

MÁRCIO DIONIZIO MOREIRA

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE INSETICIDA DE
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Ageratum conyzoides*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

MÁRCIO DIONIZIO MOREIRA

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE INSETICIDA DE
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Ageratum conyzoides*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de Março de 2001.

Prof. Luiz Cláudio de A. Barbosa
(Conselheiro)

Prof. Raul Narciso C. Guedes
(Conselheiro)

Prof. Antônio Jacinto Demuner

Dra. Madelaine Venzon

Prof. Marcelo Coutinho Picanço
(Orientador)

*Ao sempiterno criador e concesso da vida.
Aos meus pais Adir e Maria Lúcia, pelo paciente amor.
Aos meus irmãos Gislaine, Marcos e Milena.
Aos meus amigos.*

Só o espírito soprando sobre a argila pode criar o homem.

Antoine de Saint-Exupéry.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Setor de Entomologia do Departamento de Biologia Animal pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Coutinho Picanço, bem como, a sua família pelo apóio e presença em momentos decisivos.

Aos conselheiros Luiz Cláudio de A. Barbosa e Antônio Jacinto Demuner por tornarem possível este trabalho e pelos bem humorados conselhos.

Ao Dr. Raul Narciso C. Guedes e Dra. Madelaine Venzon pelas sugestões que em muito acrescentaram a este trabalho.

Aos professores da entomologia pelo convívio, amizade e capacitação profissional que nos tem proporcionado.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Entomologia pelo convívio e amizade.

À super secretária, mãe e amiga. Dona Paula e aos funcionários 'Zé' Evaristo e Francisco Ribeiro pela marcante presença na vida daqueles que passam pela Entomologia.

Aos laboratoristas do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), Sr Antônio e Ricardo pelo auxílio e brincadeiras.

Ao laboratorista e xará Márcio do Departamento de Química pela obtenção dos espectros no infravermelho.

Ao professor Elcio Santiago e a laboratorista Lúcia Helena pelo auxílio e obtenção de parte dos espectros e experimentos de RMN de ^{13}C e ^1H .

Ao professor Oliver W. Howarth da University of Warwick Inglaterra pela ajuda na obtenção de parte dos espectros e experimentos de RMN de ^{13}C e ^1H .

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas, especialmente ao Emerson, Ézio, Altair, Lessandro, Fúlvio, Adilson, e Ceber pela ajuda nas separações cromatográficas.

Aos amigos e amigas estagiários, bolsistas de iniciação científica e estudantes de Pós-Graduação do LASA pelo companheirismo durante os trabalhos, especialmente ao Fernandinho, Claudinei, Silvino, Julho, Silvia, Tatiana e Roqueline.

Aos meus amigos de república Vilmar, Catalunha e Leandro.

Ao Tomé, companheiro sempre presente desde a graduação, principalmente pra pegar o boi explodido do RU, e a sua família.

A quem, porventura, me esqueci de citar o nome mas que de alguma forma contribuiu, meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

LISTA DE SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1.Seleção das plantas e obtenção dos extratos.....	7
2.2.Obtenção dos insetos-praga.....	8
2.3.Avaliação da atividade inseticida dos extratos hexânicos e alcoólicos das plantas.....	8
2.4.Extração e avaliação da atividade inseticida do extrato hexânico de <i>A. conyzoides</i>	9
2.4.1.Elaboração do extrato.....	9
2.4.2.Avaliação da atividade inseticida do extrato.....	9

2.5. Isolamento e purificação dos compostos do extrato hexânico de <i>A. conyzoides</i>	10
2.5.1. Fracionamento cromatográfico	10
2.5.2. Avaliação da atividade inseticida das frações.....	12
2.6. Identificação dos compostos isolados do <i>A. conyzoides</i> e avaliação da atividade inseticida	12
2.6.1. Identificação	12
2.6.2. Avaliação da atividade inseticida dos compostos puros	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Avaliação da atividade inseticida dos extratos.....	14
3.2. Isolamento, identificação química e avaliação da atividade inseticida dos compostos da porção cristalizada do extrato hexânico <i>A. conyzoides</i>	15
3.2.1. Isolamento e identificação química	15
3.3. Avaliação da atividade inseticida dos compostos da porção cristalizada..	36
3.4. Fracionamento da porção oleosa do extrato bruto de <i>A. conyzoides</i> e avaliação inseticida das frações obtidas	41
3.4.1. Isolamento e identificação de ácidos graxos na fração CF 4 - 6 B.....	44
3.4.2. Isolamento, identificação química e avaliação da atividade inseticida dos constituintes da fração CF 13 - 15 B	45
4. CONCLUSÕES.....	54
5. BIBLIOGRAFIA.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
v_{as}	Deformação axial assimétrica
v_s	Deformação axial simétrica.
CCD	Cromatografia de camada delgada.
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CF	Coluna filtrante
d	Dupleto
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarization Transfer”
EE	Éter dietílico
EM	Espectroscopia de massas
H	Hexano
HMBC	“Heteronuclear multiple bond coherence”
HMQC	“Heteronuclear multiple quantum coherence”
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m/z	Razão entre massa e carga de um fragmento

Me	Metanol
MHz	Megahertz
NOE	“Nuclear overhauser effect”
PENDANT	“Polarization enhancement that is nurtured during attached nucleus testing”
Rf	Razão entre a distância percorrida pela mancha do composto e a distância percorrida pelo solvente
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto

RESUMO

MOREIRA, Márcio Dionizio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001. **Isolamento, identificação e atividade inseticida de constituintes químicos de *Ageratum conyzoides***. Orientador: Marcelo Coutinho Picanço. Conselheiros: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, Raul Narciso Carvalho Guedes.

Este trabalho objetivou isolar, identificar e estudar a atividade inseticida de compostos presentes na planta *Ageratum conyzoides*. Os extratos hexânicos e alcoólicos das plantas anis (*Ocimum celore* L.), arruda (*Ruta graveolens* L.), cordão de frade (*Leonotis nepetaefolia* L.), datura (*Datura estramonium* L.), erva balieira (*Cordia verbenaceae* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), melão-de-são-caetano (*Mormodica charantia* L.) e mentrasto (*A. conyzoides* L.) tiveram sua atividade inseticida testada e apenas o extrato hexânico da planta *A. conyzoides* apresentou atividade. O dossel desta planta foi submetido à extração, a frio, com hexano. O extrato obtido foi sucessivamente fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel para isolamento e purificação dos constituintes químicos. As frações tiveram sua atividade inseticida monitorada por meio de testes de toxicidade para *Diaphania hyalinata* (L.), *Diaphania nitidalis* (Cramer) (Lepidoptera: Pyralidae), *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae), *Sitophilus zeamais*

(Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) e *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Os compostos 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona; 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona e cumarina foram identificados através de espectroscopia no infravermelho, RMN de ¹H, RMN de ¹³C, incluindo as técnicas de PENDANT, DEPT, HMQC, HMBC e NOE. Foram isolados deste extrato os flavonóides 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona e 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona e a cumarina. As curvas dose-mortalidade para a cumarina, foram obtidas por análise de próbite. O flavonóide 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona não apresentou atividade inseticida aos insetos testados. O composto 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona, apresentou baixa atividade inseticida para *T. absoluta*, *D. hyalinata*, e *R. dominica*. A cumarina apresentou alta atividade inseticida para *T. absoluta*, *D. hyalinata*, *S. zeamais*, *R. dominica* e *M. domestica*. A ordem crescente de susceptibilidade a cumarina é *R. dominica* < *S. zeamais* < *D. hyalinata* < *M. domestica* < *T. absoluta*.

ABSTRACT

MOREIRA, Márcio Dionizio, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2001. **Isolation, identification and insecticide activity of the chemical constituents in *Ageratum conyzoides***. Adviser: Marcelo Coutinho Picanço. Committee members: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Raul Narciso Carvalho Guedes.

This work was carried out to phytochemical investigation of leaves of *Ageratum conyzoides*. The insecticide activity of the hexanic and alcoholic extracts of the plants anise (*Ocimum celore* L.), herbe grace (*Ruta graveolens* L.), lion's-ear (*Leonotis nepetaefolia* L.), datura (*Datura estramonium* L.), erva balieira (*Cordia verbenaceae* L.), mint (*Mentha piperita* L.), balsam apple (*Mormodica charantia* L.) and mentrasto (*A. conyzoides* L.) were tested, and only the hexanic extract of the plant *A. conyzoides* presented some activity. This plant canopy was submitted to cold extraction with hexane. The obtained extract was successively fractionated by gel-silica column chromatography for isolation and purification of the chemical constituents. The fraction insecticide activities were monitored by toxicity tests for *Diaphania hyalinata* (L.), *Diaphania nitidalis* (Cramer) (Lepidoptera: Pyralidae), *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae), *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae), *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tuta absoluta* (Meyrick)

(Lepidoptera: Gelechiidae). The compounds 5,6,7,8,3',4',5'-heptamethoxyflavone; 5,6,7,8,3'-pentamethoxy-4',5'-methylenedioxyflavone and coumarin were identified through infrared spectroscopy, ¹H-NMR and ¹³C-RMN, including the PENDANT, DEPT, HMQC, HMBC and NOE techniques. The flavonoids 5,6,7,8,3'-pentamethoxy-4',5'-methylenedioxyflavone; 5,6,7,8,3',4',5'-heptamethoxyflavone and coumarin were isolated from this extract. The mortality-dose curves for coumarin were obtained by probite analysis. The flavonoid 5,6,7,8,3'-pentamethoxy-4',5'-methylenedioxyflavone did not show any insecticide activity to the tested insects. The compound 5,6,7,8,3',4',5'-heptamethoxyflavone presented low insecticide activity for *T. absoluta*, *D. hyalinata* and *R. dominica*. The coumarin showed high insecticide activity for *T. absoluta*, *D. hyalinata*, *S. zeamais*, *R. dominica* and *M. domestica*. The susceptibility increasing order to coumarin is *R. dominica* < *S. zeamais* < *D. hyalinata* < *M. domestica* < *T. absoluta*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas, através do seu metabolismo secundário, apresentam grande diversidade de compostos com ação inseticida os quais tem sido explorados pelo uso de extratos vegetais como produtos comerciais ou semicomerciais (Mordue & Blackwell, 1993), ou como fonte de moléculas para a síntese de praguicidas (Cutler, 1988). Os produtos naturais podem ser usados como modelos para a síntese de inseticidas sintéticos com características desejáveis, como maior eficiência, biodegradação e menor toxicidade a organismos não alvos (Hedin et al., 1994). Estes também têm o potencial de serem incorporados, via engenharia genética, em plantas cultivadas minimizando os danos ocasionados por insetos-praga, microorganismos e plantas invasoras (Cutler, 1988; Elakovich, 1988).

A biodiversidade nos trópicos é bem mais rica que em outras áreas do globo. Um hectare de floresta em Kalimantan, Indonésia, possui 700 espécies de plantas (Cordell, 1995). Em geral, plantas tropicais possuem níveis de metabólitos secundários mais elevados do que plantas de clima não tropical (Amaral et al., 1999). As plantas tropicais têm grande potencial como fonte de novos produtos biologicamente ativos sendo necessário o estudo e exploração deste grande recurso (Escoubas, 1994).

Pertencente a família Asteraceae (Compositae), o *Ageratum conyzoides* (Figura 1) é uma planta herbácea, anual, de reprodução por semente, raiz

principal pivotante com abundantes raízes secundárias, folhas pecioladas ovais-lanceoladas opostas, inflorescência do tipo corimbos com 5 a 20 capítulos por inflorescência de coloração rosa ou branco-azulada (Lorenzi, 1982; Correa, 1984; Lorenzi, 1994; Castro & Chemale, 1995).

A origem do nome vem do grego "*a geras*", significando "que não envelhece" (termo aplicado antigamente a plantas perenes; mesmo sendo ela de ciclo curto existem plantas perenes dentro do gênero) e "*kónyz*", o nome da planta na Grécia. Tem valor ornamental e econômico.

Entre as sinónimas do *A. conyzoides* incluem-se *A. caeruleum* Hort. ex. Poir.; *A. coeruleum* Desf.; *A. hirsutum* Lam.; *A. cordifolium* Roxb.; *A. humile* Salisb.; *A. latifolium* Car.; *A. mexicanum* Sims.; *A. album* Stend; *A. obtusifolium* Lam.; *A. maritimum* H.B.K.; *A. odoratum* Vilm. e *Cacalia mentrasto* Vell. (Jaccoud, 1961). Vulgarmente é chamado por diversos nomes como catinga de bode, catinga de barrão, erva de são joão, maria preta, mentrasto, erva de são josé, picão roxo, erva de santa-lúcia, camará-opela, agerato, camará apeba, camará iapó, camará japê, erva de santa maria, macela de são joão, macela francesa e mastruço (Jaccoud, 1961; Oliveira et al., 1993).

O *A. conyzoides* é nativo na América tropical incluindo o Brasil (Correa, 1984; Amaral et al. 1999) e atualmente esta disperso por regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Foi levado para muitas regiões como ornamental ou para uso em medicina popular. Por ser usado na medicina popular contra várias enfermidades como cólicas, diarreia, diabetes, infecções, pneumonia e reumatismo e usada como bactericida (Durodola, 1977; Borthakur et al., 1987; Marques-Neto et al., 1988; Menut et al., 1993; Oliveira et al., 1993; Viana et al., 1998) espera se encontrar nesta planta substâncias de baixa toxidez ao homem e outros mamíferos.

Apesar de ser considerada como planta daninha (Lorenzi, 1982) em cerca de 50 países e indicado como invasora em cerca de 40 culturas, essa planta pode ser um componente aproveitável em programas de manejo integrado de pragas, na citricultura. Em pomares cítricos com presença de *A. conyzoides* as populações dos ácaros-praga *Panonychus citri* McGregor (Acari: Tetranychidae), *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) e *Phyllocoptruta oleivora*

Ashmead (Acari: Eriophyidae) são mantidas sob controle por servir de abrigo e fontes de alimentação complementar a inimigos naturais (Liang et al., 1994).

Apesar da planta *A. conyzoides* ser quimicamente bem estudada (Figura 2) pouco se sabe sobre atividade biológica de seus compostos especialmente sobre o ponto de vista entomológico. Tendo em vistas a tais fatos, este trabalho teve como objetivos isolar, identificar e estudar a atividade inseticida de compostos biologicamente ativos presentes nesta planta.



Figura 1. Aspecto geral do *A. conyzoides*.

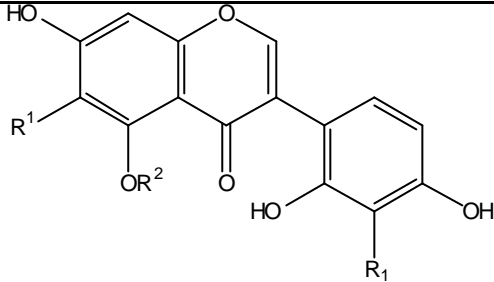
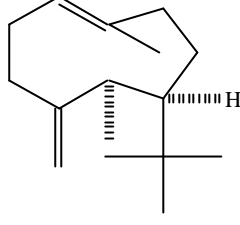
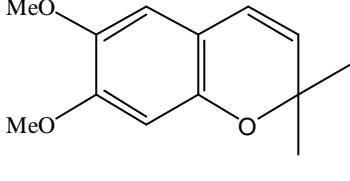
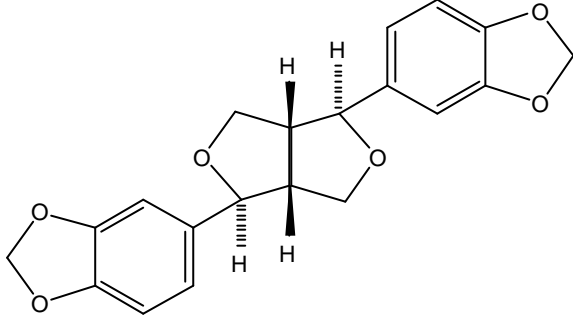
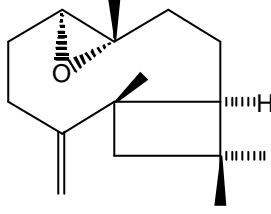
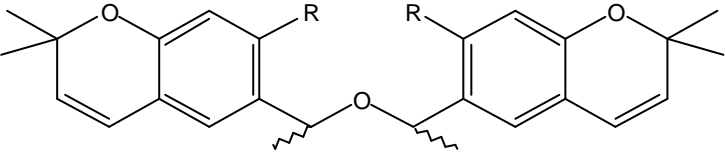
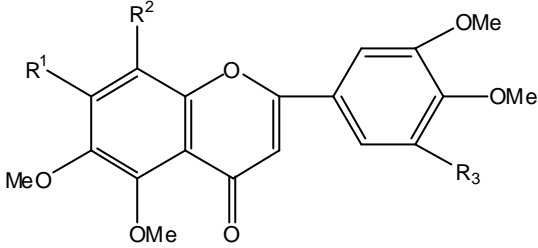
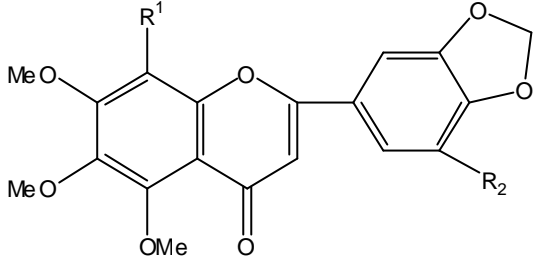
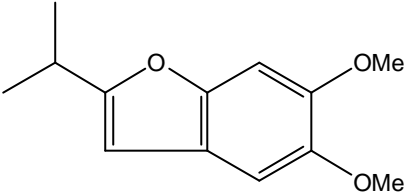
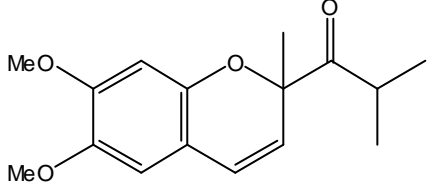
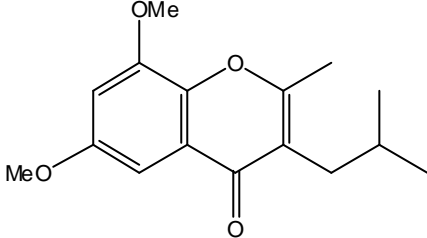
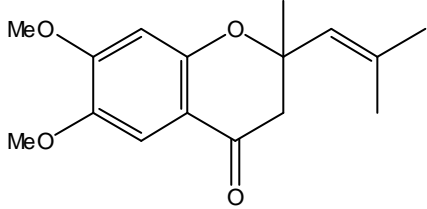
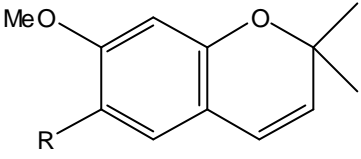
	Yadava & Kumar (1999)
	Borthakur et al. (1987)
	Kasturi et al. (1973)
	González et al. (1991a)
	González et al. (1991a)
 <p data-bbox="375 1713 1045 1803"> R = OMe 1- 11α-Me, 11'β-Me 2- 11β-Me, 11'β-Me 3- 11β-Me, 11'β-Me </p>	González et al. (1991a)

Figura 2. Relação de compostos isolados do *Ageratum conyzoides*.

Cont. da Figura 2.

