anel C, comprovando assim os acoplamentos já discutidos.

A análise do espectro de DEPT-135 (FIGURA 4.27, p. 94), em conjunto com o mapa de contorno HSQC (FIGURA 4.28, p. 95), bem como a comparação dos dados com a literatura, foi possível atribuir os oito sinais dos carbonos hidrogenados da estrutura da (-)-epicatequina. Destaca-se os sinais em  $\delta_C$  28,8 do carbono metilênico e os sinais atribuídos aos carbono oximetínico-benzílico C-2 ( $\delta_C$  79,2), que representa um dos sinais mais importantes para distinguir a epicatequina do seu epímero, a catequina, que exibe para C-2 um sinal em ( $\delta_C$  82,4). Outros sinais importantes do espectro HSQC, são os sinais  $\delta_C$  115,2 e  $\delta_C$  115,0, referente aos carbonos C-5' e C-2', respectivamente, mostrando correlações  $^1J$  com os sinais  $\delta_H$  6,784 e  $\delta_H$  7,04, atribuídos aos hidrogênios H-5' e H-2' (LÔBO et al., 2008).

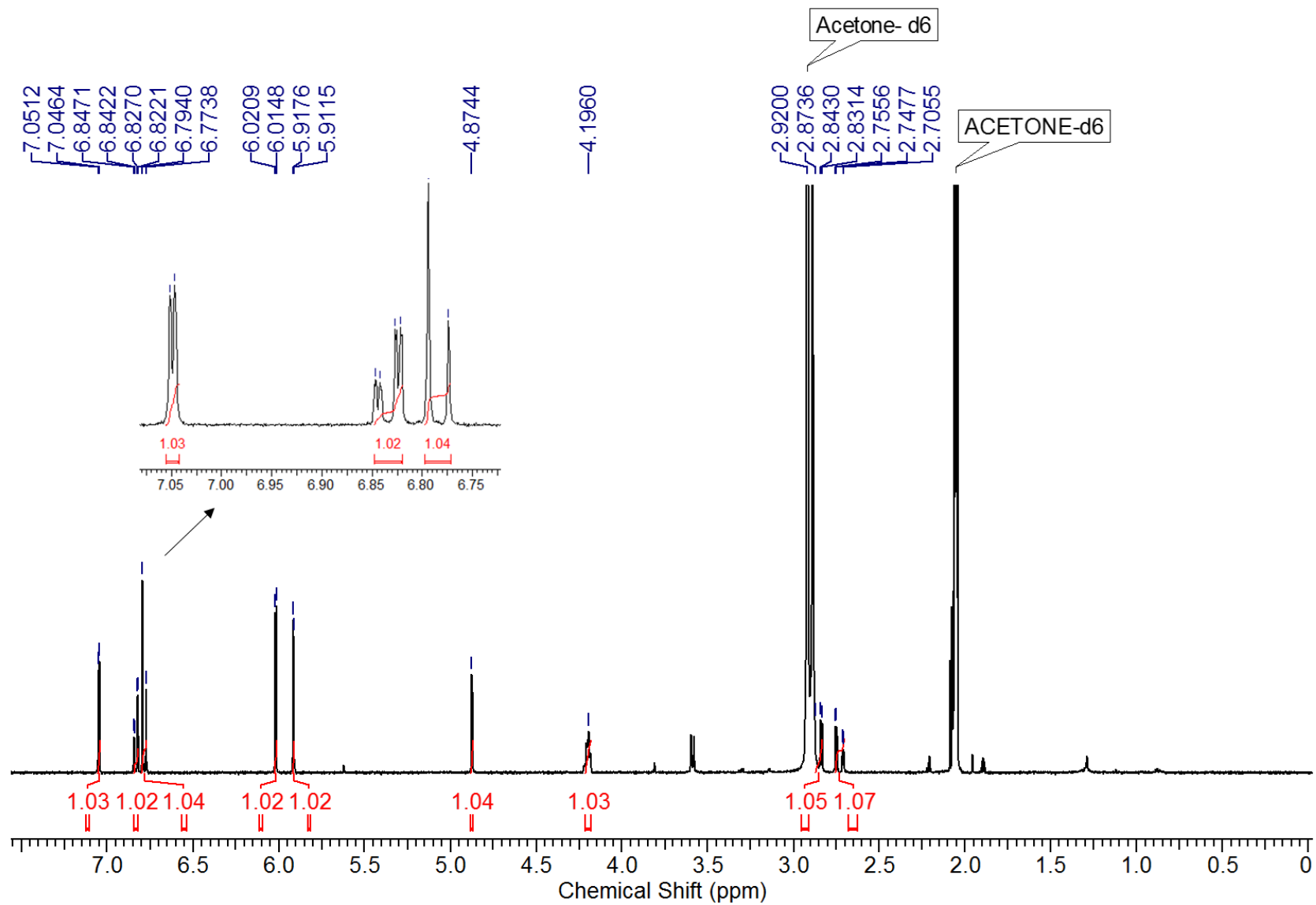
**TABELA 4.8** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância **VI** (-)-epicatequina.



**VI**

Substância VI				
H/C	Dados obtidos		LÔBO et al., 2008	
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) (acetona- $d_6$ , 100MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ + gotas $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz)
2	4,87 ( <i>sl</i> , 1H)	79,2	4,82 ( <i>sl</i> , 1H)	79,1
3	4,19 ( <i>sl</i> , 1H)	66,7	4,17 ( <i>sl</i> , 1H)	66,6
4 <sup>a</sup>	2,85 ( <i>dd</i> , $J = 16,7$ e $4,6$ Hz, 1H)	28,8	2,85 ( <i>dd</i> , $J = 16,8$ e $4,5$ Hz, 1H)	28,5
4 <sup>b</sup>	2,74 ( <i>dd</i> , $J = 16,7$ e $3,4$ Hz, 1H)	28,8	2,72 ( <i>dd</i> , $J = 16,8$ e $2,4$ Hz, 1H)	28,5
5	-	156,7	-	157,3
6	6,01 ( <i>d</i> , $J = 2,44$ Hz; 1H)	95,9	5,93 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz; 1H)	96,0
7	-	156,2	-	156,7
8	5,91 ( <i>d</i> , $J = 2,44$ Hz; 1H)	95,4	5,91 ( <i>d</i> , $J = 1,8$ Hz; 1H)	95,3
9	-	-	-	157,1
10	-	98,8	-	99,5
1'	-	131,3	-	131,7
2'	7,04 ( <i>d</i> , $J = 1,94$ Hz; 1H)	115,0	6,97 ( <i>d</i> , $J = 1,2$ Hz; 1H)	115,0
3'	-	144,1	-	145,0
4'	-	144,1	-	145,1
5'	6,78 ( <i>d</i> , $J = 8,05$ Hz; 1H)	115,2	6,75 ( <i>d</i> , $J = 8,1$ Hz; 1H)	115,4
6'	6,83 ( <i>dd</i> , $J = 8,05$ e $1,94$ Hz; 1H)	119,1	6,79 ( <i>dd</i> , $J = 8,1$ e $1,2$ Hz; 1H)	119,0

FIGURA 4.25 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância VI (acetona- $d_6$ , 400 MHz).



**FIGURA 4.26** - Mapa de contorno do experimento COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para a substância **VI** (acetona- $d_6$ , 400 MHz).

