

UEVETON PIMENTEL DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE FITOTÓXICA E
ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE *Euphorbia Heterophylla* L.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586c
2017
Silva, Ueveton Pimentel da, 1992-
Caracterização química, atividade fitotóxica e
antibacteriana de extratos de *Euphorbia heterophylla* L. /
Ueveton Pimentel da Silva. – Viçosa, MG, 2017.
xvi, 138f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo Vinícius Vieira Varejão.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 124-138.

1. Química vegetal. 2. *Euphorbia heterophylla* L. Ervas
daninhas. 3. Plantas - Composição. 4. Agentes alelopáticos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 572.2

UEVETON PIMENTEL DA SILVA


**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE FITOTÓXICA E
ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE *Euphorbia Heterophylla* L.**


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

APROVADA: 18 de julho de 2017.


Patrícia Fontes Pinheiro


Sergio Antonio Fernandes


Antônio Jacinto Demuner
(Coorientador)


Eduardo Vinícius Vieira Varejão
(Orientador)

*Dedico esse trabalho a Deus, por
abençoar e iluminar minha caminhada e
conceder-me mais essa conquista.*

AGRADECIMENTO

À Deus e Jesus Cristo por me abençoar, iluminar, pela saúde, fé e por me conceder mais essa vitória e a todos os santos que intercedem por mim;

Aos meus pais Maria Aparecida Pimentel da Silva e João Batista Sabará da Silva pelo incentivo e pela educação que fazem parte da formação do caráter e capacitação ao conduzir este trabalho, tudo isto com carinho e amor;

À minha esposa Karoline Aparecida Santece Rodrigues pela força, confiança, carinho, amor e companheirismo;

A meus irmãos Amanda Pimentel e Paulo Henrique Pimentel, sobrinha Gabrielly Aparecida e o cunhado Wanderson Oliveira por fazerem parte da minha vida;

Ao meu sogro Silmar Teodoro Rodrigues e minha sogra Maria Aparecida Santece Rodrigues e cunhada Maisa Santece pelo incentivo, força e confiança;

Ao pesquisador e orientador Dr. Eduardo Vinícius Vieira Varejão, pela confiança, ensinamentos, auxílio e atenção que contribuíram de maneira fundamental para a realização deste trabalho;

Aos professores: Marcelo Henrique dos Santos e Antônio Jacinto Demuner, pela confiança por toda atenção e informações que contribuíram para realização deste trabalho;

A todos os amigos adquiridos durante a pós-graduação, em especial aos amigos: Bruna Nunes Mont' mor, Guilherme Matheus, Jaíne Cunha, Leonardo Leite, Manoel Luiz e Lara Cola Carlete;

A todos alunos do Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), os quais foram muito importantes para o andamento da pesquisa, em especial: a Gabriela Furlani, Nycoli, Bianca, Cristiane Franco, Dayana Alves, Simone Mairink, Lorena, Luiza, Junior, Victória e Carla meu muito obrigado;

Aos técnicos Cristiane e José Luiz, pela realização das análises de RMN e Cromatografia;

À Universidade Federal de Viçosa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a CAPES pelos recursos concedidos ao LASA;

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	3
3.1. Procedimentos químicos gerais	3
3.2 Coleta da planta e identificação da espécie	4
3.3. Preparo do material vegetal e obtenção dos extratos orgânicos	5
3.4 Triagem fitoquímica	5
3.4.1. Alcaloides	5
3.4.2. Triterpenos	6
3.4.3. Carboidratos	6
3.4.4. Proteínas	7
3.4.5. Fenólicos	7
3.5 Extração de alcaloides	7
3.6 Hidrólise	8
3.7 Derivatização/CG-EM	8
3.8 Isolamento de constituintes químicos dos extratos em hexano de <i>E. heterophylla</i>	9
3.8.1 Extrato da raiz em hexano	9
3.8.2 Extrato da folha em hexano	15
3.8.3 Extrato da folha em acetato de etila	16
3.9 Atividade alelopática dos extratos obtidos da planta <i>Euphorbia heterophylla</i> ..	17
3.10 Atividade antibacteriana dos extratos e seus derivados obtidos da planta <i>Euphorbia heterophylla</i>	17
3.10.1 Teste antimicrobiano por diluição	17
3.10.2 Teste de sensibilidade por difusão	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Obtenção e caracterização dos extratos	19
4.2 Isolamento e identificação de componentes do extrato da raiz em hexano	30

4.3 Isolamento e identificação de componentes do extrato da folha em hexano	94
4.4 Isolamento e identificação de componentes do extrato da folha em acetato de etila	100
4.6 Atividade alelopática dos extratos da planta <i>E. heterophylla</i>	102
4.7 Atividade antibacteriana	122
CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cromatograma de íons totais do extrato das folhas de <i>E. heterophylla</i> em acetato de etila derivatizados antes (EFAC) e após a hidrólise (EFACH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.	26
Figura 2: Cromatograma de íons totais do extrato das folhas de <i>E. heterophylla</i> em metanol derivatizados antes (EFME) e após a hidrólise (EFMEH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.	27
Figura 3: Cromatograma de íons totais das frações obtidas após acidificação e extração líquido-líquido do extrato EFME de <i>E. heterophylla</i> , derivatizados antes (EFMEAc) e após a hidrólise (EFMEAcH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.	28
Figura 4: Cromatograma de íons totais do extrato das raízes de <i>E. heterophylla</i> em metanol derivatizados antes (ERME), e após a hidrólise (ERMEH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.	29
Figura 5: Cromatograma de íons totais da fração obtida após acidificação e extração líquido-líquido do extrato ERME de <i>E. heterophylla</i> , derivatizados antes (ERMEAc), e após a hidrólise (ERMEAcH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.	30
Figura 6: Cromatograma de íons totais do extrato da raiz em hexano de <i>E. heterophylla</i>	31
Figura 7: Cromatografia em camada delgada em sílica gel para o extrato hexânico da raiz de <i>E. heterophylla</i> eluída duas vezes com fase móvel hexano/diclorometano (1:1).	32
Figura 8: Cromatogramas de íons totais das frações obtidas do extrato da raiz de <i>E. heterophylla</i> em hexano antes (F1, F2 e F3) e após a reprecipitação (F2-A e F3-A).	32
Figura 9: Cromatografia em camada delgada sílica gel para a amostra F1, utilizando diclorometano como eluente.	33
Figura 10: Cromatograma de íons totais do β -sitosterol (1).	33
Figura 11: Espectro de massas (IE, 70 eV) do β -sitosterol (1).	34
Figura 12: Proposta de mecanismo para fragmentações do β -sitosterol (1).	35
Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do β -sitosterol (1)	36
Figura 14: Espectro DEPT-135 do β -sitosterol (1).	37
Figura 15: Espectro de RMN de ^1H , (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do β -sitosterol (1).	38

Figura 16: Cromatograma de íons totais dos compostos β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).....	40
Figura 17: Espectro de massas (IE, 70 eV) do estigmasterol (2).....	41
Figura 18: Proposta para o mecanismo de fragmentação do estigmasterol.	42
Figura 19: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) da mistura de β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).....	44
Figura 20: Espectro DEPT-135 da mistura de β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).....	45
Figura 21: Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) da mistura de β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).	46
Figura 22: Cromatografia em camada delgada (sílica gel/ AgNO_3 10%) para fração F2-A, obtido do extrato hexânico das raízes de <i>E. heterophylla</i> utilizando hexano/diclorometano (1:1) como eluente.....	48
Figura 23: Cromatograma de íons totais referente ao acetato de lupeol (3).....	49
Figura 24: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de lupeol (3).....	49
Figura 25: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de lupeol.	50
Figura 26: Espectro de RMN de ^{13}C , (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do acetato de lupeol (3).	51
Figura 27: Espectro DEPT-135 do acetato de lupeol (3).....	52
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do acetato de lupeol (3).	53
Figura 29: Cromatograma de íon totais do acetato de taraxasterol (4).....	55
Figura 30: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de taraxasterol (4).	56
Figura 31: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de taraxasterol. ...	57
Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do acetato de taraxasterol (4).....	58
Figura 33: Espectro DEPT-135 do acetato de taraxasterol (4).	59
Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do acetato de taraxasterol (4).....	60
Figura 35: Cromatograma de íons totais, para o acetato de pseudo taraxasterol (5).	62
Figura 36: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de pseudo taraxasterol (5).	63
Figura 37: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de pseudo taraxasterol.	64
Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do acetato de pseudo taraxasterol (5).	65
Figura 39: Espectro DEPT-135 do acetato de pseudo taraxasterol (5).....	66

Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do acetato de pseudo taraxasterol (5).	67
Figura 41: Cromatograma de íons totais do acetato de germanicol (6).	69
Figura 42: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de germanicol (6).	70
Figura 43: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de germanicol.	71
Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do acetato de germanicol (6).	72
Figura 45: Espectro DEPT-135 do acetato de germanicol (6).	73
Figura 46: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do acetato de germanicol (6).	74
Figura 47: Cromatograma de íons totais do acetato de α -amirina (7) e de acetato de β -amirina (8).	76
Figura 48: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de α -amirina (7)	77
Figura 49: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de α -amirina.	78
Figura 50: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de β -amirina (8).	79
Figura 51: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de β -amirina.	80
Figura 52: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8).	81
Figura 53: Espectro DEPT-135 do acetato de α -amirina (7) e do acetato de β -amirina (8).	82
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8).	83
Figura 55: Espectro de massas (IE, 70 eV) do hexanoato de germanicol (9).	86
Figura 56: Proposta para o mecanismo de fragmentação do hexanoato de germanicol.	87
Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 77,0$ ppm) do hexanoato de germanicol (9).	88
Figura 58: Espectro DEPT-135 do hexanoato de germanicol (9).	89
Figura 59: Espectro RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta\text{CDCl}_3 = 7,26$ ppm) do hexanoato de germanicol (9).	90
Figura 60: Compostos isolados do extrato em hexano das raízes de <i>E. heterophylla</i> . ..	93
Figura 61: Cromatograma de íons totais do extrato em hexano das folhas de <i>E. heterophylla</i> , e a região com picos selecionados contendo fragmentações características para triterpenos.	95
Figura 62: Cromatograma de íons totais da fração F1.1a obtida do extrato EFH, apresenta o acetato de lupeol (3), acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8).	95

Figura 63: Espectro de RMN C^{13} (75 MHz, $CDCl_3$, $\delta CDCl_3 = 77,0$ ppm) do acetato de lupeol (3), acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8).....	97
Figura 64: Espectro DEPT-135 do acetato de lupeol (3), acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8).	98
Figura 65: Espectro de RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$, $\delta CDCl_3 = 7,26$ ppm) acetato de lupeol (3), acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8).....	99
Figura 66: Cromatograma de íons totais do extrato em acetato de etila das folhas de <i>E. heterophylla</i> , e a região com componente apresentando espectro de massas com fragmentações comuns para triterpenos.	100
Figura 67: Cromatograma de íons totais do acetato de lupeol (3), obtido do extrato EFAC.	101
Figura 68: Cromatograma de íons totais do acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8), obtidos do extrato EFAC.....	101
Figura 69: Atividade alelopática dos extratos das folhas de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento do caule de sorgo.	105
Figura 70: Atividade alelopática dos extratos das folhas de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento de raízes de sementes de sorgo.	106
Figura 71: Atividade alelopática dos extratos das raízes de <i>E. heterophylla</i> sobre crescimento do caule de sementes de sorgo.....	107
Figura 72: Atividade alelopática dos extratos das raízes de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento das raízes de sementes de sorgo.....	108
Figura 73: Atividade alelopática dos extratos das folhas de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento do caule de pepino.	111
Figura 74: Atividade alelopática dos extratos das folhas de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento da raiz de pepino.	112
Figura 75: Atividade alelopática dos extratos das raízes de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento do caule de pepino.	113
Figura 76: Atividade alelopática dos extratos das raízes de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento da raiz de pepino.	114
Figura 77: Atividade alelopática dos extratos das folhas de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento do caule das sementes de alface.....	117
Figura 78: Atividade alelopática dos extratos das folhas de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento das raízes das sementes de alface.	118
Figura 79: Atividade alelopática dos extratos das raízes de <i>E. heterophylla</i> sobre o crescimento do caule de sementes de alface.	119

Figura 80: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* frente ao crescimento da raiz de sementes de alface..... 120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento dos extratos de <i>E. heterophylla</i>	19
Tabela 2: Classes químicas encontradas para os extratos de <i>E. heterophylla</i>	20
Tabela 3: Rendimentos das frações dos extratos de <i>E. heterophylla</i>	21
Tabela 4: Classes químicas encontradas para frações dos extratos da planta <i>E. heterophylla</i>	21
Tabela 5: Caracterização dos extratos das folhas e raízes de <i>E. heterophylla</i> , derivatizadas antes e após a hidrólise alcalina	23
Tabela 6: Fragmentações de massa para picos selecionados no cromatograma (Figura 6) para componentes majoritários no extrato da raiz em hexano	31
Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C , para o composto identificado como β -sitosterol (1)	39
Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C , para os compostos identificados como β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).....	47
Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C , para o composto identificado como acetato de lupeol (3).....	54
Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como acetato de taraxasterol (4)	61
Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como acetato de pseudo taraxasterol (5)	68
Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como acetato de germanicol (6).....	75
Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C para os compostos identificados como acetato de α -amirina e acetato de β -amirina	84
Tabela 14: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como hexanoato de germanicol (9).....	91
Tabela 15: Efeitos dos extratos de <i>E. heterophylla</i> sobre a germinação das sementes de sorgo.....	103
Tabela 16: Efeitos dos extratos de <i>E. heterophylla</i> sobre o desenvolvimento das sementes de pepino	109
Tabela 17: Efeitos dos extratos de <i>E. heterophylla</i> sobre o desenvolvimento das sementes de alface	115

LISTA DE ABREVIATURAS

- BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio
- BSTFA: *N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
- CCD: Cromatografia em Camada Delgada
- CDCl₃: Clorofórmio deuterado
- CG-EM: Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas
- d: Duplete
- dd: Duploduplete
- DIC: Delineamento inteiramente casualizado
- EFAC: Extrato da folha em acetato de etila
- EFH: Extrato da folha em hexano
- EFME: Extrato da folha em metanol
- EFMEAc: Extrato da folha em metanol após a acidificação e extração líquido-líquido
- EFMEAlc: Extrato da folha em metanol após a alcalinização e extração líquido-líquido
- ERH: Extrato da raiz em hexano
- ERME: Extrato da raiz em metanol
- ERMEAc: Extrato da raiz em metanol após a acidificação e extração líquido-líquido
- ERMEAlc: Extrato da raiz em metanol após a alcalinização e extração líquido-líquido
- Hz: Hertz
- IE: Impacto de elétrons
- J*: Constante de acoplamento
- m/z*: Razão massa carga
- m: Multiplete
- MH: Mueller-Hintan
- R_f: Fator de retenção
- RMN de ¹³C: Ressonância magnética nuclear de carbono 13
- RMN de ¹H: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- s: Simpleto
- t: Tripleto

RESUMO

SILVA, Ueveton Pimentel da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Caracterização química, atividade fitotóxica e antibacteriana de extratos de *Euphorbia Heterophylla* L.** Orientador: Eduardo Vinícius Vieira Varejão. Coorientadores: Antônio Jacinto Demuner e Marcelo Henrique dos Santos.

Metabólitos secundários obtidos a partir de extratos botânicos podem ser úteis para a descoberta e desenvolvimento de novos produtos com aplicação tanto na medicina quanto na agricultura. Na agricultura, os extratos botânicos e os metabólitos secundários representam uma das principais alternativas ao uso de pesticidas sintéticos, podendo apresentar baixa toxicidade e o menor impacto ambiental. *Euphorbia heterophylla* L. é considerada uma das principais plantas daninhas em importantes culturas como a soja e o milho. Sua alta competitividade em ecossistemas agrícolas pode ser devida, pelo menos em parte, à produção de compostos aleloquímicos. Por outro lado, essa espécie é utilizada na medicina popular em diferentes partes do mundo, por exemplo, como anti-inflamatória e antimicrobiana. Apesar dessas propriedades, o conhecimento sobre seus constituintes químicos é escasso. Assim, o presente trabalho teve por finalidade avaliar as atividades fitotóxica e antibacteriana de extratos das folhas e raízes de *E. heterophylla* e identificar os compostos químicos presentes nesses extratos. Os extratos das folhas foram obtidos por meio de extrações sucessivas, por maceração, utilizando os solventes hexano, acetato de etila e metanol. Os extratos das raízes foram obtidos por extração em Soxhlet usando hexano e metanol, sucessivamente. As atividades alelopática dos extratos foram avaliadas utilizando sementes de sorgo, pepino e alface. Os extratos foram submetidos a marcha fitoquímica para análise das principais classes de metabólitos presentes e os resultados mostraram a presença de triterpenos como metabólitos principais. Os extratos em metanol de folhas e raízes foram submetidos a procedimentos de extrações visando o isolamento de alcaloides, e as frações obtidas foram submetidas a análises por CG-EM após hidrólise e derivatização. Os extratos em hexano e em acetato de etila foram submetidos a fracionamentos cromatográficos para isolamento de seus constituintes químicos majoritários, que foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C . As análises por CG-EM mostraram a presença de diferentes ácidos graxos nos extratos em acetato de etila e metanol, sendo os principais os ácidos palmítico, linoleico, α -linolênico e esteárico. A partir do extrato ERH foram isolados os compostos β -sitosterol, hexanoato de germanicol, acetato de lupeol, acetato de taraxasterol, acetato de pseudo-taraxasterol e duas misturas, uma contendo β -sitosterol + estigmaterol e outra com acetato de α -amirina + acetato de β -amirina. Foi obtido do extrato EFH, uma mistura contendo os compostos acetato de

lupeol, acetato de α - amirina e acetato de β -amirina. Foram isolados do extrato EFAC o acetato de lupeol e uma mistura de acetato de α -amirina + acetato de β -amirina. Os extratos hexânicos das folhas e raízes apresentaram pequena atividade fitotóxica sobre as plantas testadas e os extratos em acetato de etila e metanol apresentaram atividade moderada, particularmente contra sementes de sorgo e alface. A atividade antibacteriana dos extratos e seus derivados foram avaliados através dos testes por diluição e difusão com os micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 29214. Os extratos e compostos não apresentaram efeito sobre os micro-organismos testados e nas condições avaliada concentrações avaliadas. Embora os extratos tenham apresentado pequenas atividades fitotóxicas para serem explorados como herbicidas naturais, a capacidade de interferir na germinação e crescimento de outras espécies, embora discreta, pode ser um fator contribuinte para a elevada competitividade da espécie *E. heterophylla* em ambientes agrícolas.

ABSTRACT

SILVA, Ueveton Pimentel da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Chemical characterization, phytotoxic and antibacterial activities of extracts from *Euphorbia heterophylla* L.** Advisor: Eduardo Vinícius Vieira Varejão. Co-advisors: Antônio Jacinto Demuner and Marcelo Henrique dos Santos.

Secondary metabolites from botanic extracts can be useful sources for the discovering and development of new products for application in both medicine and agriculture. In agriculture, botanic extracts and their metabolites represent one of the most promising alternative to synthetic herbicides, mainly because of their lower toxicity and environmental impact. *Euphorbia heterophylla* L. is plant species considered as a major weed in important cultures, including soy and corn. Its high competitiveness in agricultural ecosystems may be related, at least in part, to the production of allelochemicals. Besides, this species is used in traditional medicine in different parts of the world, for example, as anti-inflammatory, and antimicrobial. Despite these properties, the knowledge about its chemical constitutes remains scarce. Thus, the aim of the present work was to investigate the phytotoxic and antibacterial properties of extracts and metabolites from leaves and roots of *E. heterophylla*. Leaf extracts were obtained by maceration using hexane, ethyl acetate, and methanol, successively. Root extracts were produced in a Soxhlet apparatus using hexane and methanol, successively. Allelopathic properties of extracts and metabolites were accessed using seeds of sorghum, cucumber, and lettuce. A phytochemical screening was used to a preliminary detection of the major classes of metabolites present in the extracts, and these test revealed the presence of diterpenes as major metabolites. Methanolic extracts from leaves and roots were subjected to hydrolysis and derivatization prior to GC-MS analysis. Hexane and ethyl acetate extracts were fractionated by column and preparative thin layer chromatography and the isolated metabolites were purified and identified by ^1H and ^{13}C NMR methods. The GC-MS analysis showed the presence of different long chain fatty acids in the methanol and ethyl acetate extracts, with palmitic, linoleic, α -linolênic, and esteáric acids being identified as the major constituents. Fractionation of the hexane extracts from roots lead to the isolation of the triterpenes identified as β -sitosterol, germanicol hexanoate, lupeol acetate, taraxasterol acetate, and pseudo taraxasterol acetate, a mixture constituted by β -sitosterol and stigmaterol, and a mixture of α - and β -amyrin acetates. Fractionation of the hexane extracts from leaves led to a mixture of lupeol, α -amyrin and β -amyrin acetates. Fractionation of ethyl acetate extracts from leaves led to the isolation of lupeol acetate

and to a mixture of α -amyrin and β -amyrin acetates. Hexane extracts from leaves and roots showed only a discrete phytotoxic activity, while ethyl acetate and methanol extracts showed moderated phytotoxicity for sorghum and lettuce seeds. The antibacterial activities of extracts and metabolites were accessed on *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 29214 using the dilution and diffusion tests. No antibacterial activity was observed for the assayed microorganisms at the concentrations tested. Despite presenting low phytotoxic activity to be used as natural herbicides, the ability of their chemical constituents to interfere on germination and growth of other plant species may contribute to the high competitiveness of *E. heterophylla* in agricultural environments.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de produzir metabólitos secundários que desempenham diferentes funções biológicas na relação da planta com o ambiente, formando um sistema de defesa contra patógenos, predadores e outras plantas (Bourgaud *et al.*, 2001; Rafińska *et al.*, 2016). Entre as diferentes classes de metabólitos secundários, podemos citar os terpenos, alcaloides, flavonoides, taninos e fenilpropanóides (Bourgaud *et al.*, 2001; Barbehenn & Constabel, 2011; Seleem, Pardi & Murata, 2016; Bravetti *et al.*, 2017), classes essas que possuem variadas atividades biológicas de interesse farmacêutico. Em função dessas propriedades, as plantas são utilizadas na medicina tradicional há milhares de anos. Muitas dessas plantas medicinais, apesar do uso tradicional, são pouco estudadas em relação a comprovação das atividades terapêuticas e a identificação dos compostos químicos responsáveis pelas atividades (Dutra *et al.*, 2016).

A medicina popular utiliza esses produtos no tratamento de diversas enfermidades como inflamações, doenças no trato gastrointestinal, distúrbios do sistema nervoso, dores, reumatismo, problemas respiratórios, doenças metabólicas, infecções provocadas por fungos, bactérias e vírus, entre outros (Vlietinck *et al.*, 1995; Portillo *et al.*, 2001; Koné *et al.*, 2004; Bhattacharjee *et al.*, 2011; Pradhan, Biswasroy & Suri, 2013; Bahmani, Zargaran & Rafieian-Kopaei, 2014; Dutra *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016). Atualmente, centenas de compostos isolados de extratos botânicos são comercializados como fármacos, entre os quais podem citar-se a Vimblastina e Vincristina, isolados da planta *Catharanthus roseus* e utilizados no tratamento do câncer (Noble, 1990). A berberina, isolada do gênero *Berberis* spp., apresenta propriedades antiviral, analgésica, anti-hipertensiva e antibacteriano (Cui *et al.*, 2006; Pradhan *et al.*, 2013).

Na agricultura, extratos botânicos podem ser utilizados como alternativas ao uso de pesticidas sintéticos, particularmente na agricultura orgânica, podendo apresentar possivelmente baixa toxicidade e menor impacto ambiental quando comparados aos pesticidas sintéticos (Miresmailli & Isman, 2014; Ghosh *et al.*, 2015). Os pesticidas botânicos são comercializados e empregados no tratamento dos mais diversos problemas fitossanitários, como por exemplo os pesticidas derivados da planta *Sophora flavescens*, utilizado no controle de pulgões, lagartas entre outras (Miresmailli & Isman, 2014; Xiong *et al.*, 2016). Os componentes isolados dos extratos botânicos são alvos de diferentes pesquisas na busca por novos pesticidas. Os terpenóides isolados da planta *Aglaia forbesii* apresentam atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *Phytophthora*

botryosa, *Phytophthora palmivora* e *Rigidoporus microporus* (Joycharat *et al.*, 2014). Os alcaloides isolados da planta *Rhazya stricta* exibem atividade alelopática sobre trigo, alfafa, grama de centeio e rabanete selvagem (Kamel & Al-Mutlaq, 2004).

Metabólitos secundários bioativos podem ser submetidos a reações de semi-síntese ou serem utilizados como modelos para o desenvolvimento de novas moléculas, com o objetivo de se obter novos compostos visando melhorar as atividades biológicas. Um exemplo dessa abordagem é o trabalho desenvolvido por Huang *et al.* (2015), no qual foram sintetizados análogos ao alcaloide β -carbolina. Os compostos sintetizados apresentaram baixa toxicidade e considerável potencial para inibição de vírus, fungos e insetos causadores de doenças em plantas. Abreu *et al.* (2014), realizaram modificações na estrutura do ingenol, isolado da planta *Euphorbia tirucalli*, e avaliaram os compostos quanto ao potencial de inibição do vírus HIV. Os autores constataram o potencial dos compostos como possíveis coadjuvantes no tratamento contra o vírus, com baixa toxicidade.

O gênero *Euphorbia* apresenta potencial bioativo relatado para diferentes espécies, como *E. hierosolymitana* (alelopática) (Abu-Romman, Shatnawi & Shibli, 2010), *E. hirta* (antifúngica) (Basma *et al.*, 2011), *E. helioscopia* (antibacteriana) (Di *et al.*, 2015), *E. peplus* (antifúngica e inseticida) (Hua *et al.*, 2017), *E. peplus* e *E. segetalis* (antiviral) (Nothias-Scaglia *et al.*, 2015). A *Euphorbia heterophylla* L. é considerada uma das principais plantas daninhas em importantes culturas agrícolas, principalmente a soja, causando grandes prejuízos à agricultura brasileira (Rizzardi *et al.*, 2004; Kern *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Kouakou *et al.*, 2013). A espécie apresenta alto potencial competitivo em ecossistemas agrícolas, o que pode estar relacionado não apenas ao crescimento rápido e habilidade de assimilação de nutrientes do solo, mas possivelmente à capacidade de produzir metabólitos que interfiram no crescimento de espécies vizinhas (Gazziero *et al.*, 1998; Rizzardi *et al.*, 2004; Gusman *et al.*, 2011). De fato, estudos demonstram o efeito alelopático retardado de resíduos de decomposição de plantas dessa espécie (Mohamed-Saleem & Fawusi, 1983). Apesar de atuar como uma espécie invasora e causar grandes prejuízos agrícolas, *E. heterophylla* apresenta-se útil para populações de diferentes regiões do planeta em função de suas propriedades medicinais, sendo utilizada na medicina popular em função de supostas atividades anti-inflamatória (Falodun *et al.*, 2006), analgésica (Vamsidhar *et al.*, 2000), antimicrobiana e laxante (James & Friday, 2010; Okeniyi, Adedoyin & Garba, 2012), além de diferentes propriedades relatadas como cicatrizante (James & Friday, 2010), antidiabética (Annapurna & Hatware, 2014),

antibacteriana (Fred-Jaiyesimi & Abo, 2010) e antioxidante (Okeniyi, Adedoyin & Garba, 2012).

Em virtude das propriedades do gênero *Euphorbia*, particularmente da espécie *E. heterophylla*, o desenvolvimento de estudos sobre a fitoquímica e sobre as atividades biológicas da planta são de grande interesse. Assim, o presente trabalho teve a finalidade de avaliar as atividades fitotóxica e antibacteriana de diferentes extratos das raízes e folhas de *E. heterophylla* e caracterizar os constituintes químicos presentes nos referidos extratos.

2. OBJETIVOS

- ✓ Obter extratos botânicos das folhas e raízes de *Euphorbia heterophylla* utilizando diferentes solventes;
- ✓ Investigar a composição química dos extratos obtidos;
- ✓ Isolar e identificar constituintes químicos dos extratos;
- ✓ Avaliar o potencial fitotóxico dos extratos;
- ✓ Avaliar o potencial antibacteriano dos extratos;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Procedimentos químicos gerais

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais. Extrações e procedimentos cromatográficos foram realizados utilizando-se solventes de grau analítico. As separações cromatográficas em coluna foram realizadas utilizando-se sílica-gel 60 (70-230 mesh). As separações por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, foram realizadas em placas de sílica-gel 60 G F254 com 1,0 mm de espessura. Para isolamento de triterpenos, foram utilizadas placas de CCD preparativa contendo nitrato de prata a 10% (m/v). Para CCD analítica, foram utilizadas placas de sílica-gel 60 G F254 com 0,25 mm de espessura. As placas de CCD foram reveladas com luz ultravioleta (254 e 366 nm) e/ou com solução de vanilina. As análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP5050A, nas seguintes condições operacionais: método por impacto de elétrons (70 eV); modo scan, m/z 30,00

a 700,00; coluna capilar RTx5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm); fluxo do gás de arraste (He) 1 mL min^{-1} ; razão de split 1:5; temperatura do injetor 290 °C; temperatura do detector 290 °C; volume de injeção da amostra foi de 1,0 μL (1 mg mL^{-1} em CH_2Cl_2) com razão de Split 1:3. Amostras derivatizadas foram analisadas por CG-EM, operando com temperatura inicial de 80 °C por 5 min., gradiente 4 °C min^{-1} até 300 °C. Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos espectros de massas com aqueles existentes no banco de dados do equipamento e pelo índice de retenção (Isidorov et al., 2007; Isidorov et al., 2008). Os extratos hexânicos e os constituintes químico isolados foram analisadas por CG-EM, operando com temperatura inicial de 40 °C por 5 min., gradiente 20 °C min^{-1} até 300 °C. Os compostos e misturas isolados dos extratos foram submetidos a análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C operando a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os compostos foram identificados empregando-se a metodologia proposta por Olea & Roque (1990), comparando-se os dados de RMN de ^{13}C dos componentes obtidos com os dados reportados na literatura. Os pesquisadores Olea & Roque (1990), propõem relacionar os sinais dos carbonos sp^2 característicos de cada esqueleto triterpenico (tetra e pentacíclico), com dados reportados na literatura facilitando o processo de identificação. Os principais sinais nos espectros de RMN de ^1H foram atribuídos em conformidade com dados reportados na literatura. O experimento DEPT 135, foi realizado para auxiliar na identificação dos compostos, estabelecendo o número de átomos de hidrogênio ligado aos átomos de carbono.

3.2 Coleta da planta e identificação da espécie

Os espécimes de *Euphorbia heterophylla* L. foram coletadas no período matutino, no campo experimental Horta Velha, do Departamento de Agronomia da UFV (20°46'431"S 42°51'452"W) em março de 2016. Uma exsicata da planta foi preparada e encaminhada para o herbário da UFV, permanecendo armazenada sob o número de comprovante VIC 46799. A identificação da espécie foi confirmada pelo pesquisador Otávio Luiz Marques da Silva, especialista em taxonomia do gênero *Euphorbia*, Instituto de Botânica de São Paulo.

3.3. Preparo do material vegetal e obtenção dos extratos orgânicos

As plantas foram submetidas a separação de folhas e raízes, que foram secas separadamente em estufa a 40 °C. Os materiais secos foram submetidos a trituração utilizando um liquidificador industrial e submetido a procedimentos de extração.

As folhas secas e trituradas foram pesadas (1,479 kg), e transferidas para erlenmeyers e extraídas por maceração por 48 horas utilizando hexano, acetato de etila e metanol, sucessivamente (Gao *et al.*, 2016). Em cada extração, foram utilizados 3,0 L dos respectivos solventes. As extrações com cada solvente foram feitas em triplicata. Os extratos em cada um dos solventes foram reunidos e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 40 °C, obtendo-se dessa forma os extratos das folhas em hexano (EFH), em acetato de etila (EFAC) e em metanol (EFME).

O material obtido da trituração das raízes secas foi pesado (496,3 g), e em seguida, submetido a extração em aparelho soxhlet por 3 horas (Portillo *et al.*, 2001; Rodríguez-Solana *et al.*, 2014), utilizando 1,5 L de hexano e 1,5 L de metanol, sucessivamente. As extrações com cada solvente foram feitas em triplicata. Após a extração, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo, levando à obtenção dos extratos da raiz em hexano (ERH) e em metanol (ERME).

3.4 Triagem fitoquímica

Os extratos obtidos de *E. heterophylla* foram submetidos a triagem de diferentes metabólitos secundários por meio de testes para detecção de alcaloides, triterpenos, compostos fenólicos, carboidratos e proteínas.

3.4.1. Alcaloides

Teste de Dragendorff: O reagente de Dragendorff foi preparado, dissolvendo 8 g de subnitrito de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 20 mL de ácido acético e em seguida foi transferida para um Becker contendo 50 mL de solução aquosa de iodeto de potássio (KI) $3,3 \text{ mol L}^{-1}$ (Jia & Tian, 2007). A um tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada foram adicionados cerca de 2 mg de extrato e em seguida foi adicionado gota a gota de solução aquosa de ácido clorídrico a 2 mol L^{-1} , pelas paredes do tubo, até a completa dissolução do extrato. A seguir, foi adicionado 1 mL da solução de reagente de

Dragendorff. A presença de alcaloides foi detectada pela formação de um precipitado laranja-avermelhado (Silva *et al.*, 2010; Silva & Lima, 2016).

Teste de Wagner: O reagente de Wagner foi preparado dissolvendo-se 1,27 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 100 mL de água destilada (Furr & Mahlberg, 1981). Cerca de 2 mg de extrato foi transferido para tubo de ensaio, em seguida, foi adicionada solução de ácido clorídrico a 1,5% (v/v) até a completa dissolução do extrato. Em seguida foram adicionadas 8 gotas de reagente de Wagner. A formação de um precipitado amarelo ou marrom foi considerada como indicativa da presença de alcaloides (Silva & Lima, 2016).

3.4.2. Triterpenos

Teste de Liebermann-Burchard: A um tubo de ensaio foram adicionados cerca de 2 mg de extrato e 2 mL de anidrido acético. A mistura foi homogeneizada e aquecida até ebulição. Após o resfriamento da solução, o tubo foi mantido em banho de gelo e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado cuidadosamente. O aparecimento da coloração verde para rósea indicou a presença de triterpenos (Silva *et al.*, 2010; Silva & Lima, 2016).

Teste de Salkowski: Cerca de 2 mg de extrato foram diluídos em 1 mL de clorofórmio e, em seguida, 5 gotas de H₂SO₄ concentrado foram cuidadosamente adicionadas pelas paredes do tubo. O aparecimento da coloração vermelho-marrom na interface entre as duas fases líquidas indicou a presença de triterpenos (Edeoga, Okwu & Mbaebie, 2005; Ayoola *et al.*, 2008).

3.4.3. Carboidratos

Teste de Keller Killiani: A um tubo de ensaio foram adicionados cerca de 2 mg do extrato diluído em 2 mL de etanol. Foram adicionados 0,4 mL de ácido acético glacial e 5 gotas de cloreto férrico a 5% (m/v). A mistura foi agitada e 0,5 mL de H₂SO₄ concentrado foi adicionado pelas paredes do tubo. O aparecimento da coloração vermelho-marrom na fase inferior e verde azulada na fase superior indicou a presença de carboidratos (Edeoga, Okwu & Mbaebie, 2005; Silva & Lima, 2016).

3.4.4. Proteínas

Teste de Biureto: A um tubo de ensaio foi adicionado cerca de 1 mg do extrato, diluído em 1 mL de etanol, seguida a adição de 5 gotas de solução aquosa de sulfato de cobre a 1% (m/v). Em seguida foram adicionados 2 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (m/v). A confirmação do teste foi avaliada mediante o aparecimento da coloração purpura ou violeta (Layne, 1957).

3.4.5. Fenólicos

Teste de Shinoda: A um tubo de ensaio cerca de 2 mg de extrato foram misturados a 5 mL de etanol, logo após foi adicionado 0,5 mL de HCl 10% (v/v) e uma pequena fita de magnésio. A reação foi confirmada pelo aparecimento da coloração avermelhada ou castanha (Silva *et al.*, 2010).

Teste com cloreto férrico: A um tubo de ensaio cerca de 2 mg de extrato foram misturados a 5 mL de etanol seguida a adição de 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico (FeCl₃) a 10% (m/v). A reação foi confirmada mediante o aparecimento da coloração azulada ou violeta indicando a presença de compostos fenólicos (Silva *et al.*, 2010).

3.5 Extração de alcaloides

Os extratos EFME (22,0 g) e ERME (29,9 g) foram suspensos em 400 mL de solução de ácido clorídrico 5% (m/v) e a suspensão foi extraída com acetato de etila (6 x 300 mL) para o EFME, e diclorometano (6 x 300 mL) para ERME (Liu *et al.*, 2016). A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada, e o solvente foi removido em evaporador rotativo (Gutiérrez *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2016), obtendo-se as frações de extração líquido-líquido após a acidificação de EFME e ERME denominadas de EFMEAc e ERMEAc. A fase aquosa foi coletada, alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 10 e extraída como acetato de etila (300 mL x 6) para o EFME, e diclorometano (300 x 6) para ERME (Liu *et al.*, 2016). A fase orgânica foi separada e o solvente evaporado, obtendo-se as frações de extração líquido-líquido após a alcalinização denominadas EFMEAlc e ERMEAlc. Essas frações foram submetidas ao teste de Dragendorff para detecção de alcaloides.

3.6 Hidrólise

Os extratos obtidos em acetato de etila e metanol foram submetidos a hidrólise em que 20 mg de cada extrato foram transferidos para balão de duas vias, seguido da adição de 10 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio 1 mol L⁻¹ em metanol 10% (v/v) (Freire, Silvestre & Neto, 2002). A solução foi aquecida a 100 °C em banho de glicerina, sob refluxo, em atmosfera de nitrogênio durante uma hora (Freire, Silvestre & Neto, 2002). Após atingir a temperatura ambiente a solução foi acidificada com solução aquosa de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ até pH ~ 2. O material foi extraído com diclorometano (3 x 10 mL), seco sob sulfato de magnésio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo (Freire, Silvestre & Neto, 2002; Silvério *et al.*, 2007).

3.7 Derivatização/CG-EM

Os extratos em acetato de etila e metanol, tanto submetidos quanto não submetidos a hidrólise prévia, foram derivatizados. Aproximadamente 3 mg de cada extrato foi transferido para um vial de fundo cônico. Em seguida foram adicionados 60 µL de piridina anidra seguida a agitação por vórtex, logo após adicionou-se 100 µL de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (Freire, Silvestre & Neto, 2002; Silvério *et al.*, 2007; Isidoro *et al.*, 2008). A mistura reagente foi colocada em banho de glicerina a 70 °C durante 30 minutos e submetido a análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) (Freire, Silvestre & Neto, 2002; Silvério *et al.*, 2007). A identificação dos componentes dos extratos derivatizados foram realizadas através da similaridade (acima de 90%), dos espectros de massas comparados com a biblioteca (Nist-11 e Wiley-7), seguida a confirmação através da comparação dos índices de retenção com a literatura (Isidorov *et al.*, 2007; Isidorov *et al.*, 2008).

Os índices de retenção foram obtidos através da equação de Van Den Dool e Kratz (1) (Isidorov *et al.*, 2008).

$$IR = 100N + \frac{100 [(t'_{RA}) - (t'_{RN})]}{(t'_{RX}) - (t'_{RN})} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde: t'_{RA} , é o tempo de retenção do composto de interesse; N , é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção anterior ao tempo de retenção de A; t'_{RN} , é o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior ao tempo de

retenção de A; t'_{RX} , é o tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção posterior ao do composto A. Os números de carbonos e os tempos de retenção empregados nos cálculos foram obtidos em relação a injeção de padrão (mistura de alcanos lineares de 10 a 30 átomos de carbonos), no CG-EM nas mesmas condições consideradas para os extratos derivatizados (Isidorov *et al.*, 2008).