 <p>1- R1 = R2 = R3 = OMe 4- R2 = R3 = H; R1 = OMe 2- R1 = R2 = OMe; R3 = H 5- R2 = R3 = OMe; R1 = H 3- R1 = R3 = OMe; R2 = H 6- R1 = R3 = OMe; R2 = OH</p>	<p>González et al. (1991b)</p>
 <p>1- R1 = H; R2 = OMe 3- R1 = R2 = OMe 2- R1 = OMe; R2 = H</p>	<p>Herz & Kulanthaivel (1982) Vyas & Mulchandani (1984) González et al. (1991b)</p>
	<p>Pari et al. (1998)</p>
	<p>Pari et al. (1998)</p>
	<p>Pari et al. (1998)</p>
	<p>Pari et al. (1998)</p>

Cont. da Figura 2.

 <p>1 - R = H 2 - R = OMe 3 - R = -CH₂COCH₃ 4 - R = -CH₂CH=CH₂ 5 - R = -CH₂C(OMe)HCH₃ 6 - R = -CH₂C(OH)HCH₃ 7 - R = -CH₂C(OEt)HCH₃</p>	Pari et al. (1998)
---	--------------------

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção das plantas e obtenção dos extratos

As plantas anis (*Ocimum celore* L.), arruda (*Ruta graveolens* L.), cordão de frade (*Leonotis nepetaefolia* L.), datura (*Datura estramonium* L.), erva balieira (*Cordia verbenaceae* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), melão-de-são-caetano (*Mormodica charantia* L.) e mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.), foram previamente selecionadas a partir de conhecimentos populares relatados por Guerra (1985).

De cada planta coletada no Campus da UFV, foram pesados de 300 a 600 g e submetidos à extração com hexano em erlemeyers de 500 a 1000 mL. Após 48 horas a solução hexânica foi retirada sob filtração e o material vegetal, após ser macerado, foi submetido a extração com etanol por 48 horas. Os extratos hexânicos e etanólicos foram concentrados em evaporador rotativo a baixa pressão e temperatura reduzida (< 50°C). A quantidade obtida de extrato variou de 1,1 a 2 g. Os extratos foram armazenados sob refrigeração para testes biológicos.

2.2. Obtenção dos insetos-praga

Nos testes de toxicidade foram usadas larvas de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), *Diaphania nitidalis* (Cramer) e *Diaphania hyalinata* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae), adultos de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae) e de *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae) e larvas de *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae). Estes insetos foram selecionados por representarem três das mais importantes ordens de insetos e pela a sua importância como insetos-pragas. A *T. absoluta* é praga chave da cultura do tomateiro na América do Sul (Povolony, 1975; Carballo et al., 1981; Muszinki et al., 1982), a *D. nitidalis* e *D. hyalinata* são pragas-chave de curcubitáceas em praticamente todo o mundo, o *S. zeamais* e *R. dominica* são pragas-chave de cereais armazenados em todo mundo (Gallo et al., 1988) e *M. domestica* é praga-chave em criações de animais e em ambientes urbanos em todo mundo (Gramam-Smith, 1913; West, 1951).

Os insetos foram obtidos de criações em laboratório conforme Miranda et al. (1998) para *T. absoluta*, Mendes & Berti Filho (1981) para a *D. nitidalis* e *D. hyalinata* e conforme Aleixo et al. (1984) e Basden (1947) para *Musca domestica*. Os insetos de *S. zeamais* e *R. dominica* foram criados em milho e trigo respectivamente, a temperatura de $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, U.R. = $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

2.3. Avaliação da atividade inseticida dos extratos hexânicos e alcoólicos das plantas

A atividade inseticida dos extratos hexânicos e alcoólicos foi avaliada inicialmente em *T. absoluta* devido a sua maior suscetibilidade possuindo cutícula menos esclerotizada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Cada parcela experimental foi constituída de placa de Petri (9 cm de diâmetro por 2 cm de altura) contendo 10 larvas. Os tratamentos foram os extratos e a testemunha.

Os extratos foram diluídos, nos solventes em que estes foram extraídos, na concentração de 10 mg/ mL. Distribuíram-se 1,0 mL do extrato em papel de filtro

de 9 cm de diâmetro o qual foi acondicionado em placa de Petri de vidro. A testemunha foi tratada apenas com 1 mL dos respectivos solventes. Após a evaporação do solvente adicionou-se em cada unidade experimental 10 insetos e quatro horas depois avaliou-se os números de insetos vivos e mortos. Em seguida os insetos sobreviventes foram transferidos para potes de plástico (10 cm de altura por 11 cm de diâmetro) contendo um folíolo de tomate da cultivar Santa Clara e 24 horas depois avaliou-se a mortalidade dos insetos.

Em todas as avaliações dos experimentos de toxicidade os insetos foram contados como mortos quando se apresentaram imóveis. Os dados de mortalidade dos insetos nos extratos foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a $p < 0,05$.

2.4. Extração e avaliação da atividade inseticida do extrato hexânico de *A. conyzoides*

2.4.1. Elaboração do extrato

Foram coletados 5,31 kg do dossel da planta em fase de florescimento em 15 de março de 2000, no campus da Universidade Federal de Viçosa. O material vegetal foi submetido à extração com solvente hexano a frio, conforme Scramin et al. (1987), até que os componentes da planta não mais fossem transferidos por difusão ao solvente (Rey, 1970), fato observado pela ausência de coloração do solvente quando este era trocado de dois em dois dias. Este processo durou 45 dias. O extrato obtido foi concentrado em evaporador rotativo a baixa pressão e temperatura reduzida ($< 50^{\circ}\text{C}$).

2.4.2. Avaliação da atividade inseticida do extrato

A atividade inseticida do extrato bruto de *A. conyzoides* foi testada em *D. hyalinata*, *M. domestica*, *R. dominica*, *S. zeamais* e *T. absoluta*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Cada parcela experimental foi constituída de placa de Petri contendo 10 insetos. Os tratamentos foram o extrato e a testemunha.

Os insetos foram pesados e tratados topicamente com uma solução de concentração 40 mg/mL do extrato hexânico diluído em acetona usando-se uma microseringa Hamilton de 10 µL. A dose utilizada para cada inseto variou em função da massa destes. Na testemunha os insetos foram tratados topicamente com igual volume da acetona pura. As placas de Petri com os insetos foram acondicionadas em estufa incubadora a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, U.R.= $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. Os insetos vivos e mortos foram contados 6, 12, 24 e 48 horas após o tratamento. Os dados de mortalidade dos insetos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a $p > 0,05$ sendo também calculado o erro padrão das médias.

As larvas de *T. absoluta* e *D. hyalinata* após o tratamento tópico com 1µL do extrato hexânico foram mantidas em placas de Petri contendo folhas de tomate var. Santa Clara e abóbora var. Menina Brasileira Precoce (*Cucurbita morchata*), para alimentação destes, respectivamente. As folhas foram trocadas de 12 em 12 horas. Os adultos de *S. zeamais* e *R. dominica*, foram também tratados topicamente com 1 µL do extrato e confinados em placas de Petri sem alimentação. As larvas de *M. domestica* foram tratadas com 2,0 µL de solução 40 mg/mL do extrato hexânico, devido a sua maior massa e volume corporal. Estas foram mantidas em placas de Petri contendo farelo de trigo umedecido, como alimentação e para evitar a morte destas por desidratação.

2.5. Isolamento e purificação dos compostos do extrato hexânico de *A. conyzoides*

2.5.1. Fracionamento cromatográfico

O isolamento dos compostos ativos foi realizado no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) no Departamento de Química da UFV. Nas separações cromatográficas utilizou sílica gel 60 (70-230 Mesh-ASTM, Merck) como suporte. Nas análises cromatográficas em camada delgada foram utilizadas placas preparadas com sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F₂₅₄).

Para cada separação cromatográfica foi feita a seleção prévia do solvente ou da composição de solventes, em cromatografia de camada delgada (CCD), que proporcionasse a melhor separação dos constituintes. As frações foram concentradas em evaporador rotativo a baixa pressão e temperatura reduzida (< 50°C). As frações foram agrupadas por comparação das manchas em placas de CCD. Os reveladores utilizados foram solução de ácido fosfomolibdico/etanol (12 g/150 mL) ou observação sob luz ultravioleta a 254 ou 360 nm.

A coluna filtrante foi feita utilizando um funil de vidro sinterizado tendo suas extremidades revestidas com papel filtro (Figura 2). A eluição gradiente foi feita com os solventes hexano puro, hexano/éter dietílico (100: 0,5) e (50: 50), éter dietílico puro e metanol puro recolhendo-se frações de um litro.

As separações cromatográficas foram feitas em colunas (diâmetro X altura = 6,0 X 50,0 cm) utilizando as seguintes eluições: Coluna 1, hexano, éter dietílico e metanol puros, Coluna 2, hexano/éter dietílico (100: 10) e metanol puro; Coluna 3, hexano/éter dietílico (100: 40) e metanol puro; Coluna 4, hexano/éter dietílico (100: 200) e metanol puro. Foram recolhidas frações de 50 mL.

Nas recristalizações para purificação final, as frações foram diluídas a quente em diclorometano, posteriormente foi acrescentado hexano na proporção de 1: 3 (hexano: diclorometano) e carvão ativado. Esta solução foi filtrada a vácuo e deixada em descanso para formação e crescimento dos cristais.

A avaliação do grau de pureza dos compostos isolados foi feita por meio de análise cromatográfica de camada delgada, e por determinação da temperatura de fusão de cada composto. A determinação da temperatura de fusão foi feita em um aparelho Microquímica MQAPF-301.

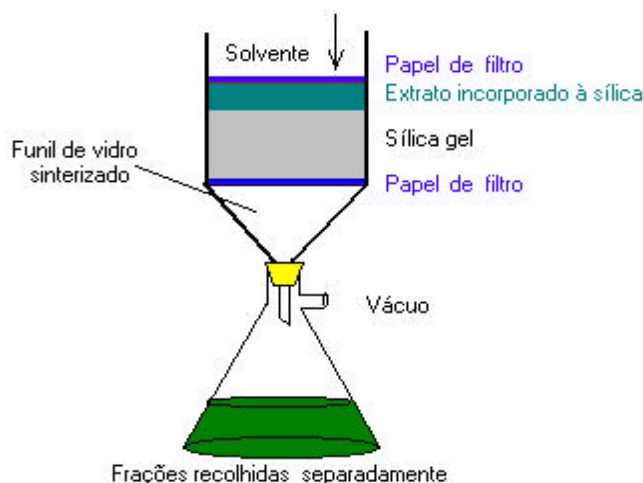


Figura 3. Esquema da coluna filtrante utilizada para o fracionamento do extrato hexânico de *A. conyzoides*.

2.5.2. Avaliação da atividade inseticida das frações

Com as frações do extrato hexânico realizou-se teste de toxicidade para *D. hyalinata* e *D. nitidalis* seguindo a metodologia descrita no item 2.4.2 para *D. hyalinata*. As doses usadas para cada espécie de inseto variaram com o peso destes.

Os dados de mortalidade dos insetos nas frações do extrato hexânico foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott e $p < 0,05$ sendo calculados os erros padrão das médias.

2.6. Identificação dos compostos isolados do *A. conyzoides* e avaliação da atividade inseticida

2.6.1. Identificação

A determinação estrutural dos compostos foi feita por meio de espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , DEPT, PENDANT, HMQC, HMBC e NOE) e espectrometria de massas. Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Perkin Elmer FTIR 1000, no Departamento de Química da UFV, na faixa de 600 a 4000

cm⁻¹ em pastilhas de KBr para os compostos cristalizados. Amostras oleosas foram analisadas como filmes em placas de NaCl. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram feitos na Universidade de Warwick, Inglaterra em aparelho Bruker WM 400 ou em aparelho Varian Mercury 300, 300 MHz, no Departamento de Química da UFV. O espectro de massas foi obtido em um aparelho Micromass Autoespec instrument na Universidade de Warwick, Inglaterra.

2.6.2. Avaliação da atividade inseticida dos compostos puros

A avaliação da atividade dos compostos puros para larvas de *T. absoluta*, *D. hyalinata*, *M. domestica* e adultos de *S. zeamais* e *R. dominica* foram feitas como descrita no item 2.4.2. Para o composto com maior atividade inseticida estimou-se as curvas dose-mortalidade. O experimento para estimar as curvas foi em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. A parcela experimental constituiu-se de placas de Petri, de 9 cm de diâmetro, contendo 10 insetos. Os tratamentos foram a dose da substância além da testemunha tratada apenas com o solvente. As placas de Petri foram mantidas em estufa incubadora a $25 \pm 0,5$ °C, U.R.= $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas. O número de insetos vivos e mortos foram contados 6, 12 e 24 horas após a aplicação.

Os dados de mortalidade dos insetos para os compostos puros foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a $p < 0,05$ sendo calculados os erros padrão das médias de mortalidade.

Os resultados de mortalidade dos insetos pelas doses da substância de maior mortalidade nos testes anteriores foram corrigidos em relação a mortalidade na testemunha usando a fórmula de Abbott (1925). Determinou-se, por análise de próbite (Finney, 1971) curvas dose-mortalidade para as cinco espécies de insetos testados. Através das curvas de dose-mortalidade, estimou-se as doses letais para 50 e 90% dos indivíduos (DL₅₀ e DL₉₀) e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade. Foram também determinados os erros padrão para as inclinações destas curvas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da atividade inseticida dos extratos

Dos extratos testados apenas, o extrato hexânico de *A. conyzoides* apresentou atividade inseticida a *T. absoluta* nas doses testadas (Tabelas 1 e 2). Assim este extrato foi selecionado para estudo dos compostos químicos relacionados a sua atividade inseticida.

Os 5,3 Kg do dossel do *A. conyzoides*, submetidos a extração com solvente hexano, forneceram 86,1 g de extrato com rendimento de 1,6% (Tabela 3).

Detectou-se efeito inseticida do extrato hexânico de *A. conyzoides* sobre *D. hyalinata*, *T. absoluta* e *R. dominica* em todas as avaliações e sobre *M. domestica* apenas 48 horas após a aplicação tópica deste extrato. Não detectou-se efeito tóxico do extrato hexânico sobre *S. zeamais* (Tabela 4).

Fagoonee & Umrit (1981), utilizando cromatografia de camada delgada (CCD), obtiveram indícios da presença dos precocenos I e II no extrato acetônico-dietil éter da parte aérea de *A. conyzoides*. Estes autores observaram que o extrato de *A. conyzoides* causou inibição ovariana de até 50% em *Dysdercus flavidus* (Guérin-Mèneville) (Hemiptera: Pyrrhocoridae). A presença dos precocenos I e II em *A. conyzoides* foi confirmada posteriormente por

Borthakur et al. (1987). Como estas substâncias não estão associadas a toxicidade aguda a insetos, o efeito tóxico agudo do extrato hexânico de *A. conyzoides* observado neste trabalho, não pode ser atribuído a presença destas substâncias.

Saxena et al. (1992) estudando a atividade inseticida do extrato obtido por éter de petróleo e acetona de *A. conyzoides*, observaram a redução do número de ovos por postura (50%) em *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) e algum efeito tóxico agudo ocasionado pelo extrato em altas concentrações.

3.2. Isolamento, identificação química e avaliação da atividade inseticida dos compostos da porção cristalizada do extrato hexânico *A. conyzoides*

3.2.1. Isolamento e identificação química

A marcha analítica simplificada, com os totais de massa, para a obtenção dos compostos isolados, pode ser vista nas Figuras 4 e 5, os quadros em destaque correspondem às frações onde foram obtidos compostos puros. As massas totais foram calculadas pela soma das frações anterior e posterior àquelas onde se obteve o composto puro e por comparação das manchas em CCD. As frações das quais não foram isolados nenhum composto ou não sofreram fracionamentos posteriores foram agrupadas em intervalos.

Após a concentração do extrato hexânico ocorreu a formação de cristais (porção cristalizada) a qual foi separada por filtração. O material resultante da filtração foi fracionado em coluna cromatográfica obtendo-se 31 frações (Tabela 5 e Figura 4).

O composto da fração 21-34 (2) apresentou coloração branca e cristalina com massa 5,285 g, resultante da soma das frações de 20 (2) a 35-39 (2). O $R_f = 0,43$ determinado por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) e mistura de solventes hexano: éter dietílico na proporção de 10: 1. O ponto de fusão para este composto variou de 66,7 a 68,9°C. A aromaticidade da fração 21-34 (2) pode ser verificada pelo espectro de infravermelho (Figura 6) que apresentou absorções características em 3045 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}\text{ C-H}$), 1706 cm^{-1} ($\nu\text{ C=O}$), 1619, 1605 e 1562 cm^{-1} ($\nu\text{ C=C arom.}$) e 1259 e 1229 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}\text{ C-O}$).

Tabela 1. Média \pm erro padrão da mortalidade (%) de *Tuta absoluta* causada após 4 e 24 horas de exposição aos extratos hexânicos e alcoólicos de oito plantas. $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, U.R.= $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

Espécies de Plantas	Extrato hexânico		Extrato etanólico	
	4 hs de exposição	24 hs de exposição	4 hs de exposição	24 hs de exposição
Testemunha	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Ageratum conyzoides</i>	100,00 \pm 0,00 aA	100,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Ruta graveolens</i>	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Leonotis nepetaefolia</i>	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Cordia verbenácea</i>	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	5,13 \pm 5,10 aB
<i>Datura estramonium</i>	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Mormodica charantia</i>	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Ocimum celore</i>	4,17 \pm 4,17 aB	4,17 \pm 4,17 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
<i>Mentha piperita</i>	8,93 \pm 4,39 aB	8,93 \pm 4,39 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB

* As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem, entre si, pelo teste Scott - Knott a $p < 0,05$.

Tabela 2. Doses (μg do extrato ou fração/ mg de inseto), usadas em aplicação tópica para avaliação da toxicidade do extrato bruto ou fração do extrato hexânico de *Ageratum conyzoides* a larvas de *Tuta absoluta*, *Musca domestica*, *Diaphania nitidalis*, *Diaphania hyalinata* e adultos de *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica*.

Espécie de inseto	Teste de toxicidade		
	Extrato bruto	Frações	Compostos puros
<i>M. domestica</i>	0,18	*	0,72
<i>S. zeamais</i>	1,27	*	2,54
<i>D. hyalinata</i>	6,67	1,67	13,33
<i>D. nitidalis</i>	*	1,47	*
<i>T. absoluta</i>	0,67	*	1,33
<i>R. dominica</i>	20,39	*	40,78

* Teste de toxicidade não realizado para este inseto.

Tabela 3. Rendimento da extração hexânica a frio do dossel de *Ageratum conyzoides*.

Componente	Quantidade
Porção oleosa do extrato hexânico	77,4 g
Porção cristalizada do extrato hexânico	8,8 g
Total extrato	86,1 g
Material vegetal	5313,0 g
Rendimento do extrato hexânico	1,6%

Tabela 4. Média \pm erro padrão da mortalidade (%) de *Musca domestica*, *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Diaphania hyalinata* e *Tuta absoluta* em 6, 12, 24 e 48 horas após a aplicação tópica do extrato hexânico de *Ageratum conyzoides* e testemunha. $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, U.R.= $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

Espécie de inseto	Tratamento	Tempo após aplicação tópica (horas)*			
		6	12	24	48
<i>Musca domestica</i>	Testemunha	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aB
	Extrato	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	6,67 \pm 5,77 aA	13,33 \pm 5,77 aA
<i>Sitophilus zeamais</i>	Testemunha	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA
	Extrato	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	10,0 \pm 0,00 aA
<i>Rhyzopertha dominica</i>	Testemunha	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	3,33 \pm 5,77 aB
	Extrato	20,00 \pm 10,00 aA	33,33 \pm 15,27 aA	36,67 \pm 11,55 aA	43,33 \pm 5,77 aA
<i>Diaphania hyalinata</i>	Testemunha	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB
	Extrato	70,00 \pm 10,00 aA	93,33 \pm 5,77 aA	93,33 \pm 5,77 aA	93,33 \pm 5,77 aA
<i>Tuta absoluta</i>	Testemunha	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	3,33 \pm 5,77 aB
	Extrato	16,67 \pm 11,55 aA	16,67 \pm 11,55 aA	26,67 \pm 15,27 aA	26,67 \pm 20,81 aA

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem, entre si, pelo teste F a $p < 0,05$.

Espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e experimentos de HMQC e PENDANT foram utilizados na elucidação da estrutura deste composto. No espectro de RMN de ^1H as absorções ocorreram na faixa de δ 6-9 peculiar de compostos aromáticos sendo observado dois dupletos característicos com $J = 9,6$ Hz em δ 5,59 e δ 6,90 de dois prótons cis-olefínicos de anel cumarínico (Figura 7).

O fato deste composto se tratar de uma cumarina é reforçado pelo espectro de RMN de ^{13}C , experimento de Pendant (Figura 8), onde se verifica as absorções correspondentes aos carbonos olefínicos em δ 116,5 (C-3) e δ 143,3 (C-4), a absorção da carbonila em δ 160,52 e a absorção de três carbonos não ligados a hidrogênio. Os três carbonos sem ligação com hidrogênios juntamente com os sinais presentes no espectro de RMN de ^1H (Figura 7), integrados para seis hidrogênios, indicam não haver substituição no anel aromático, tratando-se de uma cumarina simples. As absorções δ 131,59; δ 127,71; δ 124,21 e δ 116,31 referem-se aos demais carbonos aromáticos (Figura 8).

Os dados obtidos para δ ^{13}C foram comparados com os valores obtidos de literatura para a cumarina (Tabela 6) sendo estes coerentes entre si confirmando a estrutura proposta para este composto.

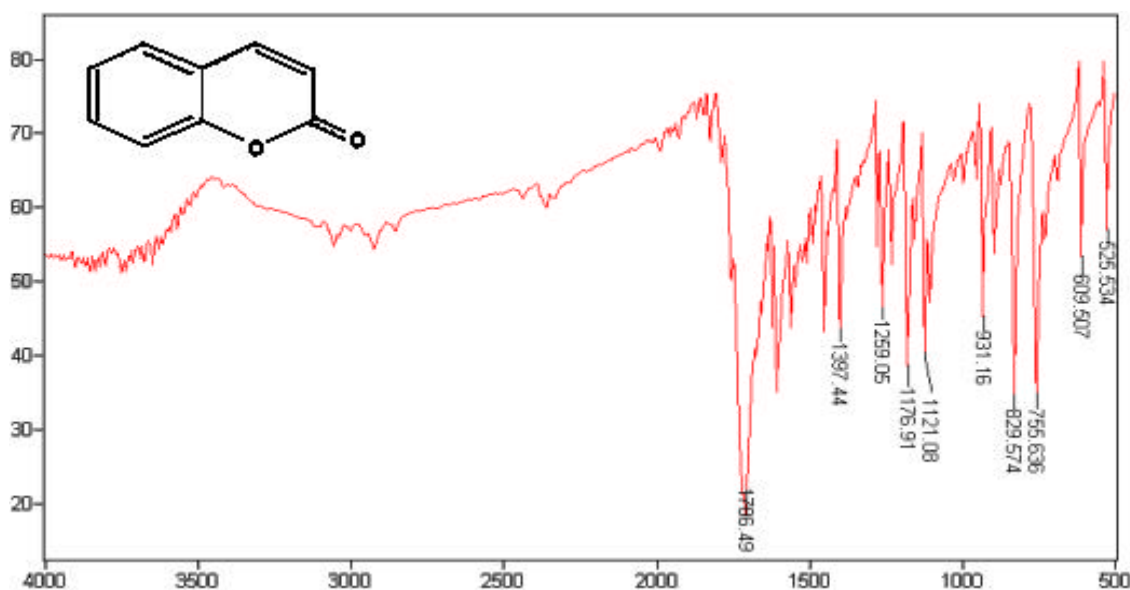


Figura 4. Espectro de infravermelho (KBr) da fração 21-34 (2).

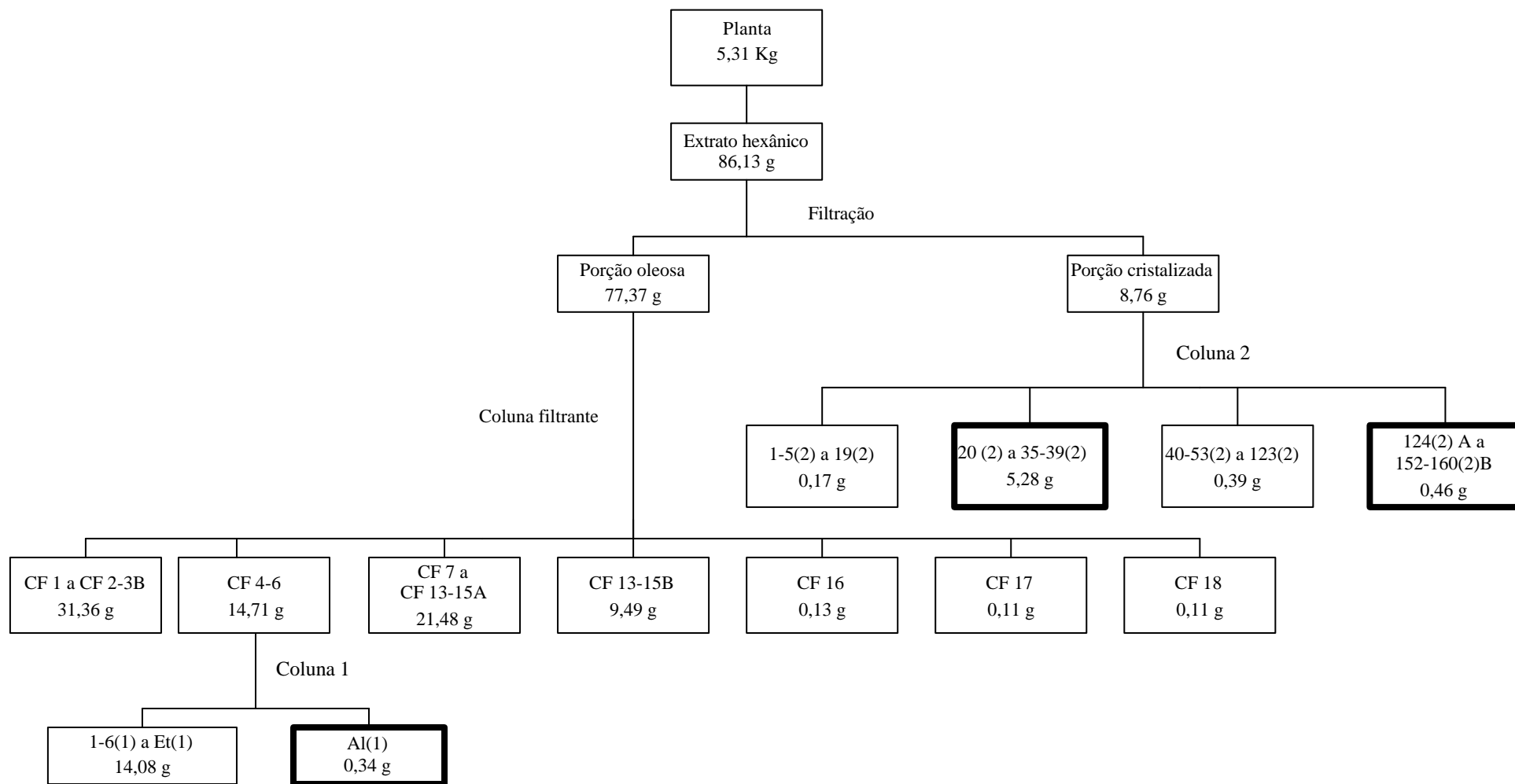


Figura 5. Marcha analítica simplificada para isolamento dos compostos. **□** Frações onde foram obtidos compostos puros.

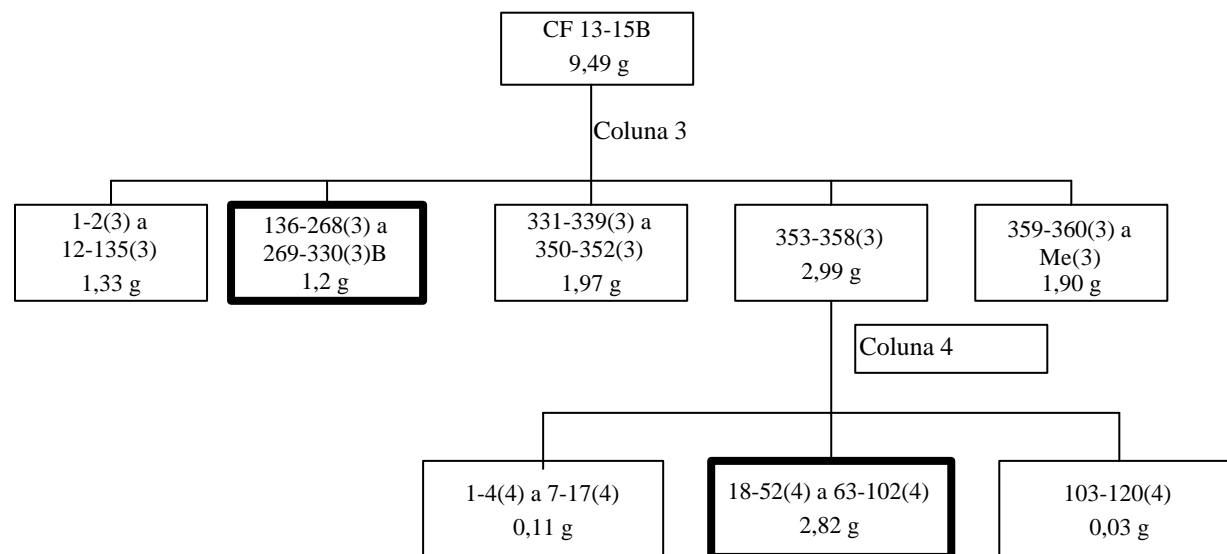


Figura 6. Marcha analítica simplificada para isolamento dos compostos. **□** Frações onde foram obtidos compostos puros.

Tabela 5. Frações, solvente de eluição e massa das frações obtidas do fracionamento da porção cristalizada do extrato hexânico bruto de *Ageratum conyzoides*.

Frações	Solvente de eluição	Massa (g)
1 - 5 (2)	H: EE (100: 10)	0,017
6 (2)	H: EE (100: 10)	0,017
7 (2)	H: EE (100: 10)	0,021
8 - 9 (2)	H: EE (100: 10)	0,015
10 - 11 (2)	H: EE (100: 10)	0,018
12 - 14 (2)	H: EE (100: 10)	0,015
15 - 18 (2)	H: EE (100: 10)	0,045
19 (2)	H: EE (100: 10)	0,028
20 (2)	H: EE (100: 10)	0,328
21 - 34 (2)*	H: EE (100: 10)	4,749
35 - 39 (2)	H: EE (100: 10)	0,208
40 - 53 (2)	H: EE (100: 10)	0,064
54 - 63 (2)	H: EE (100: 10)	0,030
64 - 101 (2)	H: EE (100: 10)	0,030
102 - 110 (2)	H: EE (100: 10)	0,025
111 - 120 (2)	H: EE (100: 10)	0,046
121 - 122 (2)	H: EE (100: 10)	0,003
123 (2)	H: EE (100: 10)	0,197
124 (2) A*	H: EE (100: 10)	0,010
124 (2) B	H: EE (100: 10)	0,103
125 - 127 (2)*	H: EE (100: 10)	0,006
128 - 131 (2) A*	Me: (Puro)	0,098
128 - 131 (2) B	Me: (Puro)	0,060
132 (2)*	Me: (Puro)	0,023
133 - 134 (2)	Me: (Puro)	0,011
135 - 143 (2) A*	Me: (Puro)	0,070
135 - 143 (2) B	Me: (Puro)	0,308
144 - 145 (2)	Me: (Puro)	0,043
146 - 151 (2) *	Me: (Puro)	0,060
152 - 160 (2) A	Me: (Puro)	0,030
152 - 160 (2) B*	Me: (Puro)	0,198
Total recuperado		6,876

H = Hexano, EE = Éter dietílico, Me = Metanol.

* Frações onde foram obtidos compostos puros.

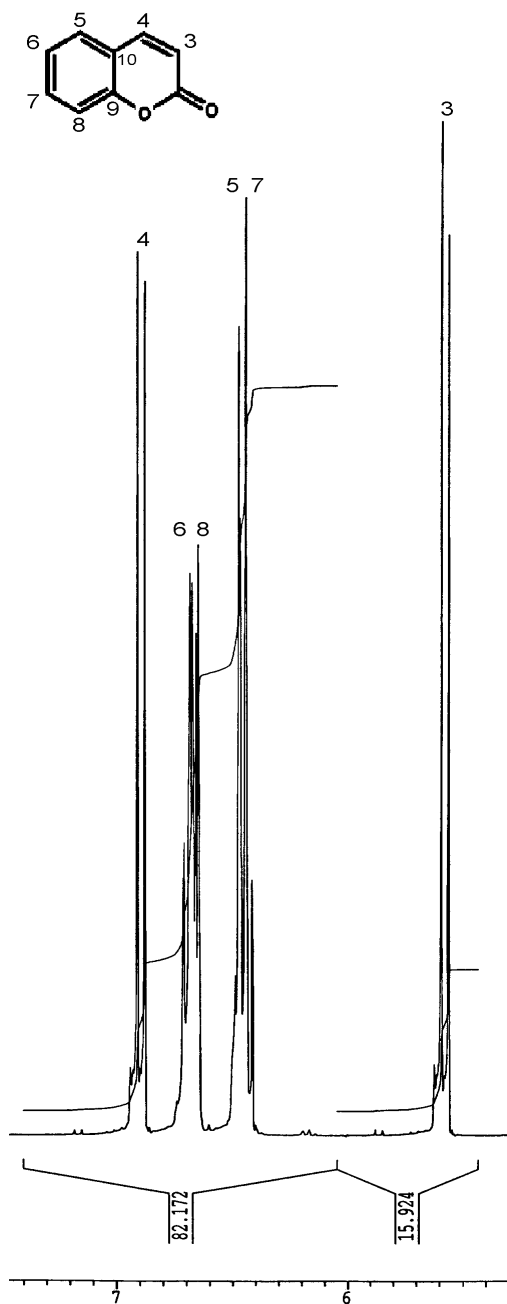


Figura 7. Espectro de RMN de ¹H (300MHz, CDCl₃) da fração 21-34 (2).

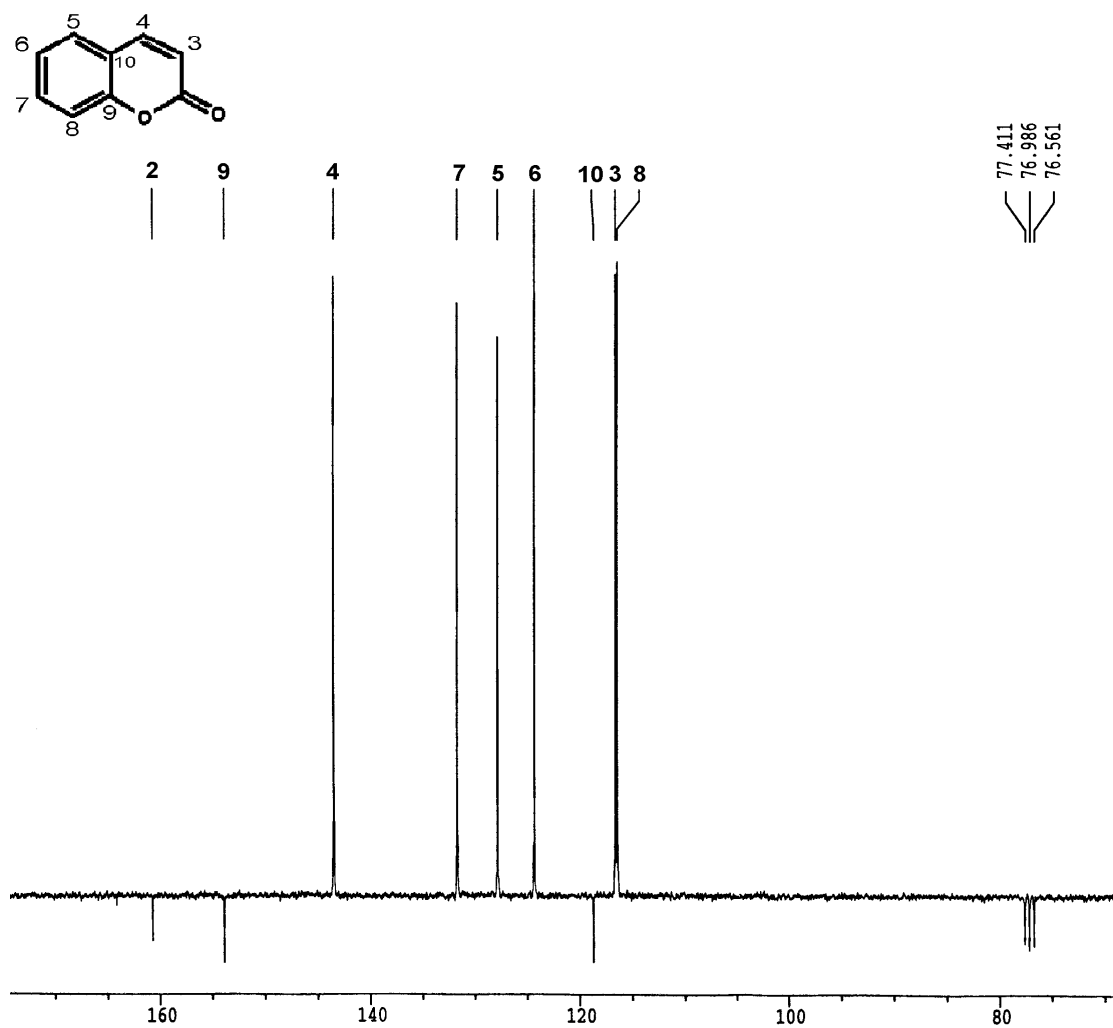


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C (experimento de PENDANT) para fração 21-34 (2).

Tabela 6. Comparação dos dados de RMN ^{13}C (300 MHz) obtidos para a fração 21-34 (2) com de literatura para cumarina.

C	$\delta^{13}\text{C}$ observado	$\delta^{13}\text{C}$ (Bretmaier & Voelter, 1990)
C-2 (Carbonila)	160,52	160,4
C-3	116,50	116,4
C-4	143,33	143,6
C-5	127,71	128,1
C-6	124,21	124,4
C-7	131,59	131,8
C-8	116,31	116,4
C-9	153,71	153,2
C-10	118,56	118,8

As frações de 124 (2) A a 152-160 (2) B, obtidas da coluna 2, apresentaram coloração variada e massa total de 0,46 g, resultante da soma das frações de 124 (2) A a 152-160 (2) B (Figura 4 e Tabela 5). Estas frações apresentaram $R_f \cong 0,55$ em éter dietílico: metanol (15: 1) e a temperatura de fusão, variou de 185 a 188,9°C, valores próximos aos obtidos por Herz et al. (1980) (190,0 - 190,5°C). A análise destas frações por espectroscopia no infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H revelou se tratar do composto 5, 6, 7, 8, 3' - pentametoxi - 4',5' - metilenodioxiflavona.