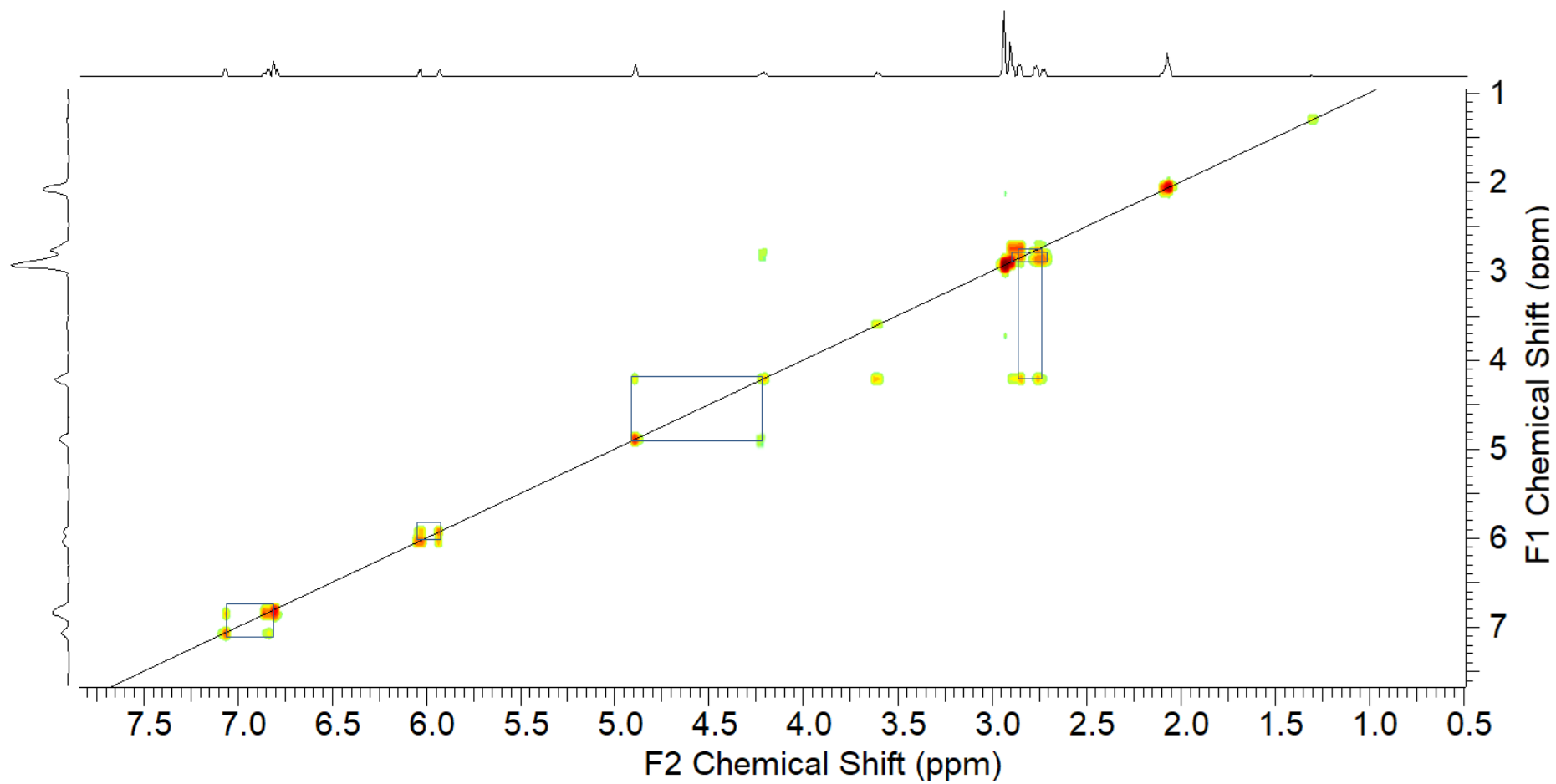


FIGURA 4.27 - Espectro de RMN DEPT-135 da substância VI (acetona- $d_6$ , 100 MHz).

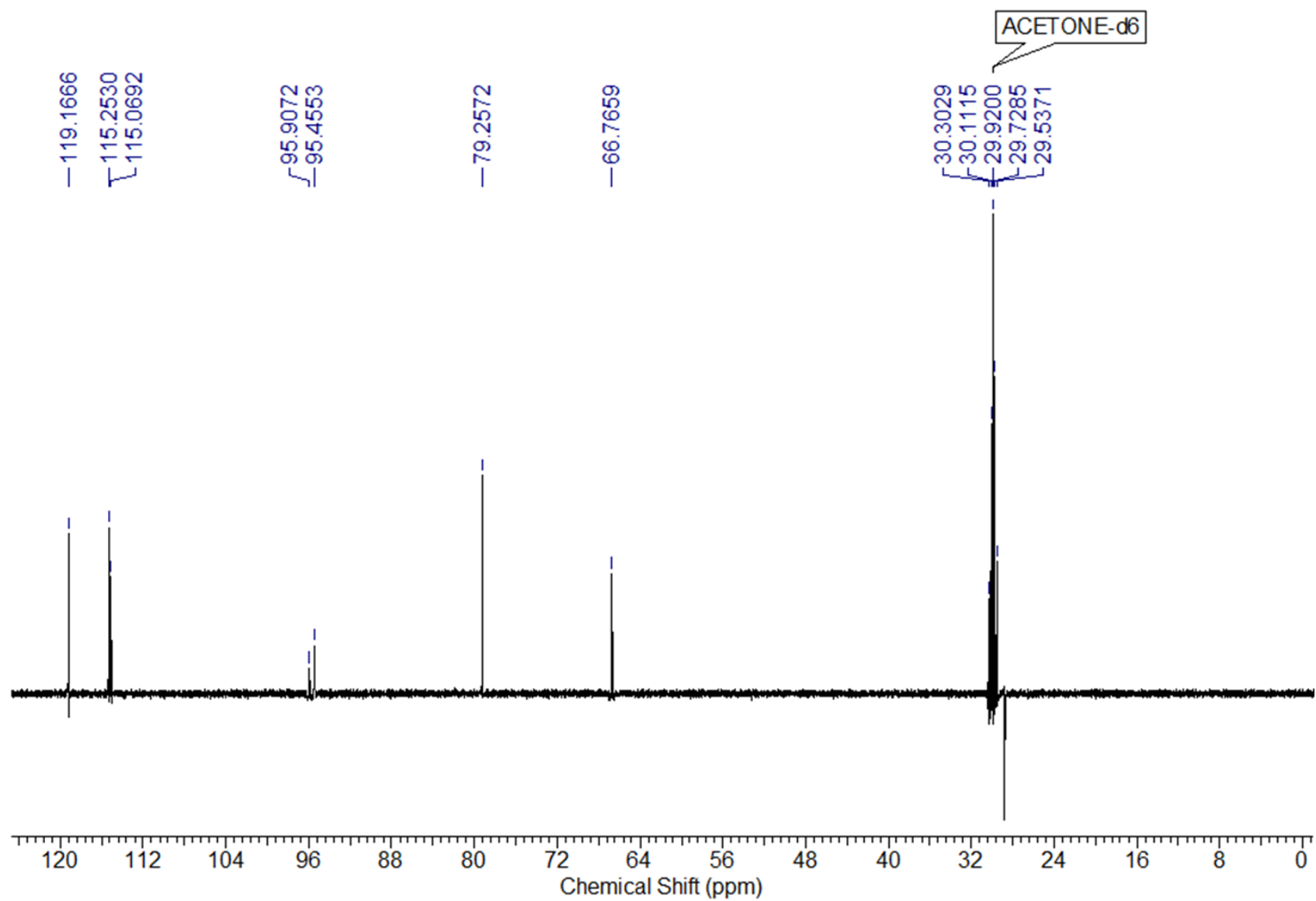
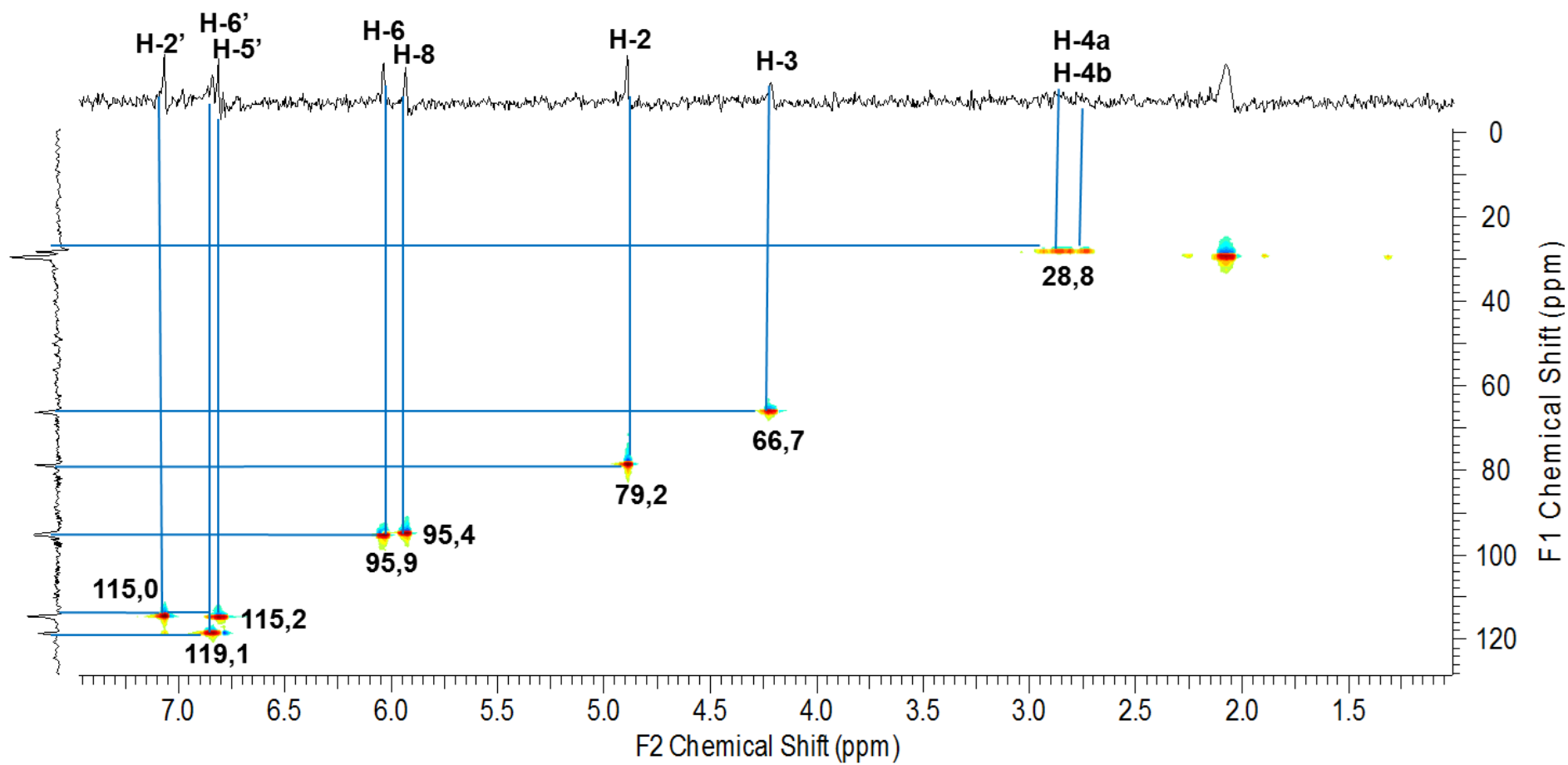


FIGURA 4.28 - Mapa de contorno do experimento HSQC para a substância VI (acetona-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz).