3.8 Isolamento de constituintes químicos dos extratos em hexano de *E. heterophylla*

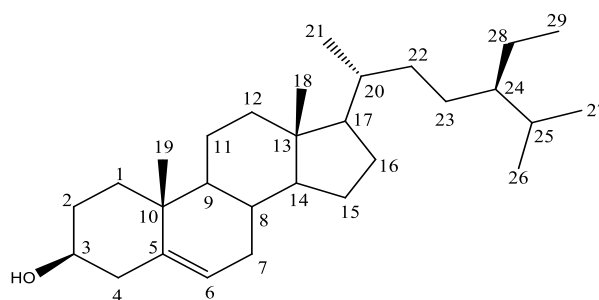
3.8.1 Extrato da raiz em hexano

O extrato das raízes de *E. heterophylla* em hexano (ERH) (3,0 g) foi fracionado através de uma série de separações cromatográficas por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, utilizando hexano: diclorometano 1:1 (v/v), eluídas duas vezes. Após as eluições, as placas de CCD tiveram suas laterais reveladas com solução ácida de vanilina obtendo-se 12 bandas. As bandas foram raspadas, eluídas com acetato de etila e as três frações principais, denominadas F1= 96,4 mg (Rf= 0,06), F2= 342,0 mg (Rf= 0,38) e F3= 94,0 mg (Rf= 0,54), foram submetidas a novas etapas de fracionamento.

A fração F1 foi submetida a separação por CCD preparativa utilizando diclorometano como fase móvel, levando à obtenção de duas subfrações majoritárias. As análises por CG-EM mostraram que a fração F1.1 (15,6 mg) correspondia ao composto β -sitosterol (**1**) e que a fração F1.2 (20,0 mg) correspondia a uma mistura contendo o β -sitosterol (**1**) + estigmasterol (**2**).

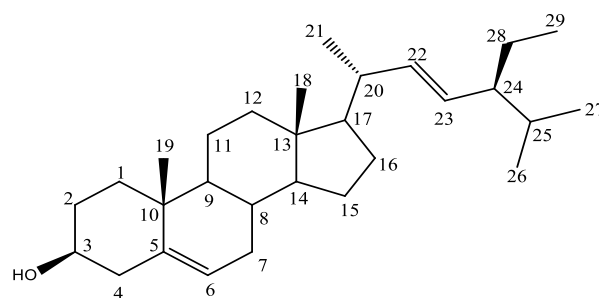
As amostras F2 e F3 foram dissolvidas em etanol a quente e mantidas em repouso por 48 horas. O precipitado formado foi lavado com etanol a frio e coletado. A fase líquida foi concentrada em evaporador rotativo e novamente dissolvida em etanol a quente. Esse processo foi repetido até que não fosse produzido precipitado. O sólido obtido a partir da fração F2, denominado F2-A foi submetido a CCD preparativa utilizando como fase estacionária sílica gel contendo AgNO_3 a 10% (m/m). Em cada placa foi aplicada solução de 100 mg do precipitado em quantidade de diclorometano suficiente para dissolução. A placa foi eluída em hexano:diclorometano 1:1 (v/v), levando à obtenção do acetato de lupeol (**3**), acetato de taraxasterol (**4**), acetato de pseudo-taraxasterol (**5**), acetato de germanicol (**6**) e uma mistura de acetato de α -amirina (**7**) + acetato de β -amirina (**8**) (26,5 mg). A amostra F3, foi reprecipitada em etanol (F3-A) e identificada como hexanoato de germanicol (**9**). Os componentes obtidos foram submetidos a análise por RMN de ^1H e de ^{13}C .

β -Sitosterol (1):



Formula molecular: $C_{29}H_{50}O$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,26 [Diclorometano]. Massa: 15,6 mg, RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$) δ : 5,35 (1H, d, $J = 5,0$ Hz, H-6), 3,52 (1H, m, H-3), 2,24 (2H, m, H-4), 1,99 (2H, m, H-7), 1,88 a 1,79 (3H, m, H-16; H-25), 1,01 (5H, s, H-19; H-28), 0,92 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H-21), 0,87 a 0,83 (5H, m, H-22; H-29), 0,81 a 0,75 (6H, m, H-26; H-27), 0,68 (3H, s, H-18). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 77,0$) δ : 140,7 (C-5), 121,7 (C-6), 71,8 (C-3), 56,7 (C-14), 56,0 (C-17), 50,1 (C-9), 45,8 (C-24), 42,3 (C-4), 42,3 (C-13), 39,7 (C-12), 37,2 (C-1), 36,5 (C-10), 36,1 (C-20), 33,9 (C-22), 31,9 (C-8), 31,6 (C-7), 29,7 (C-2), 29,1 (C-25), 28,2 (C-16), 26,0 (C-23), 24,3 (C-15), 23,0 (C-28), 21,1 (C-11), 19,8 (C-26), 19,4 (C-27), 19,0 (C-19), 18,8 (C-21), 12,0 (C-18), 11,9 (C-29). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 414 (54, M^+), 396 (46), 381 (47), 329 (62), 303 (48), 213 (72), 145 (62), 119 (57), 43 (100).

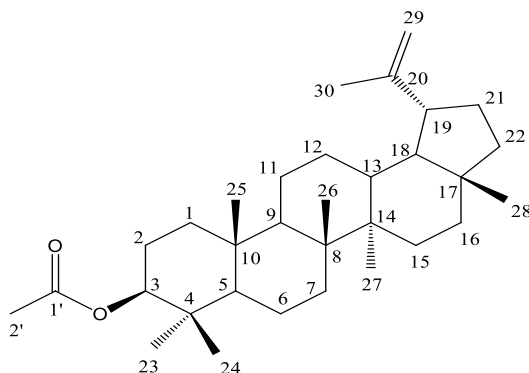
Estigmasterol (2):



Formula molecular: $C_{29}H_{48}O$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,20 [Diclorometano]. RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$) δ : 5,35 (1H, d, $J = 4,8$ Hz, H-6); 5,15 (1H, dd, $J = 15,1; 8,3$ Hz, H-22); 5,00 (1H, dd, $J = 15,1; 8,3$ Hz, H-23), 3,52 (1H, m, $J = 10,6; 4,73$ Hz, H-3). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 77,0$) δ : 140,7 (C-5), 138,3 (C-22), 129,2 (C-23), 121,7 (C-6), 71,8 (C-3), 56,8 (C-14), 55,9 (C-17), 51,2 (C-24), 50,1 (C-9), 45,8 (C-

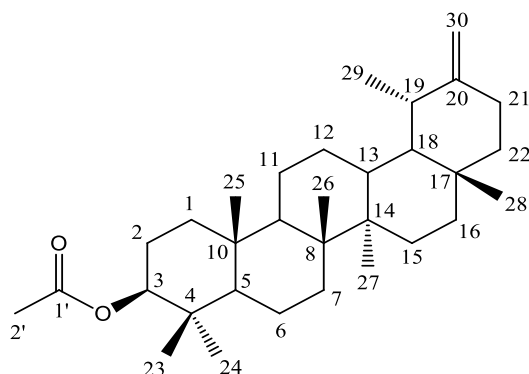
25), 42,3 (C-4), 42,2 (C-13), 40,5 (C-20), 39,6 (C-12), 37,2 (C-1), 36,5 (C10), 33,7 (C-8), 31,6 (C-7), 29,4 (C-16), 28,9 (C-2), 25,4 (C-11), 24,3 (C-28), 24,3 (C-15), 21,2 (C-21), 19,8 (C-27), 19,4 (C-26), 19,0 (C-19), 12,2 (C-29), 12,0 (C-18). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 412 (25, M^+), 394 (4), 379 (7), 351 (16), 300 (13), 271 (23), 255 (34), 229 (9%), 213 (24), 83 (77), 55 (100).

Acetato de lupeol (3):



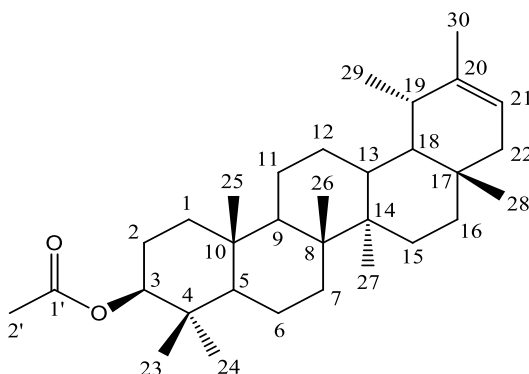
Formula molecular: $C_{32}H_{52}O_2$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,13 [hexano:diclorometano 1:1(v/v)]. Massa: 27,1 mg. RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$) δ : 4,68 (1H, s, H-29), 4,56 (1H, s, H-29), 4,47 (1H, m, $J = 10,0; 6,1$ Hz, H-3), 2,37 (1H, dt, $J = 11,1; 5,6$ Hz, H-19), 2,04 (3H, s, H-2'), 1,68 (5H, s, H-1; H-2; H-30), 1,50 (1H, m, H-1), 1,46 (1H, m, H-2), 1,02 (3H, s, H-26), 0,93 (3H, s, H-27), 0,84 (9H, m, H-23; H-24; H-25), 0,78 (3H, s, H-28). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 77,0$) δ : 171,1 (C-1'), 151,0 (C-20), 109,3 (C-29), 81,0 (C-3), 55,3 (C-5), 50,3 (C-9), 48,3 (C-18), 48,0 (C-19), 43,0 (C-17), 42,8 (C-14), 40,8 (C-8), 40,0 (C-22), 38,4 (C-1), 38,0 (C-4), 37,8 (C-13), 37,1 (C-10), 35,5 (C-16), 34,2 (C-7), 29,8 (C-21), 27,9 (C-23), 27,4 (C-2), 25,1 (C-15), 23,7 (C-12), 21,3 (C-2'), 20,9 (C-11), 19,3 (C-30), 18,2 (C-6), 18,0 (C-28), 16,5 (C-25), 16,2 (C-26), 16,0 (C-24), 14,5 (C-27). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 468 (9, M^+), 453 (7), 408 (4), 393 (8), 218 (22), 203 (35), 189 (100), 121 (78), 107 (72), 43 (64).

Acetato de taraxasterol (4):



Formula molecular: $C_{32}H_{52}O_2$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,16 [hexano:diclorometano 1:1(v/v)]. Massa: 10,7 mg. RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$) δ : 4,60 (2H, m, H-30), 4,48 (1H, m, H-3), 2,15 (1H, m, H-19), 2,05 (3H, s, H-2'), 1,02 (7H, m, H-18; H-26; H-27), 0,92 (3H, s, H-28), 0,87 (3H, s, H-23), 0,86 a 0,81 (10H, s, H-24; H-25; H-29), 0,73 (1H, s, H-5). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 77,0$) δ : 171,1 (C-1'), 154,7 (C-20), 107,1 (C-30), 81,0 (C-3), 55,4 (C-5), 50,4 (C-9), 48,6 (C-18), 42,0 (C-14), 40,9 (C-8), 39,4 (C-19), 39,1 (C-13), 38,8 (C-16), 38,4 (C-22), 38,3 (C-1), 37,8 (C-4), 37,0 (C-10), 34,5 (C-17), 34,0 (C-7), 27,9 (C-23), 26,6 (C-15), 26,1 (C-12), 25,6 (C-21), 25,5 (C-29), 23,7 (C-2), 21,4 (C-11), 21,3 (C-2'), 19,5 (C-28), 18,2 (C-6), 16,5 (C-24), 16,3 (C-26), 15,9 (C-25), 14,7 (C-27). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 468 (5, M^+), 408 (5) m/z , 365 (3), 229 (6), 190 (32), 189 (100), 109 (56), 95 (58).

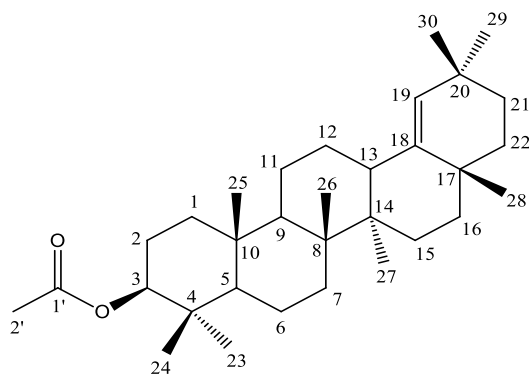
Acetato de pseudo-taraxasterol (5):



Formula molecular: $C_{32}H_{52}O_2$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,26 [hexano:diclorometano 1:1(v/v)]. Massa: 10,8 mg. RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$)

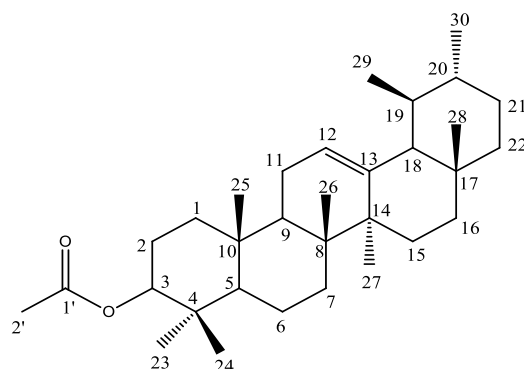
δ : 5,26 (1H, d, $J = 6,7$ Hz, H-21), 4,49 (1H, m, H-3), 2,05 (3H, s, H-2'), 1,64 a 1,61 (6H, s, H-2; H-12; H-30), 1,06 a 1,03 (5H, s, H-26; H-18; H-15), 0,98 (3H, d, $J = 6,6$ Hz, H-29), 0,94 (4H, s, H-27; H-1), 0,88 (3H, s, H-23), 0,86 a 0,83 (6H, s, H-24; H-25), 0,73 (3H, s, H-28). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$) δ : 171,0 (C-1'), 139,8 (C-20), 118,9 (C-21), 81,0 (C-3), 55,4 (C-5), 50,3 (C-9), 48,6 (C-18), 42,3 (C-14), 42,2 (C-22), 41,1 (C-8), 39,2 (C-13), 38,4 (C-1), 37,8 (C-4), 37,0 (C-10), 36,7 (C-16), 36,3 (C-19), 34,4 (C-17), 34,1 (C-7), 27,9 (C-23), 27,6 (C-2), 27,0 (C-12), 23,7 (C-15), 22,5 (C-29), 21,6 (C-30), 21,6 (C-11), 21,3 (C-2'), 18,2 (C-6), 17,7 (C-28), 16,5 (C-25), 16,4 (C-26), 16,0 (C-24), 14,7 (C-27). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 468 (7, M^+), 408 (8), 393 (6), 249 (11), 204 (11), 189 (100), 175 (18), 135 (23), 121 (50), 107 (36), 95 (45), 81 (27).

Acetato de germanicol (6)



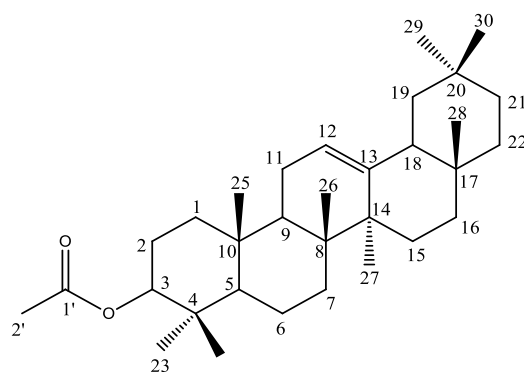
Formula molecular: $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,32 [hexano:diclorometano 1:1(v/v)]. Massa: 21,9 mg. RMN de ^1H (300 MHz, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$) δ : 4,86 (1H, s, H-19), 4,48 (1H, m, H-3), 2,04 (3H, s, H-2'), 1,07 (3H, s, H-25), 1,01 (3H, s, H-28), 0,93 (6H, s, H-29, H-30), 0,90 (3H, s, H-26), 0,84 (6H, s, H-23; H-24), 0,73 (3H, s, H-27). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$) δ : 171,0 (C-1'), 142,7 (C-18), 129,7 (C-19), 80,9 (C-3), 55,5 (C-5), 51,1 (C-9), 43,3 (C-14), 40,7 (C-8), 38,6 (C-1), 38,4 (C-13), 37,8 (C-4), 37,7 (C-16), 37,3 (C-22), 37,1 (C-10), 34,5 (C-7), 34,3 (C-17), 33,3 (C-21), 32,3 (C-20), 31,3 (C-29), 29,2 (C-30), 27,9 (C-23), 27,5 (C-15), 26,2 (C-12), 25,2 (C-28), 23,7 (C-2), 21,3 (C-2'), 21,1 (C-11), 18,1 (C-6), 16,8 (C-26), 16,5 (C-24), 16,1 (C-25), 14,5 (C-27). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 468 (6, M^+), 453 (15), 408 (1), 393 (4), 231 (10), 218 (14), 204 (76), 189 (100), 177 (62).

Acetato de α -amirina (7):



Formula molecular: $C_{32}H_{52}O_2$. Aspecto: sólido branco. CCD: R_f 0,42 [hexano:diclorometano 1:1 (v/v)]. RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$) δ : 5,11 (1H, t, $J = 3,7$ Hz, H-12), 4,50 (1H, dd, $J = 6,6; 9,5$ Hz, H-3), 2,08 (s, H-2'), 1,92 (m, H-20), 1,89 (m, H-11), 1,06 (s, H-27), 1,00 (s, H-26), 0,97 (s, H-25), 0,89 a 0,84 (m, H-23; H-24; H-30), 0,79 (s, H-28; H-29). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 77,0$) δ : 171,0 (C-1'), 139,6 (C-13), 124,3 (C-12), 80,9 (C-3), 59,0 (C-18), 55,2 (C-5), 47,6 (C-9), 42,0 (C-14), 41,5 (C-22), 40,0 (C-8), 39,6 (C-20), 39,6 (C-19), 38,4 (C-1), 37,7 (C-4), 36,8 (C-10), 33,7 (C-17), 32,8 (C-7), 31,2 (C-21), 28,7 (C-28), 28,1 (C-23), 26,7 (C-15), 26,6 (C-16), 23,6 (C-2), 23,3 (C-11), 23,2 (C-27), 21,4 (C-30), 21,3 (C-2'), 18,2 (C-6), 17,5 (C-26), 16,8 (C-29), 16,8 (C-24), 15,7 (C-25). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 468 (1, M^+), 408 (12), 365 (16), 255 (8), 270 (6), 218 (100), 203 (30), 189 (36), 175 (25), 147 (29), 135 (36) 55 (88).

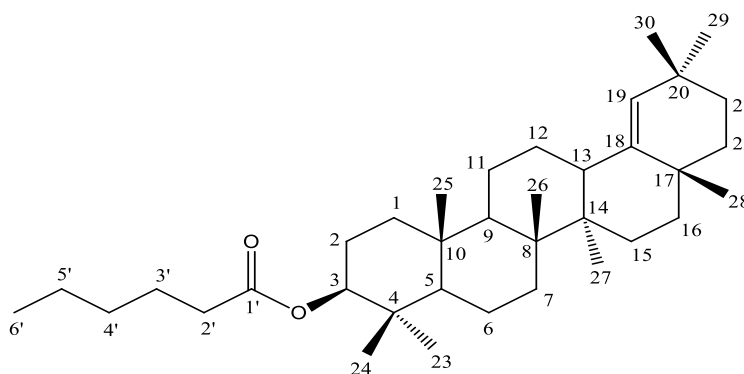
Acetato de β -amirina (8):



Formula molecular: $C_{32}H_{52}O_2$, Aspecto: sólido branco, CCD: R_f 0,42 [hexano:diclorometano 1:1(v/v)]. RMN de 1H (300 MHz, $\delta_{CDCl_3} = 7,26$) δ : 5,17 (t, $J = 3,6$

Hz, H-12), 4,50 (1H, dd, $J = 6,6; 9,5$ Hz, H-3), 2,08 (s, H-2'). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$) δ : 171,0 (C-1'), 145,2 (C-13), 121,6 (C-12), 80,9 (C-3), 55,2 (C-5), 47,5 (C-9), 47,2 (C-18), 46,7 (C-19), 41,7 (C-14), 40,0 (C-4), 38,2 (C-1), 37,7 (C-8), 37,1 (C-22), 36,8 (C-10), 34,7 (C-21), 33,3 (C-29), 32,6 (C-7), 32,5 (C-17), 31,1 (C-20), 28,4 (C-28), 28,1 (C-23), 26,9 (C-16), 26,1 (C-15), 25,9 (C-27), 23,6 (C-30), 23,6 (C-2), 23,6 (C-11), 21,3 (C-2'), 18,2 (C-6), 16,8 (C-26), 16,8 (C-25), 15,5 (C-24). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 468 (1, M^+), 408 (10), 218 (100), 203 (66), 204 (16), 190 (14), 189 (33) e 55 (83).

Hexanoato de germanicol (9):



Formula molecular: $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_2$, Aspecto: sólido branco, Massa: 29 mg. RMN de ^1H (300 MHz, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$) δ : 4,86 (1H, s, H-19), 4,48 (1H, m, H-3), 2,28 (3H, m, H-2'; H-13), 1,07, (3H, s, H-25), 1,01, (3H, s, H-28), 0,94, (6H, s, H-20; H-30), 0,90 (6H, s, H-26; H-6'), 0,84, (6H, s, H-23; H-24), 0,73 (3H, s, H-27). RMN de ^{13}C (75 MHz, $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$) δ : 173,7 (C-1'), 142,7 (C-18), 129,7 (C-19), 80,6 (C-3), 55,5 (C-5), 51,1 (C-9), 43,3 (C-14), 40,7 (C-8), 38,6 (C-1), 38,4 (C-13), 37,8 (C-4), 37,7 (C-22), 37,3 (C-16), 37,1 (C-10), 34,8 (C-2'), 34,5 (C-7), 34,3 (C-17), 33,3 (C-21), 32,4 (C-20), 31,3 (C-4'), 31,3 (C-29), 29,2 (C-30), 27,9 (C-23), 27,5 (C-15), 26,2 (C-12), 25,2 (C-28), 24,8 (C-3'), 23,7 (C-2), 22,3 (C-5'), 21,1 (C-11), 18,1 (C-6), 16,8 (C-26), 16,6 (C-25), 16,1 (C-24), 14,6 (C-27), 13,9 (C-6'). EM (IE, 70 eV), m/z (%): 524 (4, M^+), 509 (10), 408 (2), 393 (6), 218 (13), 204 (79), 189 (100), 177 (60), 99 (16), 71 (22).

3.8.2 Extrato da folha em hexano

O extrato das folhas em hexano (EFH) (7,6 g), foi fracionado em coluna de sílica-gel 60 (60-230 mesh), utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila nas proporções 99:1; 95:5; 90:10 (v/v). As frações obtidas foram agrupadas em 6 frações de

acordo com a similaridade em CCD analítica. A fração 1 (1,3 g), foi submetida a CCD preparativa utilizando como fase estacionária (sílica gel), aplicando solução de 100 mg do material em quantidade de diclorometano suficiente para dissolução. As placas foram eluídas em hexano:diclorometano 1:1 (v/v), obtendo-se 13 bandas. As bandas foram raspadas e extraídas com acetato de etila, levando à obtenção da fração principal F1.1 (143,3 mg), que foi submetida ao procedimento de reprecipitação, sendo esta dissolvida em etanol a quente e mantida em repouso por 48 horas. O precipitado formado (F1.1a), foi lavado com etanol a frio e coletado, a fase líquida foi concentrada e novamente reprecipitada até que não fosse produzido o precipitado. O sólido (37,0 mg), formado foi caracterizado como uma mistura dos compostos acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

3.8.3 Extrato da folha em acetato de etila

O extrato das folhas em acetato de etila (EFAC) foram fracionados por cromatográfica a vácuo em coluna de sílica-gel 60 (60-230 mesh), utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila nas proporções 99:1; 98:2; 95:5; 90:10; 10:10 (v/v). As frações obtidas foram agrupadas em 10 frações de acordo com a similaridade em CCD analítica, que foram submetidas a análise por CG-EM.

A fração 1 (8,4 g) foi selecionada para fracionamentos subsequentes utilizando cromatografia em coluna de (sílica-gel), utilizando a fase móvel hexano/diclorometano 4:1 e 1:1 (v/v), produzindo 13 frações (F1.0 a F1.12). A fração F1.4 (0,71 g), foi dissolvida em etanol a quente e mantida em repouso a 10 graus durante 48 horas, levando à formação de um precipitado branco. A fase líquida foi concentrada em evaporador rotativo e novamente submetida ao processo de precipitação. Esse procedimento foi repetido até a diminuição considerável da massa de amostra restante em fase líquida. Ao final, foram obtidos 0,36 g de precipitado branco que então foi submetido a cromatografia em coluna (sílica-gel), utilizando como fase móvel hexano/diclorometano 3:1 (v/v). Essa etapa de fracionamento levou à obtenção de duas frações, uma delas caracterizada como o composto acetato de lupeol (7,1 mg) (**3**) e outra como uma mistura (15,9 mg), contendo os compostos acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

3.9 Atividade alelopática dos extratos obtidos da planta *Euphorbia heterophylla*

A avaliação do efeito alelopático dos extratos obtidos de *E. heterophylla* foi realizada através de testes de inibição de germinação e crescimento radicular, utilizando sementes de *Sorghum bicolor* L. (sorgo), *Cucumis sativus* L. (pepino) e *Lactuca sativa* L. (alface). O experimento foi esquematizado em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema 3 x (7 x 4 x 3 + 1). As soluções aquosas dos extratos foram preparadas em Tween 80 a 0,5% (v/v) nas concentrações de 0 (controle), 0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mg mL⁻¹. As emulsões preparadas foram transferidas em quantidades de 5 mL para cada placa de Petri com 8 cm de diâmetro, contendo 20 sementes sobre um papel de germinação (Foley *et al.*, 2010). As placas foram seladas e transferidas para câmara de germinação tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) à temperatura de 25 °C, durante um período de quatro dias, sob fotoperíodo de 24 horas para as sementes de alface e sem iluminação para as sementes de sorgo e pepino (Tomaz *et al.*, 2014). Após este período, as sementes foram fotografadas e o crescimento dos caules e raízes foram medidos através do software Photomed. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat (Silva & Azevedo, 2016).

3.10 Atividade antibacteriana dos extratos e seus derivados obtidos da planta *Euphorbia heterophylla*

3.10.1 Teste antimicrobiano por diluição

O teste de sensibilidade foi realizado conforme as normas estabelecidas pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS, 2003).

As cepas das bactérias das espécies: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 (cepa multirresistente) e *Escherichia coli* ATCC 29214 foram inicialmente cultivados (37 °C, *overnight*) em meio Mueller-Hinton (MH, HIMEDIA, Mumbai, Índia). Posteriormente, as culturas foram centrifugadas (2800 x g, 10 min) e o inóculo foi padronizado por comparação visual usando escala McFarland (correspondendo a uma população final de 1 a 2 x 10⁸ UFC mL⁻¹ de *E. coli*). Foi utilizado meio MH como padrão e 40,25 µL dos extratos ERH, EFH, ERME, EFME, EFAC, ERMEAc e EFMEAc e os compostos 1; 3-6 e 9 e as misturas contendo os compostos 1,2; 7,8; 3,7,8, (2 mg mL⁻¹), como teste antibacteriano. As soluções-teste foram obtidas pela

dissolução em tween 80 a 4% (v/v). O experimento foi realizado em duas repetições, triplicata, em placa de microdiluição contendo 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). A concentração testada foi de 400 µg mL⁻¹ e o volume de inóculo utilizado foi de 25 µL em 175 µL de meio. Os controles positivos (meio de cultura, sem composto, com inóculo) foram utilizados para verificar o crescimento dos microrganismos em MH e os controles negativos (meio de cultura sem inóculo e sem composto; meio de cultura sem inóculo e com composto) para comprovar a esterilidade do meio foram realizados em ausência de nisina.

A incubação foi realizada a 37 °C durante 48 h e foram obtidas as densidades ópticas a 600 nm em leitor de placas de microdiluição (THERMO SCIENTIFIC, Vantaa, Finland) para verificar se houve inibição do crescimento dos microrganismos.

3.10.2 Teste de sensibilidade por difusão

As atividades antimicrobianas também foram avaliadas por difusão em meio sólido de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (CLSI, 2005). Os microrganismos utilizados foram: *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 29214, cultivados em meio MH aerobicamente a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas (2800 x g, 10 min) e o inóculo foi padronizado por comparação visual usando escala McFarland (correspondendo a uma população final de 1 a 2 x 10⁸ UFCmL⁻¹ de *E. coli*). Cada microrganismo foi adicionado (*pour plate*) aos meios MH, ágar 1,5% (m/v), numa concentração de 10% (v/v). Após solidificação do meio, poços de 5 mm de diâmetro foram utilizados para adição dos extratos ERH, EFH, ERME, EFME, EFAC, ERMEAc e EFMEAc e os compostos 1; 3-6 e 9 e as misturas contendo os compostos 1,2; 7,8; 3,7,8, como teste antibacteriano (2 mg mL⁻¹). As placas foram condicionadas a 4 °C por overnight para a completa difusão das soluções-teste em meio sólido e posteriormente incubadas a 37 °C por 24 h. Os halos de inibição foram mensurados e a atividade foi determinada de acordo com a zona de inibição visível, considerando um raio mínimo de 3 mm, a partir da borda do orifício do poço. O experimento foi realizado em duas repetições, triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção e caracterização dos extratos

As extrações das folhas de *E. heterophylla* foram realizadas com três tipos de solventes, através do método de maceração visando separar grupos de compostos de diferentes polaridades. Os extratos das raízes dessa planta foram obtidos através do método de extração por soxhlet, utilizando os solventes metanol e hexano separadamente. Os diferentes tipos de solventes proporcionaram a obtenção de diferentes grupos de componentes de acordo com a polaridade. O metanol é geralmente utilizado para extração de alcaloides, flavonoides e ácidos graxos e o hexano para compostos menos polares, como triterpenos (Rodríguez-Solana *et al.*, 2014; Pathomwichaiwat *et al.*, 2015).

As massas e os rendimentos dos extratos das folhas e raízes de *E. heterophylla* e os solventes correspondentes seguem reportados na tabela 1.

Tabela 1: Rendimento dos extratos de *E. heterophylla*

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
ERH	7,54	1,6
ERME	31,60	6,7
EFH	8,75	0,6
EFME	25,95	1,7
EFAC	15,47	1,0

Extrato da raiz em hexano (ERH) e em metanol (ERME), Extrato da folha em hexano (EFH), em metanol (EFME) e em acetato de etila (EFAC).

A marcha fitoquímica foi realizada visando classificar as classes de componentes distribuídos nos extratos, afim de especificar os procedimentos e métodos a serem utilizados no isolamento dos compostos de interesse. Os resultados dos testes para as diferentes classes de metabólitos secundários estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2: Classes químicas encontradas para os extratos de *E. heterophylla*

Extratos	Alcaloides		Triterpenos		Carboidrato	Proteína	Fenólicos	
	D	V	L-B	As	KK	B	S	C
ERH	-	-	+	+	-	-	-	-
ERME	+	+	+	+	+	-	-	-
EFH	-	-	+	+	-	-	-	-
EFME	+	+	+	+	+	-	-	-
EFAC	-	-	+	+	+	-	-	-

Extrato da raiz em hexano (ERH) e em metanol (ERME); Extrato da folha em hexano (EFH), em metanol (EFME) e em acetato de etila (EFAC). Teste de Dragendorff (D), Vagner (V), Liebermann-Burchard (L-B), Salkawsk (Sa), Keller Killian (KK), Biureto (B), Shinada (S), Cloreto Férrico (C).

Os extratos obtidos em metanol indicaram, pela marcha fitoquímica, a possível presença de alcaloides, triterpenos e carboidratos. Os extratos em hexano e acetato de etila indicaram a presença de triterpenos (Tabela 2). James & Friday (2010), constataram a presença de alcaloides, saponinas, flavonoides e taninos para os extratos aquosos e etanoicos da planta *E. heterophylla*. Os extratos metanoicos do caule e folhas de *E. heterophylla* avaliados por Okeniyi *et al.* (2012), apresentaram em sua composição saponinas, carboidratos, triterpenos, flavonoides e taninos. A fração do extrato botânico da planta *E. heterophylla*, em etanol obtida por Fred-Jaiyesimi & Abo (2010), apresentou em sua composição alcaloides, saponinas e taninos. Na literatura diferentes metabólitos foram relatados para o gênero *Euphorbia* spp. entre estes os diterpenos (*Euphorbia ebracteolata*), triterpenos pentacíclicos (*Euphorbia neriifolia*), flavonoides (*Euphorbia macroclada*) e alcaloides (*Euphorbia millii*) (Uemura & Hirata, 1971; Yuan *et al.*, 2016; Palit, Mandal & Bhunia, 2016; Farhan *et al.*, 2013).

Visto que os testes de marcha fitoquímica foi positiva para alcaloides, os extratos metanólicos foram submetidos ao procedimento para extração e identificação. Os extratos metanólicos das folhas e raízes foram acidificados e submetidos a extração líquido-líquido com acetato de etila e diclorometano para a limpeza de compostos hidrofóbicos denominados EFMEAc e ERMEAc, respectivamente. A fase aquosa restante foi alcalinizada e submetida a extração líquido-líquido para promover extração dos possíveis alcaloides pelo solvente orgânico denominados EFMEAlc e ERMEAlc. O rendimento e massa das frações obtidas estão disposto na tabela 3.

Tabela 3: Rendimentos das frações dos extratos de *E. heterophylla*

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
ERMEAc	3,45	11,5
ERMEAlc	0,46	1,5
EFMEAc	3,03	13,8
EFMEAlc	0,66	3,0

Extração líquido-líquido após a acidificação de extrato da raiz em metanol (ERMEAc), e após alcalinização (ERMEAlc), extração líquido-líquido após a acidificação de extrato da folha em metanol (EFMEAc), e após alcalinização (EFMEAlc).

Os testes para marcha fitoquímica foram realizados para as frações obtidas após a extração líquido-líquido ERMEAc, ERMEAlc, EFMEAc e EFMEAlc, os resultados seguem dispostos na tabela 4.

Tabela 4: Classes químicas encontradas para frações dos extratos da planta *E. heterophylla*

Extratos	Alcaloides		Terpenos		Carboidrato	Proteína	Fenólicos	
	D	V	L-B	As	KK	B	S	C
ERMEAc	-	-	+	+	+	-	-	-
ERMEAlc	+	+	-	-	-	-	-	-
EFMEAc	-	-	+	+	+	-	-	-
EFMEAlc	+	+	-	-	-	-	-	-

Extração líquido-líquido após a acidificação de extrato da raiz em metanol (ERMEAc), após alcalinização (ERMEAlc), após a acidificação de extrato folha em metanol (EFMEAc), após alcalinização (EFMEAlc). Teste de Dragendorff (D), Vagner (V), Liebermann-Burchard (L-B), Salkawsk (Sa), Keller Killian (KK), Biureto (B), Shinada (S), Cloreto Férrico (C).

A marcha fitoquímica avaliada para as frações dos extratos indicaram a presença de possíveis alcaloides nas frações obtidas após a alcalinização da fase aquosa EFMEAlc e ERMEAlc. A família Euphorbiaceae apresenta diferentes subclasses de alcaloides relatadas na literatura entre estes os quinolínicos, isoquinolínicos e pirrolidínicos (Bringmann *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2011). Os extratos e seus

derivados foram submetidos a derivatização e a hidrólise seguida de derivatização e foram analisados através de CG-EM os resultados seguem dispostos na tabela 5.

Tabela 5: Caracterização dos extratos das folhas e raízes de *E. heterophylla*, derivatizadas antes e após a hidrólise alcalina

Compostos	Extratos										IR	IR*	
	EFAC		EFME		EFMEAc		ERME		ERMEAc				
	D	HD	D	HD	D	HD	D	HD	D	HD			
1	Ácido benzoico-TMS	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	1232	1242 ⁵
2	Glicerol-TMS	13,3	18,0	4,2	9,4	7,0	14,4	2,2	4,7	11,9	3,1	1292	1290 ⁵
3	Ácido fenilacético- TMS	0,8	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1298	1298 ²
4	Ácido piroglutâmico-TMS	-	-	1,6	-	2,4	-	-	-	-	-	1529	1540 ¹
5	Vanilina-TMS	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,9	1534	1529 ⁵
6	Dodecan-1-ol, TMS	-	1,2	-	0,5	0,8	0,9	-	-	-	-	1570	1575 ⁶
7	Ácido láurico, TMS	-	-	-	0,4	-	0,4	-	-	-	-	1651	1656 ²
8	Ácido mirístico-TMS	-	0,6	-	1,0	-	0,7	-	0,7	-	0,4	1849	1854 ⁶
9	α -Glucopirranose-TMS	-	-	8,2	-	-	-	-	-	-	-	1927	1933 ⁶
10	Ácido pentadecanóico-TMS	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	0,3	1946	1950 ⁵
11	Palmitato de etila	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2	-	1989	1993 ³
12	Inositol-TMS	-	-	3,8	-	-	-	-	-	-	-	1991	1999 ⁶
13	β -Glucopirranose-TMS	-	-	7,3	-	0,8	-	12,3	-	1,0	-	2024	2033 ⁶

Continuação.

Tabela 5: Caracterização dos extratos das folhas e raízes de *E. heterophylla*, derivatizadas antes e após a hidrólise alcalina

Compostos	Extratos										IR	IR*	
	EFAC		EFME		EFMEAc		ERME		ERMEAc				
	D	HD	D	HD	D	HD	D	HD	D	HD			
14	Ácido palmítico-TMS	4,6	17,4	2,0	41,1	4,3	21,1	0,2	34,5	16,6	31,8	2053	2050 ⁵
15	Ácido ferúlico-TMS	-	1,6	-	0,6	-	-	-	3,4	-	2,5	2094	2101 ⁵
16	Mio-inosiol-TMS	-	-	5,4	-	-	-	0,9	-	-	-	2131	2126 ⁵
17	Ácido margárico-TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	2142	2149 ⁵
18	Ácido linoleico-TMS	2,1	6,3	0,5	8,4	1,0	8,0	-	9,0	5,2	13,7	2210	2212 ⁵
19	Ácido α -linolênico-TMS	6,4	12,8	1,0	17,7	2,8	19,2	-	6,6	10,0	19,8	2217	2110 ⁷
20	Ácido elaídico-TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	2223	2227 ⁵
21	Ácido esteárico-TMS	1,7	6,0	0,7	8,9	1,5	5,7	-	8,1	3,6	5,2	2240	2249 ⁶
22	Ácido icosanóico-TMS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2438	2447 ⁵
23	α -gliceril pmitato-TMS	5,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2601	2607 ⁴
24	Sacarose-TMS	-	-	33,7	-	-	-	50,2	-	-	-	2711	2714 ⁵

Continuação.

Tabela 5: Caracterização dos extratos das folhas e raízes de *E. heterophylla*, derivatizadas antes e após a hidrólise alcalina

Compostos	Extratos										IR	IR*	
	EFAC		EFME		EFMEAc		ERME		ERMEAc				
	D	HD	D	HD	D	HD	D	HD	D	HD			
25	α -gliceril linoleato-TMS	11,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2770	2777 ⁵
26	α -gliceril estearato-TMS	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2796	2808 ⁵
	Ácidos graxos	14,8	43,1	4,2	77,5	9,6	55,6	0,2	58,9	35,4	72,9		
	Carboidrato	-	-	58,4	-	0,8	-	63,4	-	1,0	-		
	Ésteres ácido graxos	17,6	-	-	-	-	-	-	-	6,2	-		

Extrato da folha em em metanol (EFME), em acetato de etila (EFAC), extração líquido-líquido após a acidificação de extrato em metanol (EFMEAc), extrato da raiz em metanol (ERME), extração líquido-líquido após a acidificação de extrato em metanol (ERMEAc), trimetilsilil (TMS), D derivatização, HD hidrólise seguida de derivatização, TMS trimetilsilil, IR índice de retenção calculado e IR* índice de retenção literatura. ¹Halket *et al.* (1999), ²Isidorov *et al.* (2005), ³Pino *et al.* 2005, ⁴Isidorov *et al.* (2007), ⁵Isidorov *et al.* (2008), ⁶Kotowska, Biegańska & Isidorov, (2012), ⁷Buszewska-Forajta *et al.* (2015).