O caráter aromático do composto isolado das frações 124 (2) A a 152-160 (2) B pode ser observado pelo espectro de infravermelho. Este apresentou absorções em 3078 cm^{-1} (ν C-H de arom.), 2970 e 2942 cm^{-1} (ν_{as} C-H₃), 2890 cm^{-1} (ν_{s} C-H₃), 1631 cm^{-1} (ν C=O), 1584 , 1560 e 1551 cm^{-1} (ν C=C arom.), 1448 cm^{-1} (δ_{as} C-H₃), 1370 cm^{-1} (δ_{s} C-H₃), 1247 cm^{-1} (ν_{as} C-O-C), 1040 cm^{-1} (ν_{s} C-O-C) (Figura 9).

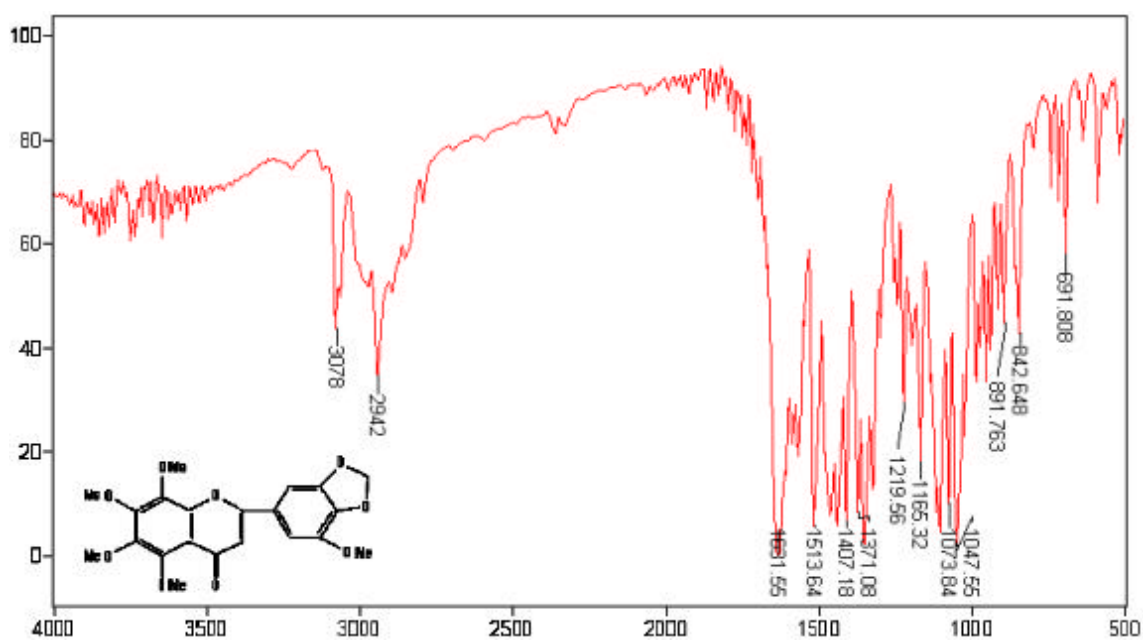


Figura 9. Espectro de infravermelho da fração de 128-131 (2) A.

A fórmula molecular ($C_{21}H_{20}O_9$) e o peso molecular (m/z 416), foram determinados a partir dos dados de espectrometria de massas por impacto de elétrons e por espectrometria RMN 1H e ^{13}C . A fragmentação deste composto e os respectivos pico no espectro de massas, mostrados nas Figuras 10 e 11, foram compatíveis com os resultados obtidos por Lê-Van & Pham (1979) e Vyas & Mulchandani (1984) que isolaram o mesmo composto de *Eupatorium coelestinum* e *A. conyzoides*, respectivamente.

Observa-se pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12) a presença de 21 carbonos, sendo que os sinais de quinze carbonos são característicos de flavonóides, os outros cinco picos, referentes aos carbonos das metoxilas, apresentaram absorção de δ 56,74 a δ 62,23. O sinal em δ 177,37 no espectro de carbono (Figura 12) foi atribuído a carbonila sendo este sinal também foi observado pelo experimento de PENDANT com absorção em δ 177,66 de carbono não hidrogenado. Os outros átomos de carbono não hidrogenados, incluindo aqueles onde as metoxilas estão inseridas, podem ser observados do sinal δ 160,76 até o sinal δ 138,12 (Figura 13). As atribuições dos sinais dos átomos de carbono foram concluídas por meio da análise de DEPT e HMBC (Tabela 7).

No espectro de RMN de 1H observa-se sinais correspondente a 20 hidrogênios. Os sinais em δ 3,95 a δ 4,11 integrados para 15 H foram atribuídos às metoxilas. O simpleto em δ 6,09, integrado para dois hidrogênios, refere-se ao grupo metilenodioxí (H-16), o simpleto em δ 6,57 relaciona-se ao H-3 e os dupletos em δ 7,11 e δ 7,06 ($J = 1,7$ Hz) correspondem aos hidrogênios 6' e 2' (Figura 14). As atribuições feitas pelo espectro de RMN de 1H são confirmadas por meio de experimentos de DEPT e HMQC. Pelo DEPT nota-se a presença de três CH (δ 107,04; δ 100,14 e δ 106,19), um CH_2 (δ 102,08) e cinco sinais de CH_3 (δ 62,01 a 56,43) das metoxilas (Figura 15). Pelos dados provenientes de HMQC pode-se verificar a quais carbonos os hidrogênios estão ligados (Figura 16).

No anel C, a substituição do H-3 é característica de flavonóides. O NOE auxiliou na atribuição dos hidrogênios especialmente os hidrogênios 2' e 6'. O H-3 apresentou NOE, indicando sua proximidade espacial, com os hidrogênios

que apresentaram deslocamento químico em δ 7,06 e δ 7,11. O hidrogênio de δ 7,11 quando irradiado apresentou NOE com os hidrogênios das metoxilas 14 e 15 e o H-3, portanto, este hidrogênio só poderia estar ligado ao carbono 6' e o hidrogênio de δ 7,06 ao carbono 2'. Os outros NOEs obtidos para este composto podem ser observados na Tabela 7 e Figura 17.

Os dados obtidos e a atribuição completa dos sinais de C e H, bem como a multiplicidade e as constantes de acoplamento para a fração 128-131 (2) A, foram coerentes com os dados provenientes de literatura (Tabela 8).

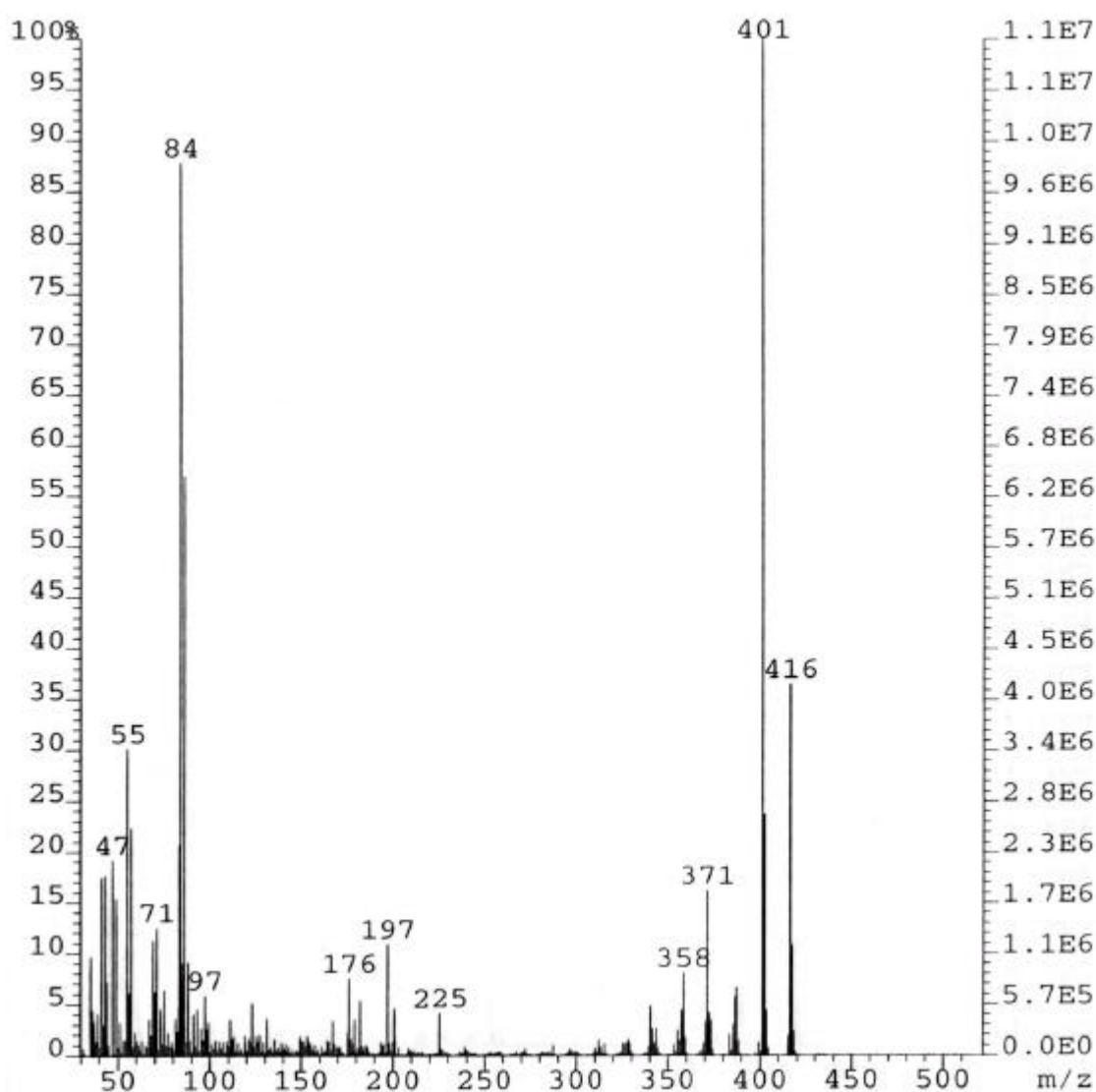


Figura 10. Espectro de massas por impacto de elétrons, obtido para fração 128-131 (2) A.

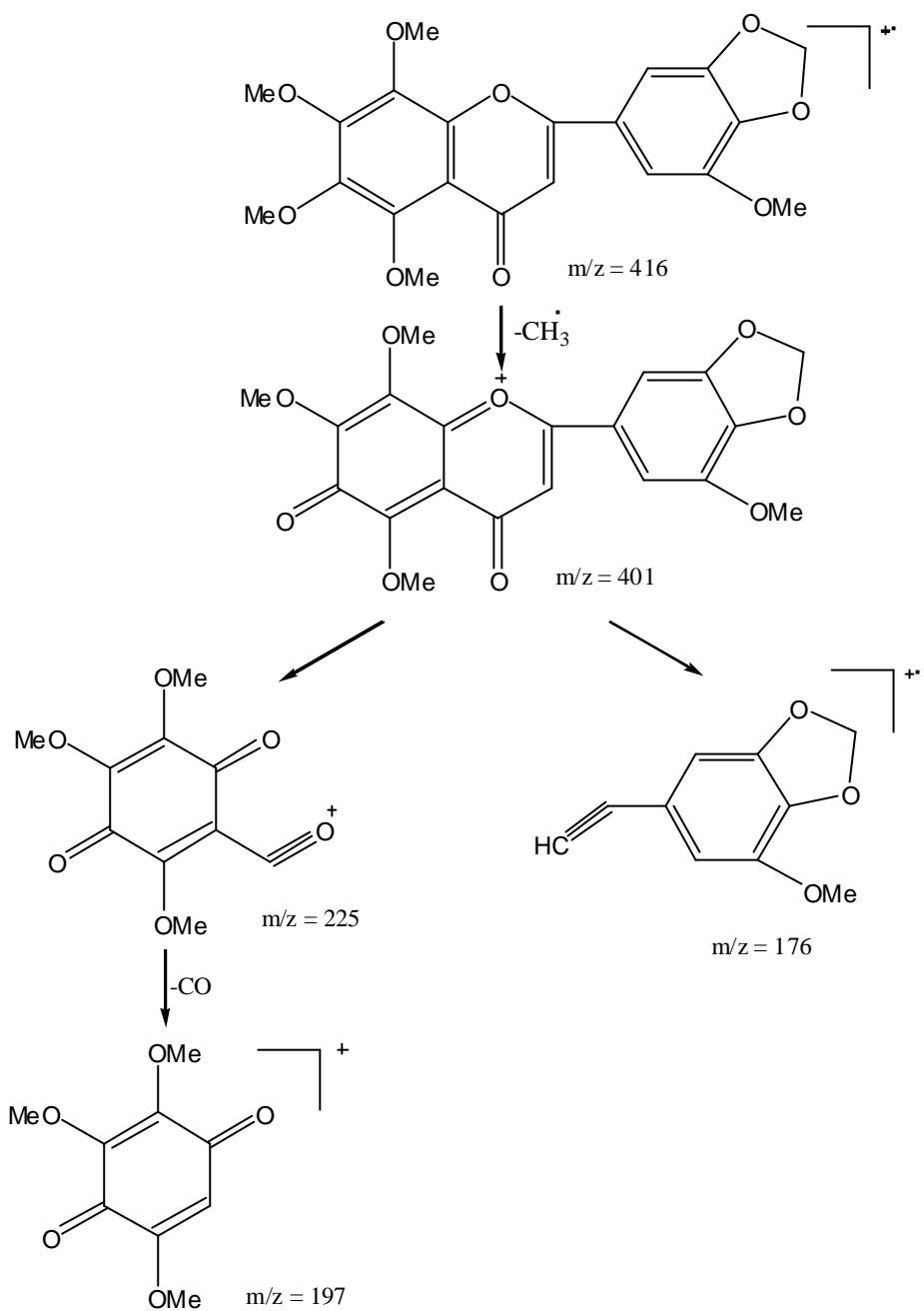


Figura 11. Fragmentação do composto da fração 128-131 (2) A em espectrometria de massas por impacto de elétrons.

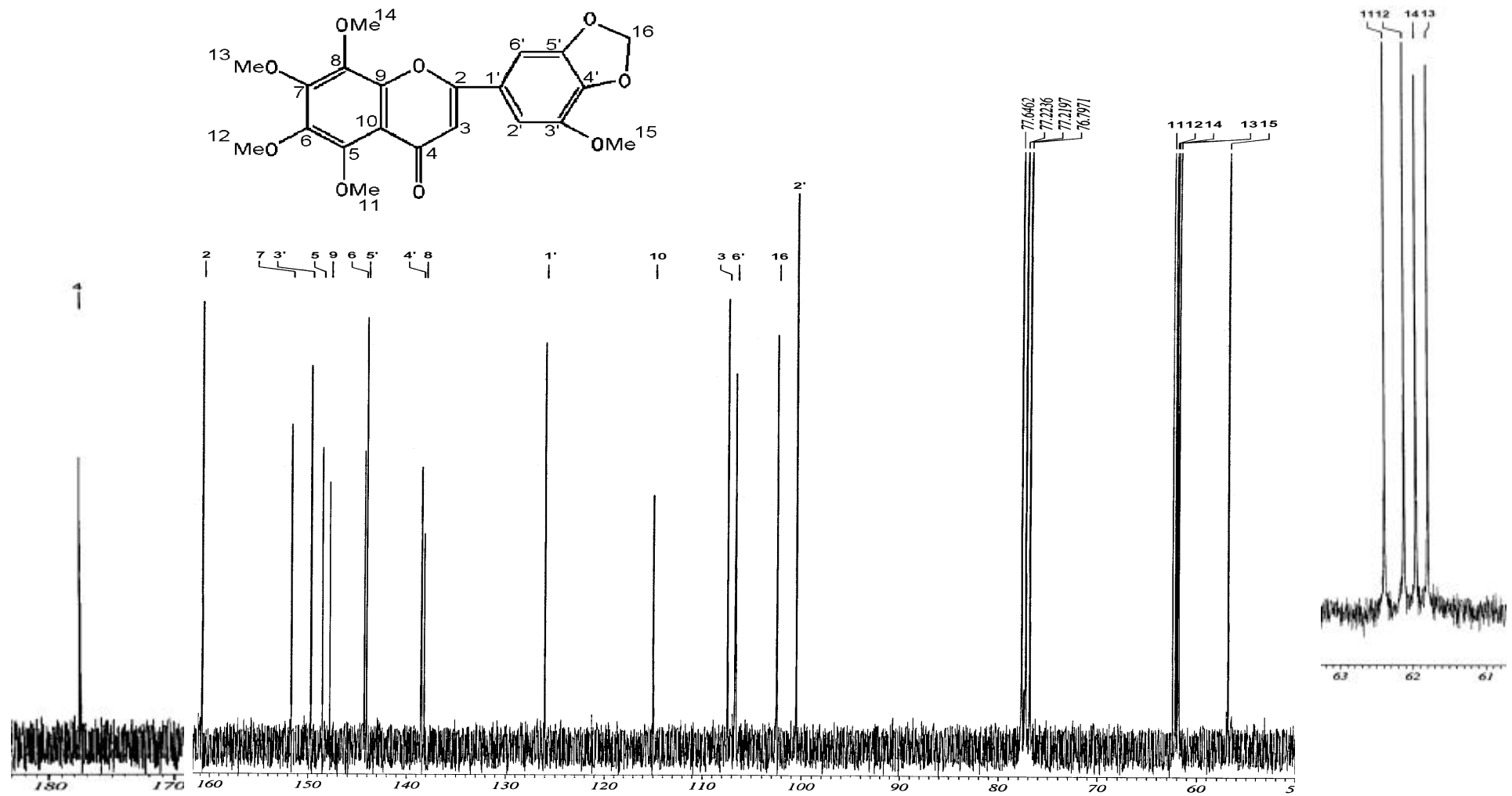


Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) da fração de 128-131 (2) A.