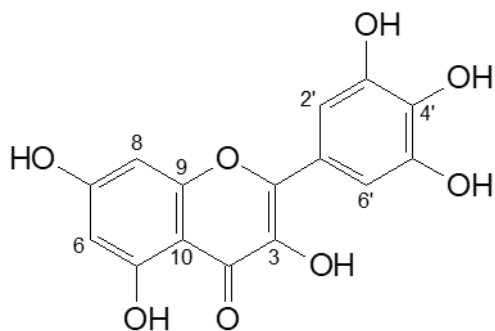


#### 4.7. Determinação estrutural da substância miricetina

A substância **VII** (miricetina) foi isolada da subfração LA 1.7.6.22.3 (Fluxograma 3.6, p. 46) como um sólido amorfo amarelo (3,5 mg), quando analisada em CCD e revelada em solução ácida de vanilina, mostrou uma macha amarela. Este composto foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  (TABELA 4.9, p. 97), em comparação com os dados da literatura (YAN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.29, p. 98), apresentou sinais bastante desblindados, próximos a 7 ppm, sugerindo a existência de hidrogênios em sistema aromático. Os hidrogênios que possuem  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (*d*,  $J = 2,08$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,38 (*d*,  $J = 2,08$  Hz) sugerem acoplamento do tipo meta de um anel aromático, referentes aos H-6 e H-8, os quais correspondem ao anel A de um flavonoide do tipo 5,7-diidroxilado (ISIDORO, et al 2012; LOPES, et al 2012; SANTOS, 2013). O sinal em  $\delta_{\text{H}}$  7,35 (*s*) integrado para dois hidrogênios, é característico de substituições simétricas no anel B, devido a livre rotação, sendo estes sinais atribuídos a H-2' e H-6'. Logo propõe-se um anel B substituído nas posições 3', 4' e 5'. Ao observar a ausência do sinal do H-3, que geralmente é um singleto entre  $\delta_{\text{H}}$  6,39-6,94, sugere-se que a substância **VII** trata-se de um flavonol. A análise dos dados espectroscópicos em comparação a literatura foi o suficiente para confirmar a substância como sendo o flavonol mericetina, um flavonoide bastante comum em várias espécies do gênero *Eugenia* (SILVA et al., 2005; FONSECA et al., 2007).

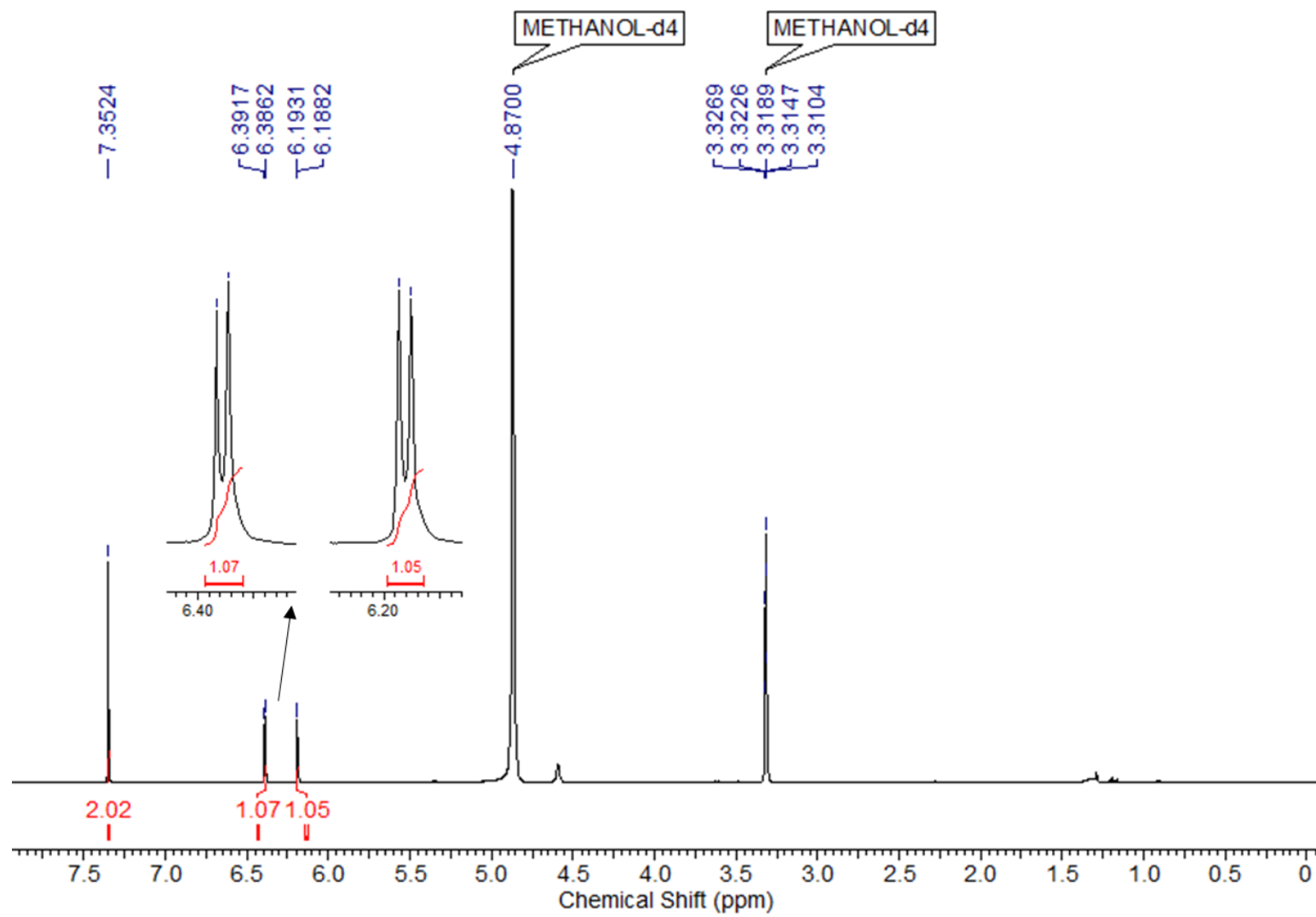
**TABELA 4.9** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  para a substância **VII** (miricetina).



**VII**

Substância VII			
H	Dados obtidos	OLIVEIRA et al., 2006	YAN et al., 2004
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 500 MHz)
6	6,19 ( <i>d</i> , $J = 2,08$ Hz)	6,37 ( <i>d</i> , $J = 2,00$ Hz)	6,27 ( <i>d</i> , $J = 1,50$ Hz)
8	6,38 ( <i>d</i> , $J = 2,08$ Hz)	6,56 ( <i>d</i> , $J = 2,00$ Hz)	6,53 ( <i>d</i> , $J = 1,50$ Hz)
2'	7,35 ( <i>s</i> )	7,53 ( <i>s</i> )	7,25 ( <i>s</i> )
6'	7,35 ( <i>s</i> )	7,53 ( <i>s</i> )	7,25 ( <i>s</i> )

**FIGURA 4.29** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **VI** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).



## 4.8. Ensaios biológicos

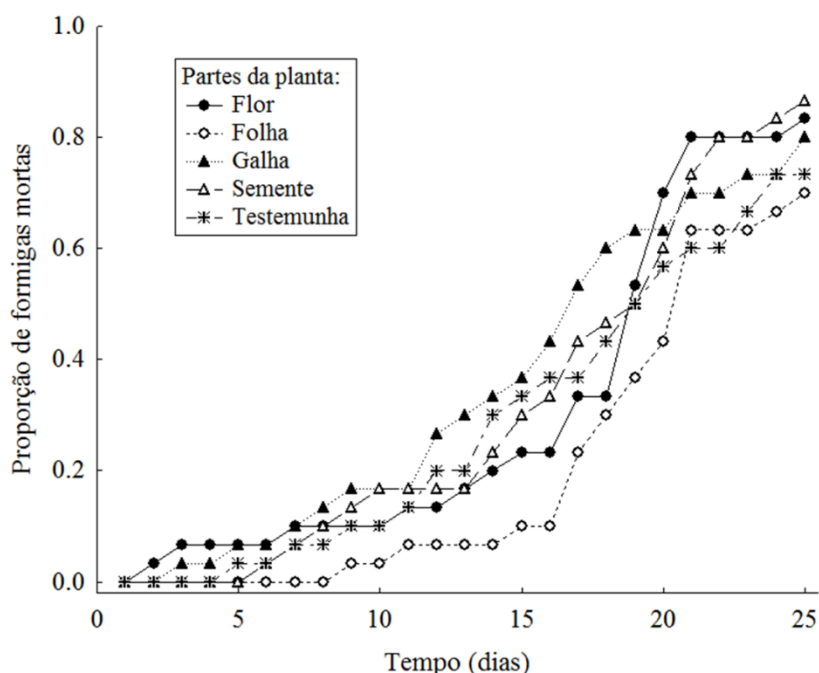
### 4.8.1. Efeito do extrato etanólico de *E. dysenterica* e de suas frações no controle às operárias de *Atta laevigata* - ensaios por ingestão

A utilização de extratos naturais para o controle de formigas cortadeiras tem sido amplamente reportado na literatura. Jung e colaboradores (2013) avaliou a atividade inseticida da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e cinanomo (*Melia azedarach* L.) frente a soldados de *Atta laevigata* enquanto que Franco (2013) avaliou a aplicação de extratos vegetais no desenvolvimento de seus fungos simbiotes.

Segundo Jung e colaboradores (2013), a família *Myrtaceae* possui resultados promissores na ação inseticida no controle da formiga cortadeira (*Atta sexdens*). Deste modo, chama a atenção a novos estudos para sua utilização no controle de insetos-pragas. Diante deste contexto, *E. dysenterica* se torna uma espécie atraente de ser investigada.