Não foi possível identificar alcaloides através do método desenvolvido para identificação dos componentes por espectro de massas e índice de retenção. Desta forma não foram identificados alcaloides para as frações obtidas após a alcalinização da fase aquosa EFMEAlc e ERMEAlc. Entretanto, foi possível detectar vários ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos nas frações obtidas após acidificação dos extratos em metanol (Tabela 5). Após a hidrólise todos os extratos apresentaram um aumento significativo na concentração dos diferentes tipos de ácidos graxos. O aumento da quantidade destes componentes está diretamente relacionado a hidrólise de ésteres de triacilglicerol ou outros tipos de ésteres presentes no extrato, em razão dessas constatou-se também um aumento considerável em glicerol para a maioria dos extratos analisados (Gutiérrez *et al.*, 1999). A hidrólise de produtos contendo ésteres de ácidos graxo é recomendado para a análise em CG-EM, pois as altas massas moleculares destes compostos dificultam a volatilidade inviabilizando a análise por este método (Gutiérrez *et al.*, 1999; Asperger *et al.*, 2001). Os cromatogramas referentes às análises por CG-EM das amostras dos extratos EFAC antes e após a hidrólise seguem dispostas na figura 1.

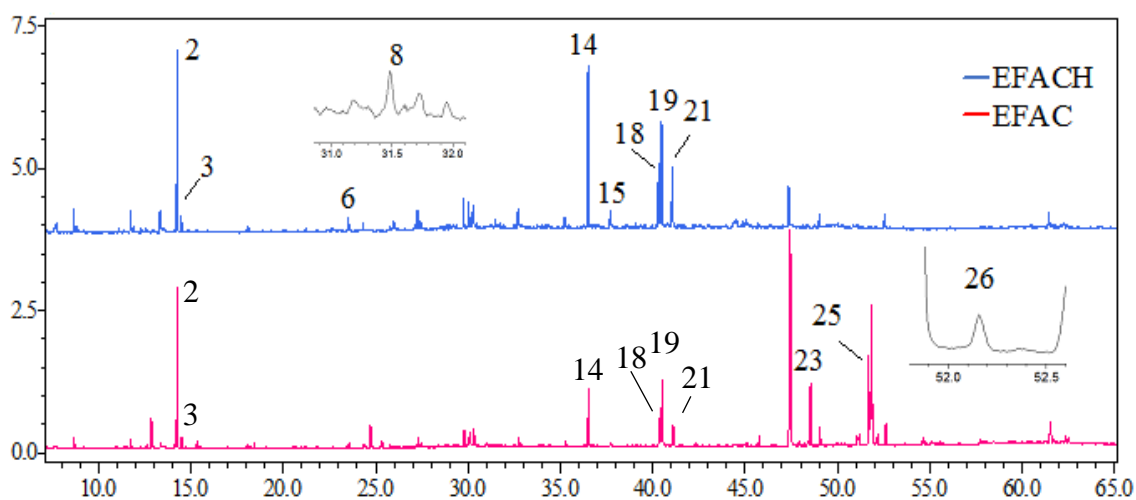


Figura 1: Cromatograma de íons totais do extrato das folhas de *E. heterophylla* em acetato de etila derivatizados antes (EFAC) e após a hidrólise (EFACH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.

Foi identificado para o extrato EFAC 14,8% de ácidos graxos que após a hidrólise teve um aumento em 43,1% (Tabela 5). Os ácidos graxos majoritários foram os ácidos palmítico (**14**) (4,6%), linoleico (**18**) (2,1%), α -linolênico (**19**) (6,4%) e esteárico (**21**) (1,7%), aumentando para 17,4%, 6,3%, 12,8% e 6,0% respectivamente após a hidrólise alcalina (Figura 1). Os principais compostos fenólicos identificados após a hidrólise

foram os ácidos fenilacético (**3**) (1,7%) e ferúlico (**15**) (1,6%). Após a hidrólise foram identificados o álcool dodecan-1-ol (**6**) (1,2%), e ácido mirístico (**8**) (0,6%), possivelmente derivados de ésteres. A concentração de glicerol (**2**) aumentou após a hidrólise de 13,3% para 18,0% indicando a formação de glicerol após a hidrólise de triacilglicerídeos, tendo em vista que foram identificados 17,6% de ésteres de ácidos graxos para a amostra EFAC. Os ésteres α -gliceril pmitato (**23**) (5,4%), β -gliceril linoleato (**25**) (11,4%), e α -gliceril estearato (**26**) (0,8%), não foram identificados após o procedimento de hidrólise.

Os cromatogramas referentes as análises por CG-EM das amostras dos extratos EFME antes e após a hidrólise seguem dispostas na figura 2.

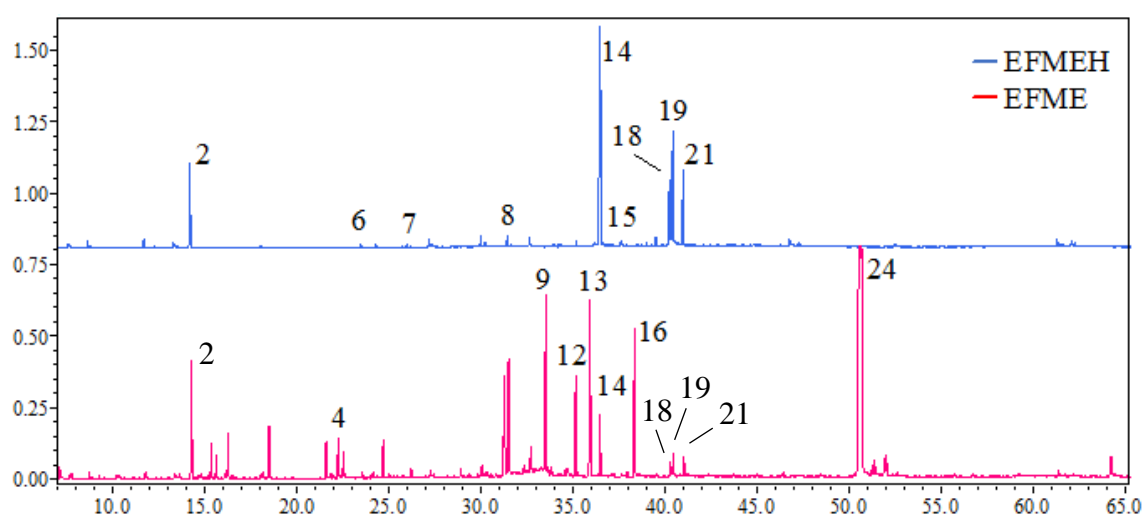


Figura 2: Cromatograma de íons totais do extrato das folhas de *E. heterophylla* em metanol derivatizados antes (EFME) e após a hidrólise (EFMEH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.

A sacarose (**24**) (33,7%), foi identificada como o componente majoritário para a amostra EFME, tendo em sua composição a concentração de 58,4% de carboidratos (Figura 2 e Tabela 5). Foram identificados apenas 4,2% de ácidos graxos para a amostra EFME, e após a hidrólise o total aumentou para 77,5%. Foram identificados os ácidos palmítico (**14**) (2,0%), linoleico (**18**) (0,5%), α -linolênico (**19**) (1,0%) e esteárico (**21**) (0,7%), aumentando para 41,1%, 8,4%, 17,7% e 8,9%, respectivamente, após a hidrólise alcalina (Figura 2). Após a hidrólise os carboidratos foram separados na fase aquosa, assim não foram identificados para a amostra hidrolisada. Foram identificados os ácidos láurico (**7**) (0,4%) e mirístico (**8**) (1,0%), possivelmente derivados de ésteres ou estarem

mais concentrados devido a diminuição dos carboidratos. A concentração de glicerol (**2**) aumentou após a hidrólise de 4,2% para 9,4% indicando a hidrólise de triacilglicerídeos.

Os cromatogramas referentes as análises por CG-EM dos extratos EFMEAc antes e após a hidrólise seguem dispostas na figura 3.

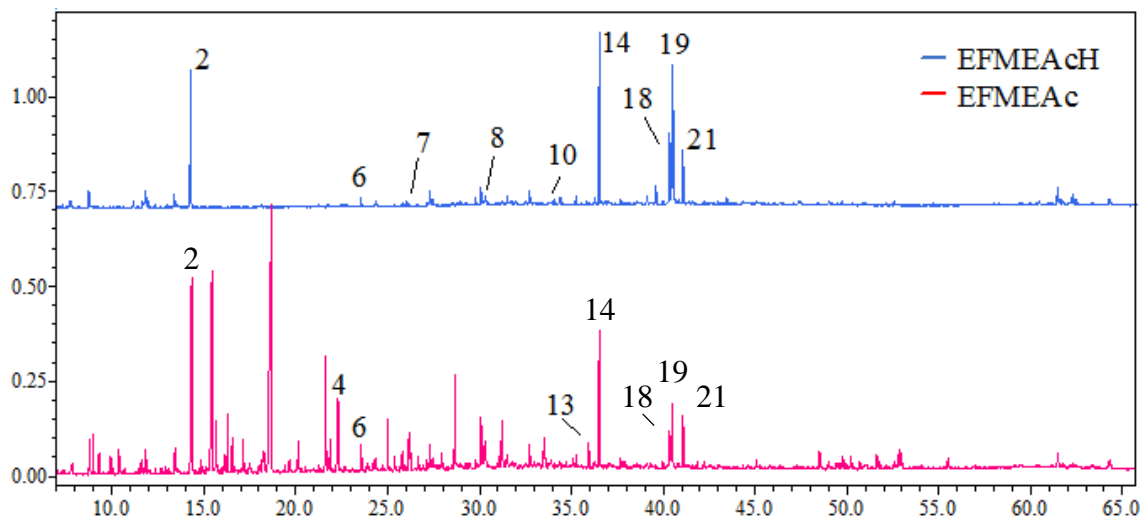


Figura 3: Cromatograma de íons totais das frações obtidas após acidificação e extração líquido-líquido do extrato EFME de *E. heterophylla*, derivatizados antes (EFMEAc) e após a hidrólise (EFMEAcH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.

Foi identificado para a fração EFMEAc 9,6% de ácidos graxos, que aumentou para 55,6% após a hidrólise (Tabela 5). Os ácidos graxos majoritários identificados foram os ácidos palmítico (**14**) (4,3%), linoleico (**18**) (1,0%) α -linolênico (**19**) (2,8%) e esteárico (**21**) (1,5%), com aumento em 21,1%, 8,0%, 19,2% e 5,7%, respectivamente, após a hidrólise (Figura 3). Após a hidrólise foram identificados os ácidos láurico (**7**) (0,4%), mirístico (**8**) (0,7%), e pentadecanóico (**10**) (0,5%), possivelmente derivados de ésteres. A concentração de glicerol (**2**) aumentou de 7,0% para 14,4%, após a hidrólise de triacilglicerídeos.

Os cromatogramas referentes as análises por CG-EM das amostras dos extratos ERME antes e após a hidrólise seguem dispostas na figura 4.

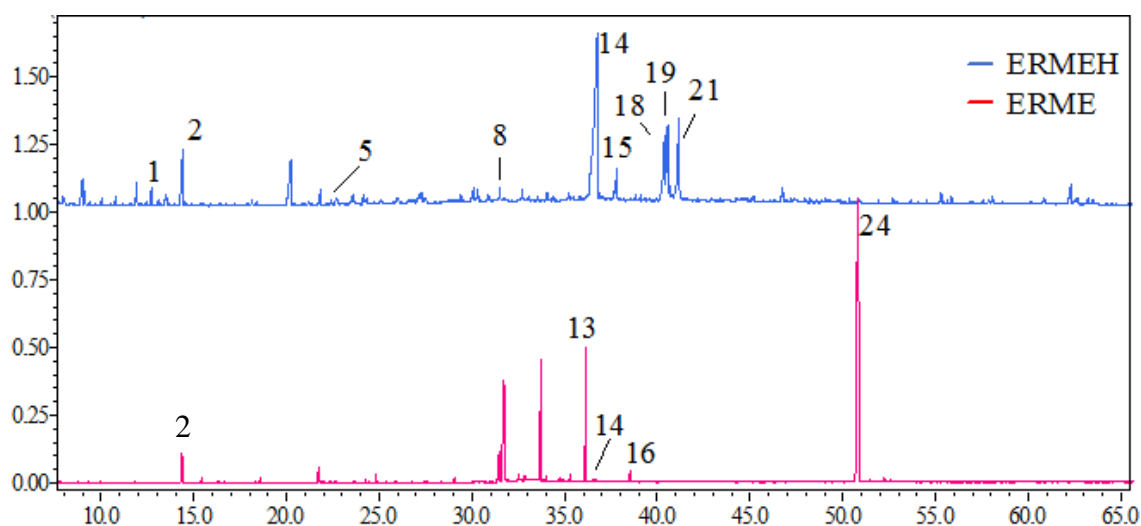


Figura 4: Cromatograma de íons totais do extrato das raízes de *E. heterophylla* em metanol derivatizados antes (ERME), e após a hidrólise (ERMEH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.

A amostra ERME é constituída por 63,4% de carboidratos e apenas 0,2% de ácidos graxos, sendo os componentes majoritários a sacarose (**24**) (50,2%), e β -glucopiranosose (**13**) (12,3%), (Figura 4). Após a hidrólise os carboidratos foram separados na fase aquosa, assim não foram identificados para a amostra hidrolisada. Desta forma pode-se identificar a presença de compostos que antes estavam diluídos, além da hidrólise de ésteres presentes na amostra. Sendo assim após a hidrólise a quantidade de ácidos graxos aumentou para 55,6%, contribuindo com o aumento de ácido palmítico (**14**) de 0,2% para 34,5% e o aparecimento de ácido mirístico (**8**) (0,7%), linoleico (**18**) (9,0%), α -linolênico (**19**) (6,6%), e esteárico (**21**) (8,1%). Após a hidrólise foi verificado também o aparecimento do ácido ferúlico (**15**) (3,4%).

Os cromatogramas referentes as análises por CG-EM dos extratos ERMEAc antes e após a hidrólise seguem dispostas na figura 5.

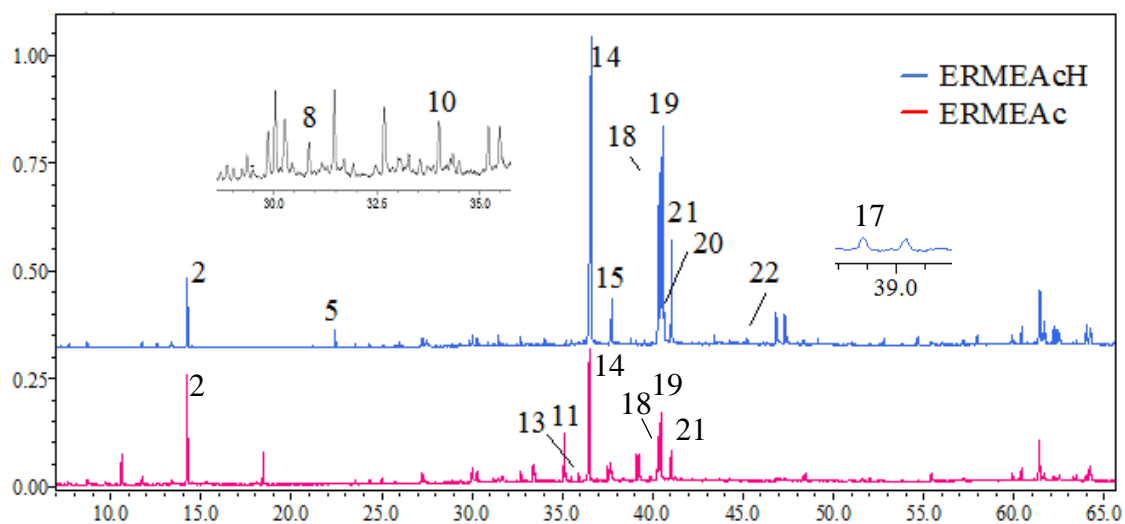


Figura 5: Cromatograma de íons totais da fração obtida após acidificação e extração líquido-líquido do extrato ERME de *E. heterophylla*, derivatizados antes (ERMEAc), e após a hidrólise (ERMEAcH). Os números dos compostos referem-se aos relatados na tabela 5.

A fração ERMEAc é constituída por 35,4% de ácidos graxos que, após a hidrólise a concentração destes compostos, aumentaram para 72,9% (Tabela 5). Os ácidos graxos majoritários identificados foram os ácidos palmítico (**14**) (16,6%), linoleico (**18**) (5,2%), α -linolênico (**19**) (10,0%), e esteárico (**21**) (3,6%), com aumento para 31,8%, 13,7%, 19,8% e 5,2%, respectivamente após a hidrólise (Figura 5). Foi identificado o palmitato de etila (**11**) (6,2%), que após a hidrólise não foi identificado, contribuindo para formação de ácido palmítico. Após a hidrólise foi constatado ácido mirístico (**8**) (0,4%), pentadecanóico (**10**) (0,3%), ferúlico (**15**) (2,5%), margárico (**17**) (0,2%), eláidico (**20**) (1,2%), e icosanóico (**22**) (0,3%), possivelmente provenientes de ésteres hidrolisados.

Os ácidos palmítico, linoleico, α -linolênico e esteárico foram encontrados para todos extratos avaliados para planta *E. heterophylla* (Tabela 5). Estes ácidos também foram identificados em diferentes espécies do gênero *Euphorbia* spp. como *E. semiperfoliata*s, *E. pithyusa*, *E. characias* e *E. dendroides* (Bruni *et al.*, 2004).

4.2 Isolamento e identificação de componentes do extrato da raiz em hexano

A massa obtida para o extrato da raiz em hexano (ERH), foi de 7,54 g e a marcha fitoquímica realizada indicou a presença de triterpenos em sua composição. Sendo assim foi realizado a análise em CG-EM, disposto no cromatograma figura 6 e tabela 6.

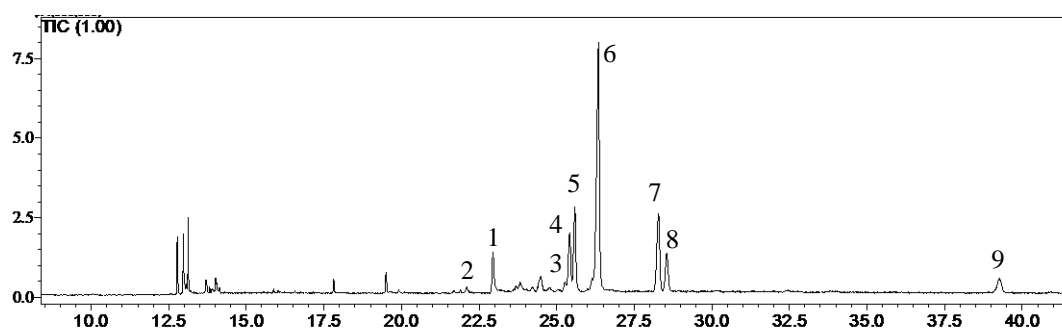


Figura 6: Cromatograma de íons totais do extrato da raiz em hexano de *E. heterophylla*.

A tabela 6 apresenta as principais fragmentações, referentes aos picos selecionados no cromatograma figura 6.

Tabela 6: Fragmentações de massa para picos selecionados no cromatograma (Figura 6) para componentes majoritários no extrato da raiz em hexano

Pico	Tr	Fragmentos (m/z)
1	22.91	189(1,4%), 203(0,5%), 214(2,8%), 218(0,4%)
2	24.49	189(61,5%), 203(34,3%), 218(87,3%), 430(1,9%)
3	25.27	189(53,5%), 203(26,8%), 218(18,9%)
4	25.42	189(24,5%), 203(60,1%), 218(87,6%)
5	25.58	189(51,6%), 203(13,4%), 214(0,1%), 218(7,5%)
6	26.35	189(29,5%), 203(19,2%), 214(0,2%), 218(49,6%)
7	28.28	189(60,3%), 203(11,9%), 214(0,6%), 218(3,1%)
8	28.55	189(47,8%), 203(11,7%), 214(0,1%), 218(3,8%)
9	39.28	189(84,5%), 203(10,8%), 214(4,0%), 218(2,5%)

Tr: tempo de retenção para picos analisados na figura 6.

Os picos selecionados no cromatograma (Figura 6), apresenta fragmentações de massa (Tabela 6) características de triterpenos (Ogunkoya, 1981; Ayatollahi *et al.*, 2011). Assim a amostra ERH, foi conduzida a procedimentos cromatográficos afim de isolar os metabólitos de interesse. O extrato foi eluído em CCD preparativa com sílica gel utilizando hexano/diclorometano (1:1) em duas etapas, obtendo-se 12 frações (Figura 7).

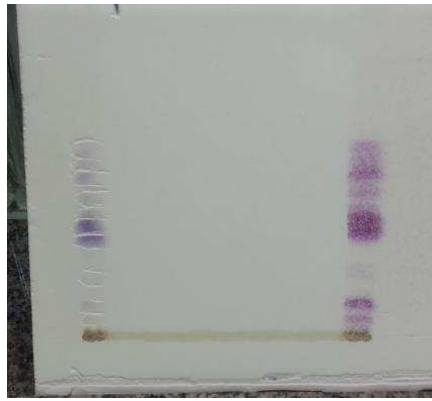


Figura 7: Cromatografia em camada delgada em sílica gel para o extrato hexânico da raiz de *E. heterophylla* eluída duas vezes com fase móvel hexano/diclorometano (1:1).

As frações obtidas (Figura 7), foram analisadas em CG-EM, e de acordo com os resultados avaliados três frações foram selecionadas por apresentarem picos com fragmentações de massas características para triterpenos denominadas F1, F2 e F3. As frações F2 e F3 passaram por procedimento de reprecipitação denominadas F2-A e F3-A, foram analisadas novamente por CG-EM e os cromatogramas seguem dispostos na figura 8.

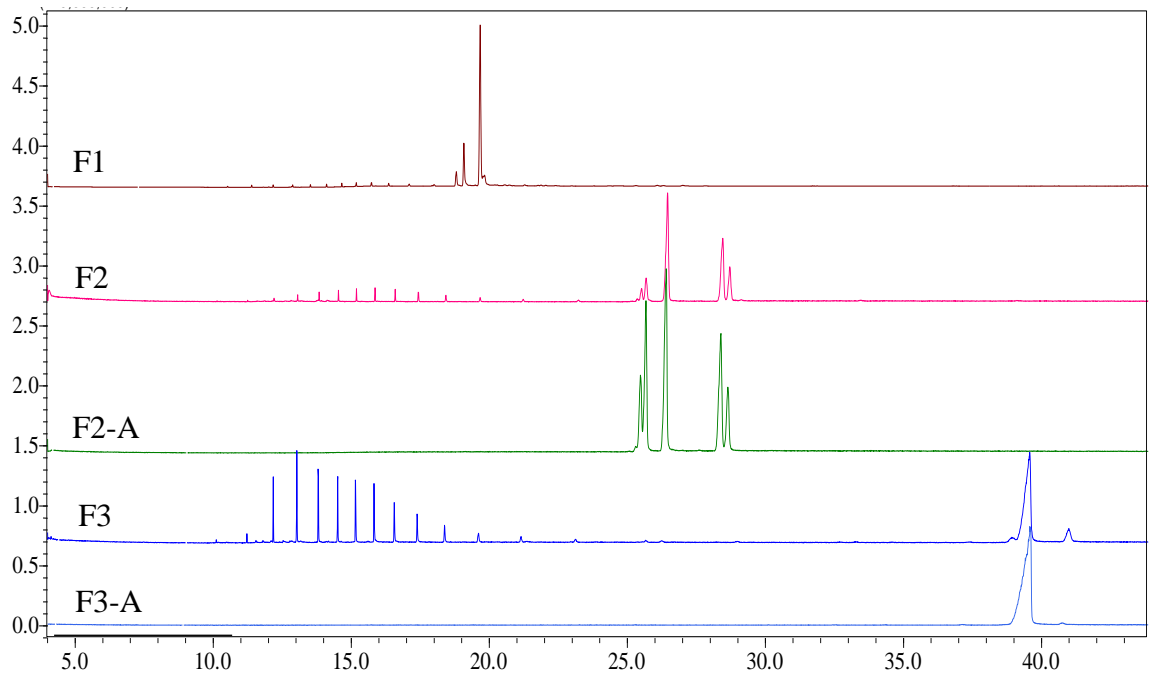


Figura 8: Cromatogramas de íons totais das frações obtidas do extrato da raiz de *E. heterophylla* em hexano antes (F1, F2 e F3) e após a reprecipitação (F2-A e F3-A).

As amostras F1 e F2-A foram submetidas aos procedimentos cromatográficos afim de isolar os componentes de interesse, a amostra F3-A, contendo apenas um composto foi submetida diretamente a análise por RMN (Figura 8).

A fração F1 foi eluída em CCD preparativa utilizando diclorometano como fase móvel figura 9.

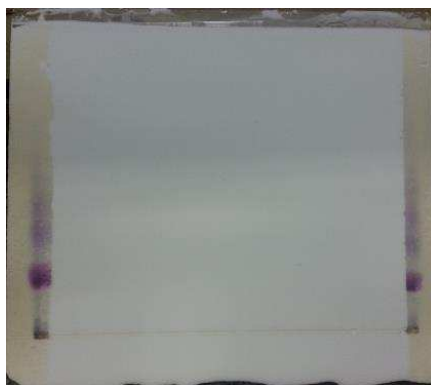


Figura 9: Cromatografia em camada delgada sílica gel para a amostra F1, utilizando diclorometano como eluente.

Após o procedimento cromatográfico (Figura 9), duas frações foram obtidas, dando origem aos composto β -sitosterol (**1**) (15,60 mg) e a uma mistura de β -sitosterol (**1**) + estigmasterol (**2**) (20 mg) identificados através de espectrometria de massas, e análise por RMN de ^1H (300 MHz), de ^{13}C (75 MHz) e DEPT 135.

Amostra contendo o composto (**1**) foi submetido a análise por CG-EM e o cromatograma e espectro de massas resultante estão apresentados nas figuras 10 e 11.

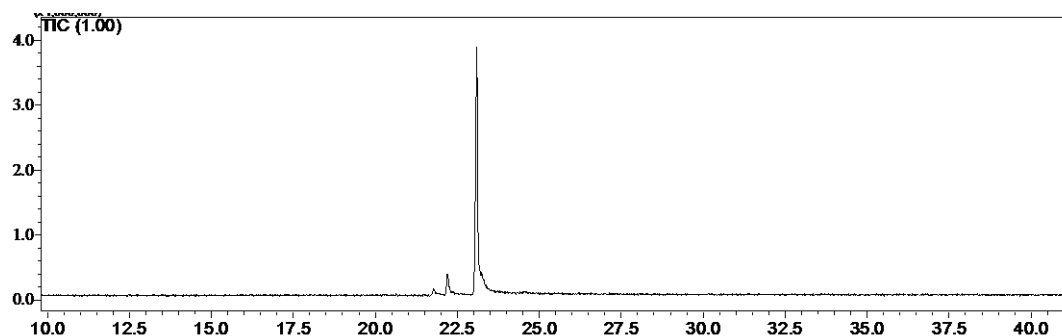


Figura 10: Cromatograma de íons totais do β -sitosterol (**1**).

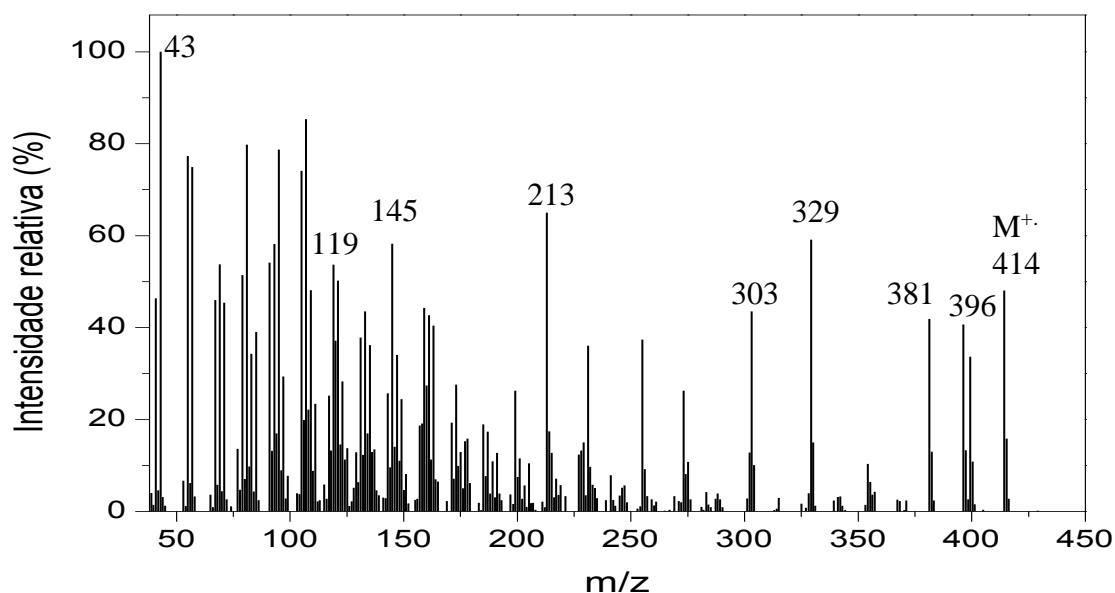


Figura 11: Espectro de massas (IE, 70 eV) do β -sitosterol (**1**).

Analisando o espectro de massas referente ao composto (**1**), pode ser observado o pico do íon-molecular em m/z 414 (54%) compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$, sugerido pela biblioteca (Nist-11), em 91% de similaridade ao β -sitosterol. No espectro de massas (Figura 11), foi observado as fragmentações compatíveis para o β -sitosterol em m/z 396 (46%), 381 (47%), 329 (62%), 303 (48%), 213 (72%), 145 (62%), 119 (57%) e 43 (100%) de acordo com os fragmentos descritos por Patra *et al.* (2010) e Halilu *et al.* (2013). A proposta para o mecanismo de fragmentação do β -sitosterol está disposta na figura 12.

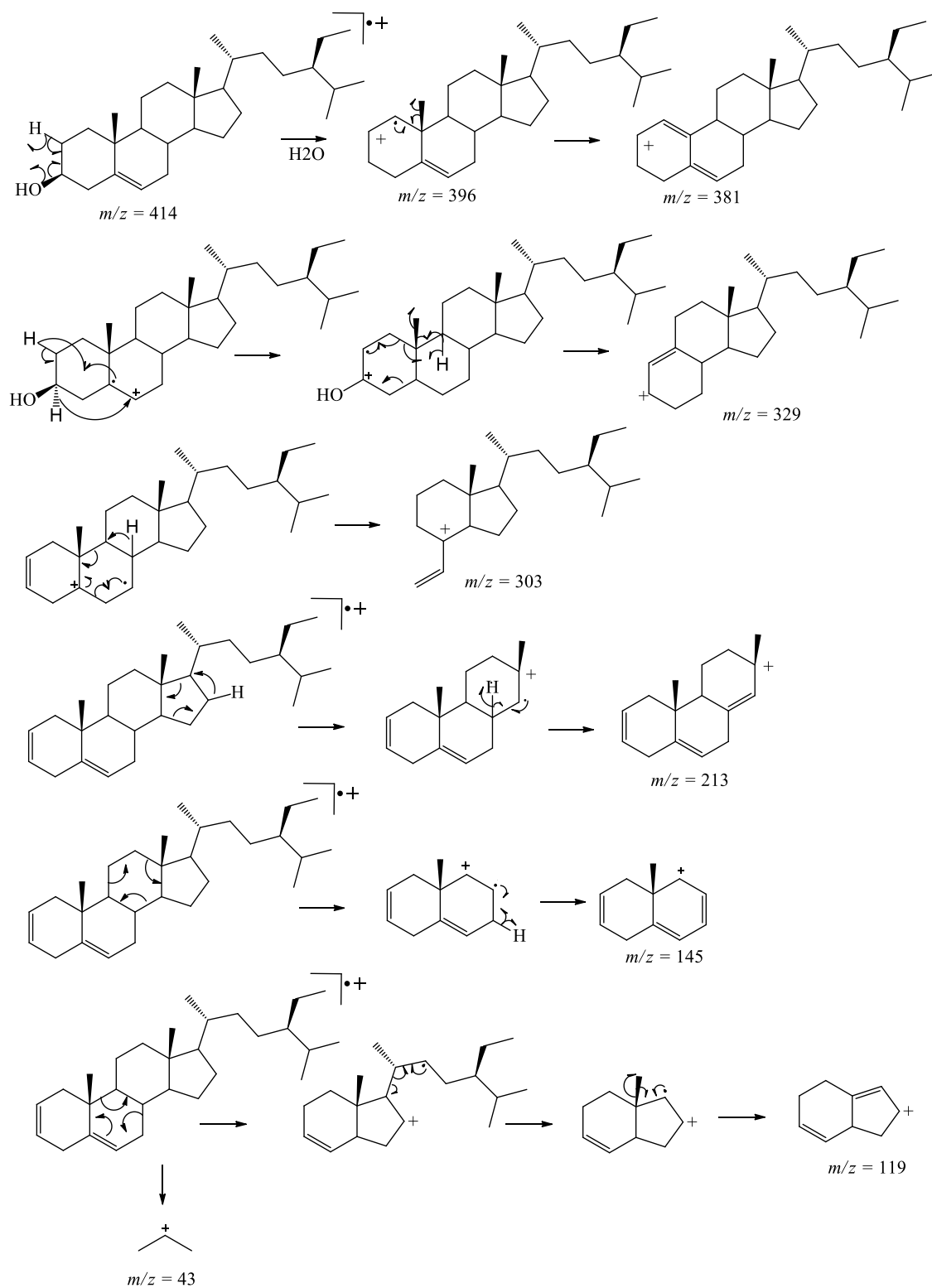


Figura 12: Proposta de mecanismo para fragmentações do β -sitosterol (**1**).

Os espectros de RMN referentes ao composto (**1**), seguem dispostos nas figuras 13, 14 e 15.

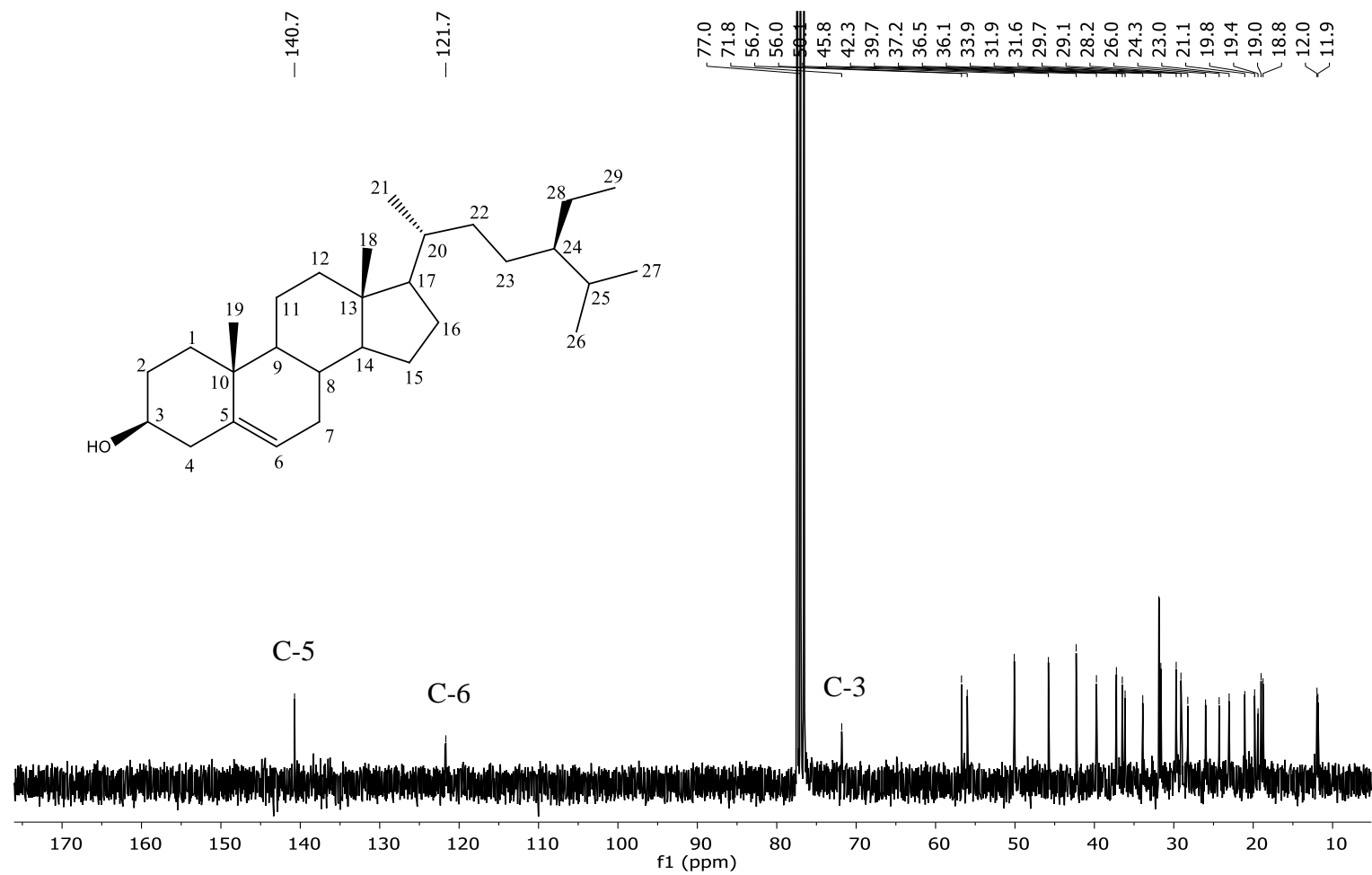


Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) do β -sitosterol (1)

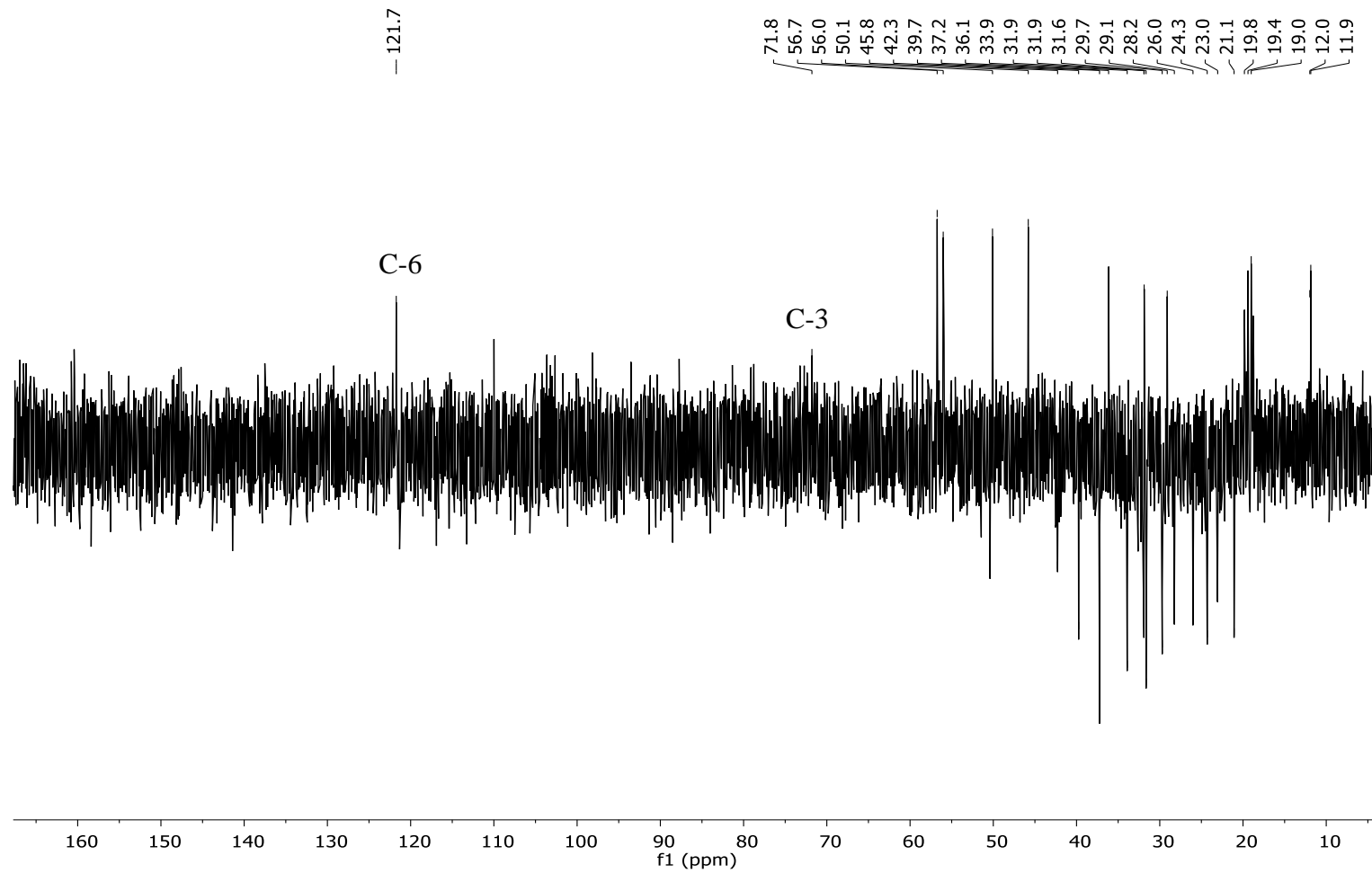


Figura 14: Espectro DEPT-135 do β -sitosterol (**1**).