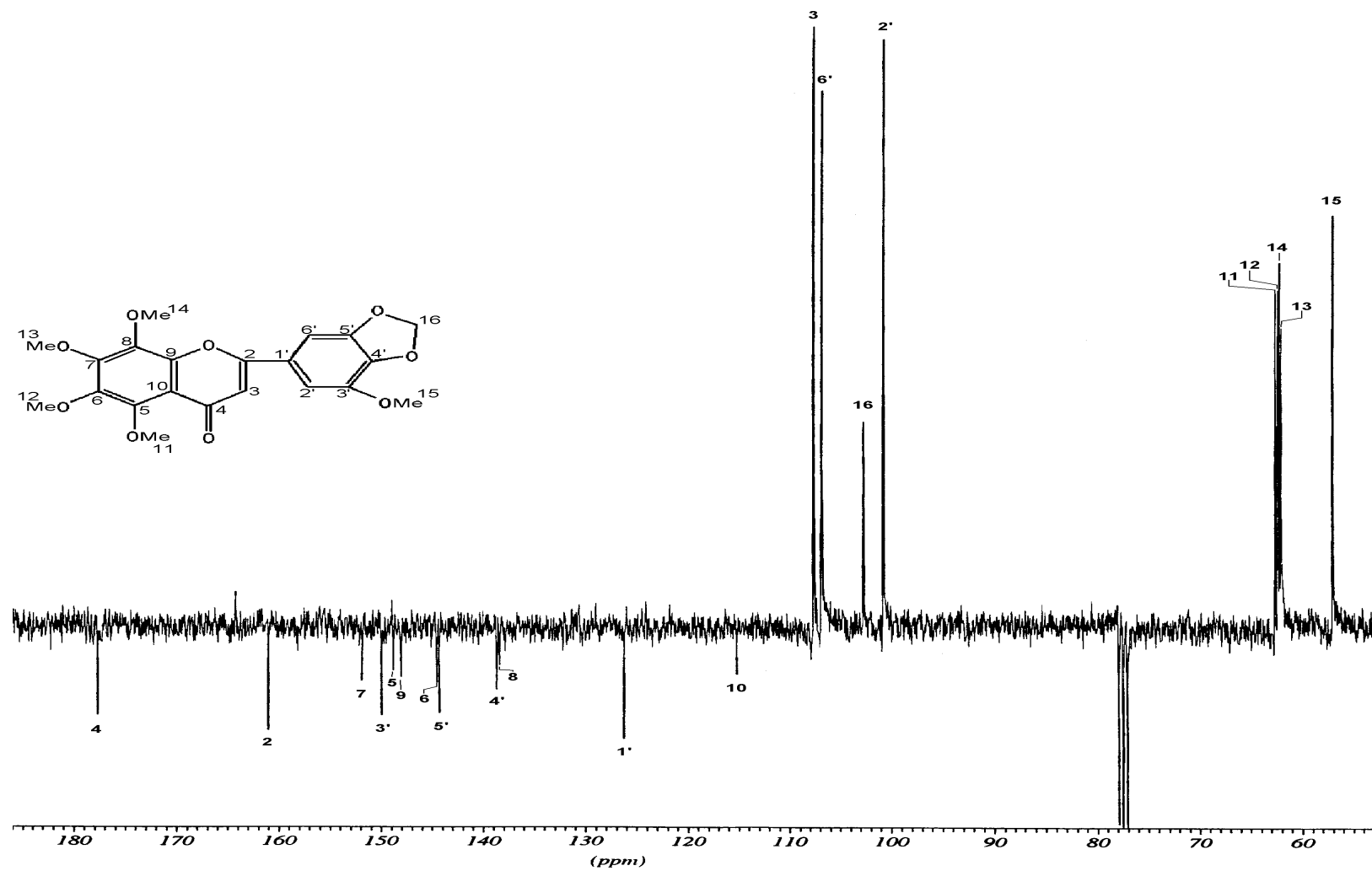


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , experimento de PENDANT) da fração de 128-131 (2) A.

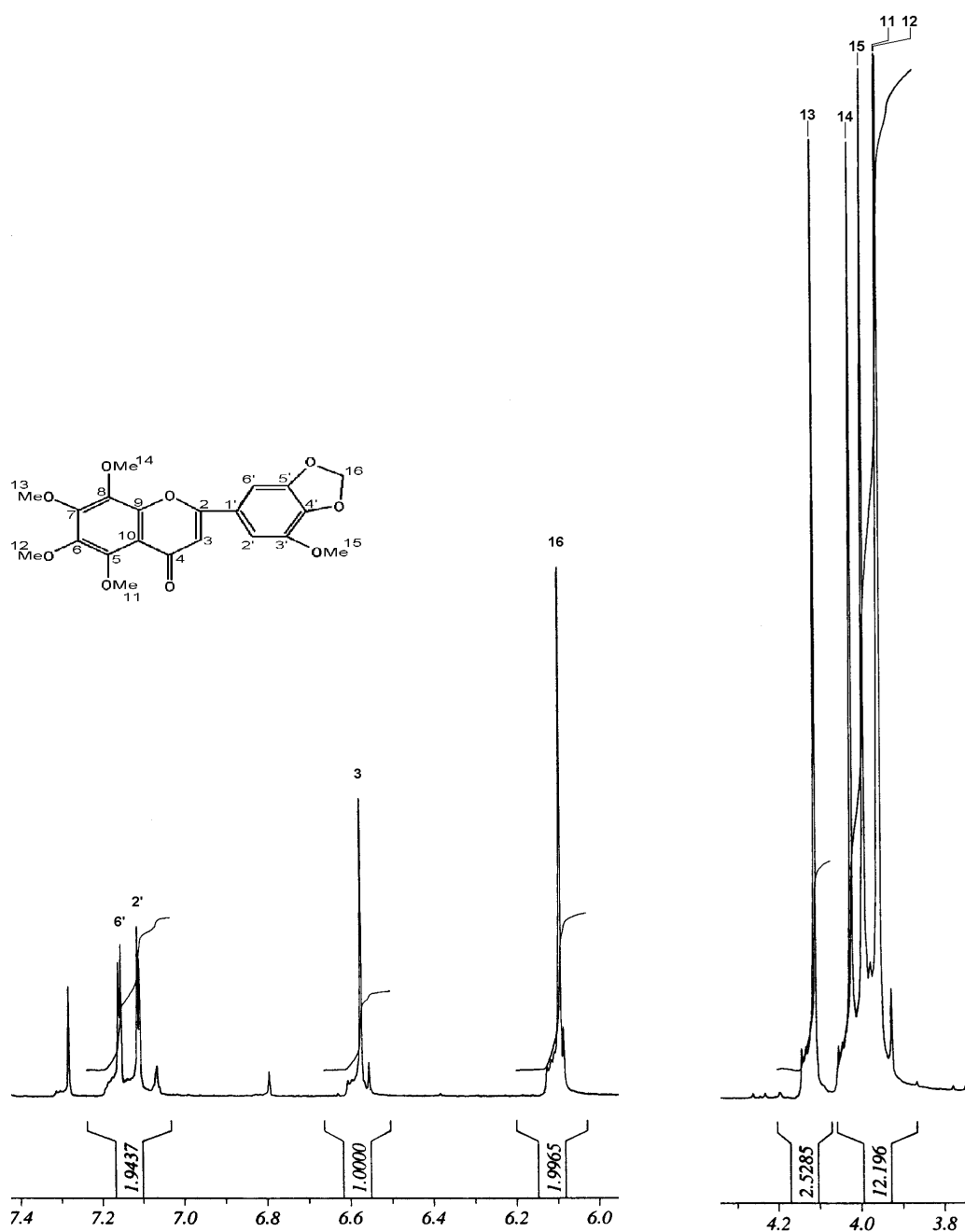


Figura 14. Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) da fração de 128-131 (2)
A.

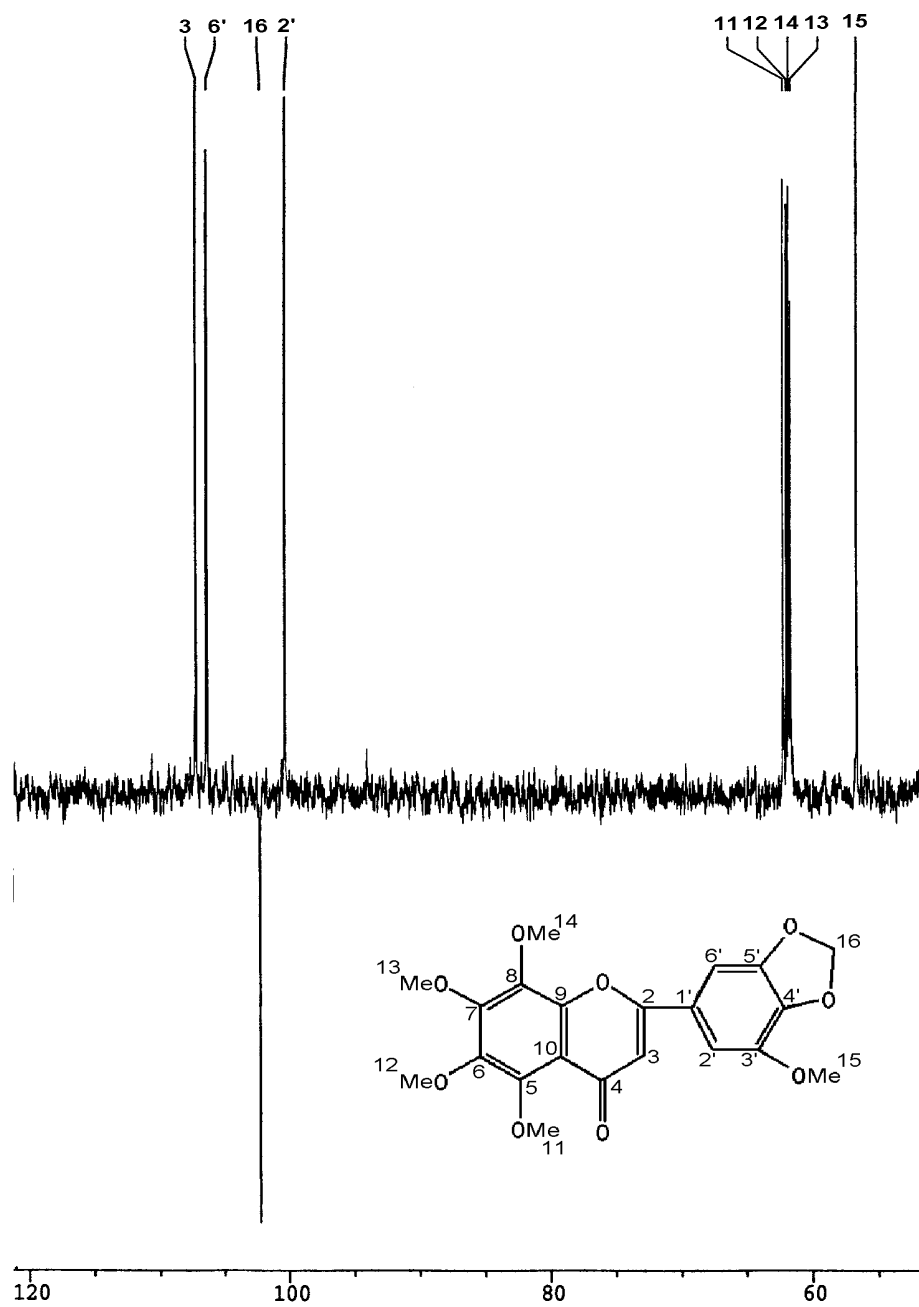


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , experimento DEPT), da fração de 128-131 (2) A.

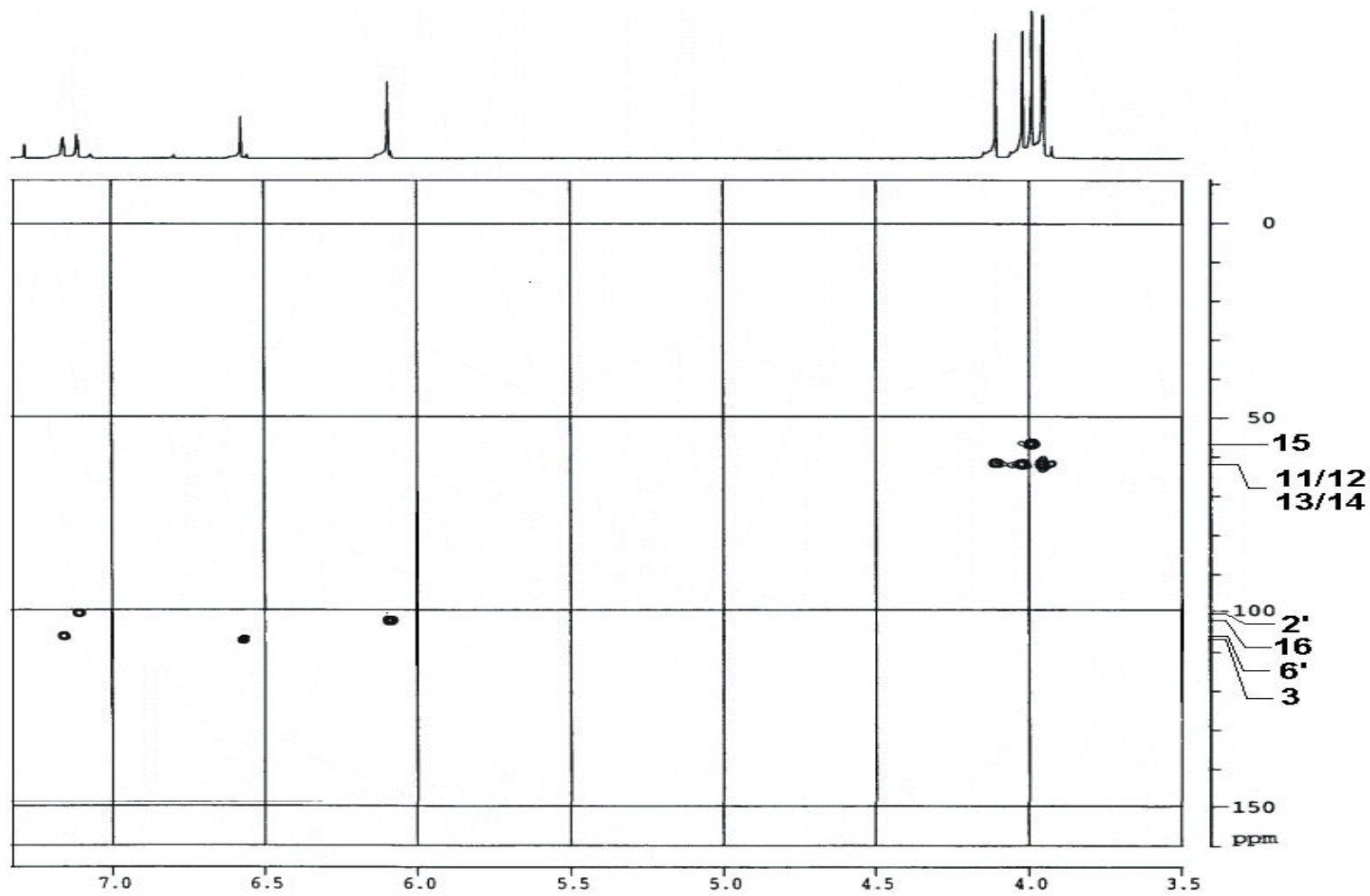


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , experimento HMQC), da fração de 128-131 (2) A.

Tabela 7. Dados de HMBC e NOE obtido para a fração 128-131 (2) A.

Átomo de C	Fração 128-131 (2) A		HMBC	NOE
	δ C	δ H	C para H	
2	160,76		3, 2', 6'	
3	107,41	6,53		2'*, 6'*
4	177,37		3	
5 [§]	148,49		11, 3	
6 [§]	144,25		12	
7	151,61		13	
8	138,12		14	
9	147,75			
10	114,93		3	
11	62,38	3,91		
12	62,11	3,92		
13	61,78	4,07		14
14	61,95	3,98		13, 2'+, 6'+
15	56,82	3,95		
16	102,45	6,05		
1'	125,98		3, 2', 6'	
2'	100,51	7,06	6'	3, 14
3'	149,66		16, 2', 3'	
4'	138,42		16, 2', 3'	
5'	143,99		2', 3'	
6'	106,61	7,11	2'	3, 14, 15

§ as atribuições para estes carbonos podem ser invertidas.

* + igual intensidade.

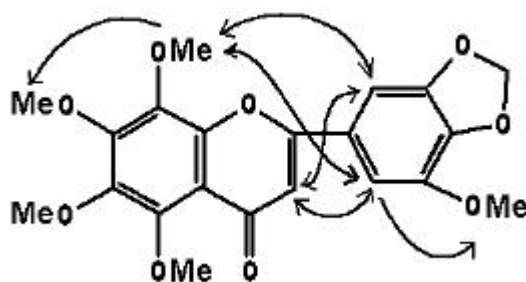


Figura 17. NOE observados para fração 128-131 (2) A.

Tabela 8. Comparação de dados de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) obtidos para fração 128-131 (2) A e dados de literatura RMN de ^{13}C (67 MHz, CDCl_3) e RMN de ^1H (100 MHz, CDCl_3).

Átomo de C	δ C		*** 128-131 (2) A		Lit**	
	*** 128-131 (2) A	Lit.*	δ H - Mult.	J (Hz)	δ H - Mult.	J (Hz)
2	160,76	160,63				
3	107,41	100,38	6,53-s		6,55-s	
4	177,37	177,15				
5	148,49	151,50				
6	144,25	138,34				
7	151,61	147,62				
8	138,12	138,06				
9	147,75	148,38				
10	114,93	114,87				
11	62,38	62,23	3,91-s		3,94-s	
12	62,11	61,95	3,92-s		3,94-s	
13	61,78	61,62	4,07-s		4,08-s	
14	61,95	61,77	3,98-s		4,00-s	
15	56,82	56,74	3,95-s		3,97-s	
16	102,45	102,32	6,05-s		6,06-s	
1'	125,98	125,90				
2'	100,51	107,28	7,06-d	0,05	7,09-d	1,5
3'	149,66	144,17				
4'	138,42	149,61				
5'	143,99	143,88				
6'	106,61	106,70	7,11-d	0,05	7,15-d	1,5

* Segundo Herz et al. (1980).

** Segundo Quijano et al. (1980).

*** Dados obtidos para fração 128-131 (2) A

3.3. Avaliação da atividade inseticida dos compostos da porção cristalizada

Do fracionamento cromatográfico realizado na coluna 2 foram obtidas 31 frações. Destas oito frações apresentaram grau de pureza satisfatório e massa que possibilitassem a realização dos testes biológicos. Com as demais frações não foi possível a realização de testes de toxicidade (Tabela 5).

A substância 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona não apresentou toxicidade nas doses testadas a nenhuma das espécies de insetos até 48 horas após aplicação tópica (Tabela 9).

A cumarina apresentou atividade inseticida para *M. domestica*, *D. hyalinata*, *T. absoluta* e *R. dominica* em todas as avaliações, sendo que só foi detectada toxicidade desta substância a *S. zeamais* 48 horas após a aplicação tópica (Tabela 9). As doses utilizadas nos testes de toxicidade do flavonóide 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona e para obtenção das suas curvas dose-mortalidade variaram em função da massa das espécies de insetos (Tabelas 2 e 10).

Não foi possível estimar as curvas dose-resposta para *S. zeamais*, nas avaliações de 6 e 12 horas e para *M. domestica* em 6 horas após a aplicação devido às baixas mortalidades ocasionadas pelas doses usadas nestas avaliações (Tabela 11).

A toxicidade da cumarina às espécies de insetos foi maior nas avaliações de 24 horas após a aplicação do que nas avaliações de 6 horas após aplicação (Tabela 11). Verificou-se que a ordem crescente de suscetibilidade dos insetos a cumarina foi *R. dominica* < *S. zeamais* < *D. hyalinata* < *M. domestica* < *T. absoluta* (Tabela 11).

Entre as espécies testadas, a curva dose-mortalidade para *S. zeamais* foi a que apresentou a maior inclinação. A maior inclinação da curva dose-mortalidade pode estar associada a menor variabilidade genética da população de *S. zeamais* quando comparando com as populações dos demais insetos com relação a sua suscetibilidade a cumarina. Em função desta menor variabilidade genética há menor segurança da aplicação da cumarina para esta espécie de inseto, ou seja, pequenas variações ou erros de dosagens acarretam grandes variações na mortalidade do *S. zeamais* (Tabela 11).