Os extratos etanólicos das folhas, flores, galhos e sementes de *E. dysenterica* foram ensaiados sobre as formigas operárias de *Atta laevigata* na concentração de 2 mg/mL, conforme metodologia descrita no item 3.3.1, p. 46. Para análise dos dados foram traçadas, inicialmente, curvas de sobrevivência para cada tratamento em relação ao controle. Na análise dos resultados obtidos, foram mostradas as curvas de sobrevivência das formigas submetidas ao tratamento por ingestão dos extratos incorporados à dieta, comparando com a curva obtida do controle contendo apenas a dieta pura, após um período de 25 dias de experimento (FIGURA 4.30, p. 100). A mortalidade acumulada e a sobrevivência mediana foram calculadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (KW) (Tabela 4.10, p. 100).

**FIGURA 4.30** - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta laevigata* frente aos ensaios por ingestão dos extratos de *E. dysenterica*.



**TABELA 4.10** - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta laevigata* frente ao ensaio por ingestão com extratos de *E. dysenterica*.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	Md*
<b>Controle Negativo</b>	0	0	0	3,3	6,6	10,0	33,3	36,6	60,0	73,3	0,29 ab
<b>Flores</b>	0	3,3	6,6	6,6	10,0	10,0	20,0	33,3	80,0	83,3	0,31 ab
<b>Folhas</b>	0	0	0	0	0	3,3	6,6	23,3	63,3	70,0	0,21 b
<b>Galhos</b>	0	0	3,3	6,6	13,3	16,6	33,3	53,3	70,0	80,0	0,35 a
<b>Sementes</b>	0	0	0	3,3	10,0	16,6	23,3	43,3	73,3	86,6	0,32 ab

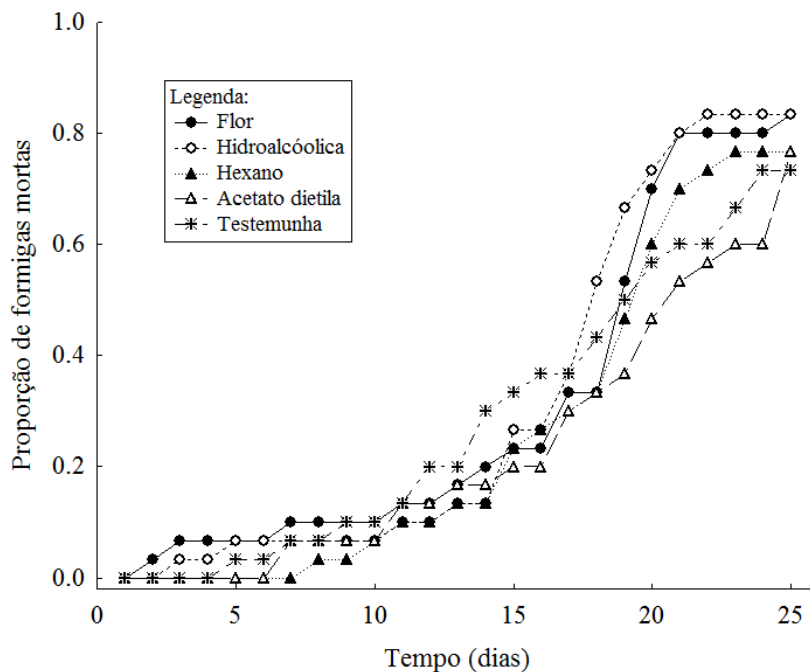
\*Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. [ ] = 2 mg/mL

No experimento houve um aumento sucessivo da mortalidade acumulada, em porcentagem por dia, durante o decorrer do tempo de experimento, destacando-se a grande mortalidade observada do 17º para o 21º dia de experimento. No entanto, apenas o extrato etanólico dos galhos apresentou diferença significativa em relação ao controle em termos de potencial tóxico às operárias de *Atta laevigata*. Observou-se para este extrato uma

mortalidade de 53% até o 17º dia, mas chegando em apenas 80% de formigas mortas ao final dos 25 dias de experimento. Uma diminuição significativa em seu potencial inseticida, quase semelhante ao apresentado pelo controle (73,3%) no final do experimento. No final do período dos experimentos, os extratos das folhas, flores e sementes apresentaram 83,3%, 70,0% e 80,0% de mortalidade, respectivamente, resultados semelhantes com o controle da dieta pura (73,3%), mostrando um baixo potencial tóxico às operárias de *Atta laevigata*. Vale destacar que em nenhum dos tratamentos a mortalidade chegou a 100% de formigas mortas.

As frações obtidas por partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico das flores também foram avaliadas frente às operárias de *Atta laevigata*. Foram ensaiadas as frações em hexano, acetato de etila e hidroalcoólica (metanol/água). Os resultados obtidos estão representados na (FIGURA 4.31, p. 101) e (Tabela 4.11, p. 102).

**FIGURA 4.31** - Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta laevigata* frente aos ensaios por ingestão das frações do extrato etanólico das flores de *E. dysenterica*.



**TABELA 4.11** - Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta laevigata* frente ao ensaio por ingestão com as frações provenientes do extrato etanólico das flores de *E. dysenterica*.

Tratamento	Mortalidade acumulada (%) por dia										
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	Md*
<b>Controle Negativo</b>	0	0	0	3,3	6,6	10,0	33,3	36,6	60,0	73,3	0,29 ab
<b>Extrato bruto Flor</b>	0	3,3	6,6	6,6	10,0	10,0	20,0	33,3	80,0	83,3	0,31 ab
<b>Hexano</b>	0	0	0	0	3,3	6,6	13,3	30,0	70,0	76,6	0,26 a
<b>Acetato de Etila</b>	0	0	0	0	6,6	6,6	16,6	30	53,3	76,6	0,23 a
<b>Hidroalcolico</b>	0	0	3,3	6,6	6,6	10	13,3	36,6	80	83,3	0,32 a

\*Letras distintas em relação ao controle indicam diferença significativa de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. [ ] = 1 mg/mL

Analisando os resultados obtidos, observou-se que nenhuma das frações mostrou ter atividade inseticida significativa frente as formigas cortadeiras de acordo com os dados estatísticos. Esses dados indicam que pode ter havido sinergismo para a atividade apresentada no extrato das flores, uma vez que o extrato apresentou mesmo que com baixa atividade, uma maior eficiência quando comparada com as frações analisadas.

#### 4.8.2. Avaliação do efeito alelopático

Foram feitos os ensaios de germinação das sementes utilizando os extratos etanólicos das folhas, flores, sementes e galhos de *E. dysenterica* frente às espécies alface, serralhinha e picão preto.

De acordo com os resultados dos experimentos realizados, observou-se que todos os diferentes extratos da *E. dysenterica* provocaram inibição da germinação das sementes avaliadas. Os extratos das flores e folhas, foram os que apresentaram os maiores valores de inibição (FIGURA 4.32, p. 105). Nestes ensaios menos de 10% das sementes avaliadas na concentração mais baixa (0,001 mg/mL) foram germinadas e nas demais concentrações o potencial de germinação foi menor que 5% para os extratos das flores e das folhas, confirmando assim um alto potencial inibitório para estas partes da planta.

Para os extratos dos galhos e sementes (FIGURA 4.33, p. 106), os resultados não foram muito expressivos, uma vez que a inibição de germinação foi diretamente proporcional ao aumento da concentração dos extratos, sendo os resultados positivos apenas a altas concentrações.

O extrato etanólico da semente provocou atraso na germinação da serralhinha e do picão preto na concentração 0,025 g/mL, que pode ser visualizado nas alterações das curvas de germinação e no tempo médio de germinação.

Nenhuma das espécies invasoras mostrou ser muito resistente quando exposta a ação dos compostos presentes nos extratos etanólicos de *E. dysenterica*, sendo que na concentração de 0,1 e 0,075 g/mL ocorreu inibição total das espécies avaliadas.

Segundo Einhellig (1999), os efeitos alelopáticos são oriundos de diferentes substâncias atuando em conjunto, visto que os aleloquímicos são encontrados em concentrações baixas no meio ambiente. Os extratos etanólicos são misturas que podem conter substâncias de várias classes de metabólitos como alcaloides, terpenoides, fenólicos e aminoácidos não protéicos, dentre outros, que apresentam efeitos complexos nas espécies avaliadas, ainda não elucidados completamente. Salientando ainda que resultados positivos em laboratório para alelopatia, podem não se repetir em condições naturais, devido à ocorrência de diferentes fatores abióticos e bióticos que podem influenciar esse fenômeno.