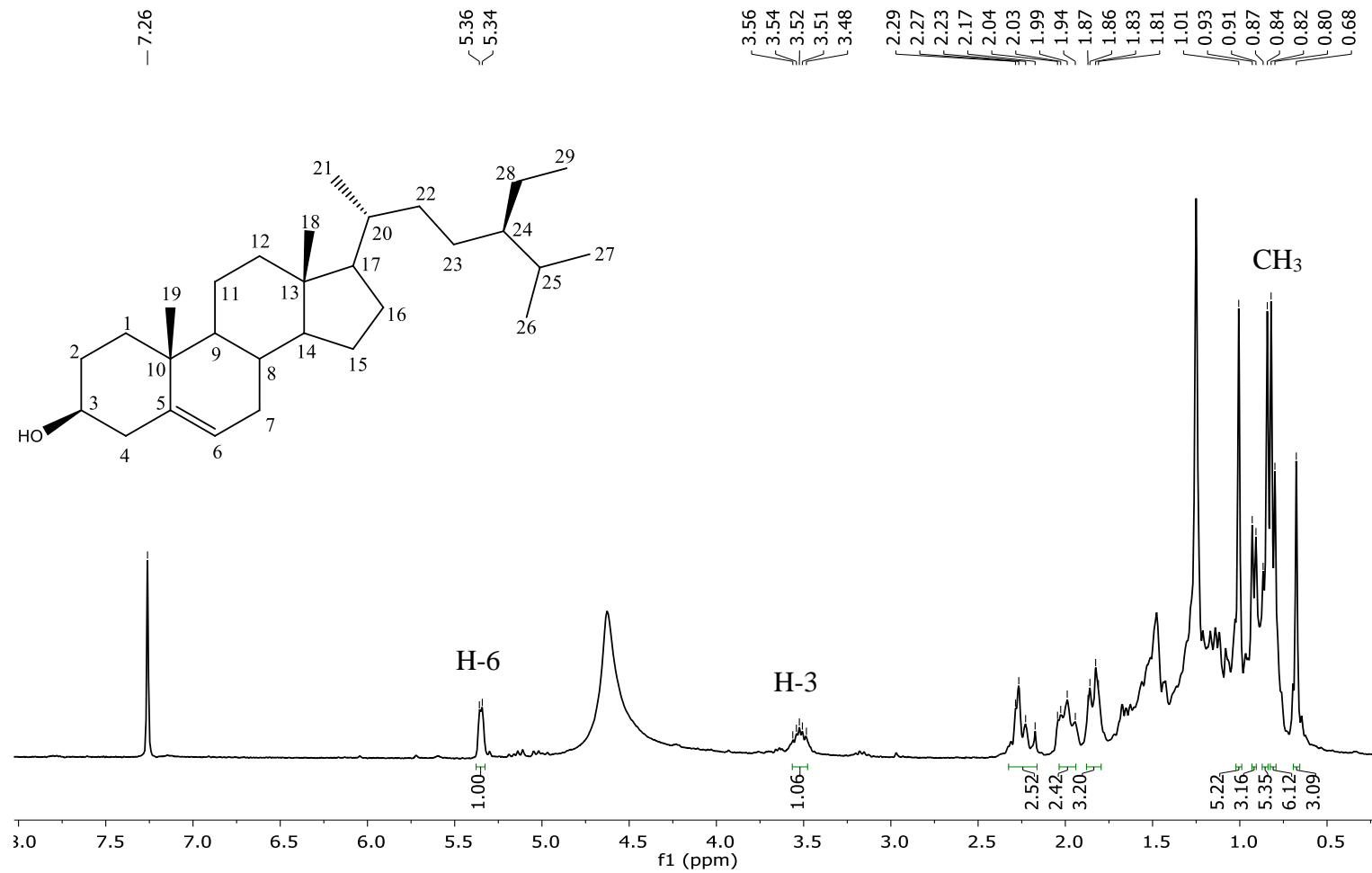


Figura 15: Espectro de RMN de ¹H, (300 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 7,26 ppm) do β-sitosterol (1).

A tabela 7 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C , para o composto (1), com os sinais referentes ao β -sitosterol, encontrados na literatura.

Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C , para o composto identificado como β -sitosterol (1)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)	Dados da literatura (ppm)	
		Ahmed <i>et al.</i> , 2013	Halilu <i>et al.</i> , 2013
C-1	37,2	37,3	37,2
C-2	31,9	31,9	31,6
C-3	71,8	71,8	71,7
C-4	42,3	42,4	40,4
C-5	140,7	140,8	140,7
C-6	121,7	121,7	121,6
C-7	31,6	31,7	33,4
C-8	31,9	31,9	31,8
C-9	50,1	50,2	50,1
C-10	36,5	36,2	39,6
C-11	21,1	21,1	22,6
C-12	39,7	39,8	39,7
C-13	42,3	42,4	42,1
C-14	56,7	56,8	56,0
C-15	24,3	24,3	26,0
C-16	28,2	28,3	24,3
C-17	56,0	56,1	56,7
C-18	12,0	11,9	12,0
C-19	19,0	19,4	19,0
C-20	36,1	36,5	36,1
C-21	18,8	19,1	19,3
C-22	33,9	34,0	33,9
C-23	26,0	26,2	26,0
C-24	45,8	45,9	45,8
C-25	29,1	29,2	29,6
C-26	19,8	19,8	21,0
C-27	19,4	18,8	21,1
C-28	23,0	23,1	23,0
C-29	11,9	12,0	12,2

No espectro de RMN de ^{13}C do composto (1) (Figura 13), observa-se os sinais de carbonos insaturados em δ 140,7 e 121,7 (Tabela 7), sinais esses característicos dos átomos de carbonos C-5 e C-6, respectivamente, do triterpeno β -sitosterol (Ahmed *et al.*, 2013; Halilu *et al.*, 2013). Foi observado no espectro DEPT-135 o sinal em δ 121,7 positivo referente ao C-6, átomo de carbono sp^2 ligado a um hidrogênio, o sinal em δ 140,7 não apareceu no espectro DEPT, indicando que o carbono C-5, não apresenta hidrogênios (Figura 14). Os sinais observados em δ 12,0 (C-18), 19,0 (C-19), 18,8 (C-

21), 19,8 (C-26), 19,4 (C-27) e 11,9 (C-29) aparecem positivo no espectro DEPT, indicando a presença de 6 grupos CH₃. Os sinais analisados para o espectro de ¹³C e DEPT, corroboram com a estrutura do β-sitosterol. Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ¹³C corroboram com os resultados descritos na literatura por Ahmed *et al.* (2013) e Halilu *et al.* (2013) (Tabela 7).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 15), foram observados diferentes sinais entre δ 1,01 a 0,68 correspondentes aos átomos de hidrogênios de grupos CH₃. O duplete integrado para um hidrogênio em δ 5,35 (*J* = 5,0 Hz) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono insaturado C-6. O sinal do hidrogênio ligado a C-3 aparece como um multiplete em δ 3,52 indicando o acoplamento com quatro átomos de hidrogênio ligado aos carbonos C-2 e C-4. As atribuições referentes aos sinais no espectro de RMN de ¹H para o β-sitosterol foram consideradas em comparação aos dados reportado por Ahmed *et al.* (2013) e Patra *et al.* (2010). Os resultados obtidos permitem identificar o composto **(1)** como o β-sitosterol.

A fração contendo a mistura dos compostos β-sitosterol **(1)** e estigmasterol **(2)**, foi submetido a análise por CG-EM e o cromatograma está apresentado na figura 16.

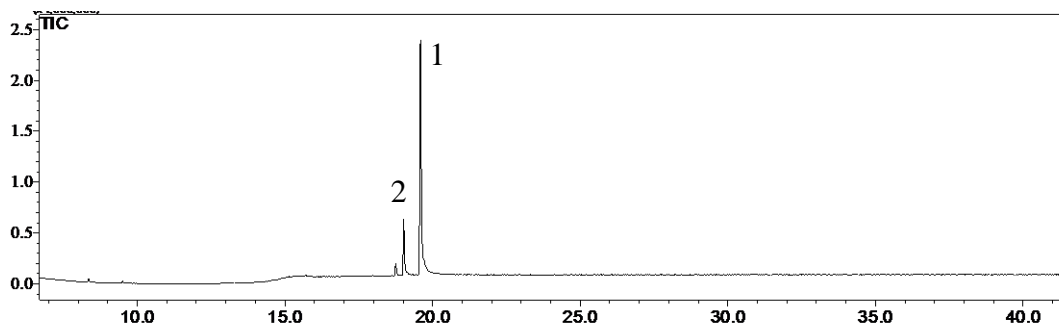


Figura 16: Cromatograma de íons totais dos compostos β-sitosterol **(1)** e estigmasterol **(2)**.

No cromatograma (Figura 16), foi observado um pico majoritário com 83,9% que corresponde ao β-sitosterol **(1)** e outro pico (14,1%) relativo ao estigmasterol **(2)**. O espectro de massas referente ao composto **(1)**, corrobora com o apresentado na figura 11, caracterizado como β-sitosterol **(1)**. O espectro de massas referente ao composto estigmasterol **(2)**, segue disposto na figura 17.

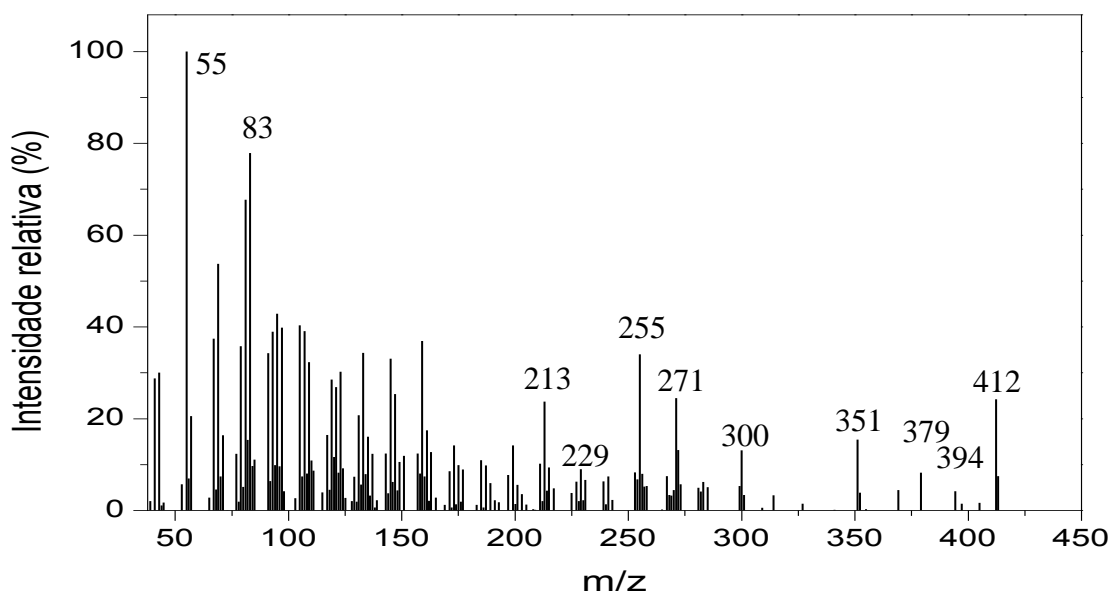


Figura 17: Espectro de massas (IE, 70 eV) do estigmasterol (**2**).

No espectro de massas referente ao composto (**2**) (Figura 17), foi observado o pico do íon-molecular em m/z 412 (25%) compatível com a fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$ sugerida pela biblioteca (Nist-11), indicando 93% de similaridade ao estigmasterol. Foi observado no espectro de massas fragmentações características do estigmasterol em m/z 394 (4%), 379 (7%), 351 (16%), 300 (13%), 271 (23%), 255 (34%), 229 (9%), 213 (24%), 83 (77%), 55 (100%), e estão de acordo com os fragmentos descritos por Chaturvedula & Prakash (2012) e Ibrahim *et al.* (2012).

A proposta referente ao mecanismo de fragmentação para o estigmasterol segue disposta na figura 18.

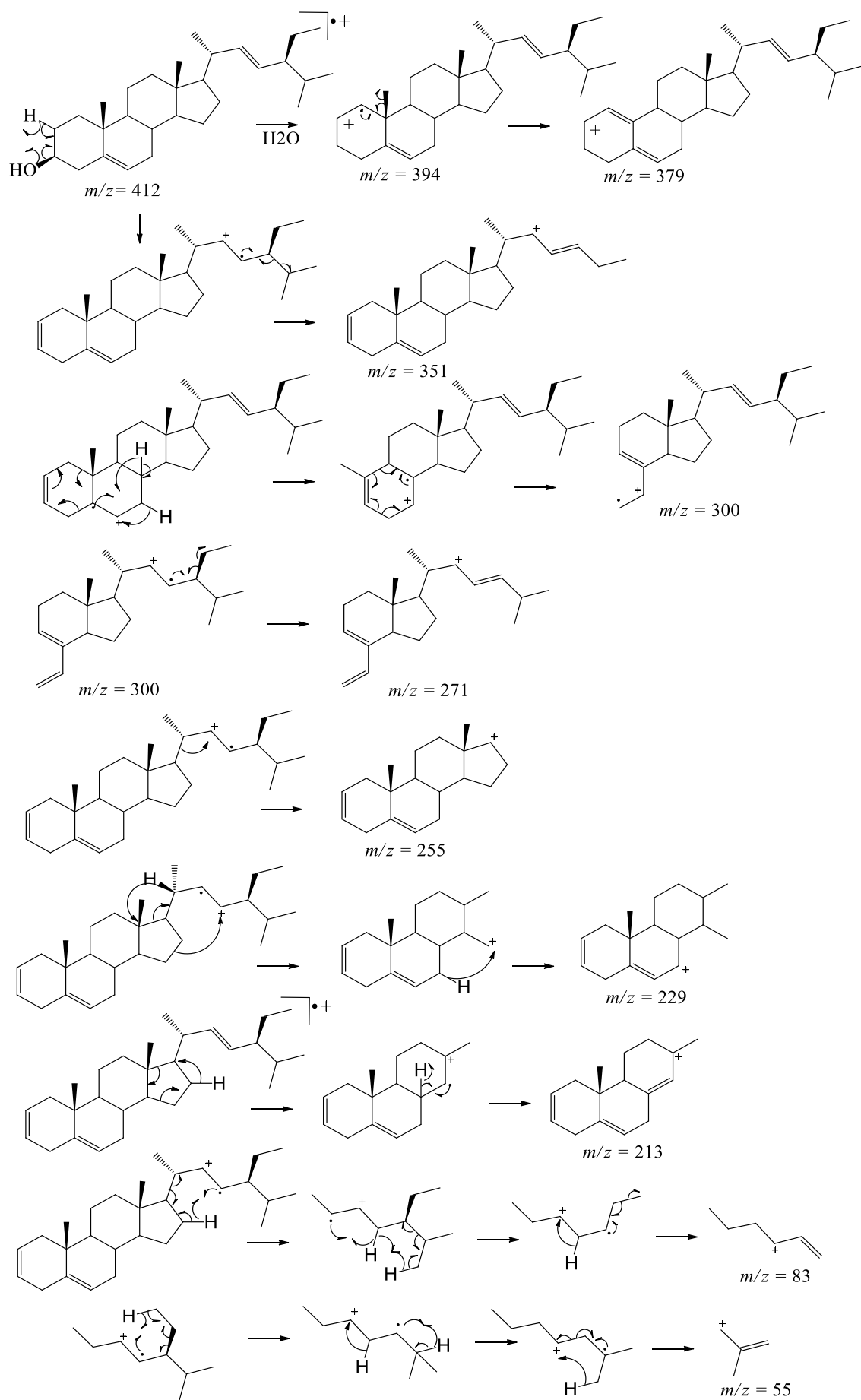


Figura 18: Proposta para o mecanismo de fragmentação do estigmasterol.

Os resultados dos sinais nos espectros de RMN, referentes a mistura dos compostos **(1)** e **(2)**, seguem dispostos nas figuras 19, 20 e 21.

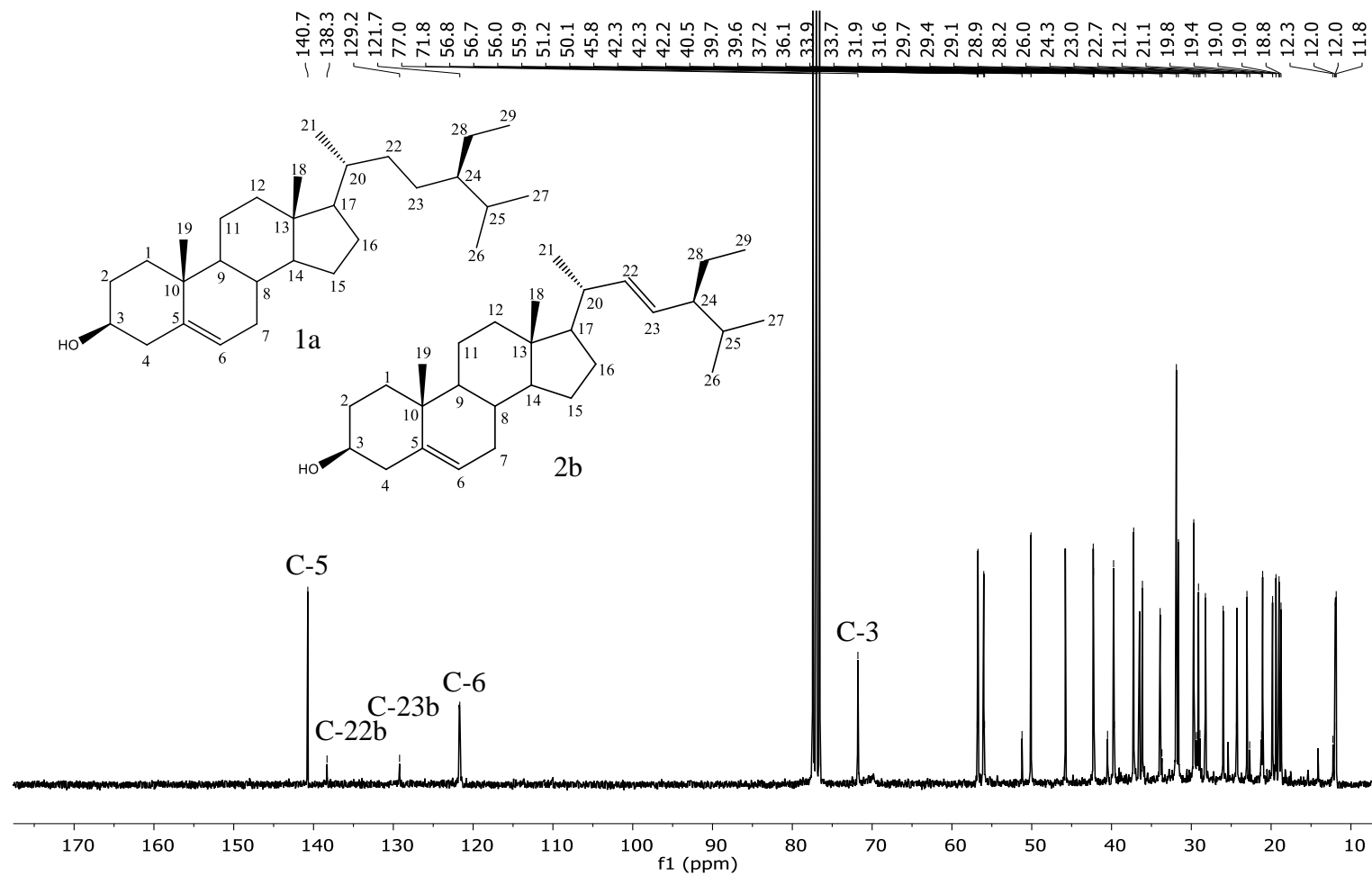


Figura 19: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) da mistura de β-sitosterol (1) e estigmasterol (2).

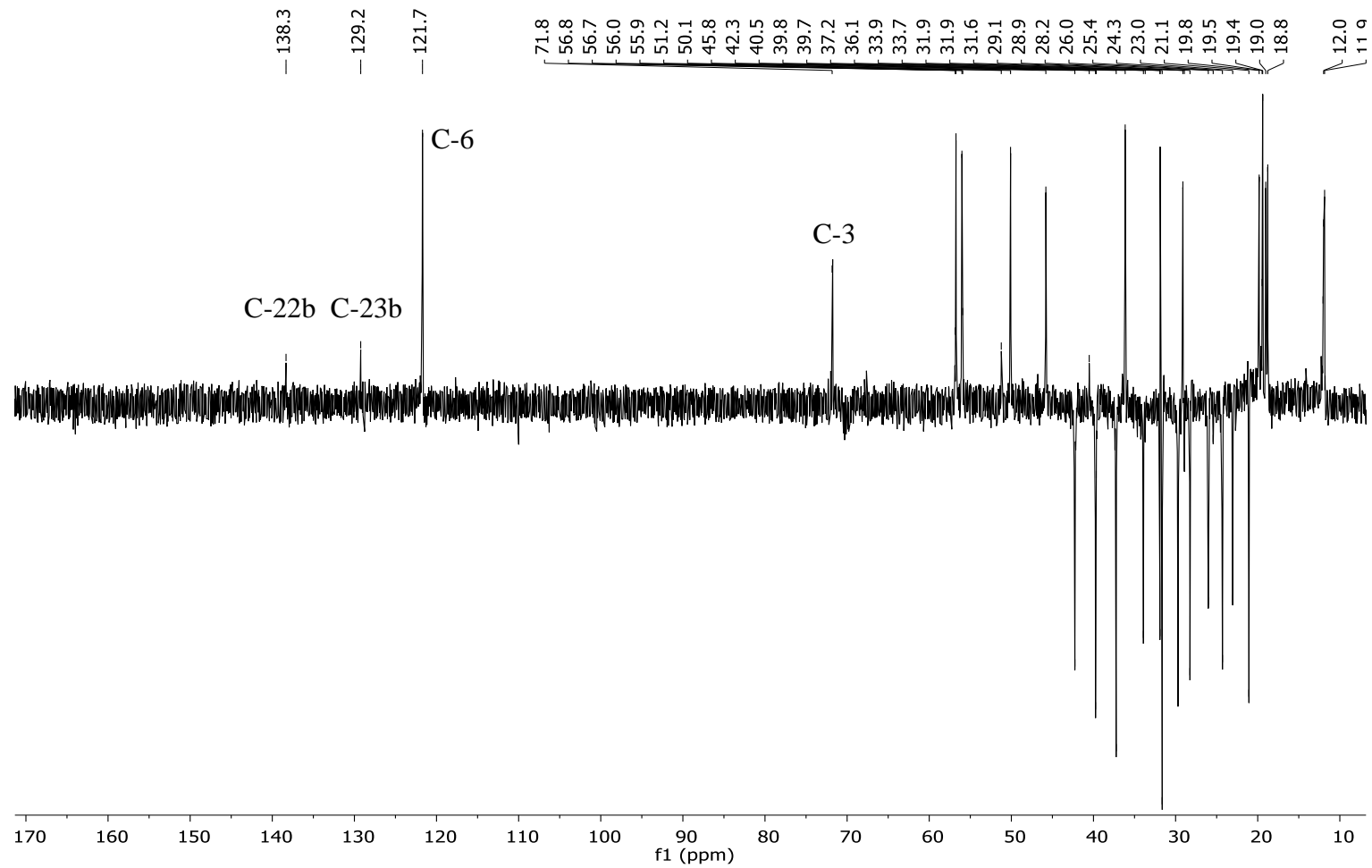


Figura 20: Espectro DEPT-135 da mistura de β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).

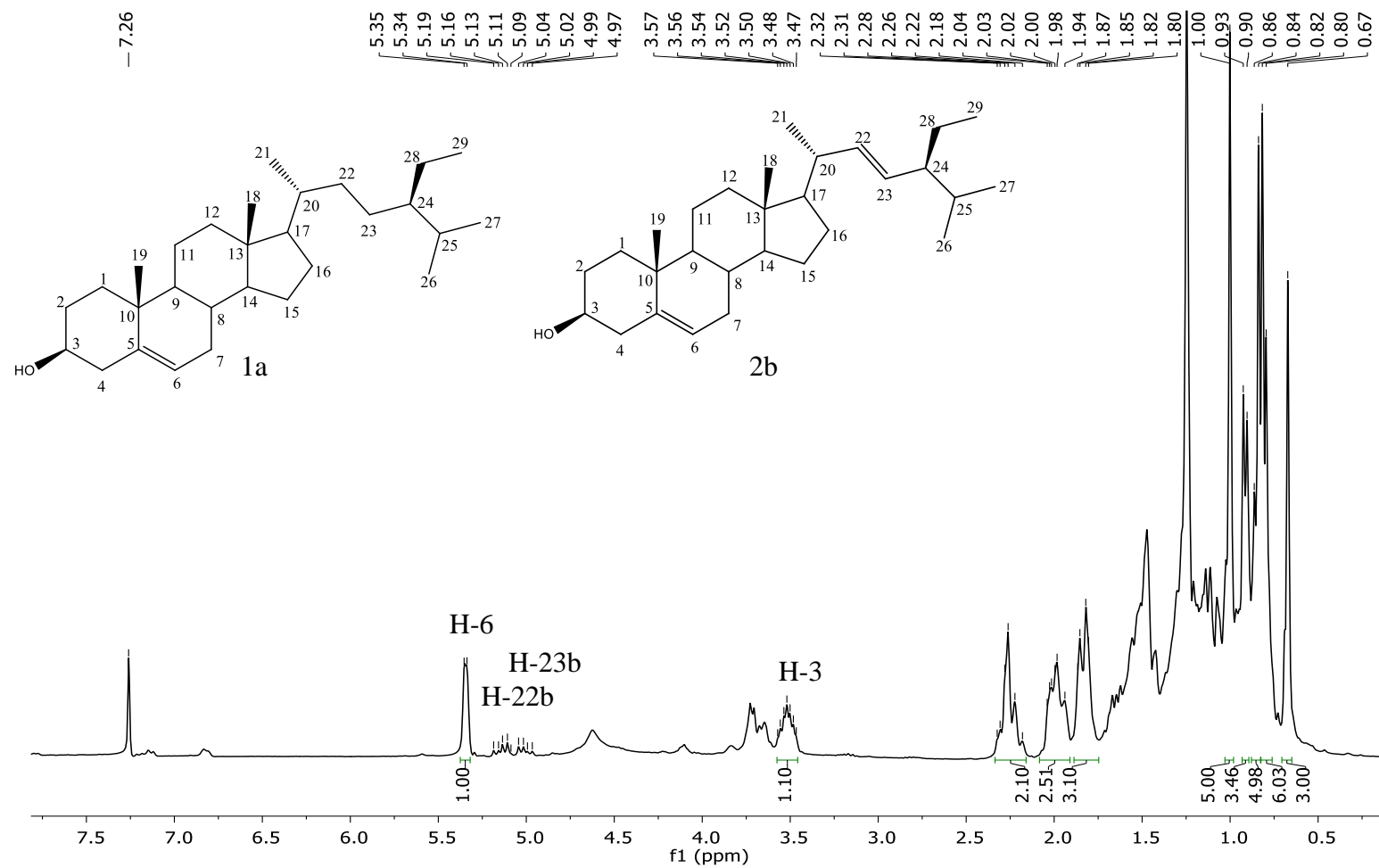


Figura 21: Espectro RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$ ppm) da mistura de β -sitosterol (1) e estigmasterol (2).

A tabela 8 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C para amostra contendo os compostos (1) e (2), com dados da literatura para o β -sitosterol e estigmasterol.

Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C , para os compostos identificados como β -sitosterol (1) e estigmasterol (2)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)		Dados da literatura (ppm)	
	β -sitosterol	estigmasterol	Ahmed <i>et al.</i> , 2013	
	β -sitosterol	estigmasterol	β -sitosterol	estigmasterol
C-1	37,2	37,2	37,3	37,3
C-2	31,9	28,9	31,9	28,3
C-3	71,8	71,8	71,8	71,8
C-4	42,3	42,3	42,4	42,4
C-5	140,7	140,7	140,8	140,8
C-6	121,7	121,7	121,7	121,7
C-7	31,6	31,6	31,7	31,7
C-8	31,9	33,7	31,9	34,0
C-9	50,1	50,1	50,2	50,2
C-10	36,5	36,5	36,2	36,5
C-11	21,1	25,4	21,1	26,2
C-12	39,7	39,6	39,8	39,8
C-13	42,3	42,2	42,4	42,4
C-14	56,7	56,8	56,8	56,8
C-15	24,3	24,3	24,3	24,3
C-16	28,2	29,4	28,3	29,2
C-17	56,0	55,9	56,1	56,1
C-18	12,0	12,0	11,9	12,0
C-19	19,0	19,0	19,4	19,4
C-20	36,1	40,5	36,5	40,5
C-21	18,8	21,2	19,1	21,1
C-22	33,9	138,3	34,0	138,3
C-23	26,0	129,2	26,2	129,0
C-24	45,8	51,2	45,9	51,3
C-25	29,1	45,8	29,2	45,9
C-26	19,8	19,4	19,8	19,4
C-27	19,4	19,8	18,8	19,8
C-28	23,0	24,3	23,1	24,3
C-29	11,9	12,2	12,0	12,3

Nos espectros de RMN de ^{13}C , DEPT e ^1H (Figura 19, 20 e 21), foi observado os sinais referentes ao β -sitosterol isolado e identificado no presente trabalho, porém também foi observado sinais característicos do composto estigmasterol (2).

Os sinais referentes ao composto (2) no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19) aparecem em δ 140,7; 138,3; 129,2 e 121,7 sinais esses característicos dos átomos de

carbono insaturados C-5, C-22, C-23 e C-6, respectivamente (Ahmed *et al.*, 2013) (Tabela 8). No espectro DEPT-135 foi observado os sinais positivos em δ 138,3, 129,2 e 121,7 referentes a C-22, C-23 e C-6 átomos de carbono sp^2 ligado a um hidrogênio, o sinal em δ 140,7 não apareceu no espectro DEPT, indicando que o carbono C-5 não está ligado à hidrogênio. O sinal em δ 71,8 refere-se ao carbono ligado a hidroxila C-3, devido a desblindagem e aparece positivo no DEPT (Figura 20), indicando a ligação apenas com um hidrogênio. Os sinais observados em δ 21,2 (C-21); 19,0 (C-19); 12,0 (C-18); 19,4 (C-26); 19,8 (C-27) e 12,2 (C-29), aparecem positivo no espectro DEPT, indicando a presença de 6 grupos metila. Os sinais analisados para o espectro de ^{13}C e DEPT, corroboram com a estrutura do estigmasterol de acordo com os resultados descritos na literatura por Ahmed *et al.* (2013) (Tabela 8).

No espectro de RMN de 1H (Figura 21), foi observado diferentes sinais entre 1,01 a 0,68 correspondentes aos átomos de hidrogênios dos grupos metilas. O sinal em δ 5,35 ($J = 4,8$ Hz), corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono insaturado (C-6). Os sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C-22 e C-23 aparecem como um duplo duplete em δ 5,15 ($J = 15,1; 8,3$ Hz) e 5,00 ($J = 15,1; 8,3$ Hz) respectivamente. Os dados espectroscópicos observados referentes aos sinais no espectro de 1H , estão de acordo com os resultados descritos por Ahmed *et al.* (2013). Os resultados obtidos permitem identificar o composto (**2**) como o estigmasterol.

A fração F2-A foi submetida a CCD (sílica gel/ $AgNO_3$ 10%) preparativa utilizando fase móvel hexano/diclorometano (1:1) (Figura 22).

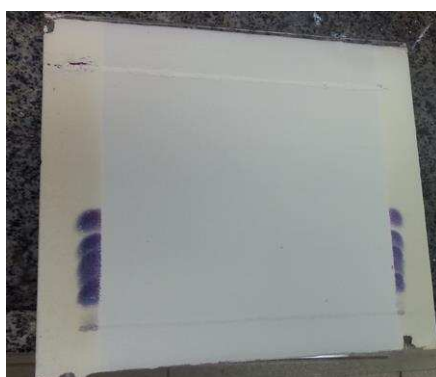


Figura 22: Cromatografia em camada delgada (sílica gel/ $AgNO_3$ 10%) para fração F2-A, obtido do extrato hexânico das raízes de *E. heterophylla* utilizando hexano/diclorometano (1:1) como eluente.

Após o procedimento cromatográfico (Figura 22), foram obtidas 6 frações, dando origem aos compostos identificados como acetato de lupeol (**3**) (27,1 mg), acetato de

taraxasterol (**4**) (10,7 mg), acetato de pseudo taraxasterol (**5**) (10,8 mg), acetato de germanicol (**6**) (21,9 mg) e uma mistura contendo o acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**) (26,5 mg), identificados por espectrometria de massas, e análise por RMN de ^1H , de ^{13}C e DEPT-135.

A fração contendo o composto (**3**), foi submetido a análise por CG-EM e o cromatograma e espectro de massas estão apresentados nas figuras 23 e 24.

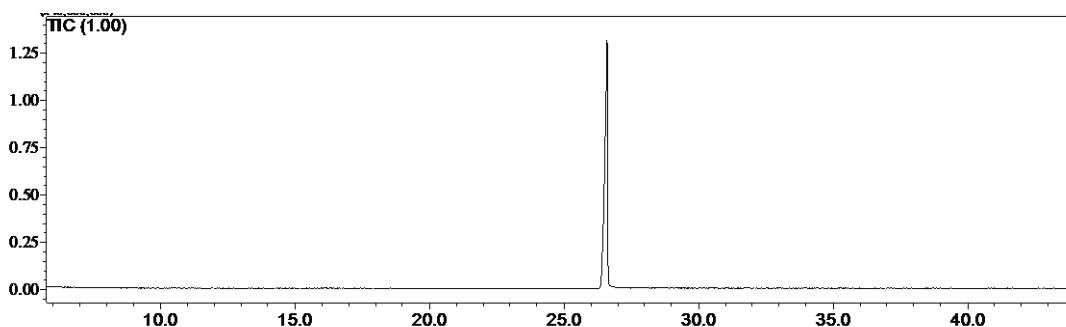


Figura 23: Cromatograma de íons totais referente ao acetato de lupeol (**3**).

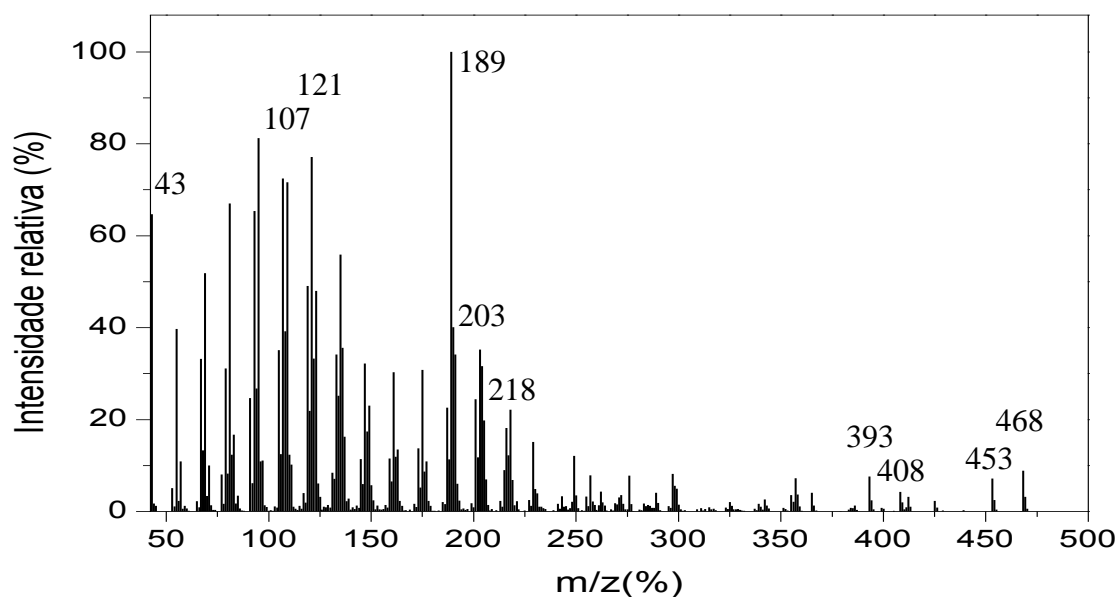


Figura 24: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de lupeol (**3**).

No espectro de massas para o composto (**3**) (Figura 24), foi observado o pico do íon-molecular em m/z 468 (9%), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ sugerido pela biblioteca (Nist-11), indicando 92% de similaridade ao acetato de lupeol. As fragmentações no espectro de massas corroboram com os dados relatados para o acetato de lupeol em m/z 453 (7%), 408 (4%), 393 (8%), 218 (22%), 203 (35%), 189 (100%), 121 (78%), 107 (72%), 43 (64%) e estão de acordo com Silva *et al.* (1998) e Jamal,

Yaacob & Din (2008). A proposta para o mecanismo de fragmentação referente ao acetato de lupeol está disposta na figura 25.