Observou-se, durante os ensaios toxicológicos, efeito de imobilização, 'knock-down', especialmente em *S. zeamais*, *D. hyalinata* e *T. absoluta*. Em *S. zeamais* observou-se movimentos trêmulos das pernas, ocorrendo, com passar do tempo a redução gradativa dos movimentos culminando com a morte do inseto. Williams et al. (1994), testando a atividade inseticida do composto 2-carboxilbezofurano e suas cumarinas precursoras, observaram que adultos de *Cylas formicarius elegantulus* Summer (Coleoptera: Curculionidae) recobriram movimento após sua aparente morte. O *S. zeamais* apresentou movimentos trêmulos com perda gradativa destes, culminando com a morte do inseto possuindo comportamento semelhante ao de insetos tratados com a cumarina surangin B. A cumarina surangin B, age inibindo a cadeia de transporte de elétrons, provavelmente tendo como sítio de ação o citocromo c oxiredutase (complexo III), com mecanismo similar ao dos β -metoxiacrilatos (Zheng et al., 1998). A progressiva paralisia resulta da despolarização ocorrida nas membranas mitocôndrias que conseqüentemente reduz a capacidade muscular de responder a atividade motora (Zheng et al., 1998) levando a morte do inseto.

Além de inibir a cadeia de transporte de elétrons a cumarina compromete a capacidade destoxificativa do inseto, reduzindo sua tolerância a xenobióticos. Esta se liga de forma reversível ou irreversível ao citocromo P450. A cumarina xantotoxina é metabolicamente ativada na dupla ligação externa do anel furano produzindo uma espécie de radical instável capaz de se ligar covalentemente ao sítio ativo do citocromo P450 (Letteron et al., 1986). Neal & Wu (1994) verificaram que a cumarina apresentou inibição reversível de 50% (I_{50}) da atividade do citocromo P450 de *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae) na concentração de 1200 μ M sendo que as furanocumarinas apresentaram inibição irreversível ou inibição não determinada, com I_{50} variando de 0,4 a >1000 μ M.

Outro mecanismo pelo qual as furanocumarinas podem expressar atividade tóxica se relaciona ao anel furano adicional (Figura 18 A e B). O anel furano interage com o DNA, inativando-o na presença de luz ultravioleta (Figura 18 D). Na ausência de luz ultravioleta estas possuem apenas efeito de deterrência sobre insetos (Berenbaum, 1978). As furanocumarinas angulares (Figura 18 B)

são menos tóxicas que as furanocumarinas lineares (Figura 18 A), devido a posição angular do anel furano que as torna menos capazes de realizar ligações cruzadas com as duplas hélices de DNA (Berenbaum, 1983). Entretanto, devido a ausência do anel furano na cumarina isolada (Figura 18 C), este provavelmente é um mecanismo que não está associado a toxicidade apresentada por esta cumarina.

Tabela 9. Média \pm erro padrão da mortalidade (%) de *Musca domestica*, *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Diaphania nitidalis* e *Tuta absoluta* 6, 12, 24 e 48 horas após aplicação tópica dos compostos 5, 6, 7, 8, 3', 4', 5'- heptametoxiflavona (1); cumarina (2) e 5, 6, 7, 8, 3'- pentametoxi- 4',5'- metilendioxiflavona (3) provenientes do dossel de *Ageratum conyzoides* e na testemunha. 25 \pm 0,5°C, U.R.= 75 \pm 5% e fotofase de 12 horas.

Espécie de inseto	Mortalidade (%)*			
	Testemunha	(1)	(2)	(3)
(6 horas após aplicação tópica)				
<i>M. domestica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	0,00 \pm 0,00 bA	23,33 \pm 3,33 aB	0,00 \pm 0,00 bA
<i>S. zeamais</i>	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aC	0,00 \pm 0,00 aA
<i>R. dominica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	3,33 \pm 3,33 bA	16,67 \pm 6,67 aB	0,00 \pm 0,00 bA
<i>D. hyalinata</i>	0,00 \pm 0,00 bA	6,67 \pm 6,67 bA	63,33 \pm 8,82 aA	0,00 \pm 0,00 bA
<i>T. absoluta</i>	0,00 \pm 0,00 bA	0,00 \pm 0,00 bA	60,00 \pm 5,77 aA	0,00 \pm 0,00 bA
(12 horas após aplicação tópica)				
<i>M. domestica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	0,00 \pm 0,00 bB	23,33 \pm 3,33 aB	0,00 \pm 0,00 bA
<i>S. zeamais</i>	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aB	7,04 \pm 93,53 aC	0,00 \pm 0,00 aA
<i>R. dominica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	3,33 \pm 3,33 bB	23,33 \pm 8,82 aB	0,00 \pm 0,00 bA
<i>D. hyalinata</i>	0,00 \pm 0,00 cA	13,33 \pm 6,67 bA	70,00 \pm 5,77 aA	0,00 \pm 0,00 cA
<i>T. absoluta</i>	0,00 \pm 0,00 bA	10,00 \pm 5,57 bA	60,00 \pm 5,77 aA	0,00 \pm 0,00 bA
(24 horas após aplicação tópica)				
<i>M. domestica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	0,00 \pm 0,00 bB	26,67 \pm 6,67 aC	3,33 \pm 3,33 bA
<i>S. zeamais</i>	0,00 \pm 0,00 aA	0,00 \pm 0,00 aB	10,37 \pm 0,37 aC	0,00 \pm 0,00 aA
<i>R. dominica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	6,67 \pm 3,33 bB	43,33 \pm 14,53 aB	0,00 \pm 0,00 bA
<i>D. hyalinata</i>	0,00 \pm 0,00 cA	16,67 \pm 3,33 bA	68,18 \pm 7,40 aA	0,00 \pm 0,00 cA
<i>T. absoluta</i>	0,00 \pm 0,00 cA	15,00 \pm 5,00 bA	66,67 \pm 6,67 aA	3,33 \pm 3,33 cA
(48 horas após aplicação tópica)				
<i>M. domestica</i>	0,00 \pm 0,00 bA	0,00 \pm 0,00 bB	33,33 \pm 3,33 aB	3,33 \pm 3,33 bA
<i>S. zeamais</i>	0,00 \pm 0,00 bA	0,00 \pm 0,00 bB	13,09 \pm 2,56 aC	0,00 \pm 0,00 bA
<i>R. dominica</i>	0,00 \pm 0,00 cA	13,33 \pm 6,67 bA	68,89 \pm 11,6 aA	0,00 \pm 0,00 cA
<i>D. hyalinata</i>	0,00 \pm 0,00 cA	20,00 \pm 5,77 bA	68,18 \pm 7,40 aA	0,00 \pm 0,00 cA
<i>T. absoluta</i>	0,00 \pm 0,00 cA	15,00 \pm 5,00 bA	70,00 \pm 5,77 aA	3,33 \pm 3,33 cA

* As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem, entre si, pelo teste Scott - Knott a $p < 0,05$.

Tabela 10. Doses (μg da substância/ mg de inseto) usadas em aplicação tópica para obtenção das curvas dose-mortalidade da cumarina para larvas de *Tuta absoluta*, *Musca domestica*, *Diaphania nitidalis* e adultos de *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica*.

Espécie de inseto				
<i>M. domestica</i>	<i>S. zeamais</i>	<i>D. hyalinata</i>	<i>T. absoluta</i>	<i>R. dominica</i>
0,02	0,16	0,17	0,08	2,55
0,05	0,32	0,83	0,12	5,10
0,11	0,80	1,17	0,17	12,76
0,23	1,59	1,67	0,42	25,51
0,29	2,07	4,17	0,83	33,16
0,36	2,55	8,33	1,08	40,82
0,45	3,18	10,83	1,33	51,02
1,17	4,14	13,33	1,66	—
1,44	5,09	16,67	—	—
1,80	—	—	—	—

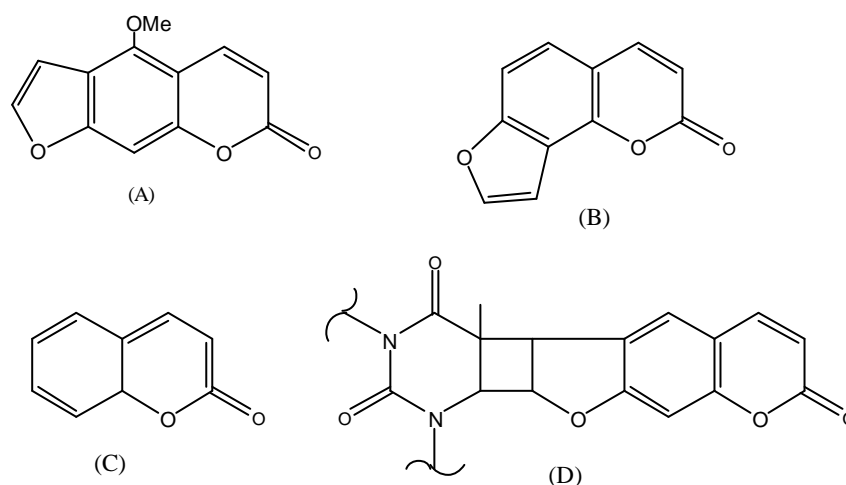


Figura 18. Diferença estrutural entre a cumarina (C), as furanocumarinas lineares (A) e as furanocumarinas angulares (B). Representação do mecanismo de ação, ligação ao DNA, das furanocumarinas (D).

Tabela 11. Equações DL₅₀ e DL₉₀, Qui-quadrado (χ^2) e probabilidade em 6,12 e 24 horas após a aplicação tópica da cumarina em larvas de *Tuta absoluta*, *Musca domestica*, *Diaphania nitidalis* e adultos de *Sitophilus zeamais* e *Rhyzopertha dominica*. 25± 0,5°C, U.R.= 75 ± 5% e fotofase de 12 horas.

Espécie de inseto	Equações*		DL ₅₀ (µg/g)**	DL ₉₀ (µg/g)**	χ^2	Probabilidade
	a	b (Média ± EPM)				
(6 horas após aplicação tópica)						
<i>R. dominica</i>	0,57	2,76 ± 0,25	39,71 (35,90 - 44,99)	115,18 (88,88 - 173,90)	6,27	0,09
<i>D. hyalinata</i>	3,31	2,73 ± 0,06	4,16 (3,61 - 4,73)	12,23 (10,58 - 14,53)	0,51	0,92
<i>T. absoluta</i>	5,55	2,46 ± 0,17	0,60 (0,53 - 0,68)	1,98 (1,59 - 2,67)	2,15	0,55
(12 horas após aplicação tópica)						
<i>M. domestica</i>	4,42	1,62 ± 0,20	2,28 (1,73 - 3,44)	14,07 (7,81 - 36,00)	2,97	0,60
<i>R. dominica</i>	1,21	2,87 ± 0,18	20,82 (18,70 - 23,08)	58,04 (49,40 - 71,65)	3,17	0,37
<i>D. hyalinata</i>	3,46	2,65 ± 0,07	3,80 (3,27 - 4,34)	11,54 (9,95 - 13,78)	0,75	0,86
<i>T. absoluta</i>	5,70	2,42 ± 0,53	0,51 (0,45 - 0,58)	1,73 (1,40 - 2,30)	3,89	0,27
(24 horas após aplicação tópica)						
<i>M. domestica</i>	4,82	2,60 ± 0,09	1,178 (0,98 - 1,52)	3,67 (2,56 - 6,29)	1,18	0,76
<i>S. zeamais</i>	2,54	3,16 ± 0,25	6,00 (5,42 - 6,76)	15,23 (12,49 - 19,93)	3,74	0,29
<i>R. dominica</i>	2,46	2,37 ± 0,26	11,82 (10,07 - 13,59)	42,94 (34,67 - 50,30)	6,93	0,07
<i>D. hyalinata</i>	4,26	2,14 ± 0,09	2,21 (1,75 - 2,64)	8,72 (7,31 - 10,92)	0,52	0,92
<i>T. absoluta</i>	5,86	2,42 ± 0,11	0,44 (0,39 - 0,49)	1,49 (1,26 - 1,81)	2,67	0,62

*Y = mortalidade (probite), X = logaritmo da dose (µg de substância/ mg de massa do inseto).

** Os valores entre parênteses correspondem aos intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

EPM = Erro-padrão da média

3.4. Fracionamento da porção oleosa do extrato bruto de *A. conyzoides* e avaliação inseticida das frações obtidas

A porção oleosa do extrato hexânico (Tabela 3) foi fracionada em coluna filtrante (Tabela 12) sendo obtidas quatorze frações. As frações CF 2-3 A, CF 11-12 A e CF 13-15 A (Tabela 12) apresentaram diversas manchas em cromatografia de camada delgada (CCD) ou possuíam pouca quantidade de material para realização dos testes de toxicidade e posteriores fracionamentos em colunas.

As frações CF 2-3 B, CF 16 e CF 17 provenientes da coluna filtrante (Tabela 12) não apresentaram toxicidade a *D. hyalinata* e *D. nitidalis* (Tabela 13) até 48 horas após a aplicação tópica.

As frações CF 4-6, CF 7, CF 8-9, CF 10, CF 11-12 e CF 13-15 B causaram mortalidades de 66,67 a 90% a *D. hyalinata* nas quatro avaliações. As frações CF 4-6, CF 7, CF 10 e CF 11-12 B apresentaram as maiores toxicidades a *D. nitidalis* (mortalidades de 80 a 100%), seguidas pela fração CF 8-9 (36,36 a 60% de mortalidade). A mortalidade causada pela fração CF 13-15 B a *D. nitidalis* só diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) da ocorrida na testemunha apenas na avaliação de seis horas após aplicação tópica (Tabela 13). Das frações da coluna filtrante apenas a fração CF 13-15 B foi submetida ao isolamento de seus constituintes ativos. As demais frações que apresentaram atividade não possuem cumarina e o flavonóide isolado da fração CF 13-15 B, fato constatado por cromatografia de camada delgada. A toxicidade exibida por estas frações provavelmente se deve a presença de outros compostos com ação inseticida (Tabela 13).

Tabela 12. Frações, solvente de eluição, massa das frações obtidas por fracionamento em coluna filtrante do extrato hexânico de *Ageratum conyzoides*.

Frações	Solvente de eluição	Massa (g)
CF 1	H: (Puro)	0,430
CF 2 - 3 A	H: (Puro)	0,100
CF 2 - 3 B	H: (Puro)	30,832
CF 4 - 6	H: (Puro)	14,710
CF 7	H: EE (100: 0,5)	7,146
CF 8 - 9	H: EE (100: 0,5)	2,050
CF 10	H: EE (100: 0,5)	2,270
CF 11 - 12 A	H: EE (100: 0,5)	0,168
CF 11 - 12 B	H: EE (100: 0,5)	9,710
CF 13 - 15 A	EE: (Puro)	0,140
CF 13 - 15 B	EE: (Puro)	9,487
CF 16	EE: (Puro)	0,128
CF 17	EE: (Puro)	0,112
CF 18	EE: (Puro)	0,111
Total recuperado		77,394

H = Hexano, EE = Éter dietílico, Me = Metanol.

Tabela 13. Média \pm erro padrão das mortalidades (%) de *Diaphania hyalinata* e *Diaphania nitidalis* 6, 12, 24 e 48 horas após aplicação tópica de nove frações proveniente da coluna filtrante do extrato hexânico de *Ageratum conyzoides* e testemunha. $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, U.R.= $75 \pm 5\%$ e fotofase de 12 horas.

Tratamento	Tempo após aplicação (horas)*			
	6	12	24	48
<i>Diaphania hyalinata</i>				
Testemunha	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	1,67 \pm 1,67 aB
CF 2 - 3 B	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	3,33 \pm 3,33 aB
CF 4 - 6	66,67 \pm 3,33 aA	76,67 \pm 8,82 aA	86,67 \pm 6,67 aA	90,00 \pm 5,77 aA
CF 7	70,00 \pm 10,00 aA	86,67 \pm 8,82 aA	86,67 \pm 8,82 aA	86,67 \pm 8,82 aA
CF 8 - 9	83,33 \pm 12,02 aA	83,33 \pm 12,02 aA	83,33 \pm 12,02 aA	83,67 \pm 12,02 aA
CF 10	90,00 \pm 10,00 aA	90,00 \pm 10,00 aA	90,00 \pm 10,00 aA	90,00 \pm 10,00 aA
CF 11 - 12 B	70,00 \pm 5,57 aA	73,33 \pm 8,82 aA	73,33 \pm 8,82 aA	80,00 \pm 5,57 aA
CF 13 - 15 B	66,67 \pm 20,28 aA	66,67 \pm 20,28 aA	66,67 \pm 20,28 aA	70,00 \pm 20,82 aA
CF 16	3,33 \pm 3,33 aB	3,33 \pm 3,33 aB	3,33 \pm 3,33 aB	13,33 \pm 8,82 aB
CF 17	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	0,00 \pm 0,00 aB	3,33 \pm 3,33 aB
<i>Diaphania nitidalis</i>				
Testemunha	0,00 \pm 0,00 aC	1,67 \pm 1,67 aC	1,67 \pm 1,67 aC	5,18 \pm 2,89 aC
CF 2 - 3 B	10,00 \pm 5,77 aC	10,00 \pm 5,77 aC	16,67 \pm 6,67 aC	30,00 \pm 11,55 aC
CF 4 - 6	83,33 \pm 3,33 aA	83,36 \pm 3,33 aA	90,00 \pm 0,00 aA	90,00 \pm 0,00 aA
CF 7	80,00 \pm 10,00 aA	86,67 \pm 6,67 aA	96,67 \pm 3,33 aA	100,00 \pm 0,00 aA
CF 8 - 9	36,37 \pm 16,17 aB	53,33 \pm 8,82 aB	53,33 \pm 8,82 aB	60,00 \pm 5,77 aB
CF 10	83,33 \pm 12,02 aA	83,33 \pm 12,02 aA	86,67 \pm 13,33 aA	86,67 \pm 13,33 aA
CF 11 - 12 B	86,66 \pm 6,67 aA	86,67 \pm 6,67 aA	86,67 \pm 6,67 aA	86,67 \pm 6,67 aA
CF 13 - 15 B	26,67 \pm 14,53 aB	26,67 \pm 14,53 aC	26,67 \pm 14,53 aC	33,33 \pm 8,82 aC
CF 16	13,33 \pm 8,82 aC	13,33 \pm 8,82 aC	16,67 \pm 8,82 aC	23,33 \pm 14,53 aC
CF 17	0,00 \pm 0,00 aC	0,00 \pm 0,00 aC	0,00 \pm 0,00 aC	16,67 \pm 3,33 aC

* As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem, entre si, pelo teste de Scott - Knott a $p < 0,05$.

3.4.1. Isolamento e identificação de ácidos graxos na fração CF 4 - 6 B

A separação cromatográfica da fração CF 4-6, proveniente da coluna filtrante, resultou no isolamento da fração Al (1) com massa de 0,342 g e consistência oleosa (Tabela 14). O espectro de infravermelho desta fração mostrou tratar-se de ácidos graxos apresentando absorções características em 3450 (ν O-H), 3010 (ν =C-H), 2959 (ν C-H), 2927 e 2854 (ν CH₃), 1709 (ν C=O), 1618 (ν C=C), 1458 e 1411 (δ C-O-H), 1269 (ν C-O), 921 (δ O-H) e 722 (δ_{as} CH₂) (Figura 19).

A fração Al (1), não foi estudada para se determinar quais os tipos de ácido graxos compunham esta fração, entretanto, verifica-se, pelo espectro no infravermelho, a presença de insaturação em 3010 cm⁻¹ sendo que os ácidos graxos com uma, duas ou três funções alquenos são comuns. Os ácido graxos com 18 carbonos com geometria cis em cada dupla ligação são os mais abundantes (Richey Júnior, 1986). Não foi encontrada literatura que fizesse referência a ácidos graxos isolados de *A. conyzoides*. Estes não possuem atividade inseticida e são constituintes naturais de óleos e vegetais.