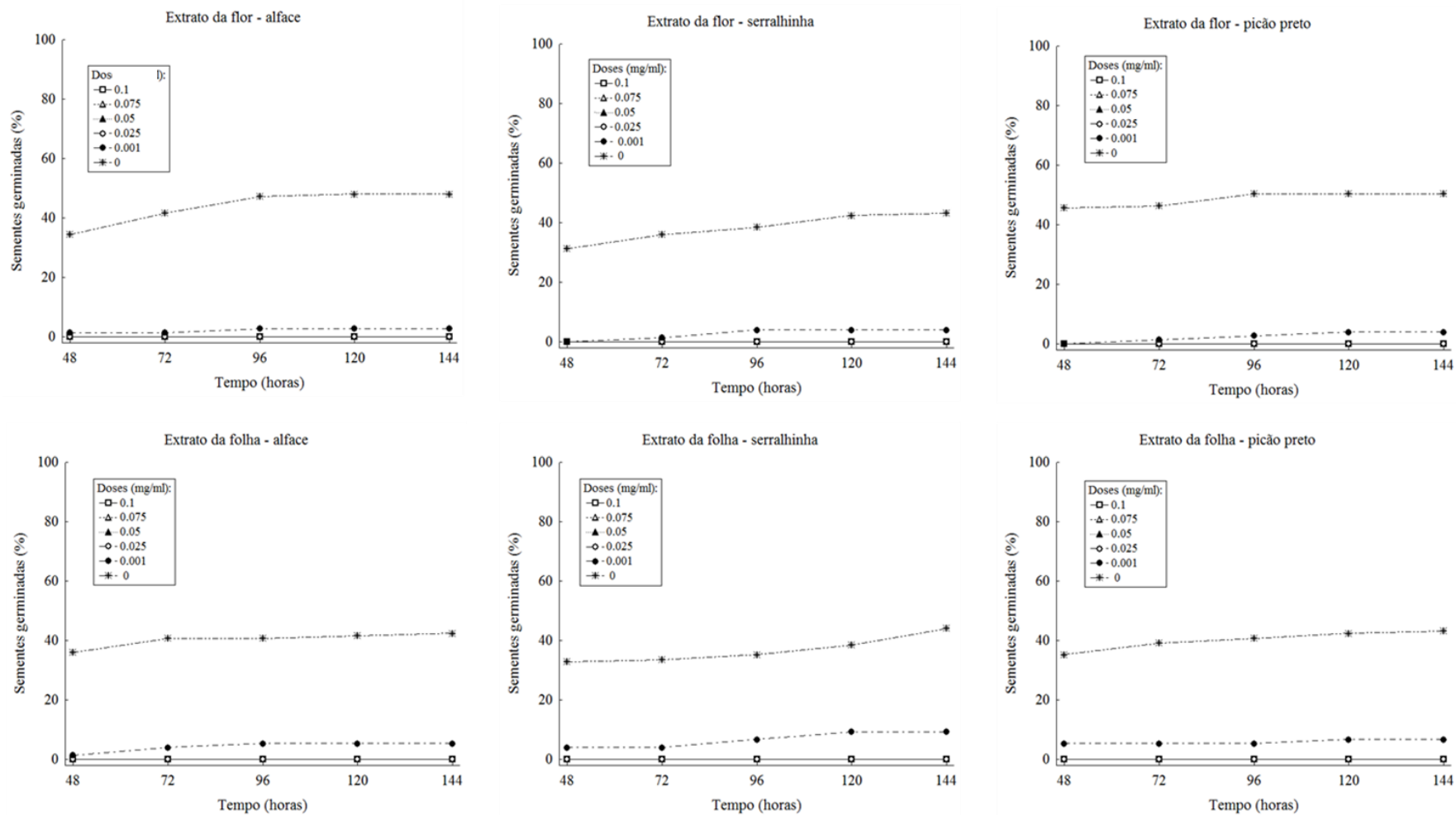
Muitas das substâncias envolvidas na alelopatia são metabólitos secundários que tem origem na via do ácido chiquímico a qual origina os flavonoides (ELLIOTT & CHENG, 1987; EINHELLIG, 1995). Estes compostos possuem um papel importante nas plantas que inclui diminuição da entrada de oxigênio nas mitocôndrias e, nos cloroplastos, eficiência do fotossistema II e redução no transporte de elétrons (MORELAND et al., 1998). Os flavonoides também agem como compostos de defesa e sinalizadores nos processos de reprodução, simbiose e patogênese nas plantas. Já no ambiente, tem efeito nas interações planta-planta, planta-microrganismo e na composição química do solo (RICE, 1984; SHIRLEY 1996). Diversos autores argumentam que o arranjo estrutural dos flavonoides é provavelmente o responsável pela atividade

alelopática e esse arranjo está relacionado com a fitotoxicidade destes compostos (MACIAS et al., 1997; BENINGER et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006).

Sendo assim, os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides identificados nas flores de *E. dysenterica* podem explicar os efeitos inibidores na germinação, uma vez que derivados fenólicos possuem efeitos inibitórios relatados (SANTOS et al., 2011). Esses compostos também estão presentes nas folhas, e em menores concentrações nos galhos e sementes, como pode ser visto nos espectros de RMN <sup>1</sup>H (FIGURA 4.3, p.39). Contudo, é importante salientar que novos experimentos devem ser realizados para comprovar que essas substância são os responsáveis pelo potencial inibitório observado.

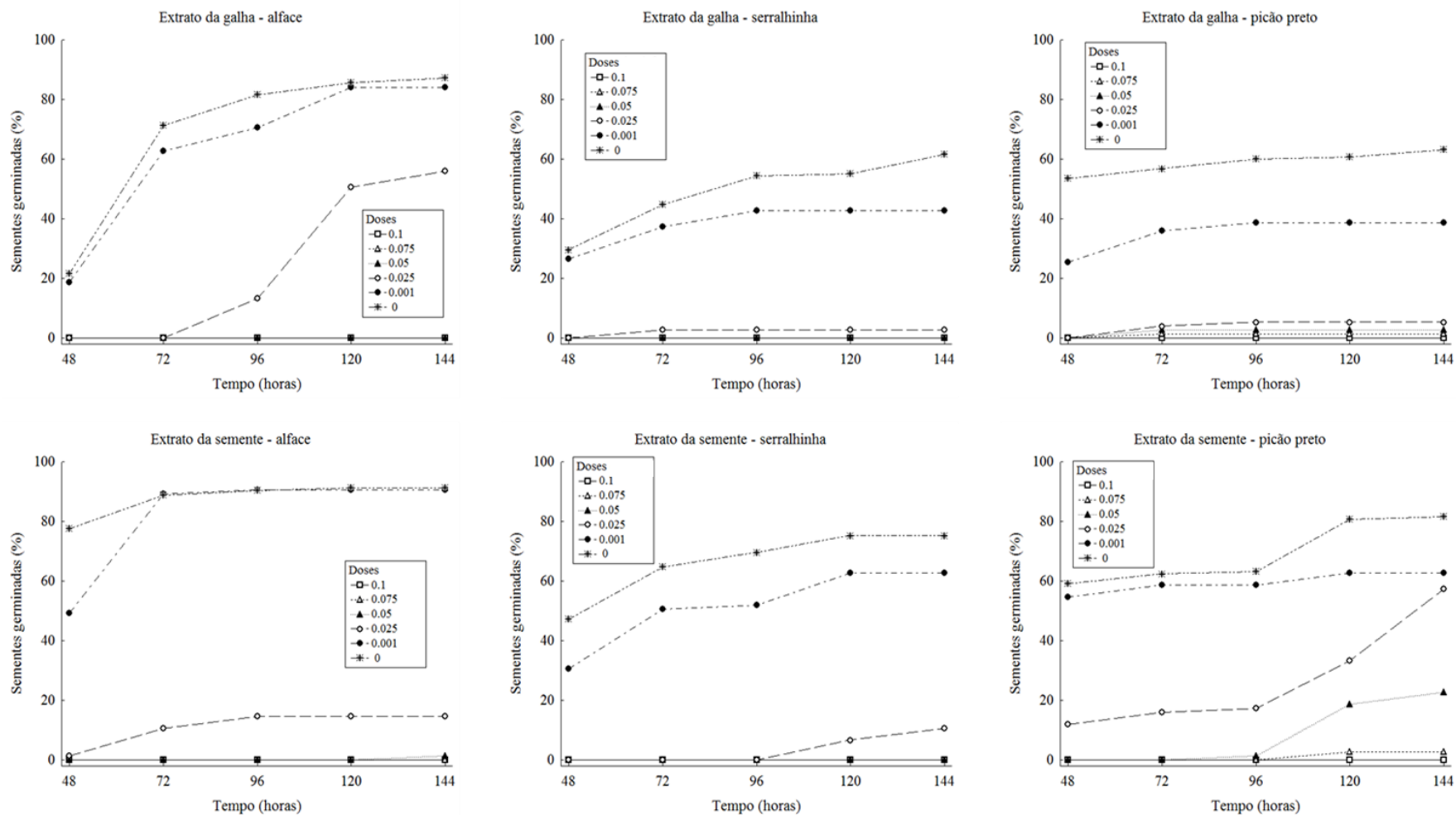
Pode-se concluir que *E. dysenterica* sugere um potencial alelopático. Uma conclusão definitiva de que esta espécie seja um alelopático em condições naturais está associada a uma investigação mais ampla e profunda, que inclui outras abordagens experimentais, principalmente testes em campo.

**FIGURA 4.32** - Potencial de inibição dos extratos etanólicos das folhas e flores de *E. dysenterica* sobre a germinação das sementes de alface, serralhinha e picão preto. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha com água destilada.



Concentrações (0,100; 0,075; 0,050; 0,025; 0,001 e 0 g/mL)

**FIGURA 4.33** - Potencial de inibição dos extratos etanólicos dos galhos e sementes de *E. dysenterica* sobre a germinação das sementes de alface, serralhinha e picão preto. Dados expressos em percentual de germinação em relação ao tratamento testemunha com água destilada.



Concentrações (0,100; 0,075; 0,050; 0,025; 0,001 e 0 g/mL)

## 5. CONCLUSÕES

O estudo químico da fração em acetato de etila do extrato etanólico das flores de *E. dysenterica* levou ao isolamento e à elucidação estrutural de sete substâncias, ácido gálico e cinco flavonoides: quercetina, miricetina, kaempferol, (-)-epicatequina e juglanina, todos já relatados para esta espécie ou gênero. Além disso, foi possível isolar e identificar o galato de etila, nunca relatado para o gênero, mas que muito provavelmente trata-se de um artefato.