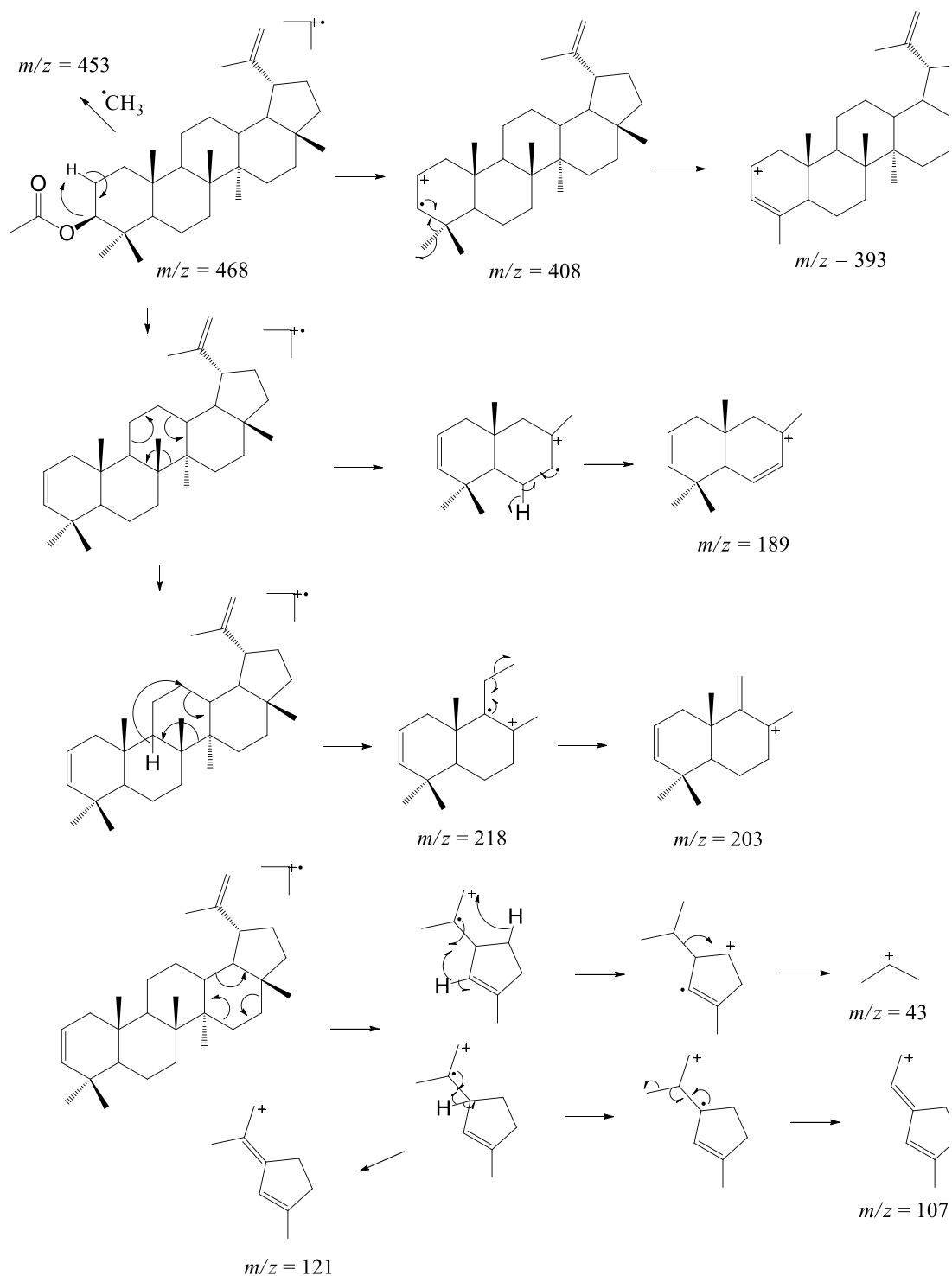


Figura 25: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de lupeol.

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT referentes ao acetato de lupeol (**3**), seguem dispostos nas figuras 26, 27 e 28.

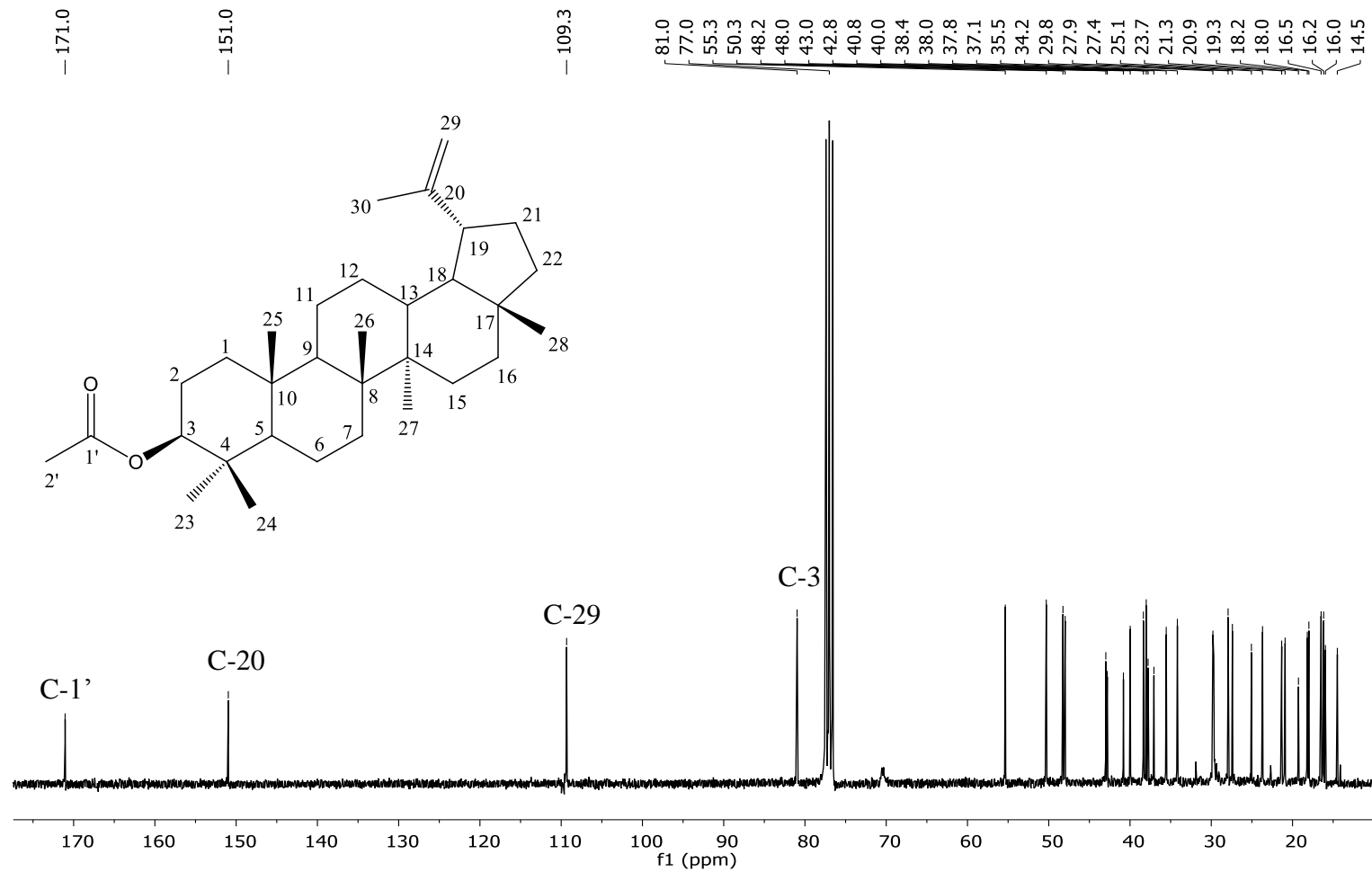


Figura 26: Espectro de RMN de ¹³C, (75 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) do acetato de lupeol (3).

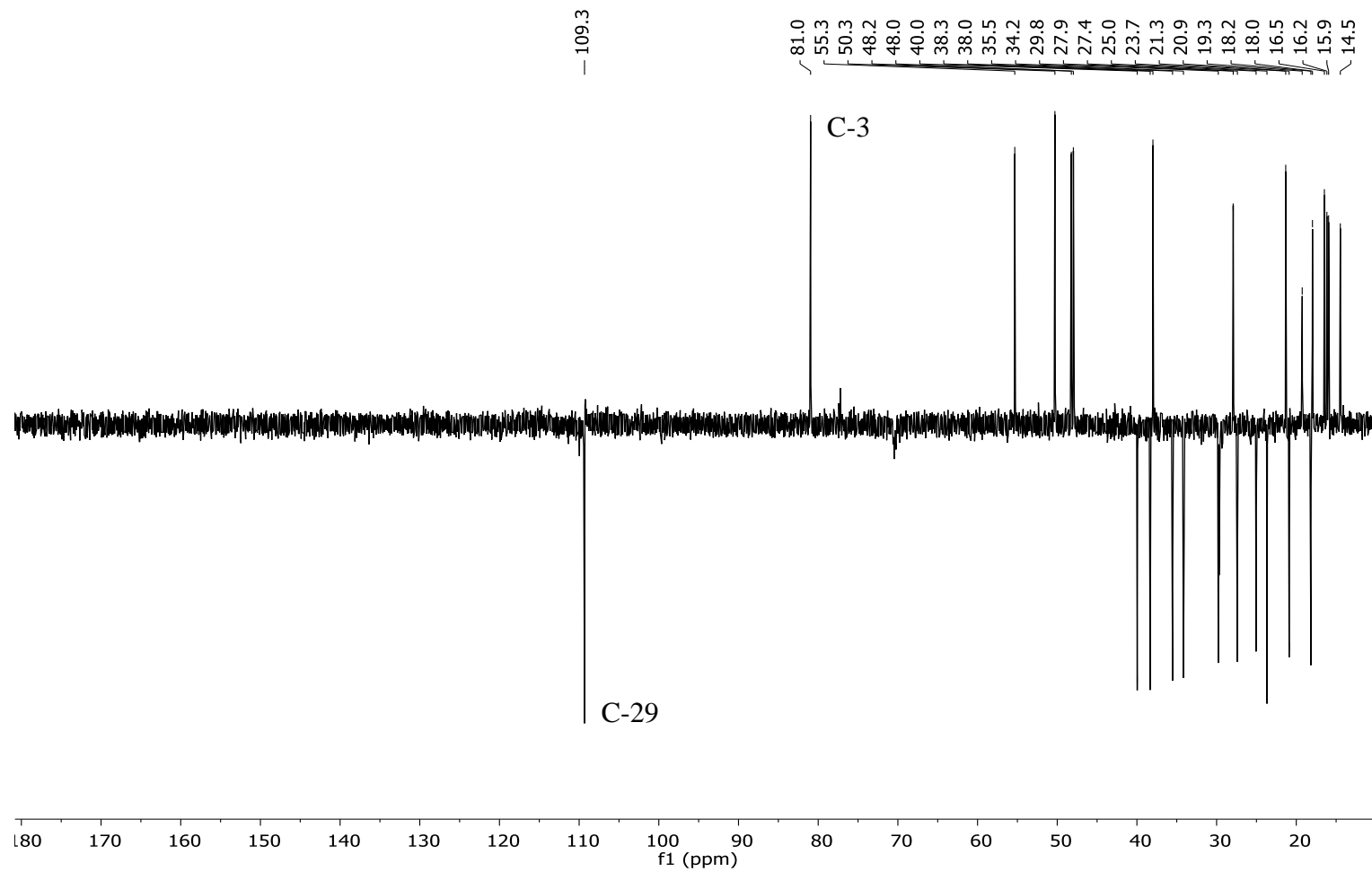


Figura 27: Espectro DEPT-135 do acetato de lupeol (**3**).

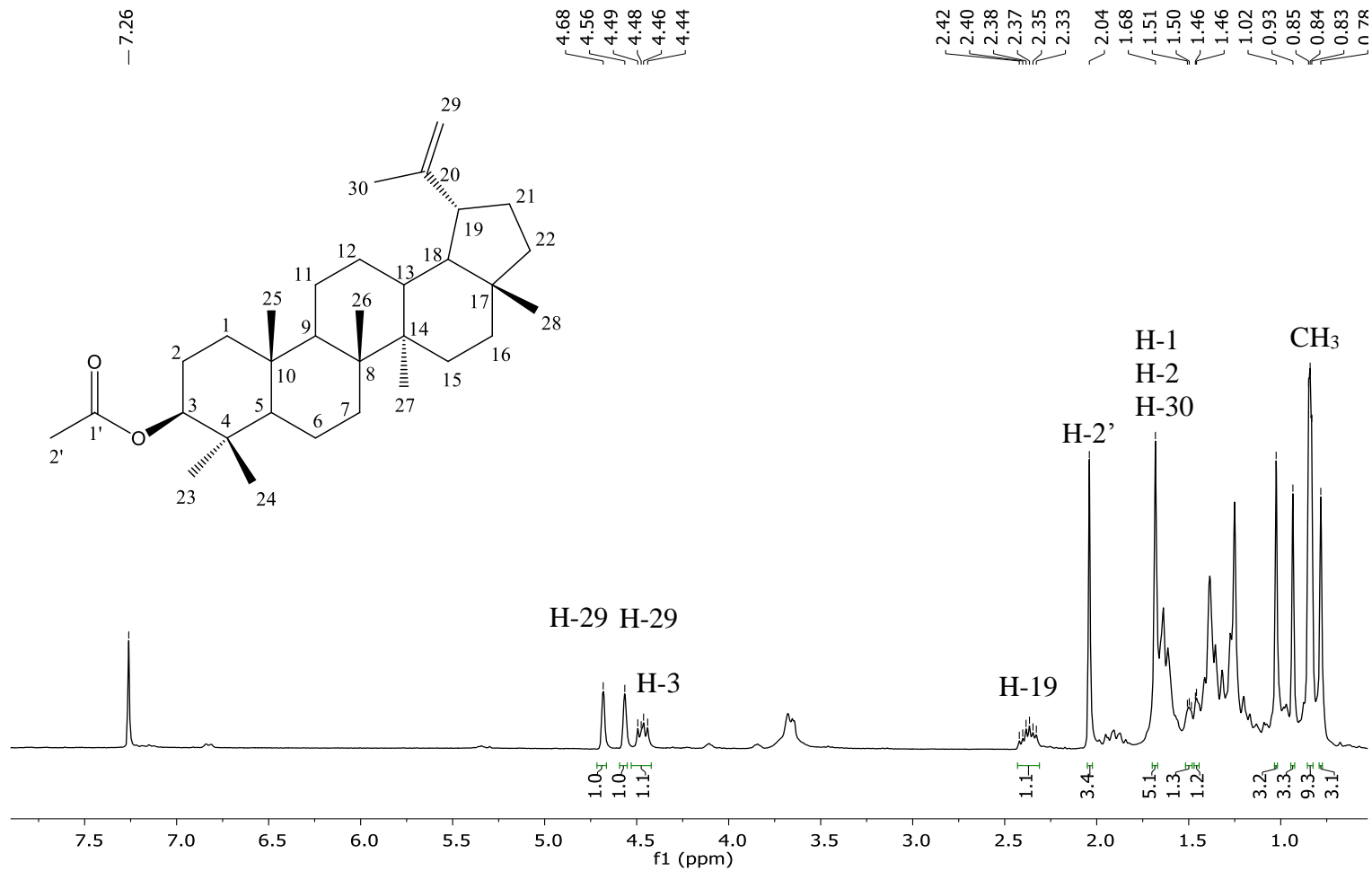


Figura 28: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 7,26 ppm) do acetato de lupeol (3).

A tabela 9 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C para amostra contendo o composto (3), com dados reportados na literatura para o acetato de lupeol.

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C , para o composto identificado como acetato de lupeol (3)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)	Dados da literatura (ppm)	
		Suwito <i>et al.</i> , 2016	Hassan <i>et al.</i> , 2015
C-1'	171,1	171,2	171,0
C-2'	21,3	21,5	21,3
C-1	38,4	38,6	38,3
C-2	27,4	27,6	27,4
C-3	81,0	81,2	80,9
C-4	38,0	38,2	37,7
C-5	55,3	55,6	55,3
C-6	18,2	18,4	18,2
C-7	34,2	34,4	34,2
C-8	40,8	41,0	40,8
C-9	50,3	50,5	50,3
C-10	37,1	37,3	37,0
C-11	20,9	21,1	20,9
C-12	23,7	23,9	25,1
C-13	37,8	37,9	38,0
C-14	42,8	43,0	42,8
C-15	25,1	27,6	27,4
C-16	35,5	35,8	35,5
C-17	43,0	43,2	42,9
C-18	48,3	48,5	48,0
C-19	48,0	48,2	48,2
C-20	151,0	151,2	150,9
C-21	29,8	30,0	29,8
C-22	40,0	40,2	39,9
C-23	27,9	28,1	28,2
C-24	16,0	16,2	15,9
C-25	16,5	16,7	16,1
C-26	16,2	16,4	16,3
C-27	14,5	14,7	14,5
C-28	18,0	18,2	17,9
C-29	109,3	109,5	109,2
C-30	19,3	19,5	19,0

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 26), e os dados da tabela 9 do composto (3) foi observado os sinais de carbonos sp^2 em δ 109,3 e 151,0 característicos dos átomos de carbono C-29 e C-20, respectivamente, compatível com a estrutura do triterpeno pentacíclico lup-20(29)-eno, também denominado lupeol. No espectro de DEPT-135

(Figura 27), foi observado que o átomo de carbono com sinal em δ 109,3 (C-29) está ligado a dois átomos de hidrogênio. O sinal em δ 151,0 não aparece no espectro DEPT-135, indicando que o C-20 não está ligado a hidrogênio. Os sinais dos carbonos do grupo acetila, ligado a C-3, com valores de δ 171,1 e 21,3 correspondem ao carbono da carbonila C-1' e metila C-2' respectivamente. O sinal em δ 19,3 corresponde ao carbono do grupo metila C-30, ligado ao átomo de carbono C-20, os demais grupos CH₃ foram observados em δ 27,9 (C-23), 16,0 (C-24), 16,5 (C-25), 16,2 (C-26), 14,5 (C-27) e 18,0 (C-28).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 28), pode-se observar o par de simpletos em δ 4,68 e 4,56, integrados para um hidrogênio cada, correspondem aos dois hidrogênios ligados à C-29. O simpleto em δ 2,04 integrado para três correspondem aos átomos de hidrogênio ligados à C-2' do grupo acetil. O multipletto em δ 4,47 integrado para um corresponde ao hidrogênio ligado a C-3. O átomo de hidrogênio ligado ao C-19, do anel pentacíclico, foi observado como um duplotripleto em δ 2,37 ($J = 11,1$ e $5,6$ Hz). Os simpletos observados entre δ 1,68 a 0,78 correspondem aos átomos de hidrogênio ligados aos grupos metilas. Os sinais observados no espectro de ¹H, estão de acordo com os sinais reportados por Hassan *et al.* (2015) e Besbes, Guérineau & Touboul (2017). Portanto, esses dados permitem identificar o composto como acetato de lupeol.

A fração contendo o composto acetato de taraxasterol (**4**), foi submetido a análise por CG-EM e o cromatograma e o espectro de massas estão apresentados nas figuras 29 e 30.

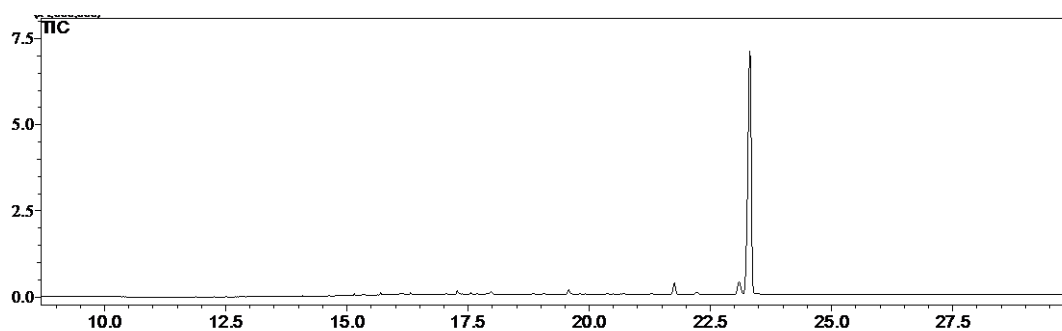


Figura 29: Cromatograma de íon totais do acetato de taraxasterol (**4**).

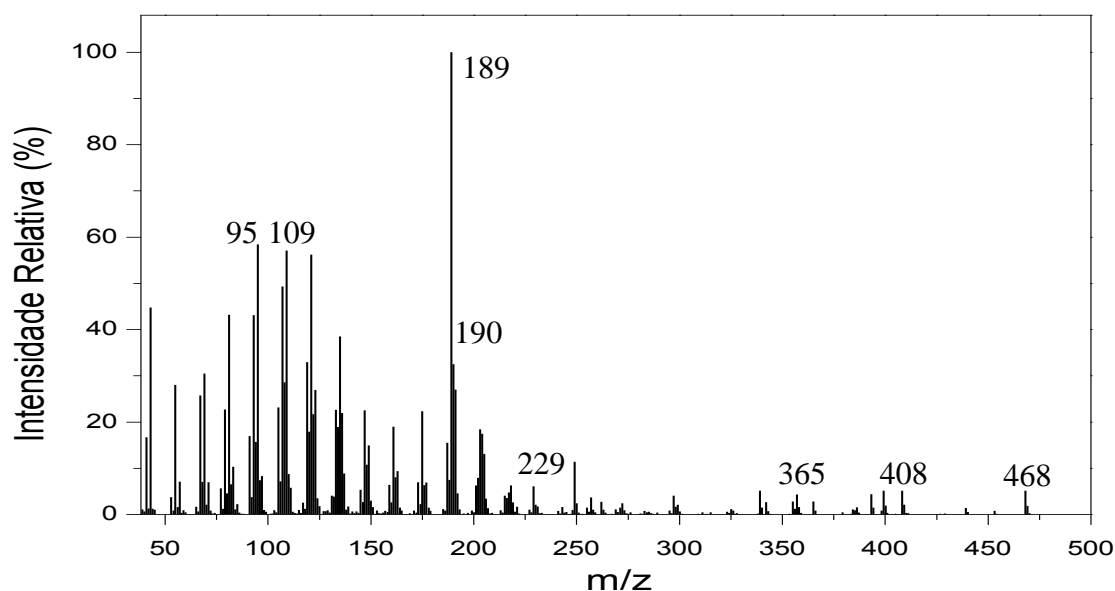


Figura 30: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de taraxasterol (**4**).

No espectro de massas (Figura 30), pode ser observado o pico do íon-molecular em m/z 468 (5%), compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$. Foi observado no espectro de massas fragmentações características do acetato de taraxasterol (**4**) em m/z 408 (5%), 365 (3%), 229 (6%), 190 (32%), 189 (100%), 109 (56%), 95 (58%), e estão de acordo com os resultados descritos por Kirimer *et al.* (1997), para este composto. A proposta para o mecanismo de fragmentação referente ao acetato de taraxasterol está disposta na figura 31.

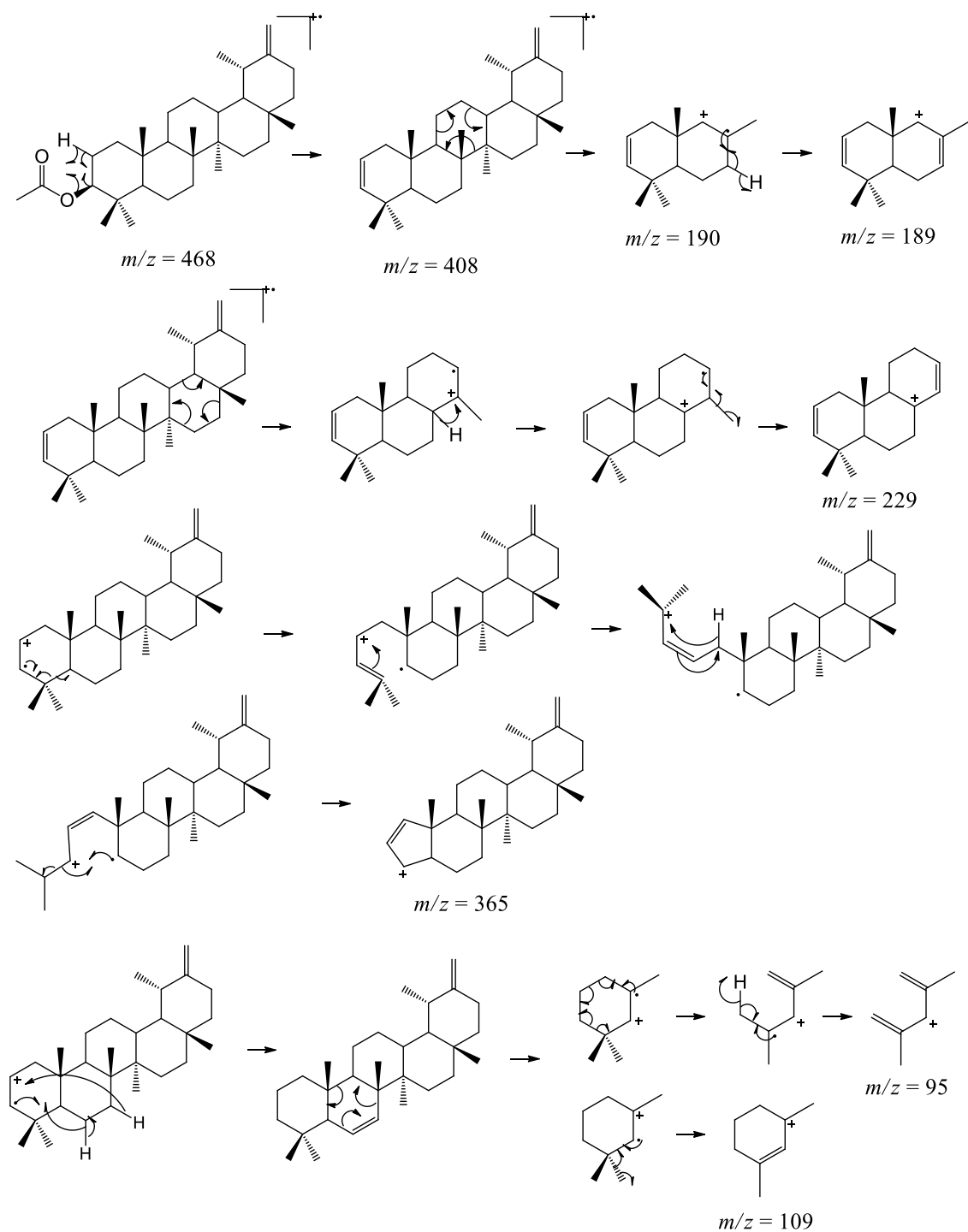


Figura 31: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de taraxasterol.

Os espectros de RMN obtidos para o acetato de taraxasterol (**4**), seguem dispostos nas figuras 32, 33 e 34.

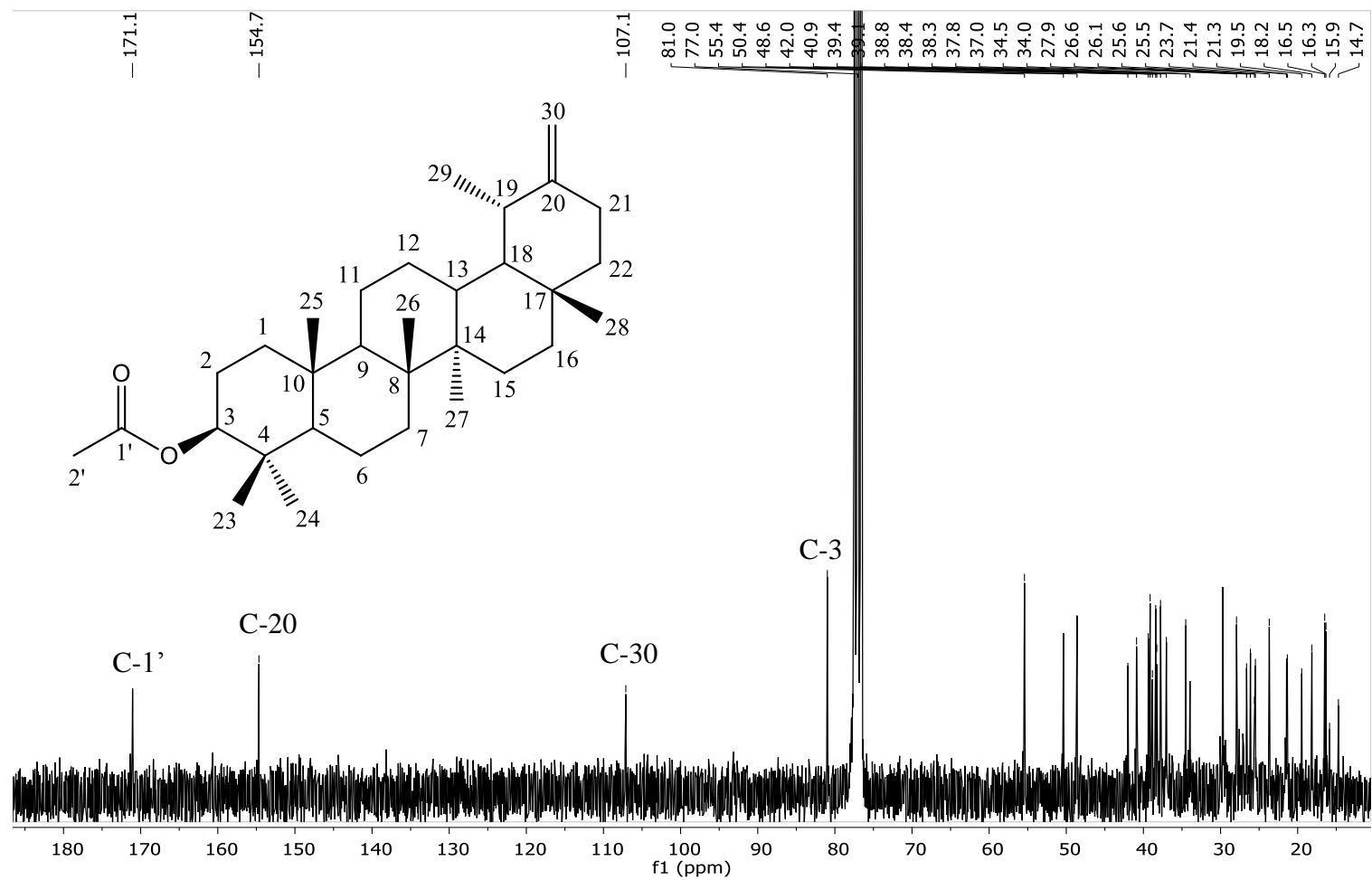


Figura 32: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) do acetato de taraxasterol (**4**).

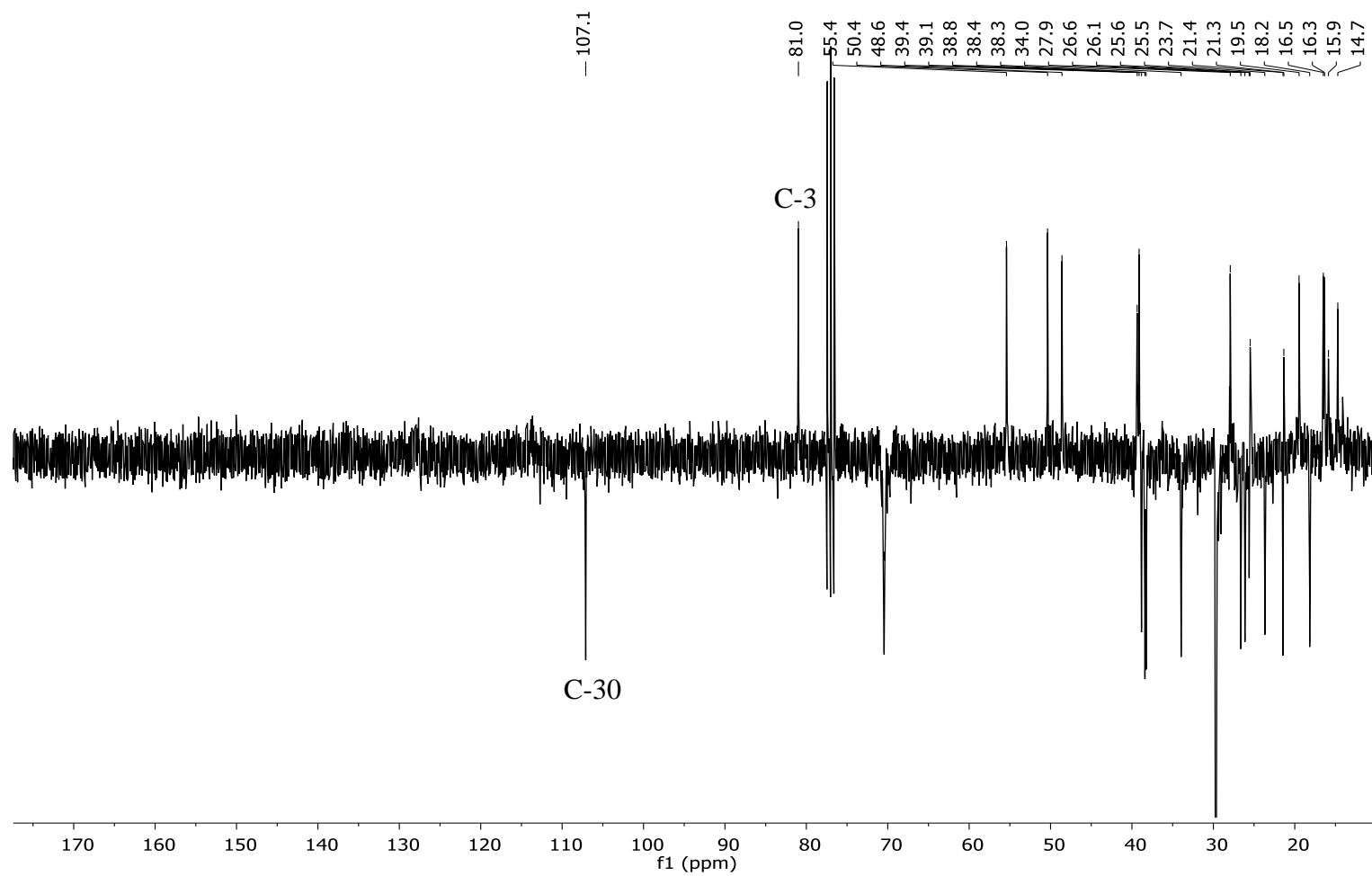


Figura 33: Espectro DEPT-135 do acetato de taraxasterol (4).

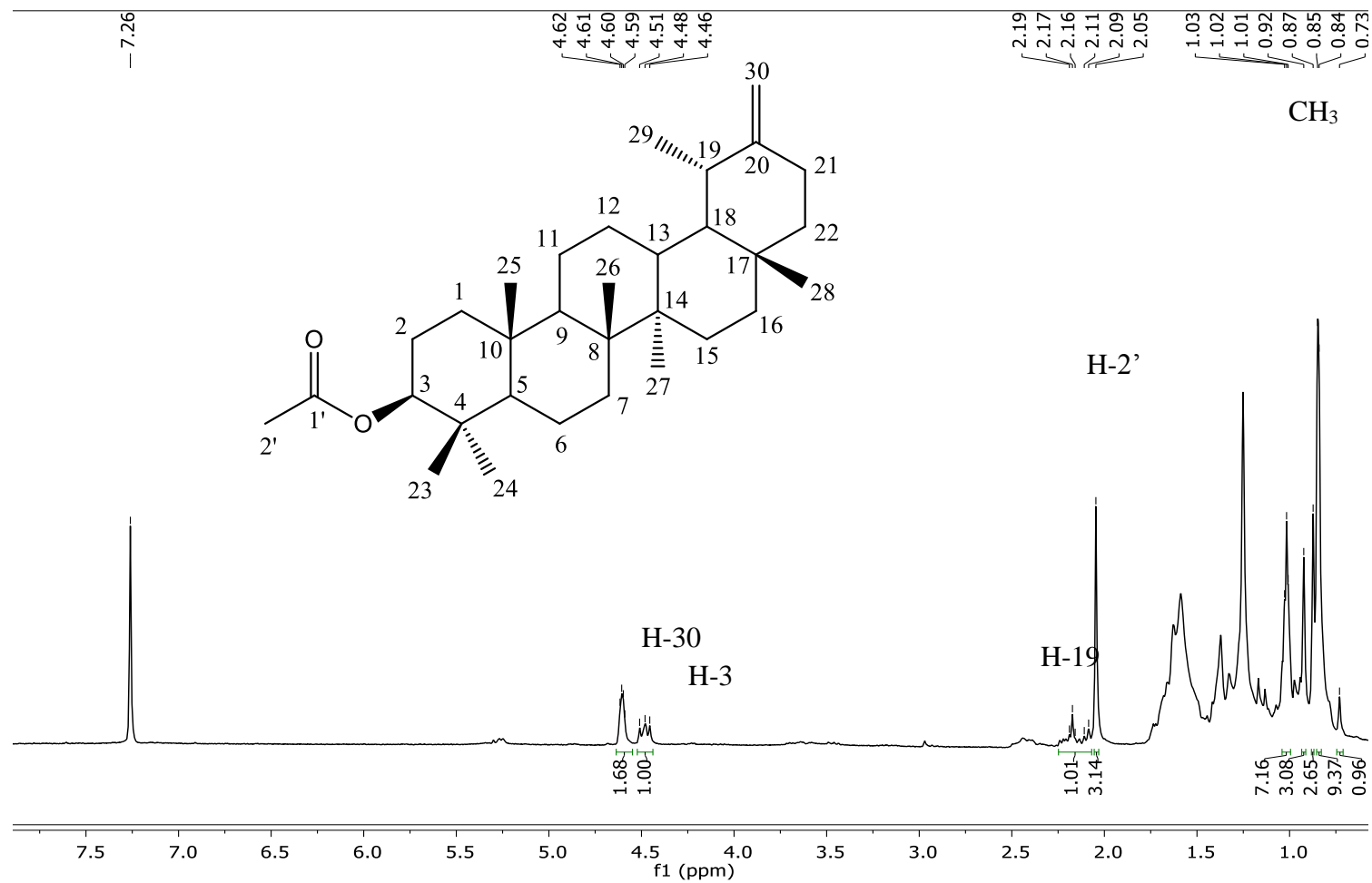


Figura 34: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$ ppm) do acetato de taraxasterol (**4**).

A tabela 10 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C para amostra contendo o composto (4), com dados da literatura para o acetato de taraxasterol.

Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como acetato de taraxasterol (4)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)	Dados da literatura (ppm)	
		Khalilov <i>et al.</i> , 2003	Reynolds <i>et al.</i> , 1985
C-1'	21,3	21,3	21,3
C-2'	171,1	170,1	171,0
C-1	38,3	38,1	38,4
C-2	23,7	23,7	23,7
C-3	81,0	80,9	81,0
C-4	37,8	37,8	37,8
C-5	55,4	55,4	55,4
C-6	18,2	18,2	18,2
C-7	34,0	34,0	34,0
C-8	40,9	40,9	40,9
C-9	50,4	50,4	50,4
C-10	37,0	37,0	37,0
C-11	21,4	21,4	21,5
C-12	26,1	26,1	26,1
C-13	39,1	39,1	39,1
C-14	42,0	42,1	42,0
C-15	26,6	26,6	26,6
C-16	38,8	38,8	38,3
C-17	34,5	34,5	34,5
C-18	48,6	48,6	48,6
C-19	39,4	39,4	39,3
C-20	154,7	154,6	154,6
C-21	25,6	25,6	25,6
C-22	38,4	38,3	38,8
C-23	27,9	27,9	27,9
C-24	16,5	16,5	16,5
C-25	15,9	15,9	16,3
C-26	16,3	16,3	15,8
C-27	14,7	14,7	14,7
C-28	19,5	19,4	19,5
C-29	25,5	25,5	25,5
C-30	107,1	107,1	107,1

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 32), foi observado os sinais de carbonos insaturados em δ 107,1 e 154,7 característicos dos átomos de carbono C-30 e C-20, respectivamente, do triterpeno pentacíclico urs-20-eno, também denominado taraxasterol. No espectro DEPT-135 (Figura 33) pode-se observar que o átomo de

carbono cujo sinal aparece em δ 107,1 está ligado a dois átomos de hidrogênio, enquanto o átomo de carbono cujo sinal aparece em δ 154,7 não está ligado a átomos de hidrogênio. Esses dados também estão de acordo com a estrutura do taraxasterol. Os sinais em δ 171,1 (C-1') e 21,3 (C-2') correspondem ao carbono da carbonila e ao carbono da metila do grupo acetil, que se encontra ligado ao C-3 do esqueleto triterpeno, cujo sinal aparece em δ 81,0. Os deslocamentos observados no espectro de RMN de ^{13}C corroboram com os resultados descritos na literatura por Reynolds *et al.* (1985) e Khalilov *et al.* (2003). Os sinais observados em δ 27,9 (C-23), 16,5 (C-24), 15,9 (C-25), 16,3 (C-26), 14,7 (C-27), 19,5 (C-28) e 25,5 (C-29) confirmam a presença de sete grupos metila. Os deslocamentos em 25,6 e 39,4 correspondem aos sinais dos carbonos C-21 e C-19 respectivamente, ligados ao átomo de carbono insaturado C-20.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 34), foi observado diferentes simpletos com sinais entre δ 1,02 a 0,85 correspondentes aos átomos de hidrogênios presentes nos sete grupos metila C-23 a C-29. O simpleto em δ 2,05 integrado para três, correspondem aos átomos de hidrogênios ligado a C-2'. O sinal do hidrogênio ligado a C-3 aparece como um multiplete em δ 4,48. O duploduplete em δ 4,60 integrado para dois hidrogênios, corresponde aos dois hidrogênios vinílicos ligados ao C-30. O multiplete integrado para um hidrogênio em δ 2,15 corresponde ao hidrogênio ligado ao C-19. As atribuições referentes aos sinais no espectro de hidrogênio, está de acordo com os resultados descritos por Babaamer *et al.* (2013) e Khalilov *et al.* (2003). Portanto, esses dados permitem identificar o composto como acetato de taraxasterol.