Tabela 14. Frações, solvente de eluição e massa das frações obtidas por fracionamento em coluna da fração CF 46 proveniente da coluna filtrante.

Frações	Solvente de eluição	Massa (g)
1 - 6 (1)	H (Puro)	0,060
7 - 15 (1)	H (Puro)	0,115
16 - 22 (1)	H (Puro)	0,080
23 - 35 (1)	H (Puro)	0,151
36 - 49 (1)	H (Puro)	0,242
50 - 58 (1)	H (Puro)	0,236
59 - 60 (1)	H (Puro)	4,952
Et (1)	EE (Puro)	8,244
Al (1)*	Me (Puro)	0,342
Total recuperado		14,422

* Fração onde foi obtido composto ácidos graxos.

H = Hexano, EE = Éter dietílico, Me = Metanol.

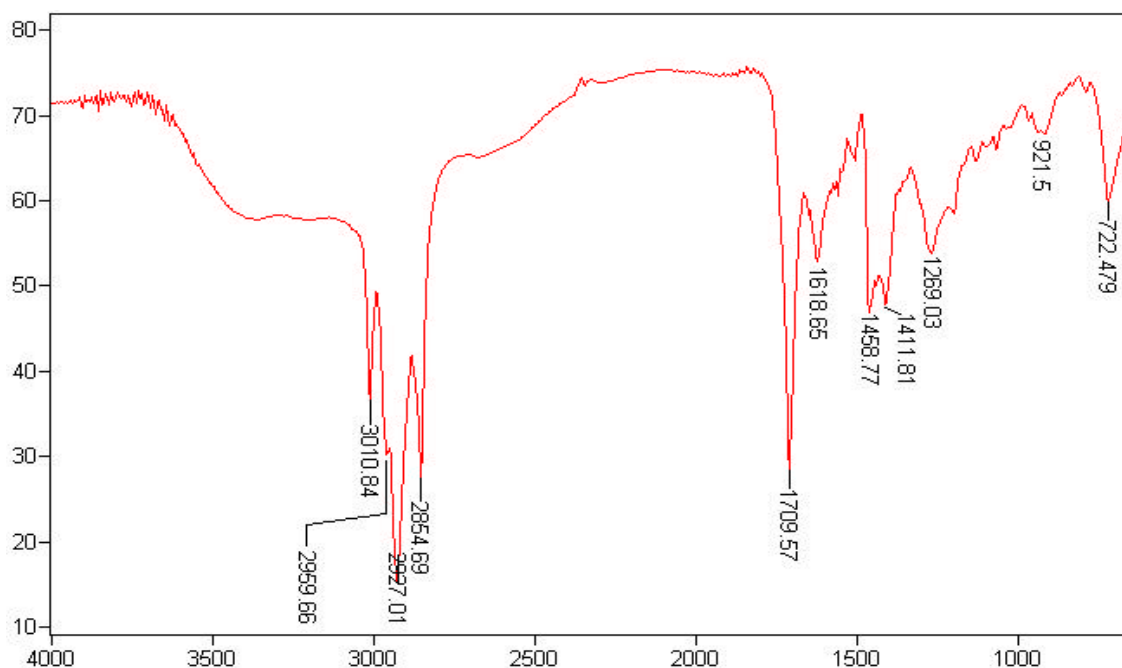


Figura 19. Espectro de infravermelhos obtido para a fração Al (1).

3.4.2. Isolamento, identificação química e avaliação da atividade inseticida dos constituintes da fração CF 13 - 15 B

3.4.2.1. Isolamento e identificação

A fração CF 13-15 B (Tabela 12), sofreu fracionamento cromatográfico resultando em 16 frações (Tabela 15), dentre estas, a fração 269-330 (3) A com massa de 0,463 g, foi obtida pura. Esta fração apresentou coloração amarelada, ponto de fusão variando de 115,3 a 116,9°C e $R_f = 0,5$ em mistura de solvente éter dietílico: metanol (15: 2).

A fração 353-358 (3) da coluna anterior (Tabela 15), foi novamente fracionada (Tabela 16), obtendo-se 0,311 g de massa, de um cristal levemente amarelo na fração 53-62 (4), de $R_f = 0,51$ em éter dietílico: metanol (15: 2) e temperatura de fusão entre 109 a 115,5°C. Através dos espectros de infravermelho e espectros de ressonância magnética nuclear RMN- ^1H e RMN- ^{13}C identificou-se as frações 269-330 (3) A e 53-62 (4) como sendo o flavonóide 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona. A massa total deste flavonóide é dado pela soma das frações de 136-268 (3) a 269-330 (3) B e 18-52 (4) a 63-102 (4) (Figura 5).

Tabela 15. Frações, solvente de eluição, e massa das frações resultantes do fracionamento da fração CF 13-15 B (Proveniente da coluna filtrante).

Frações	Solvente de eluição	Massa (g)
1 - 2 (3)	H: EE (10: 4)	0,083
3 - 7 + 9 (3)	H: EE (10: 4)	0,176
8 (3)	H: EE (10: 4)	0,464
10 - 11 (3)	H: EE (10: 4)	0,156
12 - 135 (3)	H: EE (10: 4)	0,448
136 - 268 (3)	H: EE (10: 4)	0,492
269 - 330 (3) A*	H: EE (10: 4)	0,464
269 - 330 (3) B	H: EE (10: 4)	0,244
331 - 339 (3)	H: EE (10: 4)	0,594
340 - 344 (3)	H: EE (10: 4)	0,715
345 - 349 (3) A	H: EE (10: 4)	0,583
345 - 349 (3) B	H: EE (10: 4)	0,025
350 - 352 (3)	H: EE (10: 4)	0,053
353 - 358 (3)	H: EE (10: 4)	2,995
359 - 360 (3)	H: EE (10: 4)	0,048
Me (3)	Me (Puro)	1,851
Total recuperado	-	9,389

H = Hexano, EE = Éter dietílico, Me = Metanol.

* Fração onde foi obtido composto puro.

Tabela 16. Frações, solvente de eluição e massa das frações resultantes do fracionamento da fração 353-358 (3).

Frações	Solvente de eluição	Massa (g)
1 - 4 (4)	H: EE (1: 2)	0,053
5 (4)	H: EE (1: 2)	0,002
6 (4)	H: EE (1: 2)	0,016
7 - 17 (4)	H: EE (1: 2)	0,036
18 - 52 (4)	H: EE (1: 2)	0,903
53 - 62 (4)*	H: EE (1: 2)	0,311
63 - 102 (4)	H: EE (1: 2)	1,603
103 - 120 (4)	Me (Puro)	0,036
Total recuperado		2,960

H = Hexano, EE = Éter dietílico, Me = Metanol.

* Fração onde foi obtido composto puro.

O espectro de infravermelho para esta fração foi muito semelhante ao espectro da fração 128-131 (2) A apresentando absorções em 2992, 2941 e 2838 cm^{-1} (ν C-H₃), 2890 cm^{-1} (ν_s C-H₃), 1643 cm^{-1} (ν C=O), 1589, 1570 e 1551 cm^{-1} (ν C=C arom.), 1247 e 1040 cm^{-1} (ν_{as} C-O-C), (Figura 20).

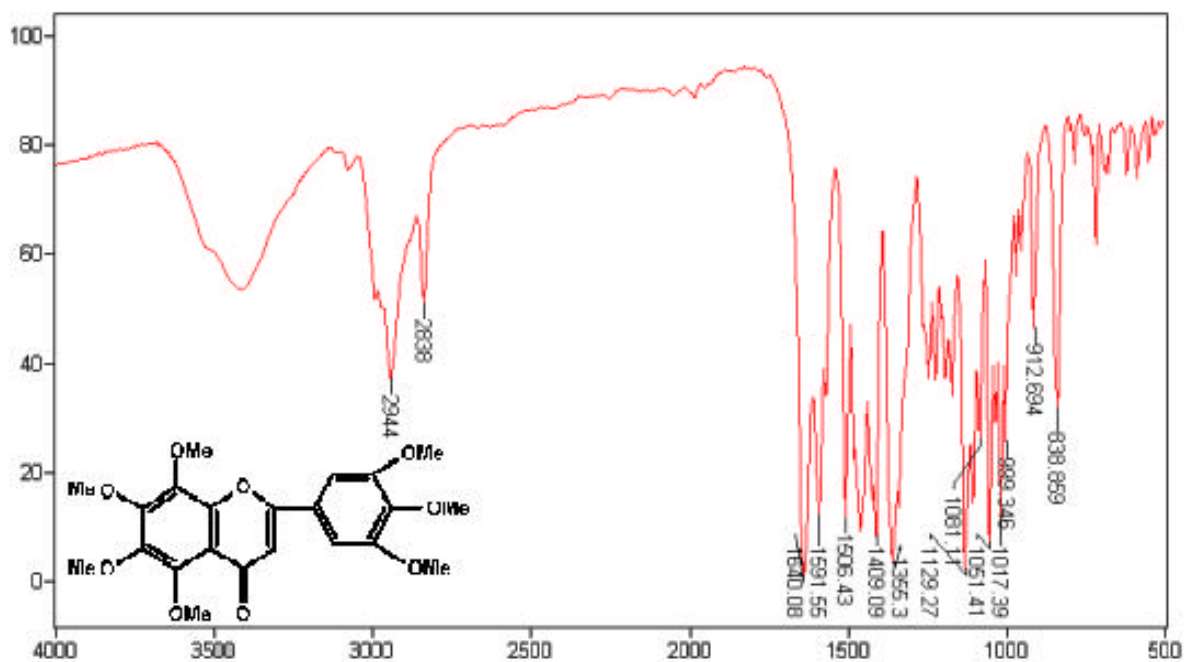


Figura 20. Espectro de infravermelho obtido para as frações de 269-330 (3) A e 53-62 (4).

O espectro de RMN de ^1H foi muito semelhante ao espectro de RMN de ^1H obtido para a fração 128-131 (2) A, sendo observadas absorções correspondentes a 24 hidrogênios. Os sinais entre δ 3,92 e δ 4,10 foram integrados para 21 hidrogênios e atribuídos a sete metoxilas. Devido a simetria deste anel aromático os hidrogênios em H-2' e H-6' apareceram como um simpleto em δ 7,15, mesma região dos hidrogênios 2' e 6' do composto isolado das frações 124 (2) A a 152-160 (2) B. O simpleto em δ 6,63 corresponde ao H-3 (Figura 21). As atribuições feitas foram reforçadas pelo espectro obtido por experimento DEPT, este revelou a presença de três sinais CH e sete sinais de

CH₃ das metoxilas (Figura 22). As atribuições obtidas para os hidrogênios 2' e 6' bem como sua comparação com dados de literatura (Tabela 17), não deixam dúvidas com relação a determinação estrutural e ao padrão de substituição desta molécula, entretanto, as atribuições dos sinais aos respectivos átomos, principalmente aos átomos de carbono, não podem ser feitas com precisão havendo a necessidade da realização de outros experimentos como HMBC e NOE.

Foi constatada a presença de vinte e dois átomos de carbono, sendo que quinze destes carbonos são característicos de flavonóides e podem ser observado pelo espectro de RMN de ¹³C (Figura 23). O carbono 2 apresentou deslocamento químico em δ 161,00; o carbono 3 em δ 107,86 e o carbono 4 em δ 177,56 (Figura 23). As metoxilas apresentaram deslocamento químico de δ 55 a δ 65.

Tabela 17. Comparação de dados de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) obtidos para as frações 269-330 (3) A e 53-62 (4) e dados de literatura RMN de ¹H (100 MHz, CDCl₃).

Proton	Obt. Fraç. 128-131 (2) A		Lit.*	
	δ H	Integração - Mult.	δ H	Integração - Mult.
H-3	6,63	1 - s	6,62	1 - s
H-2'	7,15	1 - s	7,16	1 - s
H-6'	7,15	1 - s	7,16	1 - s
OMe	3,92	1 - s	3,92	1 - s
	3,94	12 - s	3,95	12 - s
	4,01	1 - s	4,02	1 - s
	4,10	1 - s	4,09	1 - s

* Lê-Van & Pham (1979).

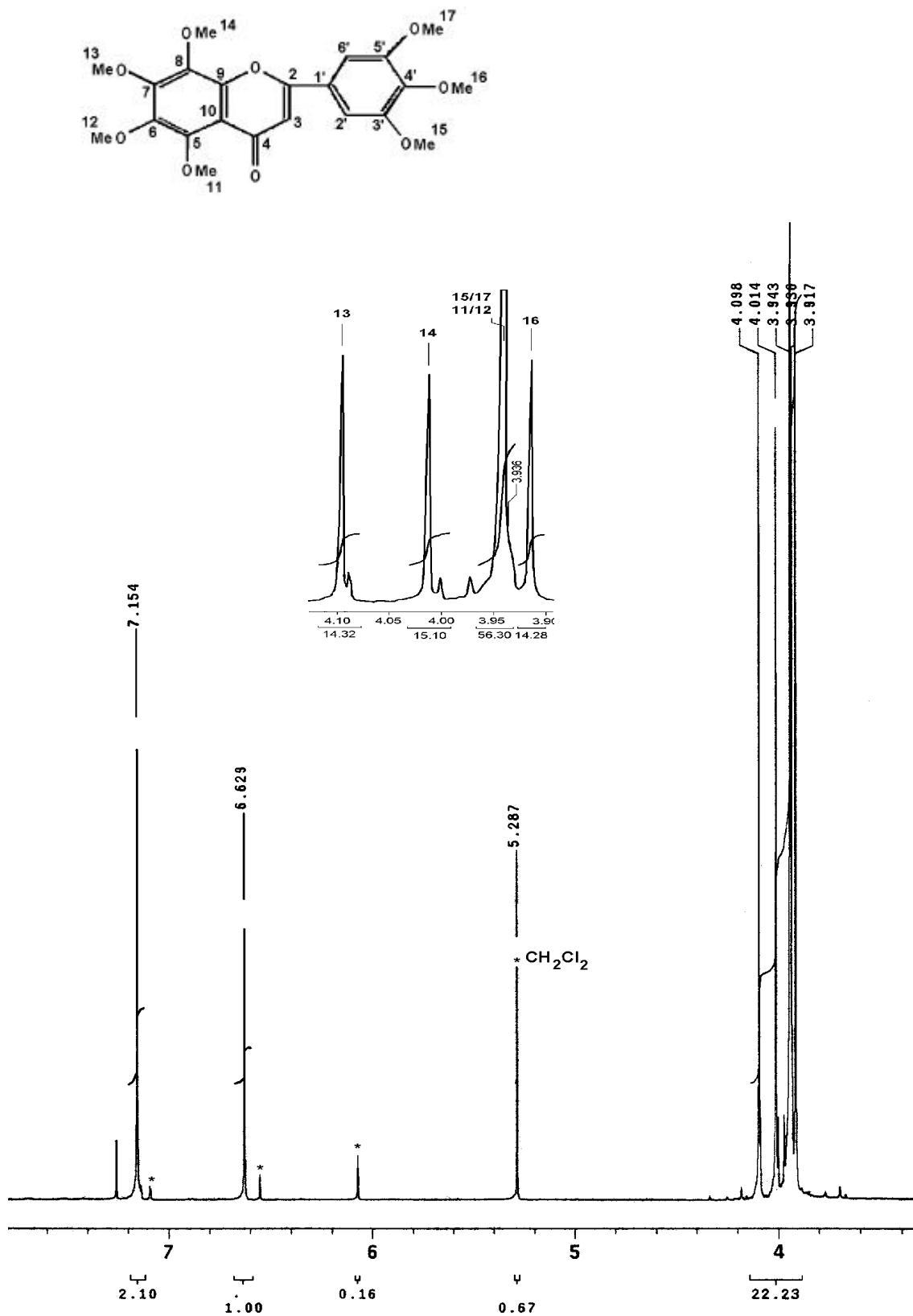
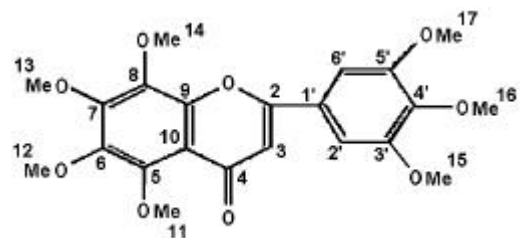


Figura 21. Espectro de RMN¹ H (300 MHz, CDCl₃) obtido para as frações de 269-330 (3) A e 53-62 (4). * impurezas.



CH₃

CH₂

CH

a 11 carbonos protonados

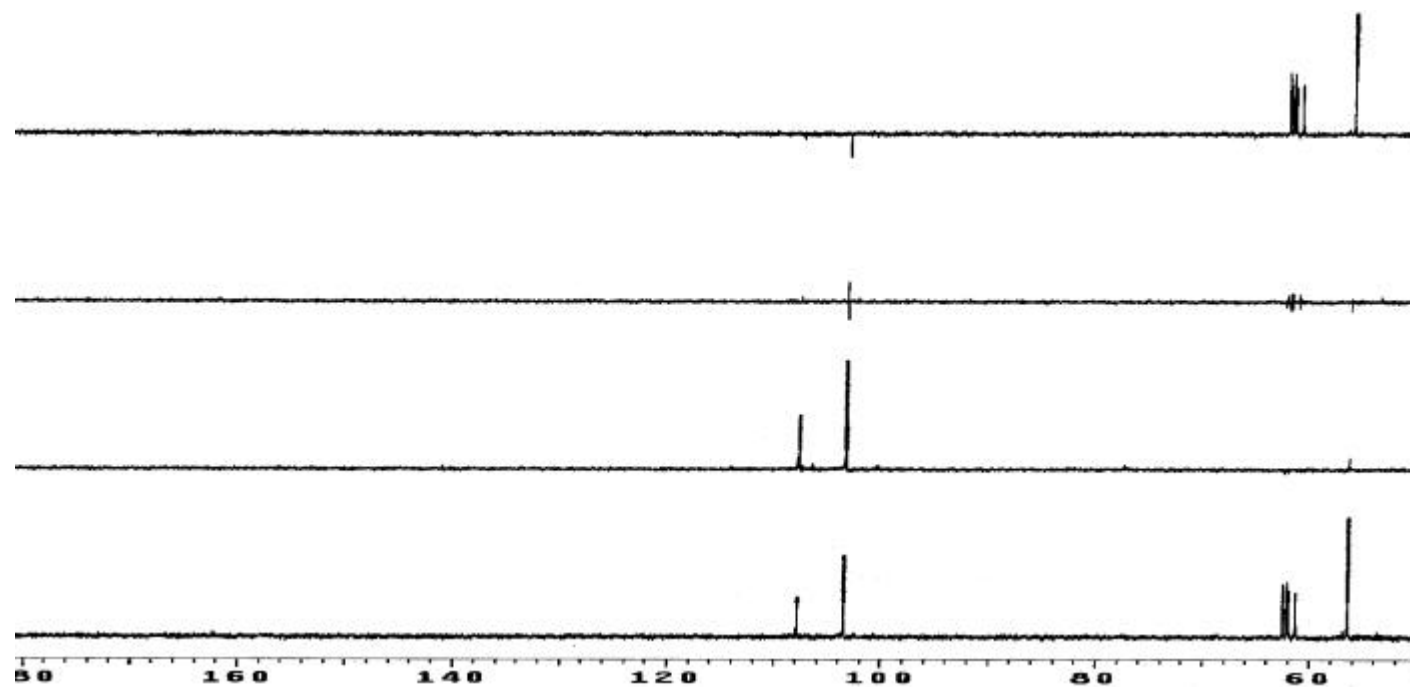


Figura 22. Espectro de RMN de ¹³C (300 MHz, CDCl₃), experimento de DEPT, obtido para as frações de 269-330 (3) A e 53-62 (4).