Os ensaios inseticidas realizados com os extratos etanólicos brutos das folhas, flores, galhos e sementes, assim como as frações oriundas dos extratos das flores frente as operárias de *Atta laevigatta*, não apresentaram resultados significativos. No entanto, é importante ressaltar que não há relatos na literatura de ensaios realizada com esta espécie frente *Atta laevigatta*, reforçando assim a importância do estudo realizado.

Já os ensaios alelopáticos realizados com os extratos etanólicos brutos das folhas, flores, galhos e sementes forneceram resultados satisfatórios, sendo um dado importante no que tange a busca de compostos naturais que forneçam novas perspectivas no desenvolvimento de herbicidas naturais, menos prejudiciais ao meio ambiente e aos mamíferos. Os extratos das flores e folhas apresentaram maior potencial de inibição de germinação, tornando evidente a necessidade de realizar mais estudos para compreender melhor este fenômeno em condições naturais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. "Active antifungal substances from natural sources". ARKIVOC: Journal and online education in chemistry. v.2, p.116–145, 2007.

ALMEIDA, R.N.A.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; SIMOTE, S.Y.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. & SILVA, M.F.G.F. "Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* RE Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Moller". Bio. Assay. v. 2, p. 1-8, 2007.

ALMEIDA, L. F. R. Composição Química e Atividade Alelopática de Extratos Foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae). Botucatu, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UNESP, 2006. Tese Doutorado, 105 p.

ANAYA, A. L. "Allelopathy as a Tool in the Management of Biotic Resources in Agroecosystems". Critical Reviews in Plant Sciences. 18(6): p. 697-739, 1999.

ASFAW, N.; STORESUND, H.J.; SKATTEBOL, L.; AASEM, A.J. "Coexistence of chrysanthenone, filifolone and (Z)-isogeranic acid in hydrodistillates. Artifacts". Phytochemistry. v.58, p.489-492, 2001.

BARBOSA-FILHO, J.M.; MARTINS, V.K.M.; RABELO, L.A.; MOURA, M.D.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; ALMEIDA, R.N.; MEDEIROS, I.A. "Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000". Rev Bras Farmacogn. V. 16: p. 421-446. 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. "Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos". Quím. Nova. Vol. 32, n.3, p. 679-688, 2009.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. "A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORNFAR)". Revista Química Nova. v.28, p. 56 - 63, 2005.

BATALHÃO, J. R. Estudo fitoquímico de *Eugenia myrcianthes* – Busca de substâncias bioativas. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2014. Tese Doutorado, 167 p.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. "Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas". Alim. Nutr., v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BENINGER, C.W.; HALL, J.C. "Allelopathic activity of luteolin 7-O-B-glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L". Biochemical Systematics and Ecology, v.33, p.103–111, 2005.

BERTI FILHO, E.; MARCHINI, L. C & NAKANO, O. "Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura". IN: Formigas Cortadeiras e Cupins. Piracicaba, FEALQ. p. 631-671, 1992.

BEUCHLE, R.; GRECCHI, R. C.; SHIMABUKURO, Y. E.; SELIGER, R.; EVA, H. D.; SANO, E.; ACHARD, F. "Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach". Applied Geography, v. 58, n.1, p. 116-127, 2015.

BEZERRA JCB, SILVA IA, FERREIRA HD, FERRI PH, SANTOS SC. "Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants". Fitoterapia. 73(5): p. 428-433, 2002.

BHADORIA, P.B.S. "Allelopathy: a natural way towards weed management". Am. J. Exp. Agric. 1(1): p. 7-20, 2011.

BICALHO, K. U. Estudo fitoquímico de *Virola sebifera* Associado ao controle de formigas cortadeiras. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2011. Dissertação Mestrado, 168 f.

BOARETTO, M.A.C. & FORTI, L.C. "Perspectivas no controle de formigas cortadeiras". Série Técnica IPEF, 11: p. 31-46, 1997.

BOULOGNE, I.; PETIT, P.; OZIER-LAFONTAINE, H.; DESFONTAINES, L.; LORANGER-MERCIRIS, G. "Inseticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review". Environ. Chem. Lett., 10: 325-347, 2012.

BRITTON, R.; ROBERGE, M.; BERISCH, H.; ANDERSON, R. "Antimitotic diterpenoids from *Erythropodium caribaceorum*: isolation artifacts and putative biosynthetic intermediates". Tetrahedron Letters, v.42, p.2953-2956, 2001.

BUENO, O.C.; MORINI, M.S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A.; SILVA, O.A. "Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) Isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais". An. Soc. Entomol. Bras. 26: 107-113, 1997.

CANTANHEDE FILHO, A.J.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.S.P.; ZOGHBI, M.G.B.; PORTS, P.S.; RODRIGUES, I.C.S.; "Triterpenoides, fenólicos e efeito fitotóxico das folhas de *Eugenia flavescens* DC (Myrtaceae)". Quim. Nova, Vol. 40, No. 3, 252-259, 2017.

CARVALHO, L.M.J.; RIBEIRO, E.M.G.; MOURA, M.R.L.; MOTTA, E.L.D.; VIANA, D.S.; BARBI, N. "Antioxidant activity and polyphenols in cagaita (*Eugenia dysenterica*, D.C.) whole pulp 5th International Technical Symposium on Food Processing, Monitoring Technology in Bioprocesses and Food Quality Management". Potsdam. p. 959-63, 2009.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B. D.; OLIVEIRA, P. D. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A. D.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. D. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. D. "Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral

activity against rotavirus”. Journal of ethnopharmacology, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

CHAVES, L. J. Melhoria e Conservação de Espécies Frutíferas do Cerrado. disponível em: <<http://www.sbmp.org.br/cbmp.2001/palestras/palestra.htm>>. Acesso em: 15 Setembro. 2016.

CHANG, S. W.; KIM, K. H.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. “Phytochemical Constituents of *Geranium eriostemon*”. Natural Product Sciences. v. 15, n. 3, p. 151-155, 2009.

COLE, R.A.; BANSAL, A.; MORIARTY, D.M.; HABER, W.A.; SETZER, W.N.; “Chemical composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Eugenia zuchowskiae* from Monteverde, Costa Rica”. Journal of Natural Medicines. Vol, 61, p. 414-417, 2007.

COLLA, A. R. S.; MACHADO, D. G.; BETTIO, L. E. B.; COLLA, G.; MAGINA, M. D. A.; BRIGHENTE, I. M. C. & RODRIGUES, A. L. S. “Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice”. J. Ethnopharmacol, p. 143-720, 2012.

CORRÊA, A.G.; VIEIRA, P.C. Produtos Naturais no Controle de Insetos. 2a ed. São Carlos: EdUFSCar, 2007. 150 p.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. L.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H.; SILVA, M. D. R. R. “Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil”. Journal of Ethnopharmacology, v. 72, n. 1, p. 111-117, 2000.

CRUZ, M. P. Isolamento e Identificação de Compostos Bioativos de *Mimosa hostilis* BENTH. Bahia, Programa de Pós-Graduação em Química – UFBA, 2013. Tese Doutorado, 202 f.

DA SILVA, A. L. G.; PINHEIRO, M. C. B. “Biologia floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae)”. Acta Bot Bras, v. 21, p. 235-247, 2007.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. “Métodos atuais de controle e perspectivas”. In: As formigas cortadeiras. DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 163-176.

DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.; WONG, G.; NEWMARK, H. “Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia”. Carcinogenesis, London, v. 7, p. 1193-1196, 1991.

DEWICK, P.M. “Medicinal natural products: a biosynthetic approach”. New York: JOHN Wiley & Sons, 3º ed., 2009, 539 p.

DUBOC, E.; GUERRINI, I. A. Desenvolvimento Inicial e Nutrição da Cagaita em Áreas de Cerrado Degradado. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 182, Embrapa. ISSN 1676-918X. Planaltina - DF, junho 2007.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. "Anthocyanin antioxidants from edible fruits". Food chemistry, v.84, p.23-28, 2004.

EINHELLIG, F.A. "Allelopathy: Current Status and Future Goals". Acs Symposium Series, v. 582, p.1-24, 1995.

EINHELLIG, F.A.; DAKSHINI, K.M.M. "Foy An integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderjit". Principles and Practices in Plant Ecology. p. 479-494, 1999.

ELLIOTT, L.F.; CHENG, H.H. "Assessment of allelopathy among microbes and plants". ACS Symposium Series, v.330, p.504-515, 1987.

FEBVAY, G. & KERMARREC, A. "Activites enzymatiques des glandes salivaires etle tinteintin moyen dune fourmi Attine (aductes et larves): *Acromyrmex octospinosus* (Formicidae, Attini)". Arch. Biol., 92:299-316, 1981.

FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; CORREA, A.G.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. "O futuro dos produtos naturais no controle de formigas". Biológico, São Paulo, 69: 221-224, 2007.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. "Alelopatia: Uma área emergente da ecofisiologia". Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.12 (ed. Esp.), p.175-204, 2000.

FONSECA, R.C.; SOUZA, N.A.; CORREA, T.C.L.; GARCIA, L.F.; REIS, L.G.V.; RODRIGUEZ, A.G. "Assessment of toxic potential of Cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay". Food Sci Technol. 33 (2): 251-6, 2013.

FONSECA, A.P.N.D.; SILVA, G.D.F.; CARVALHO, J.J.; SALAZAR, G.D.C.M. & DUARTE, L.P. "Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinoceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto". Quim. Nova, 30: 842, 2007.

FORMAGIO, A.S.N.; MASETTO, T.E.; BALDIVIA, D.S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H.; PEREIRA, Z.V. "Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae". R. bras. Bioc., Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 349-354, 2010.