A fração contendo o composto acetato de pseudo taraxasterol (**5**), foi submetida a análise por CG-EM e o cromatograma e espectro de massas estão apresentados nas figuras 35 e 36.

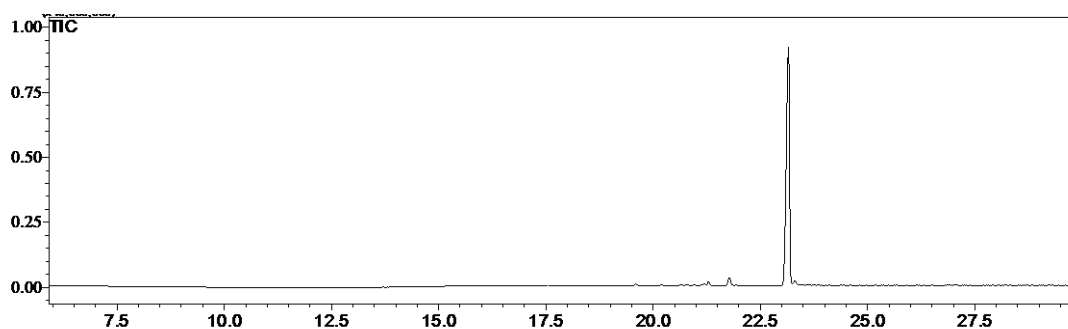


Figura 35: Cromatograma de íons totais, para o acetato de pseudo taraxasterol (**5**).

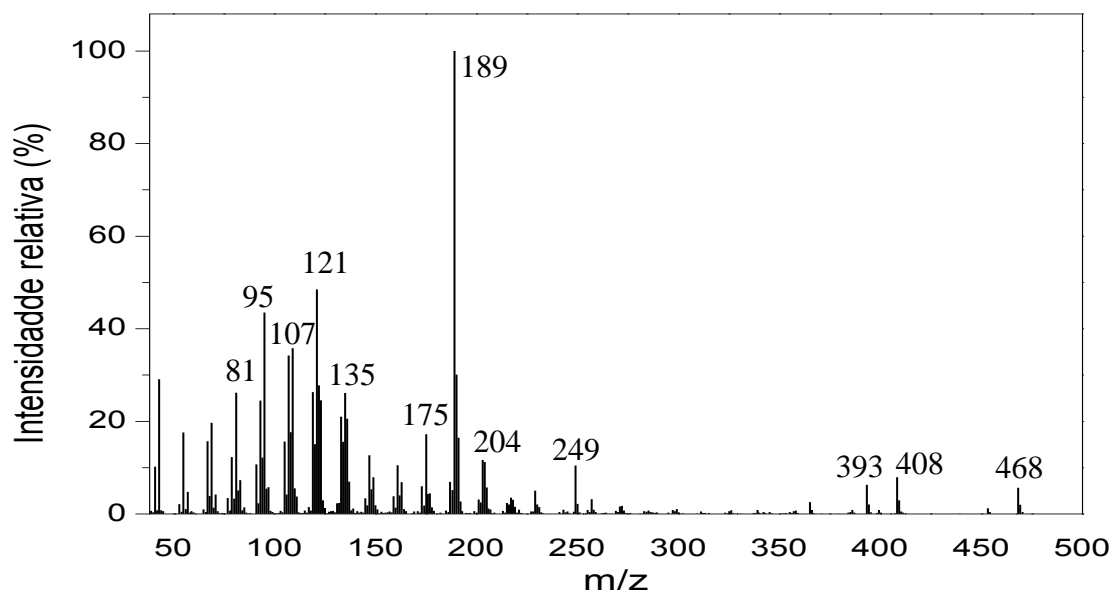


Figura 36: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de pseudo taraxasterol (**5**).

No espectro de massas (Figura 36), referente ao composto (**5**) foi observado o pico do íon-molecular em m/z 468 (7%), compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$. No espectro de massas foi observado fragmentações características do acetato de pseudo taraxasterol em m/z 408 (8%), 393 (6%), 249 (11%), 204 (11%), 189 (100%), 175 (18%), 135 (23%), 121 (50%), 107 (36%), 95 (45%), 81 (27%) de acordo com os resultados descritos por Ibrahim *et al.* (2012). A proposta para os mecanismos de fragmentações referentes ao acetato de pseudo taraxasterol está disposta na figura 37.

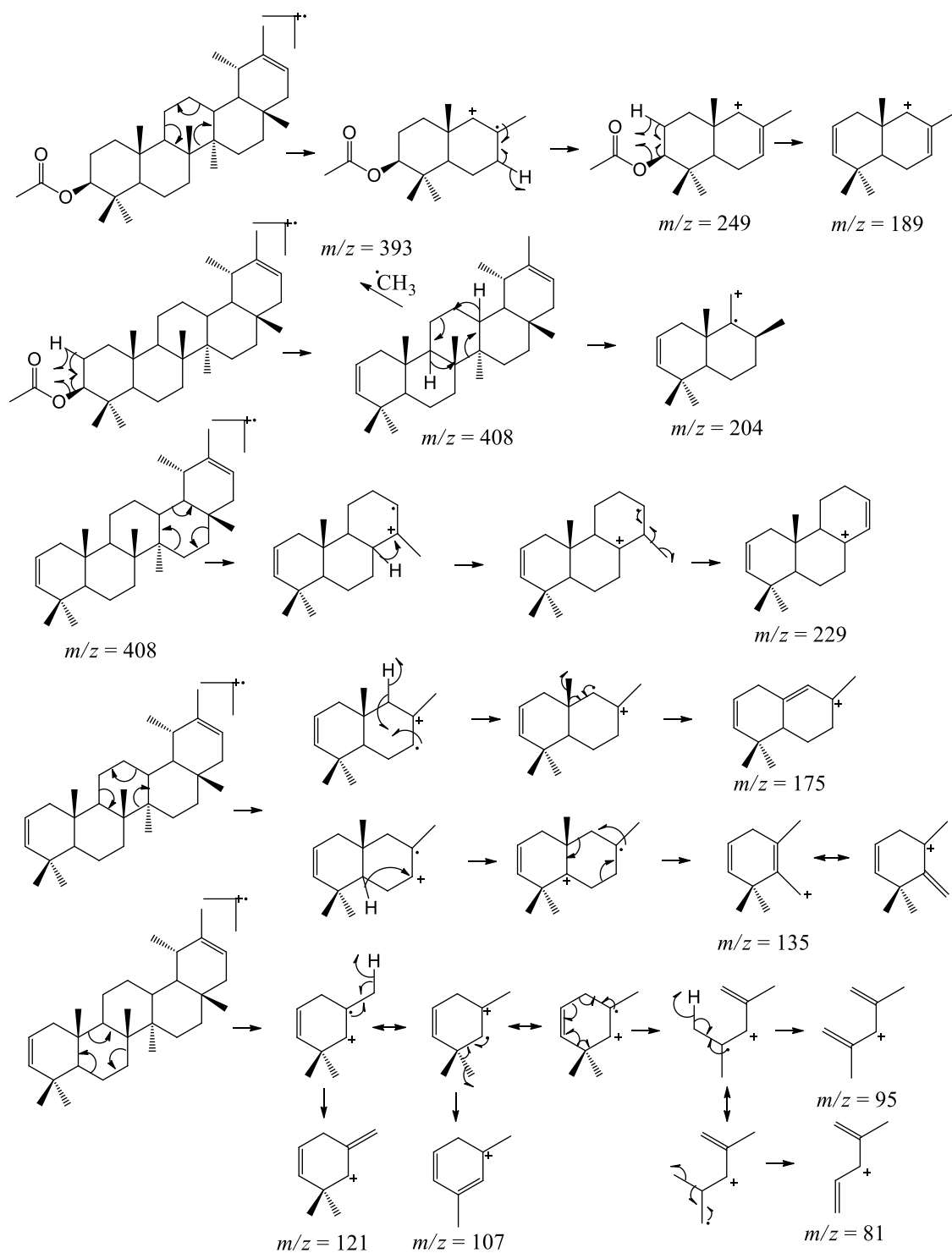


Figura 37: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de pseudo taraxasterol.

Os resultados de RMN referentes ao acetato de pseudo taraxasterol (**5**), seguem dispostos nas figuras 38, 39 e 40.

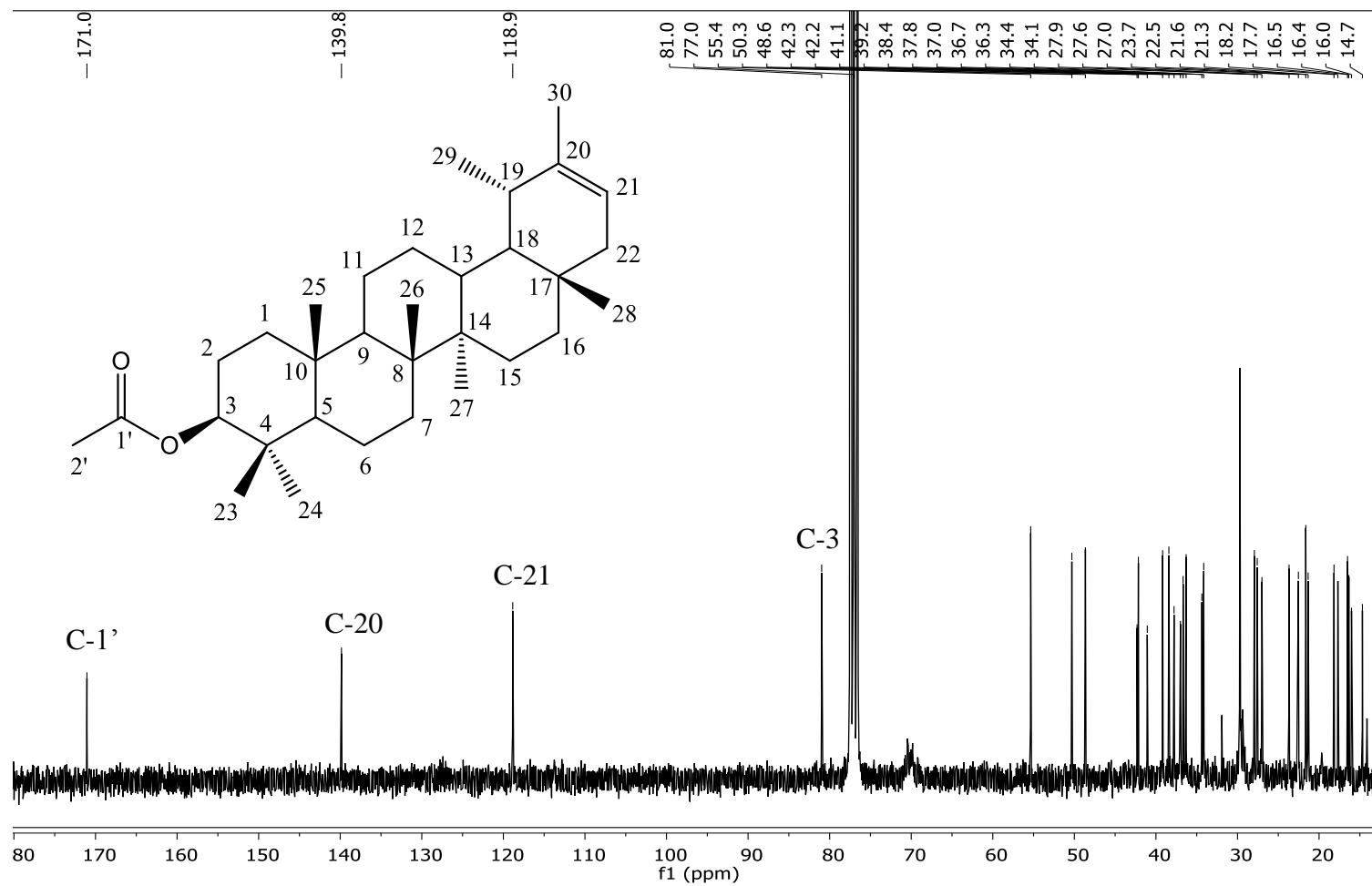


Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) do acetato de pseudo taraxasterol (5).

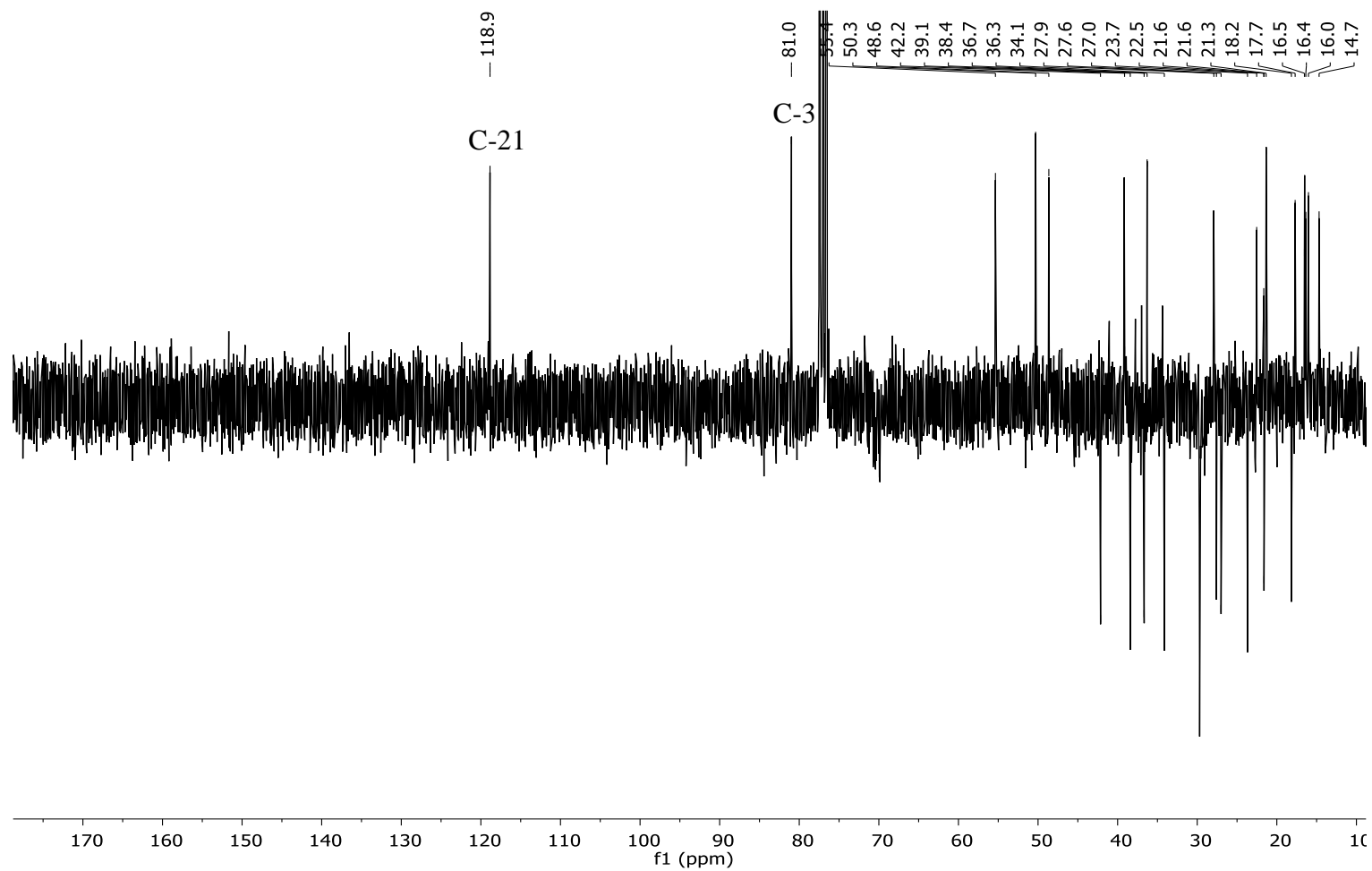


Figura 39: Espectro DEPT-135 do acetato de pseudo taraxasterol (5).

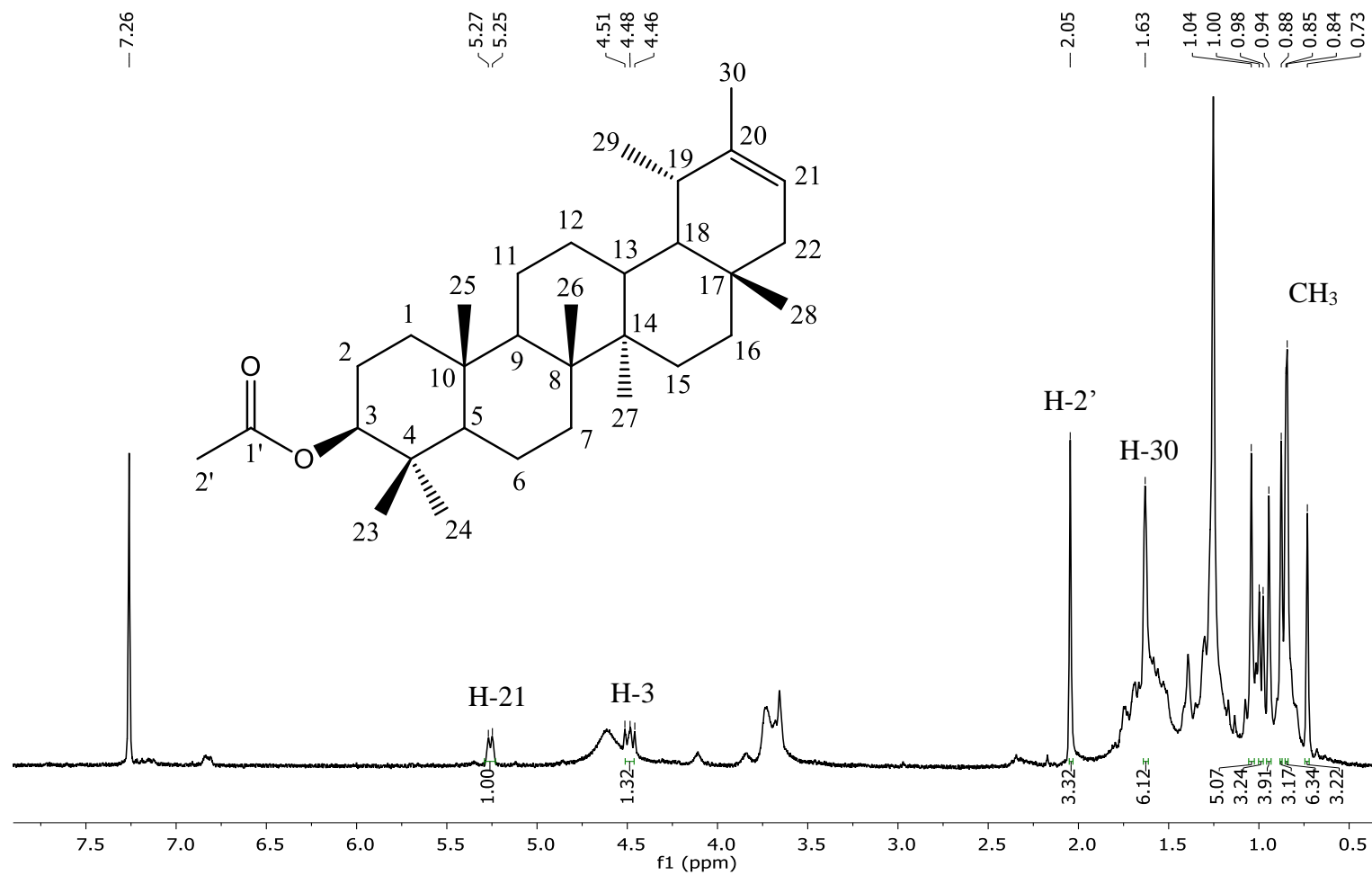


Figura 40: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 7,26 ppm) do acetato de pseudo taraxasterol (**5**).

A tabela 11 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C para amostra contendo o composto (5), com os dados da literatura referentes ao acetato de pseudo taraxasterol.

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como acetato de pseudo taraxasterol (5)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)	Dados da literatura (ppm)	
		Varnava <i>et al.</i> , 2016	Abreu <i>et al.</i> , 2011
C-1'	171,0		171,0
C-2'	21,3		
C-1	38,4	39,0	38,8
C-2	27,6	27,1	27,7
C-3	81,0	79,6	80,9
C-4	37,8	38,8	38,8
C-5	55,4	55,3	55,6
C-6	18,2	18,6	18,3
C-7	34,1	34,1	34,5
C-8	41,1	41,0	41,2
C-9	50,3	50,3	50,6
C-10	37,0	37,5	37,1
C-11	21,6	21,0	21,6
C-12	27,0	27,0	27,7
C-13	39,2	39,0	38,8
C-14	42,3	42,3	42,4
C-15	23,7	27,3	26,9
C-16	36,7	36,9	36,6
C-17	34,4	34,9	34,5
C-18	48,6	48,9	48,6
C-19	36,3	36,7	36,6
C-20	139,8	139,8	139,8
C-21	118,9	119,0	118,9
C-22	42,2	42,1	42,4
C-23	27,9	28,3	28,3
C-24	16,0	15,4	15,8
C-25	16,5	16,0	16,3
C-26	16,4	15,8	16,0
C-27	14,7	15,0	14,8
C-28	17,7	17,5	17,8
C-29	22,5	22,4	22,8
C-30	21,6	21,6	21,7

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 38), foi observado sinais de carbonos insaturados em δ 118,8 e 139,8, sinais esses característicos dos átomos de carbono C-21

e C-20, respectivamente, do triterpeno pentacíclico urs-20(21)-eno, também denominado pseudo-taraxasterol (Tabela 11) (Abreu *et al.*, 2011; Varnava *et al.*, 2016). No espectro DEPT-135 (Figura 39), foi observado que o átomo de carbono C-21 cujo o sinal aparece em δ 118,8 está ligado a um átomo de hidrogênio, enquanto que o átomo de carbono C-20 em δ 139,8 não aparece no DEPT pois o mesmo não está ligado a átomos de hidrogênio. Os sinais em δ 171,0 (C-1') e 21,3 (C-2') correspondem ao carbono da carbonila e ao carbono da metila de grupo acetil, que se encontra ligado ao C-3 do esqueleto triterpeno, cujo sinal aparece em δ 81,0. Os sinais observados em δ 27,9 (C-23); 16,0 (C-24); 16,5 (C-25); 16,4 (C-26); 14,7 (C-27); 17,7 (C-28); 22,5 (C-29); 21,6 (C-30) confirmam a presença de oito grupos metila na estrutura pentacíclica. Os deslocamentos observados no espectro obtido por RMN de ^{13}C , corroboram com os resultados descritos na literatura por Abreu *et al.* (2011) e Varnava *et al.* (2016).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 40), foi observado diferentes simpletos com sinais entre δ 1,04 a 0,73 correspondentes aos átomos de hidrogênios presentes nos sete grupos metila C-23 a C-29. O sinal dos hidrogênios da metila C-30, ligada ao carbono C-20, parecem como um simpleto entre δ 1,61 a 1,64. O simpleto em δ 2,05 integrado para três hidrogênios, correspondem aos átomos de hidrogênios de C-2' ligado a carbonila. O sinal do hidrogênio ligado a C-3 aparece como um multiplete em δ 4,49. O duplete em δ 5,26 ($J = 6,7$ Hz), integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono insaturado C-21 de acordo com os sinais descritos por Varnava *et al.* (2016), referentes a estrutura pentacíclica do pseudo taraxasterol. Portanto, esses dados permitem identificar o composto como acetato de pseudo-taraxasterol.

A fração contendo o composto acetato de germanicol (**6**), foi submetida a análise por CG-EM e o cromatograma e espectro de massas estão apresentados nas figuras 41 e 42.

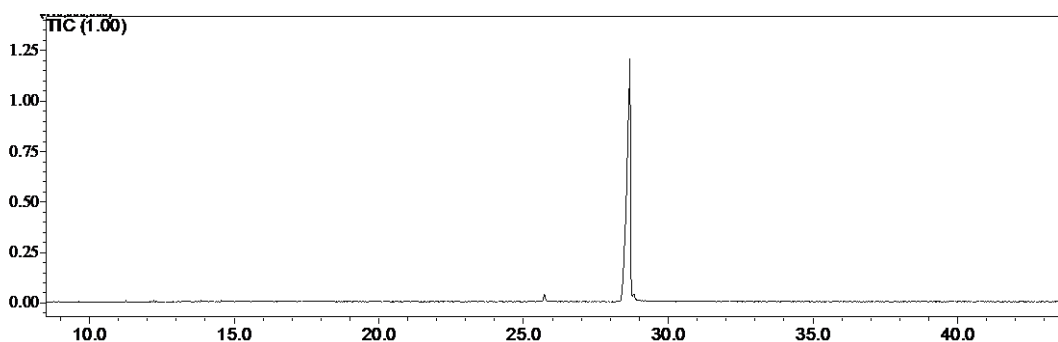


Figura 41: Cromatograma de íons totais do acetato de germanicol (**6**).

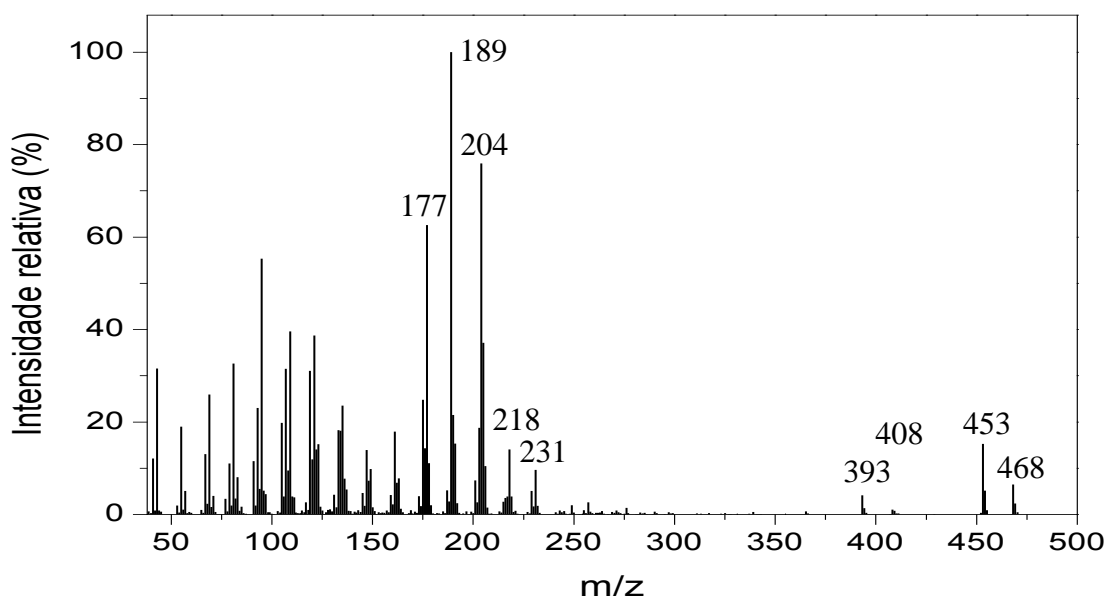


Figura 42: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de germanicol (**6**).

No espectro de massas (Figura 42), referente ao composto (**6**) foi observado o pico do íon-molecular em m/z 468 (6%), compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$. No espectro de massas foi observado fragmentações compatíveis com as do acetato de germanicol em m/z 453 (15), 408 (1%), 393 (4%), 231 (10%), 218 (14%), 204,2 (76%), 189 (100%) e 177 (62%) quando comparadas com os dados descritos por Biesboer *et al.* (1982). A proposta para o mecanismo de fragmentação referente ao acetato de germanicol está disposta na figura 43.

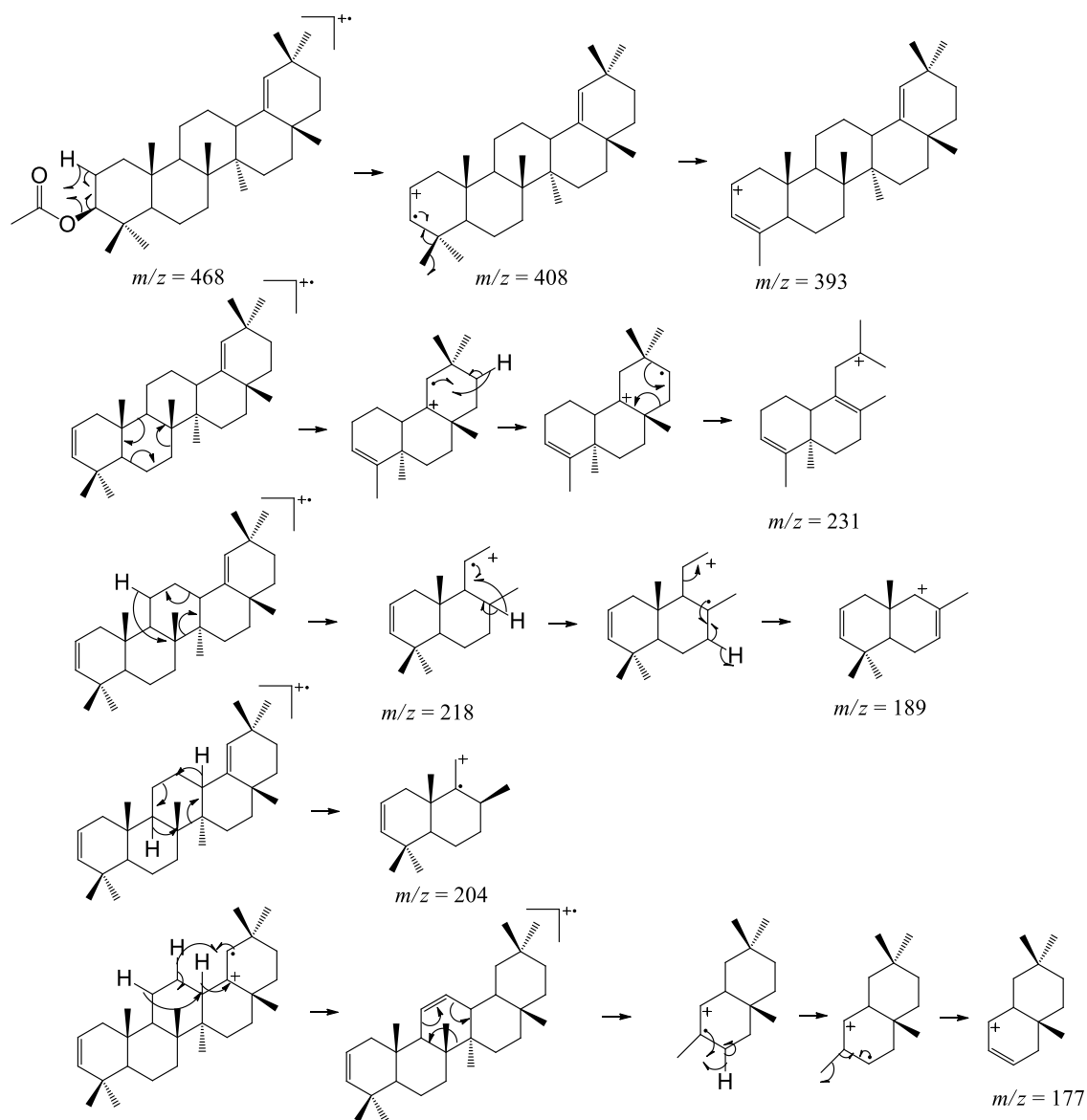


Figura 43: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de geranicol.

Os resultados de RMN referentes ao composto acetato de geranicol (**6**), seguem dispostos nas figuras 44, 45 e 46.

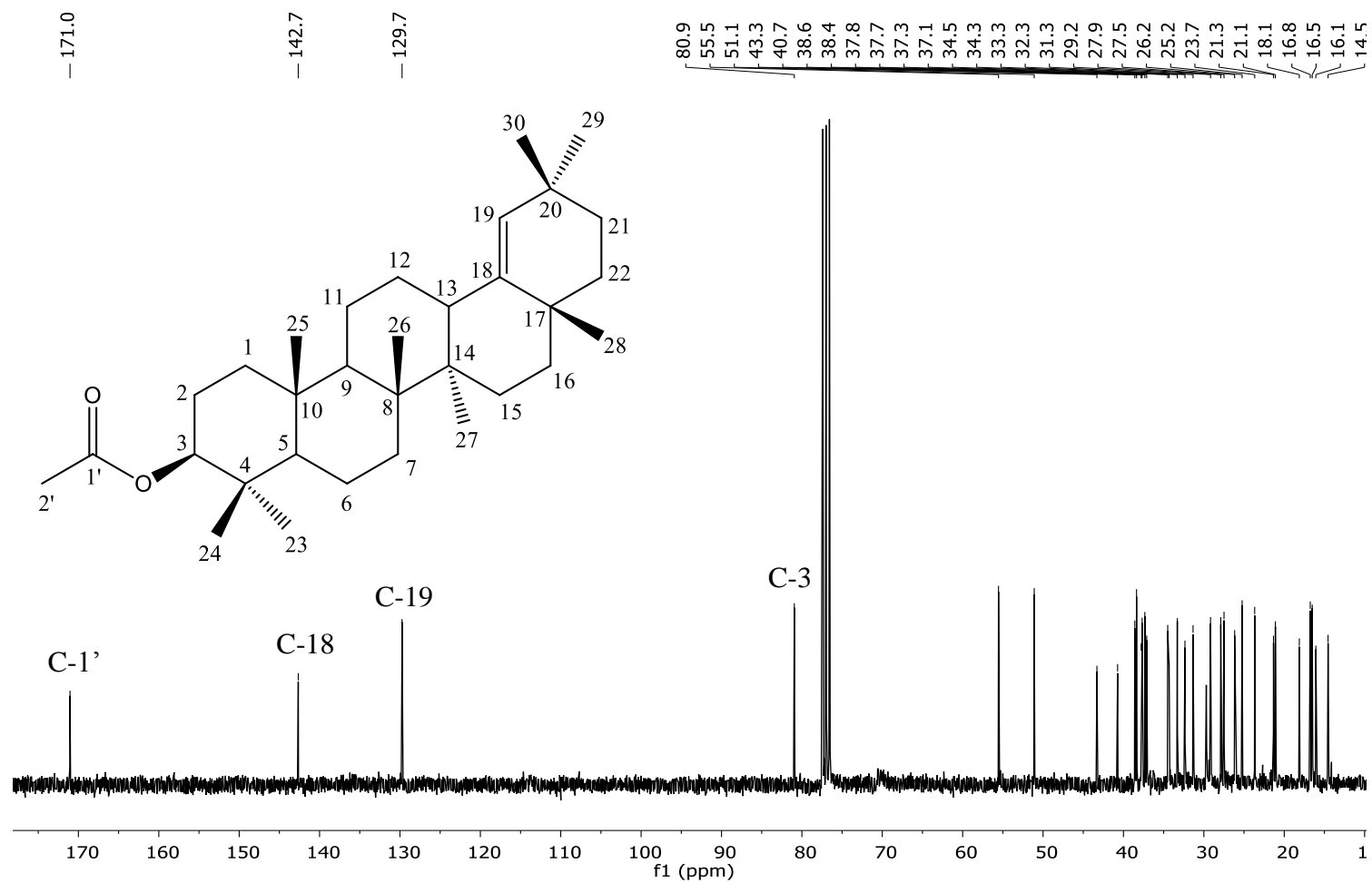


Figura 44: Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 77,0 ppm) do acetato de geraniol (**6**).

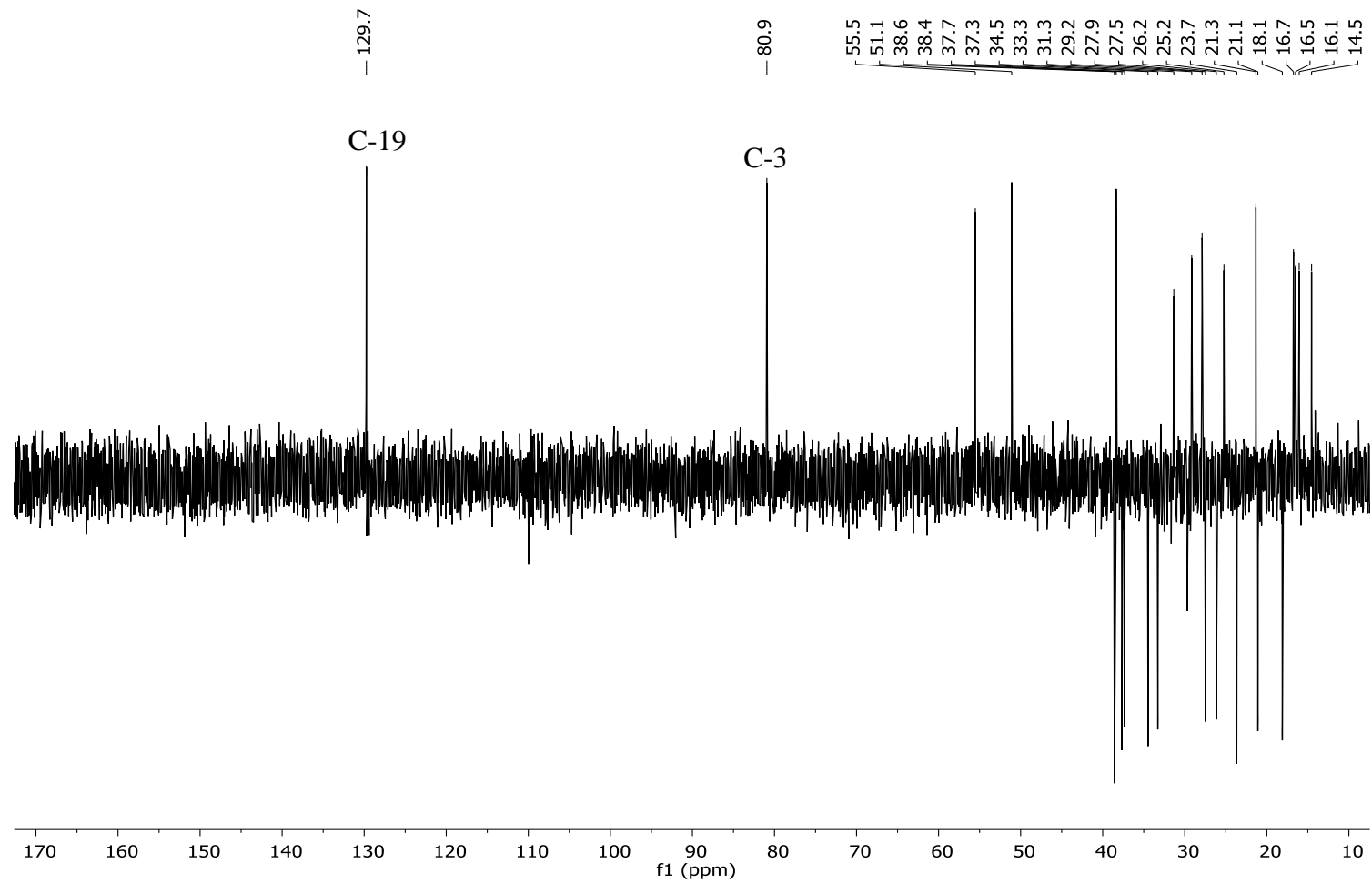


Figura 45: Espectro DEPT-135 do acetato de geranicol (6).