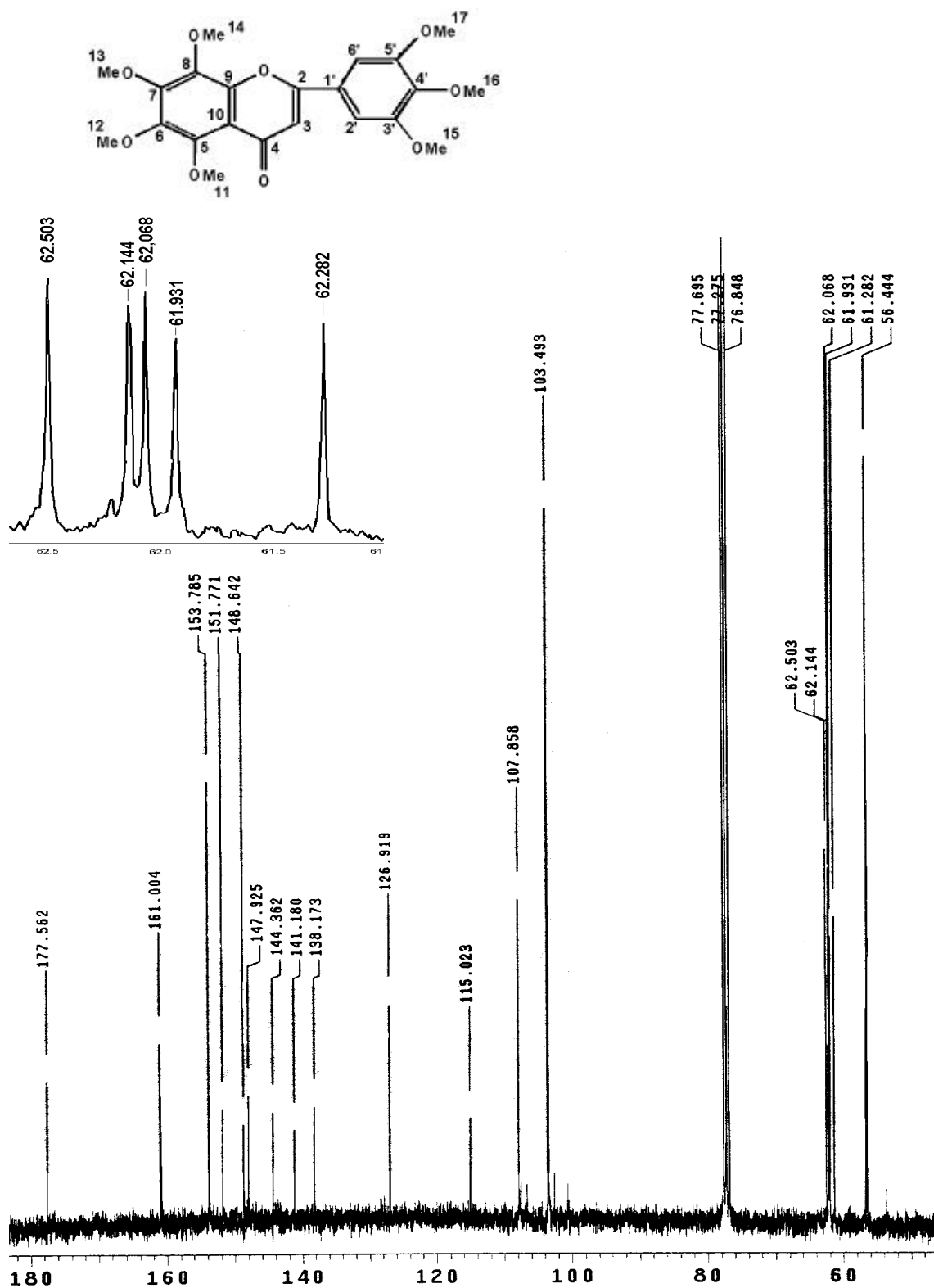


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) obtido para as frações de 269-330 (3) A e 53-62 (4).

3.4.2.2. Avaliação da atividade inseticida dos compostos da fração CF 13-15 B

Não foi avaliada a toxicidade das frações 18-52 (4) e 63-102 (4), recolhidas antes e após a fração 53-62 (4), por estas se apresentarem impuras (Tabela 16). Estas tiveram como principal constituinte, avaliado por cromatografia de camada delgada (CCD), o composto isolado na fração 53-62 (4) e manchas como contaminantes. As cinco frações restantes, 1-4 (4), 5 (4), 6 (4), 7-17 (4) e 103-120 (4) apresentaram diversas manchas em cromatografia de camada delgada (CCD) e foram recolhidas em quantidades insuficiente para realização de testes de toxicidade aos insetos e fracionamentos posteriores apresentando diversas manchas em CCD (Tabela 10).

A substância 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona ocasionou mortalidades de 13,33; 16,67 e 20,00% a *D. hyalinata* após 12, 24 e 48 horas de sua aplicação, 15,00% a *T. absoluta* em 24 e 48 horas após aplicação e 13,33% de mortalidade a *R. dominica* 48 horas após a aplicação tópica, respectivamente. Não detectou-se efeito inseticida deste composto a *M. domestica* e *S. zeamais* (Tabela 9). As diferenças nas mortalidades ocorridas, possivelmente relacionado com as doses utilizadas para *M. domestica* (0,72 µg/g de massa) e *S. zeamais* (2,54 µg/g de massa) serem inferiores às doses utilizadas para *D. hyalinata* (13,33 µg/g de massa) e *R. dominica* (40,78 µg/g de massa). Essas diferenças nas doses utilizadas ocorreram devido a variação na massa corporal dos insetos 0,00098; 0,003; 0,0157 e 0,1108 g respectivamente para *R. dominica*, *D. hyalinata*, *S. zeamais* e *M. domestica*. A diferente toxicidade apresentada pelo composto 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona a *T. absoluta* e *S. zeamais* é provavelmente devido a menor susceptibilidade do *S. zeamais* já que a dose aplicada para *T. absoluta* (1,33 µg/g de massa) foi maior do que a aplicada para *S. zeamais*.

Os flavonóides possuem larga atividade biológica como antioxidantes e são de baixa citotoxicidade (Ng et al., 2000). Este grupo de compostos tem sido relatado como deterrente (Echeverri et al., 1991; Morimoto et al., 2000) e inibidores de crescimento de insetos, provavelmente por interferirem em mecanismos hormonais (Echeverri et al., 1991; Yu, 1995).

Os flavonóides possuem anel catecólico que aparentemente é responsável pela atividade tóxica a insetos (Elliger et al. 1980) sendo que esta atividade varia de acordo com a estrutura química destes compostos (Larsson et al., 1992). Assim espera-se uma grande variação na atividade destes compostos visto representarem um grupo de substâncias com grande diversidade estrutural. Isto possivelmente está associado ao fato de ter sido detectada toxicidade do flavonóide 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona a insetos; enquanto que o mesmo não foi verificado para a 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona.

4. CONCLUSÕES

O extrato hexânico do dossel de *Ageratum conyzoides* tem atividade inseticida.

Foram isolados do extrato hexânico de *A. conyzoides* os flavonóides 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona, 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona e a cumarina.

O flavonóide 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilenodioxiflavona não tem atividade inseticida contra *T. absoluta*, *D. hyalinata*, *S. zeamais* *R. dominica* e *M. domestica*.

O flavonóide 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona tem baixa atividade inseticida para *Tuta absoluta*, *Diaphania hyalinata*, e *Rhyzopertha dominica*.

A cumarina apresenta alta atividade inseticida para *T. absoluta*, *D. hyalinata*, *S. zeamais* *R. dominica* e *Musca domestica*. Sendo que a ordem crescente de susceptibilidade a cumarina é *R. dominica* < *S. zeamais* < *D. hyalinata* < *M. domestica* < *T. absoluta*.

5. BIBLIOGRAFIA

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of insecticide. **Journal Econ. Entomol.**, 18: 265-267, 1925.

ALEIXO, R.C.; LIMA, L.S. & LOPES, A.G. **Criação de mosca doméstica para suplementação alimentar de rãs.** Viçosa, UFV, 1984. (Informe Técnico) 11p.

AMARAL, C.L.F.; OLIVEIRA, J.E.Z. & CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: melhoramento genético.** Viçosa-MG., Departamento de Fitotecnia UFV. 1999. 153p.

BASDEN, E.B. Breeding the house-fly (*Musca domestica* L.) in the laboratory. **Bull. Entomol. Res.**, 37: 381-383, 1947.

BERENBAUM, M. Toxicity of furanocoumarin to armyworms: A case of biosynthetic escape from insect herbivores. **Science**, 201: 532-533, 1978.

BERENBAUM, M. Coumarins and caterpillars: A case for coevolution. **Evolution**, 37: 163-179, 1983.

BORTHAKUR, N.; BARUAH, A.K.S. & BHAGAT, S.D. Search for precocenes in *Ageratum conyzoides* Linn. of North-East India. **J. Indian Chem. Soc.**, 64: 580-581, 1987.

- BREITMAIER, E. & VOELTER, W. **Carbon 13 NMR spectroscopy- High resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry.** New York, VCH Publishers, 1990. 515 p.
- CARBALLO, R.; BASSO, C.; SCATONE, I. & COMOTTO, F. Ensayo para el control de *Scrobipalpula absoluta* (Meyrick) temporada 1980-81. **Rev. Tec.**, 50: 41-46, 1981.
- CASTRO, L. O. & CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo.** Guaíba, Agropecuária, 1995. 196p.
- CORDELL, G.A. Natural products as medicinal and biological agents. In: **Chemistry of the Amazon biodiversity, natural products, and environmental issues.** International Symposium on chemistry and the Amazon. Washington, American Chemical Society. 1995. 315p.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura Rio de Janeiro, IBDF. 1984. 139p.
- CUTLER, G.H. Natural products and their potential in agriculture. In: **Biologically active natural products: Potential use in agriculture.** Meeting of the American Chemical Society. Washington, DC: American Chemical Society. 1988. 483p.
- DURODOLA, J.J. Antibacterial property of crude extracts from herbal wound healing remedy-*Ageratum conyzoides*. **Planta Med.** 32: 388-390, 1977.
- ECHEVERRI, F.; CARDONA, G.; TORRES, F.; PELAEZ, C.; QUINONES, W. & RENTERIA, E. Ermanin: An insect deterrent flavonoid from *Passiflora foetida* resin. **Phytochemistry**, 30: 153-155, 1991.
- ELAKOVICH, S.D. Terpenoids as models for new agrochemicals. In: CUTLER, G.H. **Biologically active natural products: Potential use in agriculture.** Washington, DC: American Chemical Society. 1988. 483p.
- ELLIGER, C.A.; CHAN, B.C. & WEIS, A.C. Flavonóides as larval growth inhibitors. **Naturwissenschaften**, 67: 358-360, 1980.

- ESCOUBAS, P.; LAJIDE, L. & MIZUTANI, J. Insecticidal and antifeedant activities of plant compounds: potential leads for novel pesticides. In: **Natural and engineered pest management agents**. Conference on Engineered Pest Management Agents. Washington, DC. American Chemical Society, 1994. 552p.
- FAGOONEE, I. & UMRIT, G. Anti-gonadotrophic hormones from the goatweed, *Ageratum conyzoides*. **Insect Sci. Appl.**, 4: 373-376, 1981.
- FINNEY, D.J. **Probit analysis**. 3ed. London, Cambridge University, 1971. 333p.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B. & VENDRAMIM, J.D. **Manual de entomologia agrícola**. 2nd ed., São Paulo, Agronômica Ceres, 1988. 649p.
- GONZÁLEZ, A.G.; AGUIAR, Z.E.; GRILLO, T.A.; LUIS, J.G.; RIVERA, A. & CALLE, J. Chromenes from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, 30: 1137-1139, 1991a.
- GONZÁLEZ, A.G.; AGUIAR, Z.E.; GRILLO, T.A.; LUIS, J.G.; RIVERA, A. & CALLE, J. Methoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, 30: 1269-1271, 1991b.
- GRAMAM-SMITH, G.S. **Flies in relation to disease (non-bloodsucking flies)**. Cambridge, Cambridge University, 1913. 292 p.
- GUERRA, M.S. **Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e seus produtos**. Brasília, EMBRATER, 1985. 166p.
- HEDIN, P.A.; MENN, J.J. & HOLLINGWORTH, R.M. **Natural and engineered pest management agents**. Washington, American Chemical Society, 1994. 552p.
- HERZ, W.; GOVIDAN, S.V.; RIESS-MAURER, I.; KREIL, B.; WAGNER, H.; FARKAS, L. & STRELYSKY, J. Isolation and synthesis of two new flavones from *Conoclium coelestinum*. **Phytochemistry**, 19: 669-672, 1980.
- HERZ, W. & KULANTHAIVEL, P. Flavones from *Eupatorium leucolepis*. **Phytochemistry**, 21: 2363-2366, 1982.

- JACCOUD, R.J.S. Contribuição para o estudo farmacognóstico do *Ageratum conyzoides* L. **Rev. Bras. Farm.**, 42: 177-197, 1961.
- KASTURI, T.R.; THOMAS, M. & ABRAHAM, E.M. Essential oil of *Ageratum conyzoides*: isolation and structure of two new constituents. **Indian J. Chem.**, 11: 91-95, 1973.
- LARSSON, S.; LUNDGREN, L.; OHMART, C.P. & GREF, R. Weak responses of pine sawfly larvae to high needle flavonoid concentrations in scots pine. **J. Chem. Ecol.**, 18: 271-282, 1992.
- LETTERON, P.; DESCATOIR, P.; LARREY, D.; TINEL, M. GENEVE, J. & PESSAYRE, D. Inactivation and induction of cytochrome P450 by various psoralens derivats in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 238: 685-692, 1986.
- LÊ-VAN, N. & PHAN, T.V.C. Two new flavones from the *Eupatorium coelestinum*. **Phytochemistry**, 18: 1859-1861, 1979.
- LIANG, WG; HUANG, MD; PROKOPY, RJ & COLI, WM. Influence of citrus orchard ground cover plants on arthropod communities in China: a review. **Agric. Ecosyst. Environ.** 50: 29-37, 1994.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa, H. Lorenzi, 1982. 425p.
- LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: Plantio direto e convencional**. Nova Odessa, Plantarum, 1994. 336p.
- MARQUES-NETO, J.F.; LAPA, A. & KUBOTA, M. Efeitos do *Ageratum conyzoides* Lineé no tratamento da artrose. **Rev. Bras. Reumat.** 28: 34-37, 1988.
- MENDES, A.C.B. & BERTI Filho, E. Biologia da broca das cucurbitáceas *Diaphania nitidalis* (Cramer, 1781) (Lepidoptera: Pyralidae). **An. Soc. Entomol. Bras.**, 10: 141-146, 1981.
- MENUT, C., SHARMA S., & C. LUTHRA. Aromatic plants of tropical central Africa, Part X-Chemical composition of essential oils of *Ageratum houstonianum* Mill. and *Ageratum conyzoides* L. **Cameroon. Flavour Fragr. J.** 8 : 1-4, 1993.

- MIRANDA, M.M.M.; PICANÇO, M.C.; ZANUNCIO, J.C.; GUEDES, R.N.C. Ecological life table of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) **Biocontrol Sci. Technol.**, (8): 597-606, 1998.
- MORDUE, A.J. & BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update . **J. Insect Physiol.**, 39: 903-924, 1993.
- MORIMOTO, M.; KUMEDA, S. & KOMAI, K. Insect antifeedant flavonoid from *Gnaphalium affine* D. Don. **J. Agric. Food Chem.**, 48: 1888-1891, 2000.
- MUSZINKI, T.; LAVENDOWSKI, I.M. & MASCHIO, L.M.A. Constatação de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), como praga do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), no litoral do Paraná. **An. Soc. Entomol. Bras.**, 11: 291-292, 1982.
- NEAL, J.J. & WU, D. Inhibition of insect cytochromes P450 by furanocoumarins. **Pest. Biochem. Physiol.**, 50: 43-50, 1994.
- NG, T.B.; LIU, F. & WANG, Z.T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sci.**, 66: 709-723, 2000.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, M.K. & GARCIA, L.O. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluído de mentrasto, *Ageratum conyzoides*. **L. Lecta**, 11: 63-100, 1993.
- PARI, K.; RAO, P.J.; SUBRAMHANYAN, B.; RASTHOGI, J.N. & DEAKUMAR, C. Benzofuran and other constituents of the essential oil of *Ageratum conyzoides*. **Phytochemistry**, 49: 1385-1388, 1998.
- POVOLONY, D. On three neotropical species of *Gnorimoschemini* (Lepidoptera: Gelechiidae) mining solanaceae. **Acta Univ. Agric.**, 23: 379-393, 1975.
- QUIJANO, L.; CALDERON, J.S.; GOMEZ, F.; SORIA, I.E. & RIOS, T. Highly oxygenated flavonoids from *Ageratum corymbosum*. **Phytochemistry**, 19: 2439-2442, 1980.
- REY, A.B. **Química tecnológica fundamental**. In: Física/Química Moderna. São Paulo, Fortaleza, v.5, 1970. 405p.

RICHEY JÚNIOR. H.G. **Química orgânica**. Rio de Janeiro, Prentice/Hall do Brasil. 1986. 418p.

SAXENA, R.C., DIXIT, O.P. & SUKUMARAN, P. Laboratory assessment of indigenous plant extracts for antijuvenile hormone activity in *Culex quinquefasciatus*. **Indian J. Med. Res.** 95: 204-206, 1992.

SCRAMIN, S.; SILVA, H.P.; FERNANDES, L.M.S. & YHAN, C.A. Avaliação biológica de extratos de 14 espécies vegetais sobre *Meloidogyne incognita* raça I. **Nematol. Bras.**, 12: 121-129, 1987.

VIANA, G.F.G.; ARAGÃO JR., A.G.M. & RIBEIRO, R.A. Effects of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia**, 69: 349-357, 1998.

VYAS, A.V. & MULCHANDANI, N.B. Structure reinvestigation of conyzorigum, a new chromone from *Ageratum conyzoides*. **J. Chem. Soc. Perkin Trans.**, 12: 2945-2947, 1984.

WEST, L.S. **The house fly, its natural history, medical importance and control**. Ithaca, Cornell University, 1951. 584p.

WILLIAMS, L.A.D.; ANDERSON, M.J. & JACKSON, Y.A. Insecticidal activity of synthetic 2-carboxylbenzofurans and their coumarin precursors. **Pestic. Sci.**, 42: 167-171, 1994.

YADAVA, R.N. & KUMAR, S. A novel isoflavone from the stems of *Ageratum conyzoides*. **Fitoterapia**, 70: 475-477, 1999.

YU, S.J. Allelochemical stimulation of ecdysone 20-monooxygenase in fall armyworm larvae. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 28: 365-375, 1995.

ZHENG, J.; LEONG, D.; LEES, G. & NICHOLSON, A. Studies on the interaction of surangin B with insect mitochondria, insect synaptosomes, and rat cortical neurons in primary culture. **Pest. Biochem. Physiol.**, 61: 1-13, 1998.