FRANCO, A.A.; PERES, A.R.; SOUZA, M.F.P.; QUEIROZ, M.S.; ASSIS, J.M.F. "Ação de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fungos simbiotes das formigas cortadeiras". Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal, v. 10, n. 1, p. 103-113, 2013.

FRANZON, R. C.; Espécies de araçás nativos merecem maior atenção da pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. Disponível em:

<<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/133/>>. Acesso em: 15 de Outubro de 2016.

GIMENES, L. Estudo fitoquímico de *Annona sylvatica* (ANNONACEAE). Avaliação das atividades inseticida e fungicida frente as formigas cortadeiras e seu fungo simbionte e ao gorgulho do milho. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2013. Tese Doutorado, 208 f.

GILIOLI, A. Análise fitoquímica e atividade biológica de *Eugenia umbeliflora*. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSC, 2010. Dissertação de mestrado, 103 f.

GRANGEIRO, M.S.; LIMA-CALHEIROS, A.P.; MARTINS, M.F.; ARRUDA, L.F.; CARMO, L.G.; SANTOS, W.C. “Pharmacological effects of *Eugenia puniceifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission”. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 108, Issue 1, Pag. 26-30, 2006.

GUIMARÃES, L. D.; SILVA, M.A.D.; ANACLETO, T. C. “Natureza Viva Cerrado. Caracterização e Conservação”. Goiânia. Ed. UCG, p. 21-44, 2006.

GU, J.Q.; PARK, E.J.; LUYENGI, L.; HAWTHORNE, M.E.; MEHTA, R.G.; FARNSWORTH, N.R.; PEZZUTO, J.M. & KINGHORN, A.D. “Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential câncer chemopreventive activity”. Phytochem., 58: 121, 2001.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. “Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands”. Nutr. Cancer, v.20, n.1, p.21-29, 1993.

HICHIRI, I.; BARRIEU, F.; BOGS, J.; KAPPEL, C.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. “Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway”. J. Exp. Bot., 2465-2483, 2011.

HIDALGO, M.; SANCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. “Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity”. Food Chem., 121: 691-696, 2010.

HOLLOBLER, B.; WILSON, E. O. “The Ants”. Cambridge: Harvard University Press, 1990.

HU, Y.C.; LUO, Y.D.; LI, L.; JOSHI, M.K. & LU, Y.H. “*In Vitro* Investigation of 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone for Glycemic Control”. J.Agric. Food Chem., v. 60: n.10683, 2012.

HUSSEIN, S.A.M.; HASHEM, A.N.M.; SELIEM, M.A.; LINDEQUIST, U.; NAWWAR, M.A.M. “Polyoxygenated flavonoids from *Eugenia edulis*”. Phytochemistry, v. 64, p. 883- 889, 2003.

IMATOMI, M.; NOVAES, P.; GUALTIERI, S.C.J.; "Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae". Acta Bot. Bras., v.27: n.1, p.54-61, 2013.

INDERJIT. "Plant phenolics in allelopathy". Boanical Review, v.62, p.182-202, 1996.

INDERJIT; NILSEN, E.T. "Biossays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: Progress and problems". Critical Reviews in Plant Sciences, v.22, p.221-238, 2003.

ISHIKAWA, T.; DANATINI, R.S.; DIAZ, I.E.C.; YOSHIDA, M.; BACCHI, E.M. & KATO, E.T.M. "Evaluation of gastroprotective activity of *Pliniaedulis* (Vell.)Sobral (Myrtaceae) leaves in rats". J. Ethnopharmacol, p.118-527, 2008.

ISIDORO, M.M.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C.; ARRUDA, A.C. & SILVA, S.C. "Fitoquímica e Quimiosistemática de *Euxylophora paraensis* (Rutaceae)". Quim. Nova, 35: 2119, 2012.

ISMAN, M. B. "The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world". Annual Review Entomology, v. 51, n. 1, p. 45-66, 2006.

JACCOUD, D.A.B. "Formigas cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas". Ed. IBAMA, 56 p., 2000.

JORGE, N.; MORENO, D. M.; BERTANHA, B. J.; "*Eugenia dysenterica* dc: actividad antioxidante, perfil de ácidos grasos y determinación de tocoferoles". Rev Chil Nutr., Vol. 37, N°2, págs: 208-214, 2010.

JUNG, P.H.; SILVEIRA, A.C.; NIERI, E.M.; POTRICH, M.; SILVA, E.R.L.; REFATTI, M. "Atividade inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith". Floresta e Ambiente. 20(2):191-196, 2013.

KALEGARI, M.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J.; LORDELLO, A. L.; LIMA, C. P.; MIYAZAKI, C. M.; ZANIN, S. M.; VERDAM, M. C.; MIGUEL, O. "Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch.(Connaraceae)". Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KNEKT, P.; ISOTUPA, S.; RISSANEN, H.; HELIOVAARA, M.; JARVINEN, R.; HAKKINEN, S.; AROMAA, A.; REUNANEN. A. "Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease". Eur. J. Clin. Nutr., v.54, p. 415-417, 2000.

KUSKOSKI, E.M.; VEGA, J.M.; RIOS, J.J.; FETT, R.; TRONCOSO, A.M.; ASUERO, A.G. "Characterization of anthocyanins from the fruits of baguaçu (*Eugenia umbelliflora* Berg)". Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.51, p. 5450-5454, 2003.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIN, M. A.; MARTINS, R. C. C.; BAROLI, A. A.; CARVALHO, B. A.; SOARES, M. G.; dos SANTOS, R. T.; SARTORELLI, P. "Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae — *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel". *Molecules*, v; 16, n. 9827, 2011.

LEITE, A. C. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (MELIACEAE). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2005. Tese Doutorado, 142 f.

LÔBO, L. T.; CASTRO, K. C. F.; ARRUDA, M. S.; SILVA, ARRUDA, A. C.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, A. S. & FILHO, A. P. S. S. "Potencial alelopático de catequinas de *Tachigali myrmecophyla* (Leguminosae)". *Quím. Nova*, 31: 493-497, 2008.

LOPES, E.L.; NETO, M.A.; SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. & BRAZ-FILHO, R. "Flavonoides e Sesquiterpenos de *Croton pedicellatus* Kunth". *Quim. Nova*, 35: 2169, 2012.

LOWRY, J.B. "Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families". *Phytochemistry*, 15: 513, 1976.

MACIAS, F.A. et al. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*, v.45, p.683-687, 1997.

MAGINA, M. D. A. Estudo Fitoquímico e Biológico de Espécies do Gênero *Eugenia*. Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Química-UFSC, 2008. Tese Doutorado, 199f.

MAGINA, M.D.A.; DALMARCO, E.M.; DALMARCO, J.B.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. "Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*". *Química Nova*, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1184-1188, 2012.

MALHEIROS A.; PERES M. T.L.P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In: YNES, R. A., CALIXTO, J. B. "Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna". Chapecó: Argos. p. 503-523, 2001.

MMA – Ministério do Meio Ambiente/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, O Bioma Cerrado, 2016. <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 01 de Novembro 2016.

MANAHARAN, T.; MING, C.H. & PALANISAMY, U.D. "Syzygium aqueum leaf extract and its bioactive compounds enhances pre-adipocyte differentiation and 2-NBDG uptake in 3T3-L1 cells". *Food Chem.*, 136: 354, 2013.

MARASCHIM-SILVA, F.; AQUILA, M.E.A. "Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae)". *Acta bot. bras.* 20(1): 61-69. 2006.

MARTINOTTO, C.; PAIVA, R.; SOARES, F.P.; SANTOS, B.R.; NOGUEIRA, R.C. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.). Lavras-MG: Universidade Federal de Lavras; 2008. 1-21 p.

MARINHO, C. G. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. “Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras”. Bahia Agric., 7: 18-21, 2006.

MARICONI, F. A. M. As saúvas: insetos daninhos as plantas cultivadas, 3º Ed., São Paulo. Livraria Nobel, 1974. 251p.

MAZUTI SILVA, S. M.; GASCA SILVA, C. A.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHAES, P. O.; SILVEIRA, D.; “*Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC. (cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico”. Infarma Ciências Farmacêuticas. Vol 27. Ed.1, p 49-95, 2015.

MEDEIROS, J. D. Guia de Campo: Vegetação do Cerrado 500 espécies. MMA/SBF. Brasília. 2011. 532 p.

MEHDIABADI, N.J. & SCHULTZ, T.R. “Natural history and phylogeny of the fungus-framing ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicina: Attini)”. Myrmecol. News, 13: 37-55, 2009.

MIYASHIRA, C.H.; TANIGUSHI, D.G.; GUGLIOTTA, A.M.; SANTOS, D.Y.A.C. “Influence of caffeine on the survival of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* and *in vitro* growth of their mutualistic fungus”. Pest. Manag. Sci., 68: 935-940, 2012.

MORELAND, D.E.; NOVITZKY, W.P. “Interference by flavone and flavonols with chloroplast-mediated electron transport and phosphorylation”. Phytochemistry, v.27, p.3359-3366, 1988.

MORESCO, H.H.; COLLA, G.; CAVALCANTE, I.D.; QUEIROZ, G.S.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. “Chemical constituents of *Eugenia catharinae* and their antioxidant activity”. Natura Product Research. 30, 22., 2624-2628, 2016.

MOURA, A.C.S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. “Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (Fabaceae) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antiradicalar”. Quim. Nova, 34, 7, 2011.

MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D.C.; DAVIDSON, E.A. “Influence of leaf-cutting ant nest on secondary forest growth and soil properties in Amazônia”. Ecology, 84: 1265-1276, 2003.