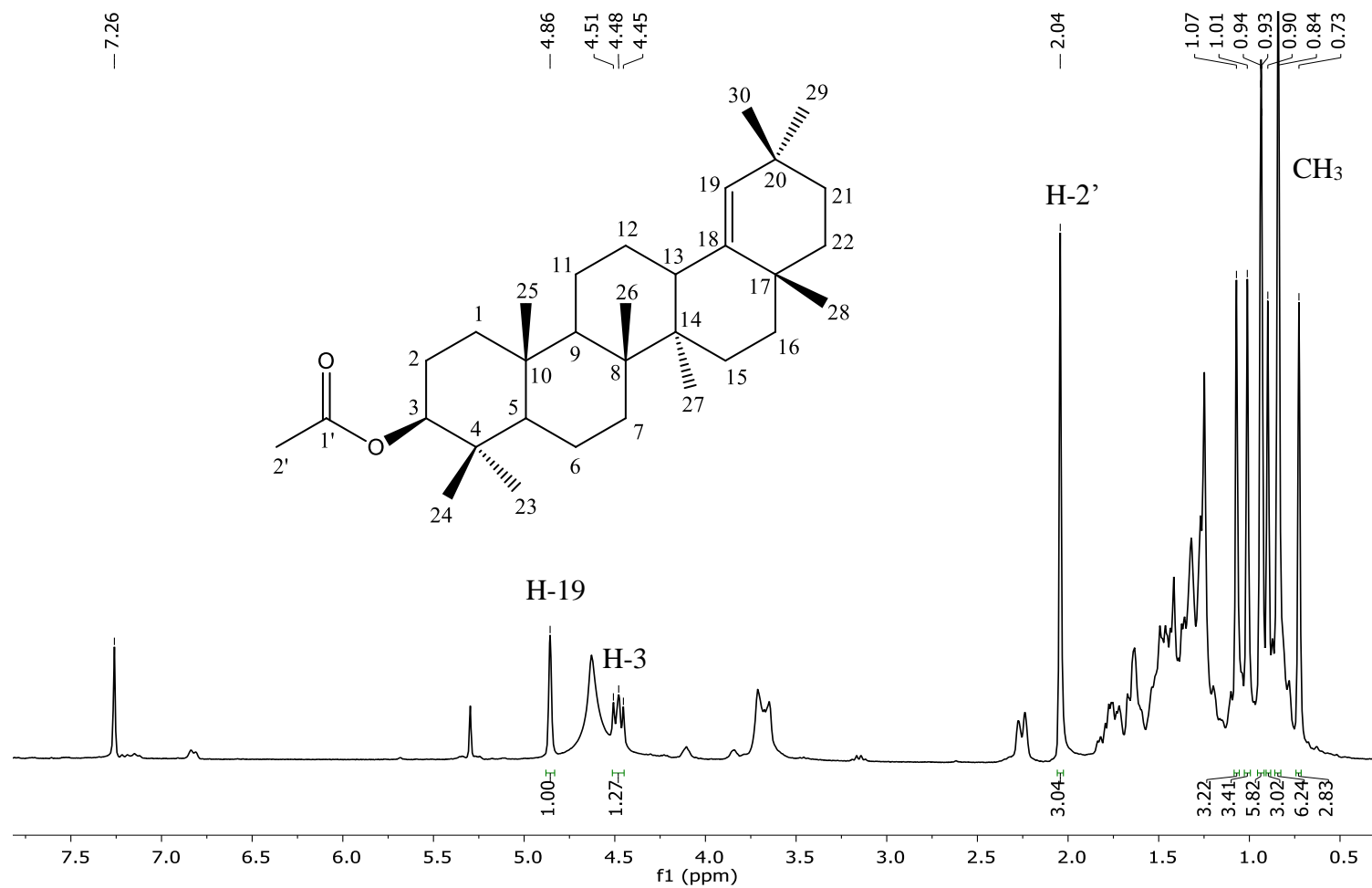


Figura 46: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 7,26 ppm) do acetato de geranicol (6).

A tabela 12 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C , para amostra contendo o composto (6), com dados da literatura referentes ao acetato de germanicol.

Tabela 12: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como acetato de germanicol (6)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)	Dados da literatura (ppm)	
		Alqasoumi <i>et al.</i> , (2014)	González <i>et al.</i> , (1981)
C-1'	171,0	171,1	170,9
C-2'	21,3	21,3	21,7
C-1	38,6	38,5	38,5
C-2	23,7	23,7	23,8
C-3	80,9	81,0	81,0
C-4	37,8	38,4	37,9
C-5	55,5	55,6	55,7
C-6	18,1	18,2	18,2
C-7	34,5	34,5	34,6
C-8	40,7	40,8	40,9
C-9	51,1	51,1	51,2
C-10	37,1	37,8	37,3
C-11	21,1	21,1	21,2
C-12	26,2	26,2	26,1
C-13	38,4	38,6	38,7
C-14	43,3	43,3	43,4
C-15	27,5	27,5	27,6
C-16	37,7	37,4	37,7
C-17	34,3	34,4	34,4
C-18	142,7	142,7	142,7
C-19	129,7	129,8	129,8
C-20	32,3	32,4	32,4
C-21	33,3	33,3	33,4
C-22	37,3	37,2	37,5
C-23	27,9	27,9	28,0
C-24	16,5	16,5	16,5
C-25	16,1	16,1	16,1
C-26	16,8	16,8	16,8
C-27	14,5	14,6	14,5
C-28	25,2	25,3	25,3
C-29	31,3	31,4	31,3
C-30	29,2	29,2	29,2

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44) foi observado os sinais de carbonos insaturados em δ 129,7 e 142,7 característicos dos átomos de carbono C-19 e C-18, respectivamente, do triterpeno pentacíclico olean-18-eno germanicol (Tabela 12) (Olea & Rock, 1990). No espectro DEPT-135 (Figura 45) foi observado o sinal em δ 129,7

positivo referente ao C-19, átomo de carbono sp^2 ligado a um hidrogênio. O sinal em δ 142,7 não foi observado no espectro DEPT, indicando que o carbono C-20, não possui hidrogênio ligado. Os sinais em δ 171,0 (C-1') e 21,3 (C-2') correspondem ao carbono da carbonila e ao carbono da metila de grupo acetil, que se encontra ligado ao C-3 do esqueleto triterpeno. No espectro do DEPT, não foi observado o sinal para o deslocamento em δ 171,0 indicando que o carbono C-1', não está ligado a hidrogênios. O sinal em δ 80,9 se refere a C-3 indicando que está ligado a um hidrogênio. Os sinais observados em δ 27,9 (C-23), 16,5 (C-24), 16,1 (C-25), 16,8 (C-26), 14,5 (C-27), 25,2 (C-28), 31,3 (C-29), 29,2 (C-30), aparecem positivo no espectro DEPT, indicando a presença de oito grupos metila. Os sinais analisados para o espectro de RMN de ^{13}C e DEPT, corroboram com a estrutura do acetato de germanicol e dados com os descritos na literatura por González *et al.* (1981) e Alqasoumi *et al.* (2014).

No espectro de RMN de 1H (Figura 46), observa-se diferentes simpletos com sinais entre δ 1,07 a 0,73 correspondentes aos átomos de hidrogênios dos grupos metila entre C-23 a C-30. O simpleto em δ 2,04 corresponde aos átomos de hidrogênios de C-2' ligado à carbonila. O sinal do hidrogênio ligado a C-3 aparece como um tripleto em δ 4,48 indicando o acoplamento com dois átomos de hidrogênio ligados ao carbono C-2. O simpleto em δ 4,86 integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-19. As atribuições referentes aos sinais no espectro de hidrogênio, estão de acordo com os resultados descritos por Alqasoumi *et al.* (2014).

A fração contendo a mistura dos compostos acetato de α -amirina (7) e acetato de β -amirina (8), foi submetida a análise por CG-EM e o cromatograma está disposto na figura 47.

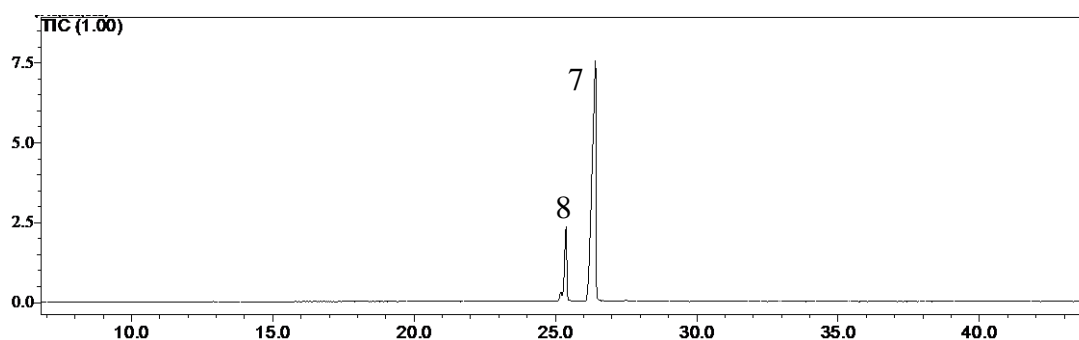


Figura 47: Cromatograma de íons totais do acetato de α -amirina (7) e de acetato de β -amirina (8).

Os compostos referentes aos picos no cromatograma (Figura 47), apresentaram proporções de 16,1% para o acetato de β -amirina (**8**), e 83,9% para acetato de α -amirina (**7**). Os espectros de massas para cada componente seguem dispostos nas figuras 48 e 49.

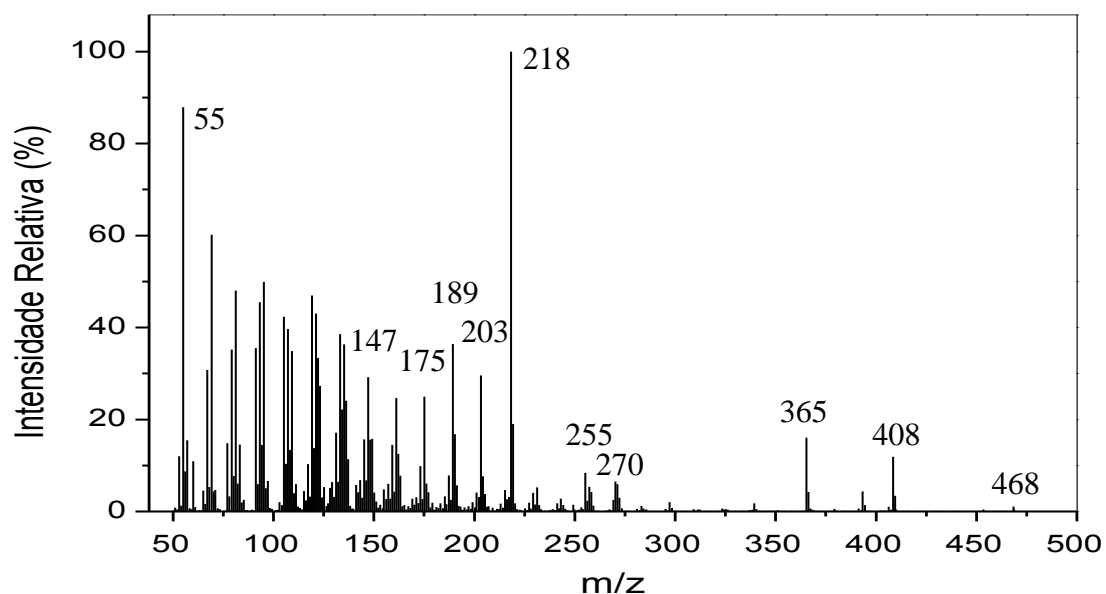


Figura 48: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de α -amirina (**7**)

No espectro de massas (Figura 48), referente ao composto (**7**) foi observado o pico do íon-molecular em m/z 468 (1%), compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$. Foi observado no espectro de massas fragmentações compatíveis com o acetato de α -amirina em m/z 408 (12%), 365 (16%), 255 (8), 270 (6%), 218 (100%), 203 (30%), 189 (36%), 175 (25%), 147 (29%), 135 (36%) e 55 (88%) e estão de acordo com os dados reportados por Abreu *et al.* (2011) e Fingolo, Santos & Kaplan (2013). A proposta para o mecanismo de fragmentação referente ao acetato de α -amirina está disposta na figura 49.

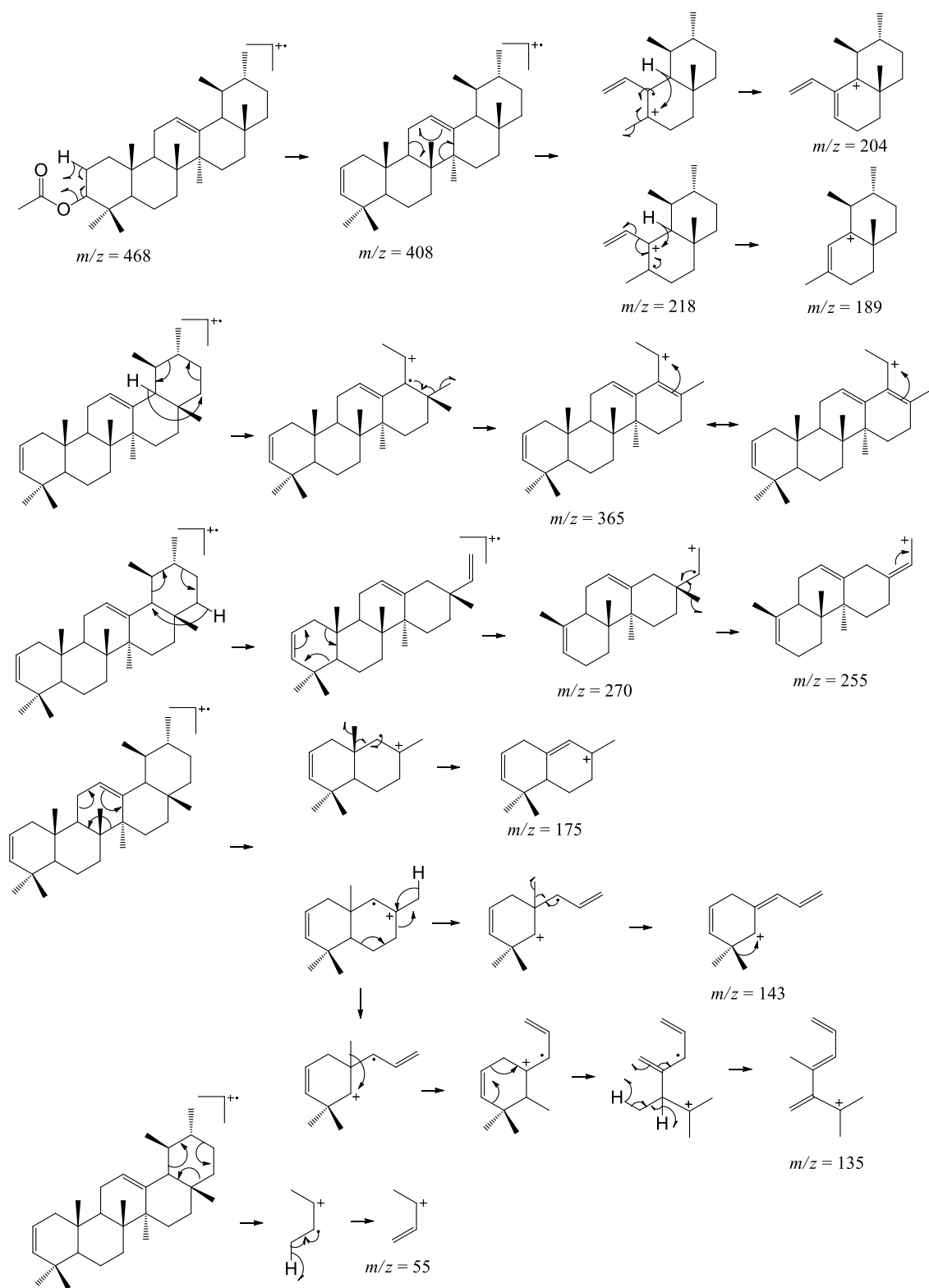


Figura 49: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de α -amirina.

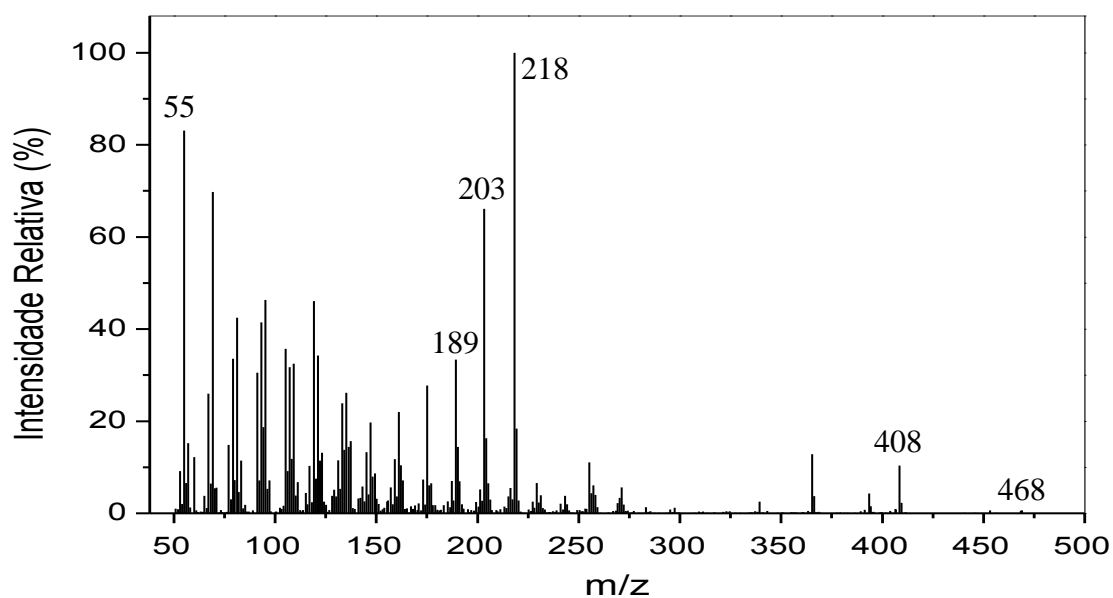


Figura 50: Espectro de massas (IE, 70 eV) do acetato de β -amirina (**8**).

Pode-se observar no espectro de massas (Figura 50), referente ao composto (**8**) o pico do íon-molecular em m/z 468 (1%), compatível com a fórmula molecular $C_{32}H_{52}O_2$. Foi observado no espectro de massas fragmentações comuns para o acetato de β -amirina em m/z 408 (10%), 218 (100%), 203 (66%), 204 (16%), 190 (14%), 189 (33%) e 55 (83%) de acordo com os dados reportados por Biesboer *et al.* (1982). A proposta para o mecanismo de fragmentação referente ao acetato de β -amirina está disposta na figura 51.

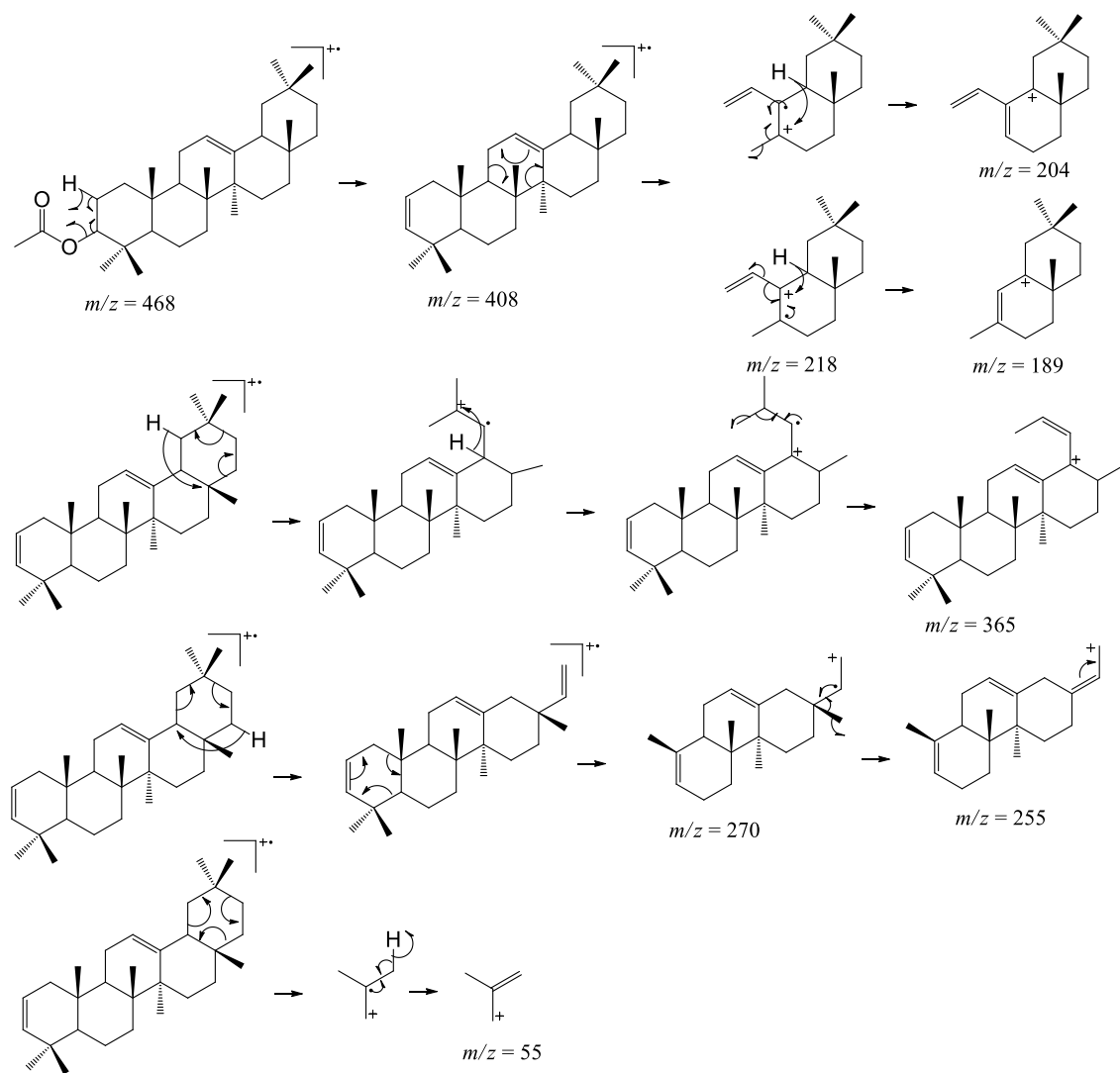


Figura 51: Proposta para o mecanismo de fragmentação do acetato de β -amirina.

Os espectros de RMN referentes ao acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**), seguem dispostos nas figuras 52, 53 e 54.

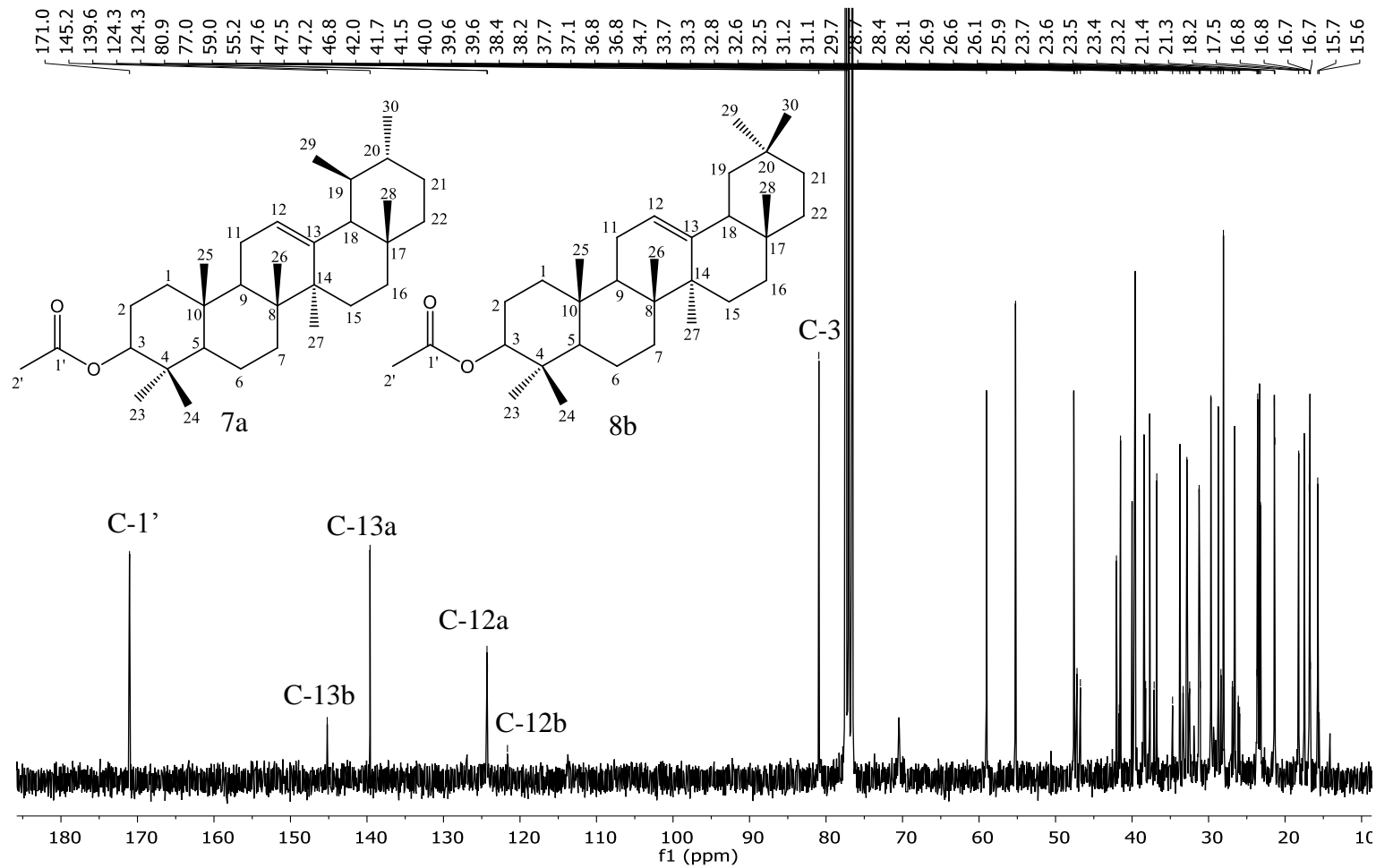


Figura 52: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) do acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

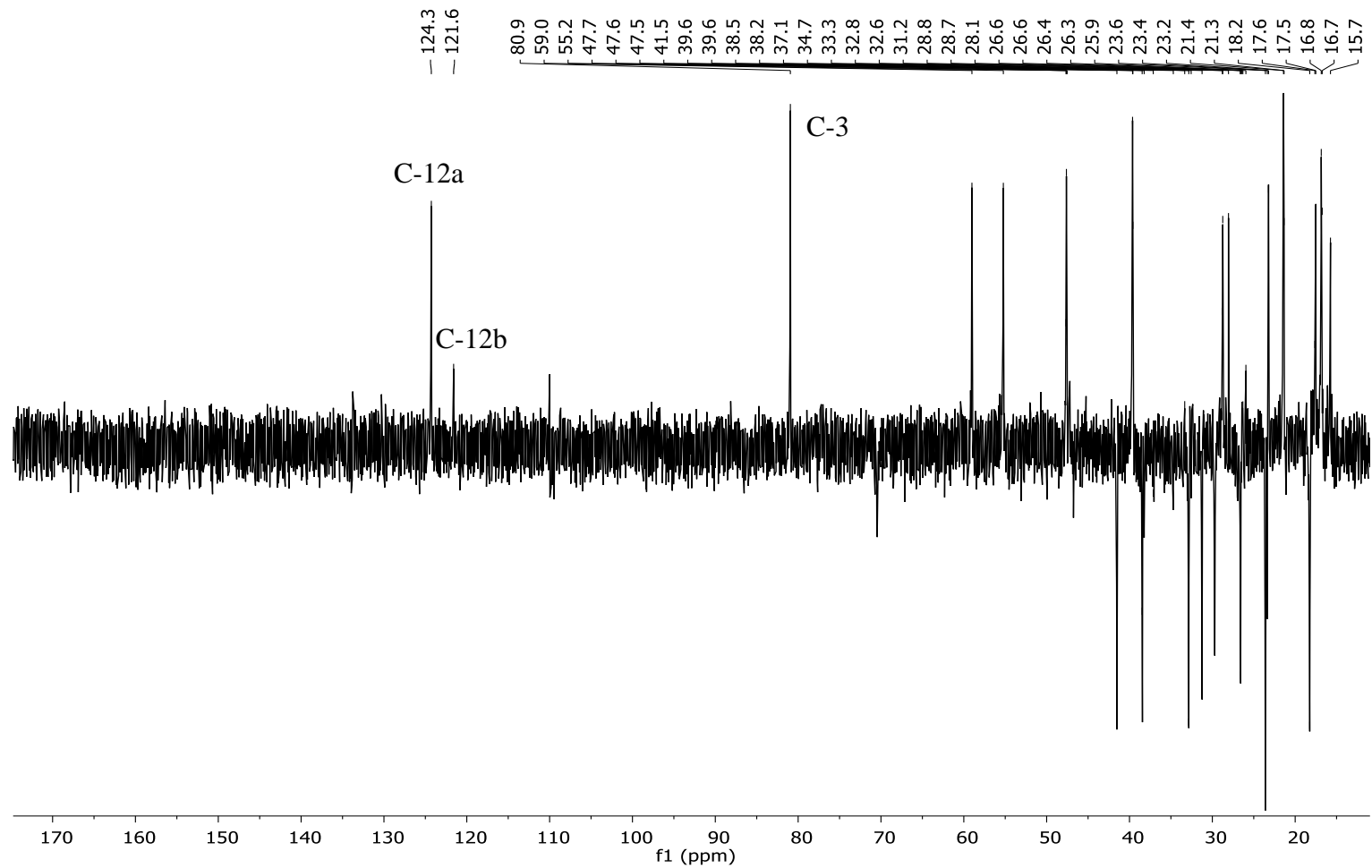


Figura 53: Espectro DEPT-135 do acetato de α -amirina (**7**) e do acetato de β -amirina (**8**).

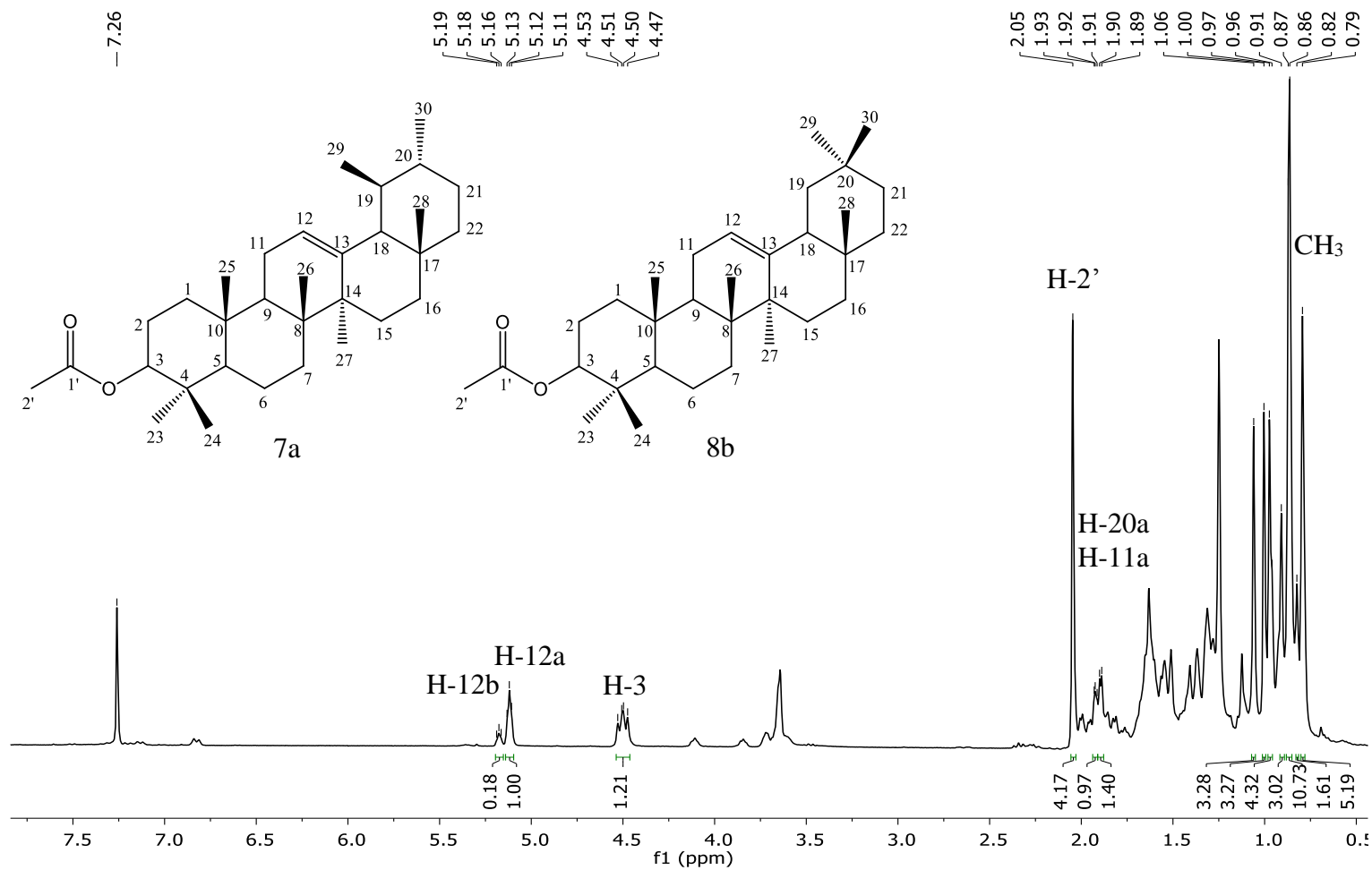


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$ ppm) do acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 52) para a mistura dos compostos (7) e (8) foi observado os sinais de carbonos olefínicos em δ 124,3 e 139,6 característicos do triterpeno urs-12-eno, denominado α -amirina. No espectro também se observou sinais com menor intensidade em δ 121,6 e 145,2 característico do triterpeno olean-12-eno, denominado de β -amirina (Olea & Roque, 1990). O sinal em δ 171,0 é característico da carbonila do grupo acetato ligado ao triterpeno, contribuindo para massa molecular em m/z 468 para os dois componentes presentes na amostra. Sendo assim os sinais no espectro de RMN de ^{13}C para a amostra contendo os compostos (7) e (8), foram comparados com os dados da literatura para o acetato de α -amirina e acetato de β -amirina (tabela 13).

Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C para os compostos identificados como acetato de α -amirina e acetato de β -amirina

Carbonos	Dados Obtidos (ppm)		Dados da literatura (ppm)	
	Acetato de α -amirina	Acetato de β -amirina	Okoye <i>et al.</i> , 2014	Shan <i>et al.</i> , 2014
C-1'	171,0	171,0	171,5	171,1
C-2'	21,3	21,3	21,5	21,4
C-1	38,4	38,2	38,6	38,3
C-2	23,6	23,6	23,8	23,5
C-3	80,94	80,9	81,2	81,0
C-4	37,7	40,0	37,9	39,8
C-5	55,2	55,2	55,5	55,2
C-6	18,2	18,2	18,4	18,3
C-7	32,8	32,6	33,1	32,6
C-8	40,0	37,7	40,2	37,7
C-9	47,6	47,5	47,8	47,6
C-10	36,8	36,8	37,0	36,8
C-11	23,3	23,6	23,6	23,6
C-12	124,3	121,6	124,5	121,6
C-13	139,6	145,2	139,8	145,2
C-14	42,0	41,7	42,4	41,7
C-15	26,7	26,1	28,3	26,1
C-16	26,6	26,9	26,8	26,9
C-17	33,7	32,5	33,9	32,5
C-18	59,0	47,2	59,3	47,2
C-19	39,6	46,7	39,8	46,8
C-20	39,6	31,1	39,8	31,1
C-21	31,23	34,7	31,5	34,7
C-22	41,5	37,1	41,7	37,1
C-23	28,1	28,1	28,3	28,0
C-24	16,8	15,5	16,9	15,6

Continuação.

Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C para os compostos identificados como acetato de α -amirina e acetato de β -amirina

Carbonos	Dados Obtidos (ppm)		Dados da literatura (ppm)	
	Acetato de α -amirina	Acetato de β -amirina	Okoye <i>et al.</i> , 2014	Shan <i>et al.</i> , 2014
C-25	15,7	16,8	15,9	16,7
C-26	17,5	16,8	17,7	16,8
C-27	23,2	25,9	23,4	26,0
C-28	28,7	28,4	29,1	28,4
C-29	16,8	33,3	17,0	33,4
C-30	21,4	23,6	21,6	23,7

No espectro DEPT-135 (Figura 53), não foi observado o sinal para o deslocamento em δ 171,0 indicando que o carbono C-1', não está ligado a hidrogênios. O sinal em δ 80,9 aparece positivo para o carbono C-3 indicando que o carbono está ligado a um hidrogênio. Os sinais em δ 171,0 (C-1') e 21,3 (C-2') correspondem ao carbono da carbonila e ao carbono da metila de grupo acetil respectivamente. No espectro DEPT-135 foi observado o sinal positivo em δ 124,3 referente ao C-12a, átomo de carbono sp^2 ligado a um hidrogênio, o sinal em δ 139,6, não apareceu no espectro DEPT-135, indicando que o carbono C-13a, não está ligado á hidrogênios. Os sinais analisados para o espectro de RMN de ^{13}C e DEPT, corroboram com a estrutura do acetato de α -amirina (**7**) de acordo com os dados descritos na literatura por Okoye *et al.* (2014).

No espectro DEPT-135 foi observdo o sinal positivo em δ 121,6 referente a C-12b átomo de carbono sp^2 ligado a um hidrogênio, o sinal em δ 145,2, não apareceu no espectro DEPT, indicando que o carbono C-13b, não apresenta hidrogênios. Os sinais no espectro de RMN de ^{13}C e DEPT, corroboram com a estrutura do acetato de β -amirina (**8**) (Maurya *et al.*, 2012; Shan *et al.* 2014).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 54), foi observado sinais como simpletos entre δ 1,06 a 0,79 correspondentes aos átomos de hidrogênios dos grupos metila entre C-23 a C-30. O simpleto em δ 2,08 corresponde aos átomos de hidrogênios de C-2' ligado a carbonila. O sinal do hidrogênio ligado a C-3 aparece como um duploduplete em δ 4,50. O tripleto em δ 5,11 ($J = 3,7$ Hz) integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-12a, referente ao acetato de α -amirina de acordo com os dados descritos por Okoye *et al.* (2014). O tripleto em δ 5,17 ($J = 3,6$ Hz), corresponde ao hidrogênio ligado a C-12b (Shan *et al.*, 2014; Srisurichan & Pornpakakul, 2015).

A fração F3, foi submetida a reprecipitação obtendo-se o composto hexanoato de germanicol (**9**) (29 mg). A amostra foi submetida a análise por CG-EM e o cromatograma foi mostrado na figura 8, o espectro de massas está disposto na figura 55.