NASCIMENTO, G. C.; Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antitumoral e Citotoxicidade *In Vitro* de *Erythroxylum Deciduum* (ERYTHROXYLACEAE). Anápolis, Programa de Mestrado em Ciências Moleculares – UEG, 2008. Dissertação de mestrado, 72 f.

NASCIMENTO, M.N.G. Estudo Químico de *Erythroxylum Suberosum* (ERYTHROXYLACEAE) Frente às Catepsinas K, L e V. Catalão, Programa de Mestrado em Química – UFG, 2014. Dissertação de Mestrado, 122f.

NAVES, R. V.; ALMEIDA NETO, J. X.; ROCHA, M. R. “Determinação de características físicas em frutos e teor de nutrientes em folhas e no solo, de três espécies frutíferas de Ocorrência Natural nos Cerrados de Goiás”. Anais da Escola de Agronomia e Veterinária, Goiânia, v.25, p. 99-106, 1995.

NEGI, A.S., DAROKAR, M.P., CHATTOPADHYAY, S.K.; GARG, A.; BHATTACHARYA, A.K.; SRIVASTAVA, V.; KHANUJA, S.P.S. “Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid”. Bioorg Med Chem Lett 15: 1243-1247. 2005.

NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. “Evolutionary aspects of antifungus interactions in leaf-cutting ants”. Trends Ecol., 12: 386-389, 1997.

NUNES, X.P.; MESQUITA, R.F.; SILVA, D.A.; LIRA, D.P.; COSTA, V.C.O.; SILVA, M.V.B.; XAVIER, A.L.; DINIZ, M.F.F.M.; AGRA, M.F. “Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae)”. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18: 718-723, 2008.

OLIVEIRA, A. M. D.; HUMBERTO, M. M. D. S.; SILVA, J. M. D.; ROCHA, R. D. F. D. A.; SANT'ANA, A. E. G. “Phytochemical studies of the extracts of stem bark and leaves of *Eugenia malaccensis* L.(Myrtaceae) and evaluation of their molluscicidal and larvicidal activities”. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n., p. 618-624, 2006.

OLIVEIRA, M.; PANTOJA, L.; DUARTE, W.; COLLELA, C.; VALARELLI, L.; SCHWAN, R.; DIAS, D. “Fruit wine produced from cagaita *Eugenia dysenterica* DC. by both free and immobilised yeast cell fermentation”. Food Research International, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M. & KRIZ, G. S. Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 3a ed. Melbourne: Thomson Learning, 2001. 579 p.

PAWAR, V.C.; THAKER, V.S. “*In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*”. Mycoses, v.49, p.316-323, 2006.

PEPATO, M.T.; MORI, D.M.; BAVIERA, A.M.; HARAMI, J.B.; VENDRAMINI, R. C. & BRUNETTI, I.L. “Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabetes”. J. Ethnopharmacol., 96: 43, 2005.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Disponível no site: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp>>. Acesso em: 18 de Agosto de 2016.

PETERNELLI, E.F.O.; DELLA-LUCIA, T.M.C.; MARTINS, S.V. “Espécies de formigas que interagem com as sementes de *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae)”. Rev. Árvore, 28: 733-738, 2004.

PETERNELLI, E.F.O.; BARBOSA, L.C.A.; DELLA-LUCIA, T.M.C. “Isolation of compounds attractive to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) from *Mabea fistulifer* ELAIOSOME”. Quím. Nova, 31: 475-478. 2008.

PIETTA, P.G.; SIMONETTI, P. “Antioxidant Food Supplements in Human Health”. San Diego: Academic Press, 1999, p.283-308.

PINTEREST, exploração de frutas brasileiras. Disponível em: <<https://br.pinterest.com/pin/534732155741747231/>>. Acessado em 10 Agosto de 2017.

QI, L.W.; LIU, E.H.; CHU, C.; PENG, Y.B.; CAI, H.X. & LI, P. “Anti-Diabetic Agents from Natural Products—An Update from 2004 to 2009”. Curr. Top. Med. Chem., 10: 434, 2010.

RATES, S. M. K. “Plants as source of drugs”. Toxicon, n. 39, p.603-613, 2001.

REIS FILHO, W.; IEDE, E.T.; NICHELE, M.A.; CALDATO, M.; FERREIRA, A.C. “Reconhecimento dos danos causados por formigas cortadeiras no gênero *Acromyrmex* em plantios iniciais de *Pinus taeda* no Sul do Brasil”. Comunicado Técnico 189 – Embrapa, p 1-4, 2007.

RICE, E. L. Allelopathy. 2. ed. New York: Academic, 1984, 422 p.

RICHARD, F. J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. “Digestive capacities of leaf-cutting ants and the contribution of theirs fungal cultivar to the degradation of plant material”. J. Comp. Physiol. B., 175: 297-303, 2005.

RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. “Exploration of allelochemicals in improving crop productivity. In: RIZVI, S.J.H.; RIZVI, V. (Eds.). Allelopathy: Basic end applied aspects”. London: Chapman & Hall, p.443-472, 1992.

ROHDIANA, D.; SUGANDA, A.G.; WIRASUTISNA, K.R.; IWO, M.I. “Isolation of xanthine oxidase inhibitor compounds of pekoe fanning black tea and their activity on interferon- $\gamma$  production *in vivo*”. International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences., 5(4), 239-242. 2014.

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. “Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity *in vitro*”. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010.

ROSSI, M.H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J.G.S. “Neolignans, Styrylpyrones and Flavonoids from na *Aniba* Species”. Phytochemistry. (6): 1263-1269, 1997.

SANTOS, S. I. MORAES, M. L. L.; REZENDE, M. O. O.; SOUZA FILHO, A. P. S. "Potencial alelopático e identificação de compostos secundários em extratos de calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) utilizando eletroforese capilar". *Ecletica Quim.*, p. 36-51, 2011.

SANTOS, M.H.F. Estudo químico e avaliação biológica das espécies *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (MALPIGHIACEAE) e *Eugenia malaccensis* L. (MYRTACEAE). Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal de Goiás, 2013. Dissertação de mestrado, 87p.

SHIRLEY, B.W. "Flavonoid biosynthesis: new functions for an old pathway". *Trends Plant Science*, v.31, p.377-382, 1996.

SINNOTT, M.L. *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry Structure and Mechanism*. 3a ed. Editora WILEY-VCH. Weinheim. 2007. 51p.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. "Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management". *Review Plant Science*, v.22, p.239–311, 2003.

SINGH, J.; BAGHOTIA, A. & GOEL, S.P. "*Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review". *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.*, 3: 1469, 2012.

SILVA, M.A.B.; MELO, L.V.L.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, J.P.M.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; "Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil". *Ver. Bras. Farmacol.*; 20(4):549-562. 2010.

SILVA, C.A.G. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Eugenia dysenterica* Mart. Ex. DC. Berg (Myrtaceae). Brasília, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - Universidade de Brasília, 2016. Dissertação de Mestrado, 128f.

SILVA, D.A.; COSTA, D.A.; SILVA, D.F.; SOUZA, M.F.V.; AGRA, M.F.; MEDEIROS, I.A.; BARBOSA-FILHO, J.M. & BRAZ-FILHO, R. "Flavonoides glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizichy (Malvaceae) e testes farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-O-a-L-ramnopiranosideo". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 15: 23, 2005.

SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. "Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources". *J.Insect Physiol.*, 49: 307-313, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. & KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7a ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. Myrtaceae: lista de espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2014.

SOUZA, P. M.; ELIAS, S. T.; SIMEONI, L. A.; DE PAULA, J. E.; GOMES, S. M.; GUERRA, E. N.; FONSECA, Y. M.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHAES, P. O. "Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity". PLoS One, v. 7, n. 11, p. 485-489, 2012.

SOUZA FILHO, A.P.S.; SANTOS, R.A.; SANTOS, L.S.; GUILHON, G.M.P.; SANTOS, A.S.; ARRUDA, M.S.P.; MULLER, A.H.; ARRUDA, A.C. "Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*". Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 24, n. 4, p. 649-656, 2006.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. "Essential oils from neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties". Chemistry & Biodiversity, v.8, n.1, p.73-94, 2011.

VIEIRA, P.M.; VERONEZI, E.; SILVA, C.R.; CHEN-CHEN, L. "Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae) in mice". J. Med. Food. 15(6):563-7, 2012.

VITEK, R.; NOVAIS, L.M.R.; TORQUATO, H.F.V.; GAMERO, P.; CARVALHO, M.G.; SOUSA JR, P.T.; JACINTO, M.J.; SILVA, V.C. "Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*". Natural Product Research, p. 1-5, 2016.

VUKICS, V. & GUTTMAN, A. "Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry". Mass Spectr., 29: 1-6, 2010.

WEBER, N.A. "Gardening ants: the Attines". Mem. Am. Philos. Soc., 92: 146, 1972.

YANG, H. H.; HWANGBO, K.; ZHENG, M. S.; SON, J. K.; KIM, H. Y.; BAEK, S. H.; CHOI, H. C.; PARK, S. Y.; KIM, J. R. "Inhibitory effects of juglanin on cellular senescence in human dermal fibroblasts". J. Nat. Med., n. 68, p. 473-480, 2014.

YAN, T.; JUN, W.; SI, Z. "Flavonoids from Leaves of *Heritiera littoralis* D. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences", 13 (3). 2004.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3ª ed. Revista e Ampliada. Editora Univali. Itajaí. 2012. 383p.

ZHANG, Y.; JIAO, J.; LIU, C.; WU, X.; ZHANG, Y. "Isolation and purification of four flavone C-glucosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography". Food Chem., 107: 1326-1336, 2008.