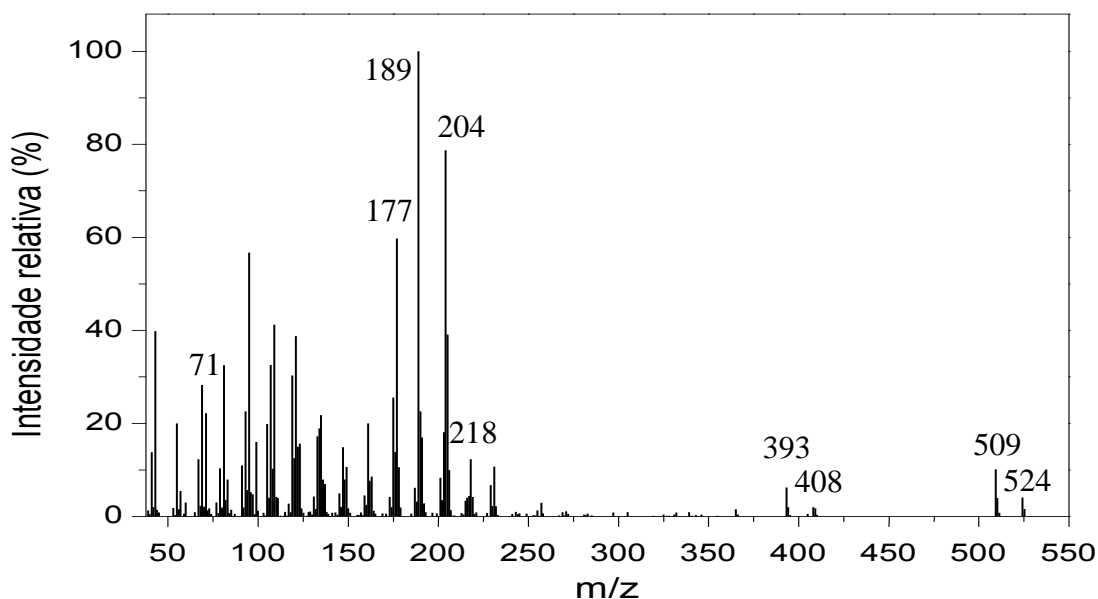


Figura 55: Espectro de massas (IE, 70 eV) do hexanoato de germanicol (**9**).

No espectro de massas referente ao composto (**9**), observa-se pico do íon-molecular em m/z 524 (4%) compatível com a fórmula molecular $C_{36}H_{60}O_2$ compatível com a fórmula molecular do hexanoato de germanicol (Figura 55). No espectro de massas foi observado fragmentações características para o germanicol em m/z 408 (2%), 393 (6%), 218 (13%), 204 (79%), 189 (100%), 177 (60%) e estão de acordo com os dados reportados por Biesboer *et al.* (1982). O fragmento em m/z 509 (10%) observado no espectro de massas corresponde a perda de um grupo metila e os fragmentos em 99 (16%) e 71 (22%) supostamente estão relacionando ao grupo hexanoil. A proposta para o mecanismo de fragmentação está disposta na figura 56.

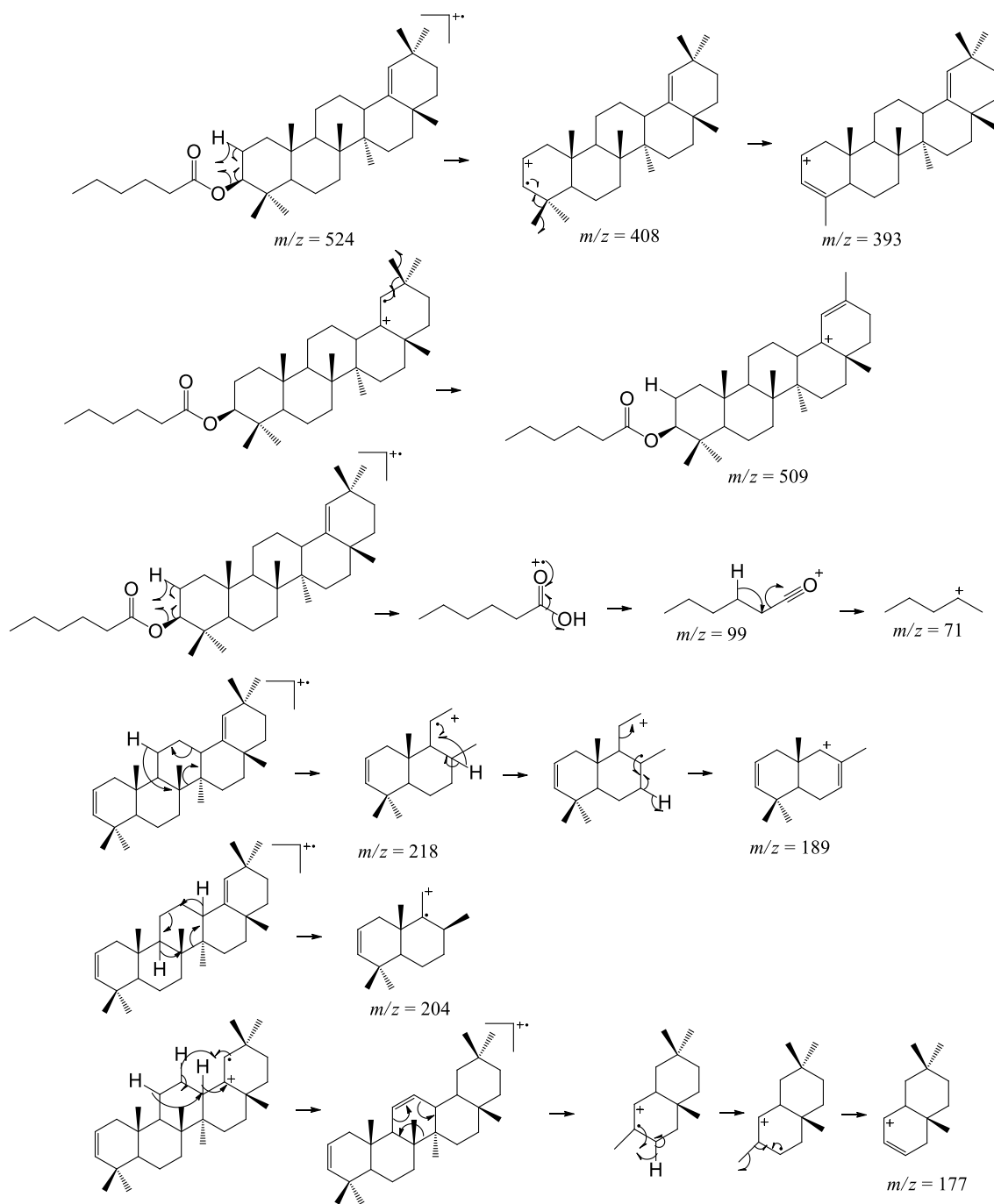


Figura 56: Proposta para o mecanismo de fragmentação do hexanoato de germanicol.

Os dados de RMN referentes ao hexanoato de germanicol (**9**), seguem dispostos nas figuras 57, 58 e 59.

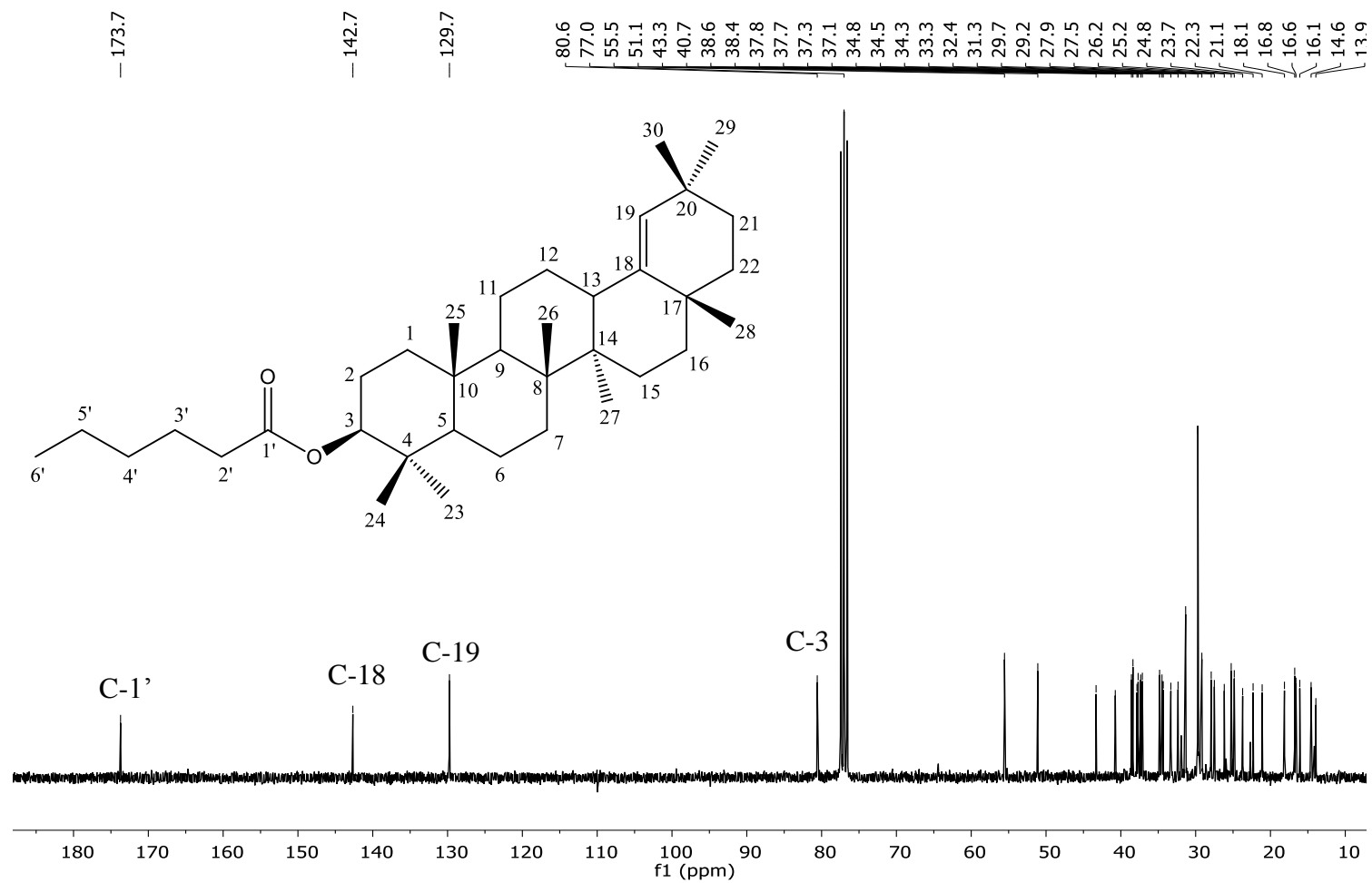


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) do hexanoato de germanicol (**9**).

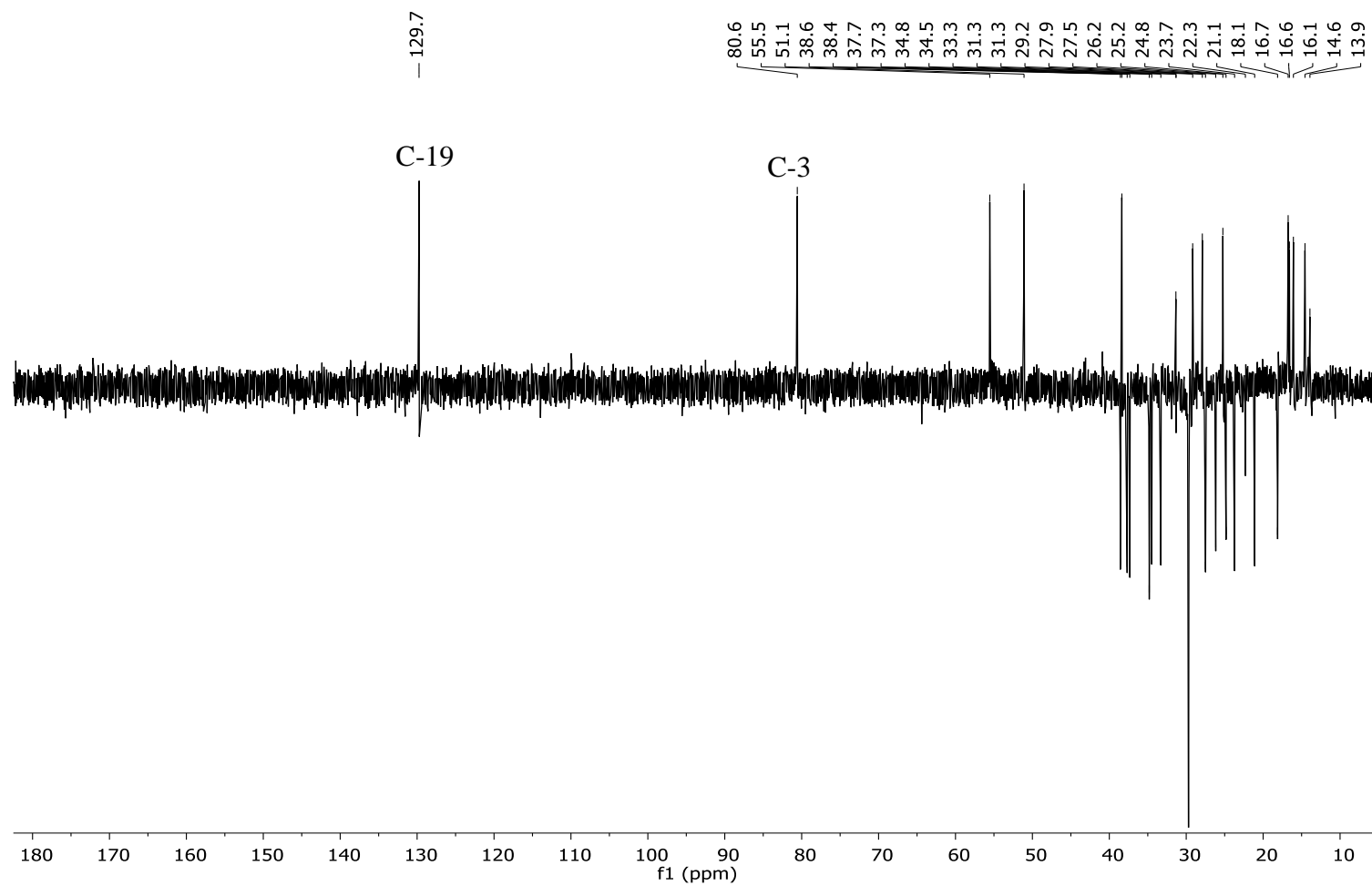


Figura 58: Espectro DEPT-135 do hexanoato de geraniol (**9**).

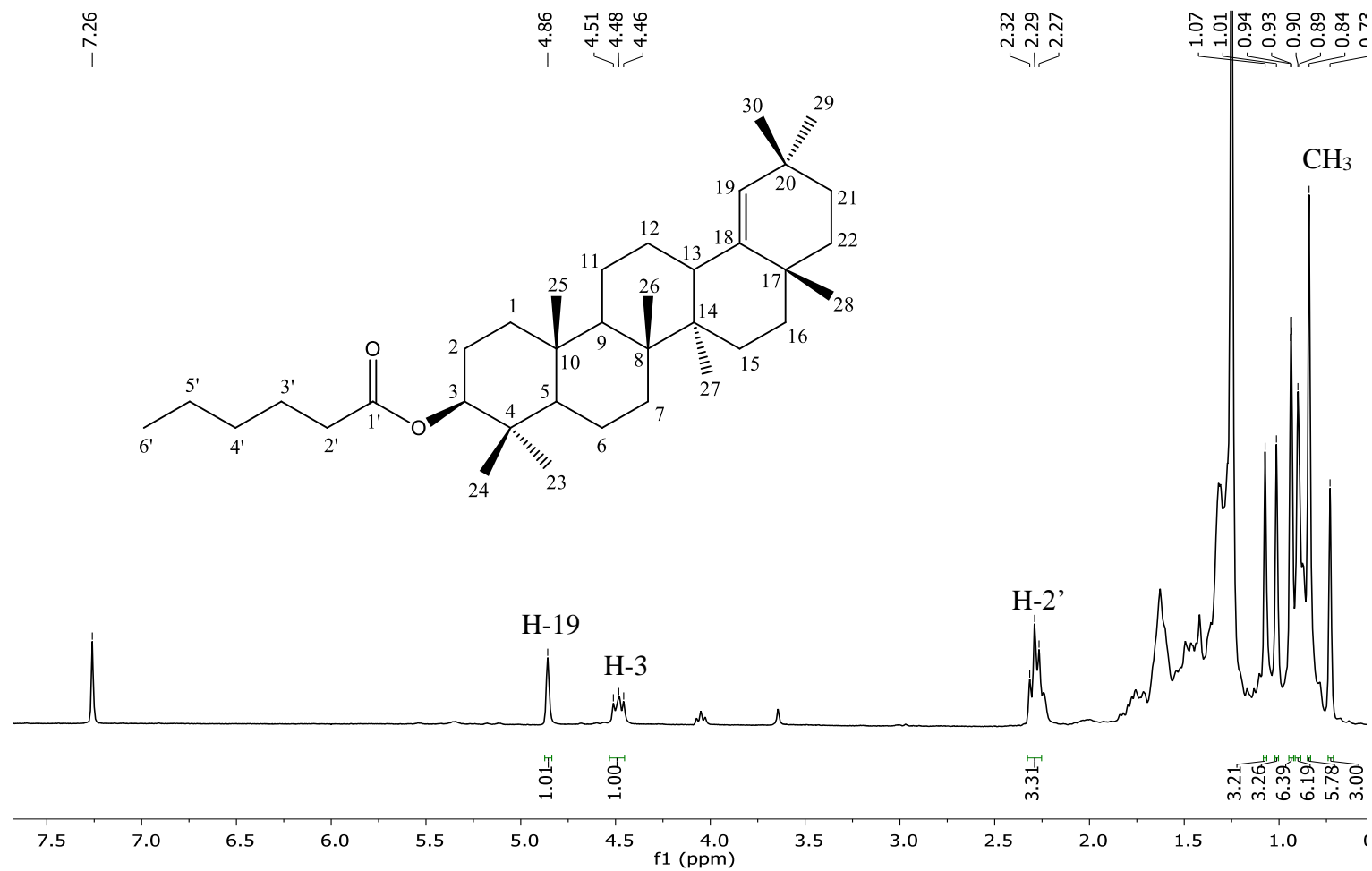


Figura 59: Espectro RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ_{CDCl₃} = 7,26 ppm) do hexanoato de germanicol (**9**).

A tabela 14 relaciona os sinais obtidos no espectro de RMN de ^{13}C para o composto (9), com os dados da literatura referente ao hexanoato de germanicol.

Tabela 14: Dados de RMN de ^{13}C para o composto identificado como hexanoato de germanicol (9)

Carbono	Dados Obtidos (ppm)	Dados da literatura (ppm)		
		Rojas <i>et al.</i> , 2004	Luz <i>et al.</i> , 2016	Tian <i>et al.</i> , 2006
C-6'	13,9			13,7
C-5'	22,3			22,2
C-4'	31,3			31,1
C-3'	24,8	24,7		24,8
C-2'	34,8	34,7		34,6
C-1'	173,7	173,6		172,7
C-1	38,6	38,5	38,2	
C-2	23,7	23,6	23,7	
C-3	80,6	80,5	81,0	
C-4	37,8	37,7	37,9	
C-5	55,5	55,4	55,5	
C-6	18,1	18,0	18,1	
C-7	34,5	34,2	34,5	
C-8	40,7	40,6	40,9	
C-9	51,1	51,0	51,1	
C-10	37,1	37,0	37,1	
C-11	21,1	21,0	21,2	
C-12	26,2	26,1	26,2	
C-13	38,4	38,3	38,4	
C-14	43,3	43,2	43,3	
C-15	27,5	27,4	27,5	
C-16	37,3	37,6	37,2	
C-17	34,3	34,4	34,3	
C-18	142,7	142,6	142,7	
C-19	129,7	129,6	129,7	
C-20	32,4	32,2	32,2	
C-21	33,3	33,2	33,2	
C-22	37,7	37,2	37,8	
C-23	27,9	27,8	27,9	
C-24	16,1	16,0	16,5	
C-25	16,6	16,5	16,8	
C-26	16,8	16,6	16,2	
C-27	14,6	14,5	14,6	
C-28	25,2	25,1	25,3	
C-29	31,3	31,2	31,3	
C-30	29,2	29,1	29,2	

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57) para o composto (**9**) foi observado os sinais de carbonos insaturados em δ 129,7 e 142,7 característicos dos átomos de carbono C-19 e C-18, respectivamente, do triterpeno pentacíclico germanicol (Tabela 14). No espectro DEPT-135 (Figura 58) foi observado o sinal em δ 129,7 positivo referente a C-19, átomo de carbono sp^2 ligado a um hidrogênio. O sinal em δ 142,7 não apareceu no espectro DEPT, indicando que o carbono C-20, não está ligado a hidrogênios. O sinal em δ 173,7 refere-se a C-1' correspondente ao carbono da carbonila. O sinal em δ 80,6 (C-3) do esqueleto triterpeno corresponde ao carbono ligado ao grupo (-OCO-). Não foi observado no espectro do DEPT-135 o sinal para o deslocamento em δ 173,7, indicando que o carbono C-1', não está ligado a hidrogênios. O sinal em δ 80,6 aparece positivo para C-3 indicando que o carbono está ligado a um hidrogênio. Os sinais observados em δ 27,9 (C-23), 16,1 (C-24), 16,6 (C-25), 16,8 (C-26), 14,6 (C-27), 25,2 (C-28), 31,3 (C-29), 29,2 (C-30) confirmam a presença de oito grupos metila pertencentes a estrutura olean-18-eno, de acordo com a literatura Rojas *et al.* (2004) e Luz *et al.* (2016). Os sinais em δ 13,9 (C-6'), 22,3 (C-5'), 31,3 (C-4'), 24,8 (C-3'), 34,8 (C-2'), não fazem parte da estrutura olean-18-eno, indicando a presença do grupo hexanoil ligado a estrutura do germanicol (Tian *et al.*, 2006) (Tabela 14). Os sinais observados no DEPT-135 indicam a presença de $9\text{x}(\text{CH}_3)$ $14\text{x}(\text{CH}_2)$ e $5\text{x}(\text{CH})$, compatível com a estrutura do hexanoato de germanicol.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 59), foi observado diferentes simpletos entre δ 1,07 a 0,73 correspondentes aos átomos de hidrogênios pertencentes aos grupos metilas (C-6'), (C-23), (C-24), (C-25), (C-26), (C-27), (C-28), (C-29) e (C-30). O multipletto em δ 2,28 corresponde aos átomos de hidrogênios do C-2' ligado a carbonila. O sinal do hidrogênio ligado a C-3 aparece como um tripleto em δ 4,48 indicando o acoplamento com dois átomos de hidrogênio ligado ao carbono C-2. O simpleto em δ 4,86 integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono C-19. As atribuições referentes aos sinais no espectro de hidrogênio, está de acordo com os resultados descritos por Rojas *et al.* (2004) e Alqasoumi *et al.* (2014).

Na figura 60 está disposto todos os compostos obtidos do extrato hexânico das raízes de *E. heterophylla*.

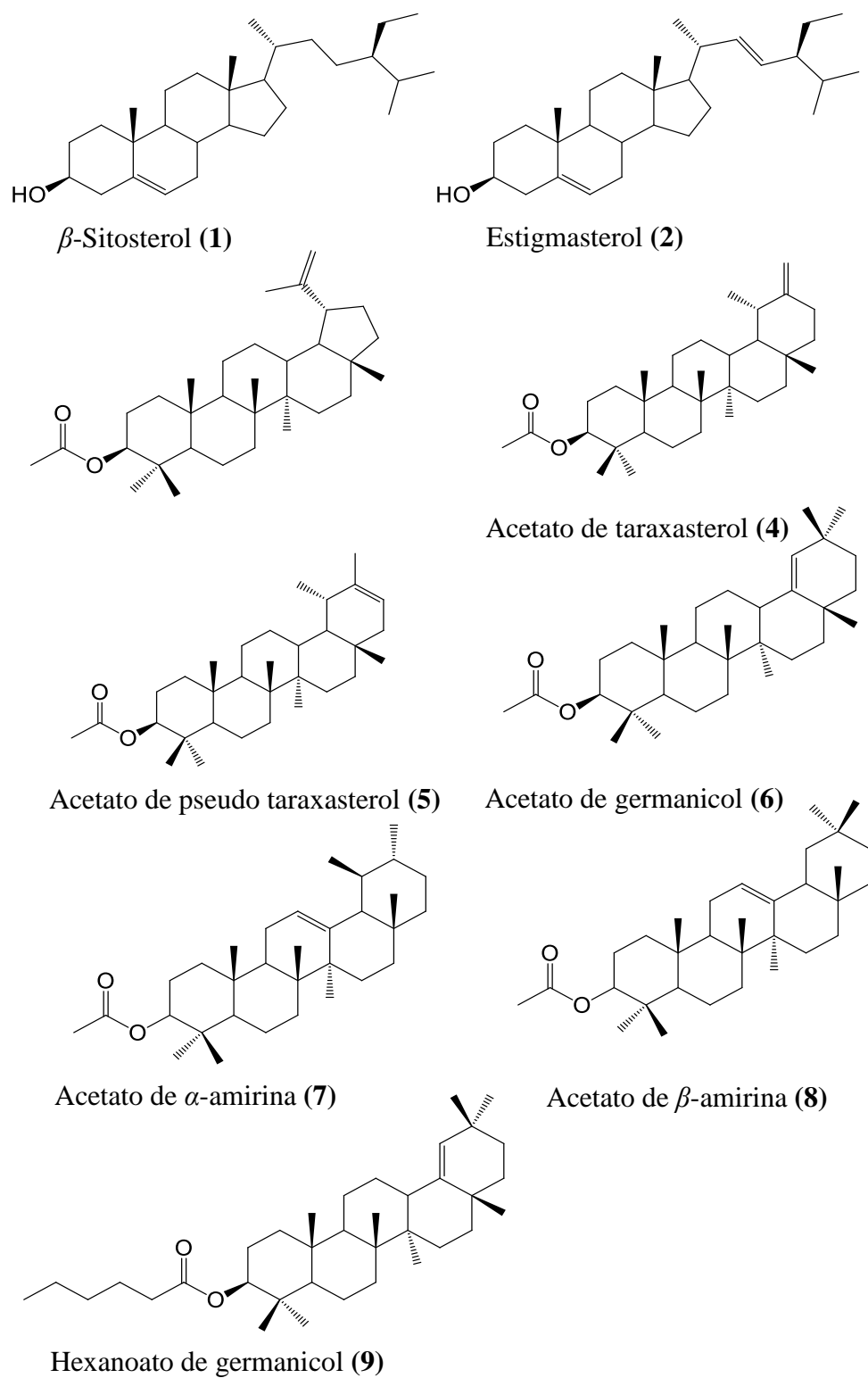


Figura 60: Compostos isolados do extrato em hexano das raízes de *E. heterophylla*.

Os triterpenos caracterizados (Figura 60), para o extrato hexânico de *E. heterophylla* podem estar vinculados as diferentes propriedades bioativas para esta espécie, visto que tais componentes apresentam diferentes tipos de atividades bioativas

relatadas (Kirimer *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2012; Iyer & Patil, 2012; Maurya *et al.*, 2012; Okoye *et al.*, 2014).

O β -sitosterol (**1**) possui propriedade anti-hiperlipidêmicos, antitumorais, anti-inflamatória (Loizou *et al.*, 2010; Iyer & Patil, 2012). O acetato de lupeol (**3**) componente majoritário no ERH, possui propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória e antitumorais (Chen *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2014). O acetato de taraxasterol (**4**), possui atividade relatada frente a prevenção de insuficiência hepática e antiespasmódico (Ijima *et al.*, 1995. Kirimer *et al.*, 1997). O acetato de α -amirina (**7**) possui atividade anti-inflamatória e antidiabética (Singh *et al.*, 2009; Okoye *et al.*, 2014). O acetato de β -amirina (**8**) possui propriedades anti-hiperlipidêmicos, antioxidante e citotóxica (Fabiya *et al.*, 2012; Maurya *et al.*, 2012).

Os pesquisadores Vamsidhar *et al.* (2000), avaliaram a marcha fitoquímica e o potencial antinociceptivo dos extratos em hexano, acetato de etila e clorofórmio para as raízes da planta *E. heterophylla*. Todos os extratos apresentaram avaliação positiva para triterpenos e um potencial antinociceptivo significativo. Os extratos metanólico e aquoso para as folhas da planta *E. heterophylla* foram avaliados frente a marcha fitoquímica e o potencial anti-inflamatórios por Falodun *et al.* (2006). Os testes de marcha fitoquímica indicaram a presença de terpenos e saponinas para os extratos aquosos da planta, tal qual apresentou potencial anti-inflamatório comparado ao medicamento utilizado como referência. Okeniyi *et al.* (2012) avaliaram a atividade antioxidante das frações em hexano, acetato de etila e butanol derivados da extração líquido-líquido proveniente do extrato das folhas e caules em metanol da planta *E. heterophylla*. A marcha fitoquímica para o extrato em metanol indicou a presença de triterpenos na composição dos extratos em metanol, todas as frações derivadas apresentaram potencial antioxidante considerável.

4.3 Isolamento e identificação de componentes do extrato da folha em hexano

A massa obtida para o extrato das folhas em hexano (EFH), foi de 8,75 g e a marcha fitoquímica realizada indicou a presença de triterpenos em sua composição o extrato foi analisado por CG-EM (Figura 61).

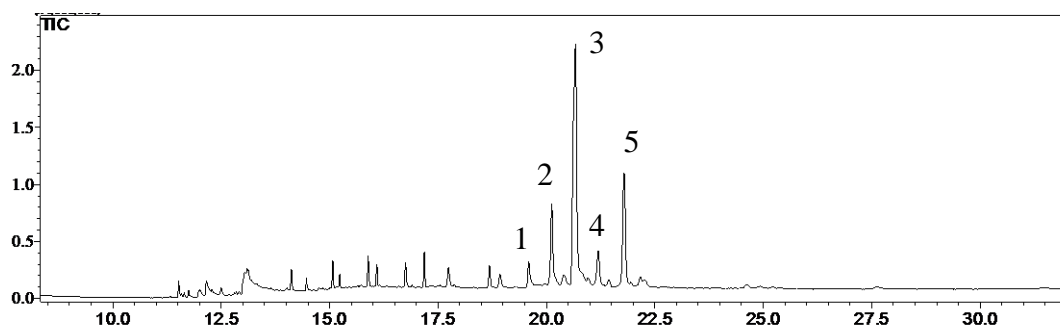


Figura 61: Cromatograma de íons totais do extrato em hexano das folhas de *E. heterophylla*, e a região com picos selecionados contendo fragmentações características para triterpenos.

Os picos selecionados no cromatograma de 1 a 5 (Figura 61), tiveram fragmentações em m/z 189, 203, 214 e 218 característicos para triterpenos (Ogunkoya, 1981; Ayatollahi et al., 2011), sendo assim o extrato EFH, foi conduzido aos procedimentos cromatográficos para isolamento dos metabólitos de interesse. Inicialmente, foi realizado pré-fractionamento por cromatografia a vácuo, e a fração F1 (1,3 g), foi selecionada e submetida ao procedimento de CCD preparativa (sílica gel), com fase móvel hexano-diclorometano 1:1 (v/v), obtendo a fração F1.1 (143,3 mg). A fração F1.1 foi reprecipitada obtendo-se a fração F1.1a (37 mg), contendo o acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**), caracterizados por CG-EM e RMN.

O cromatograma referente a fração F1.1a está disposto na figura 62.

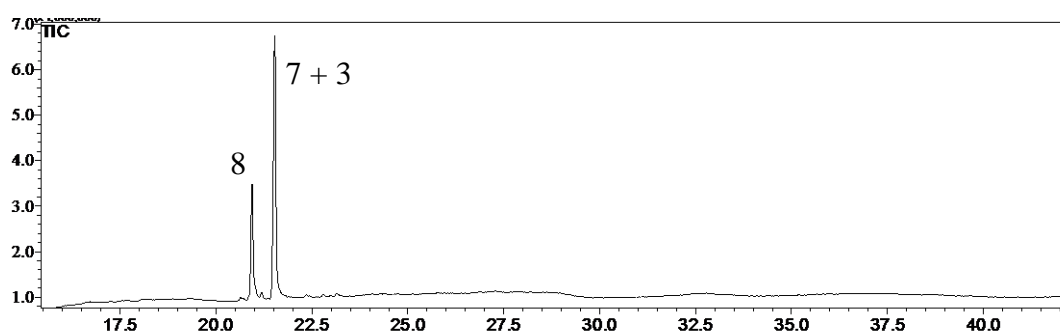


Figura 62: Cromatograma de íons totais da fração F1.1a obtida do extrato EFH, apresenta o acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

No cromatograma figura 62 observa-se o pico majoritário com área de 71,0% referente a sobreposição das áreas do acetato de lupeol (**3**) e acetato de α -amirina (**7**). O outro pico com área de 29,0%, foi identificado como acetato de β -amirina (**8**). Os

espectros de massas referente aos compostos, corroboram com os caracterizados no item 4.2 para os compostos em questão.

Os os dados de RMN referentes a mistura obtida, seguem dispostos nas figuras 63, 64 e 65.

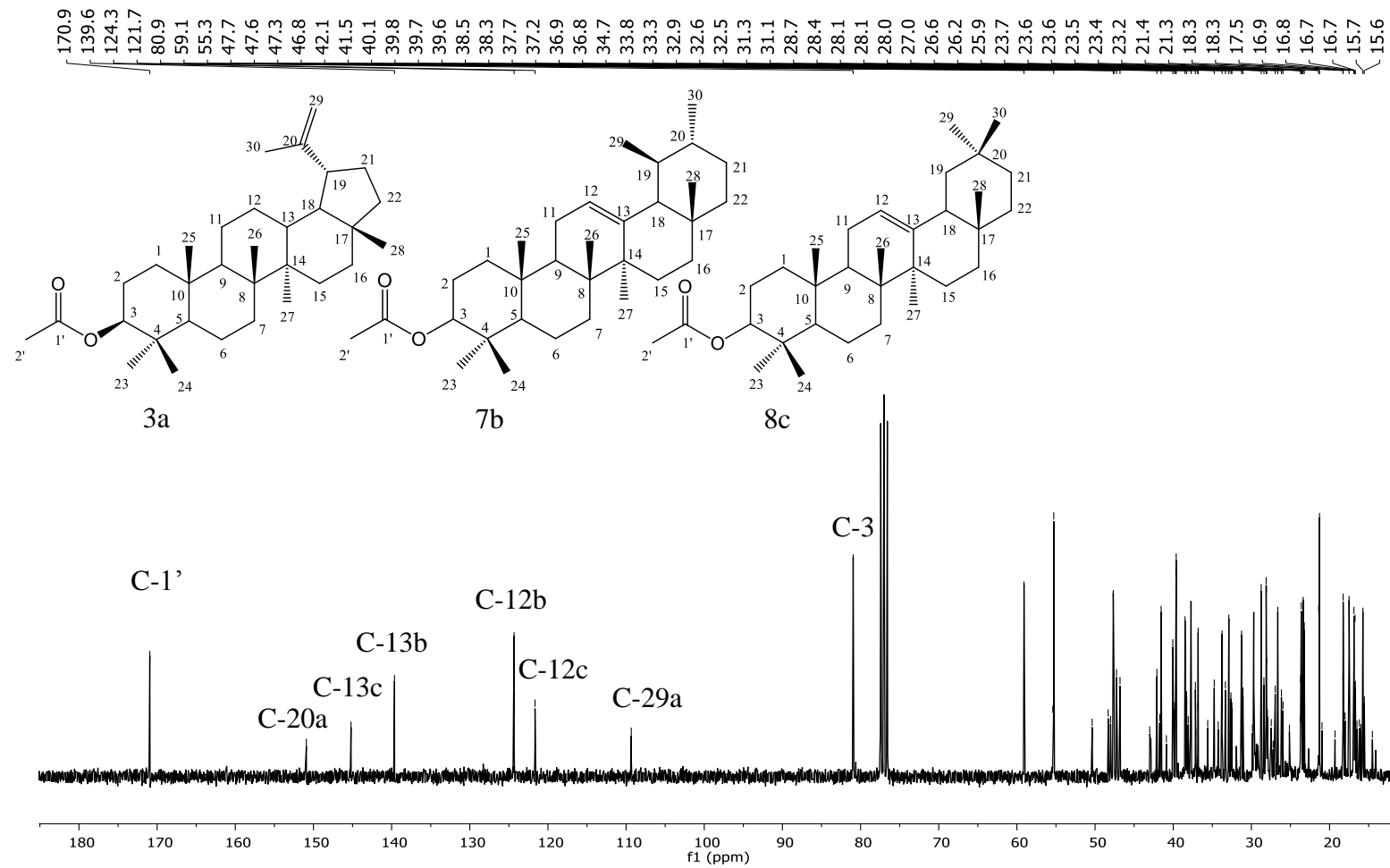


Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,0$ ppm) do acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

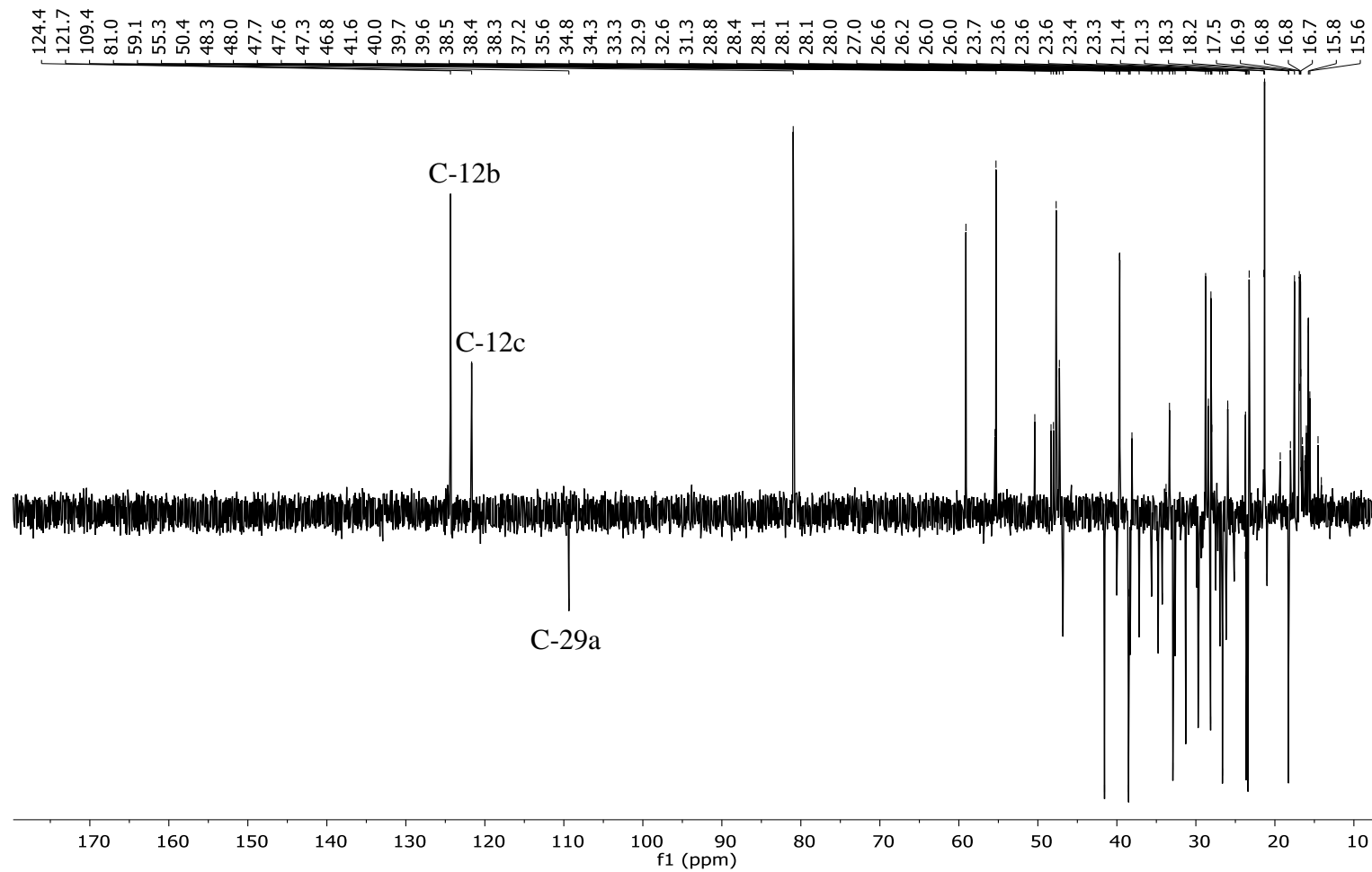


Figura 64: Espectro DEPT-135 do acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

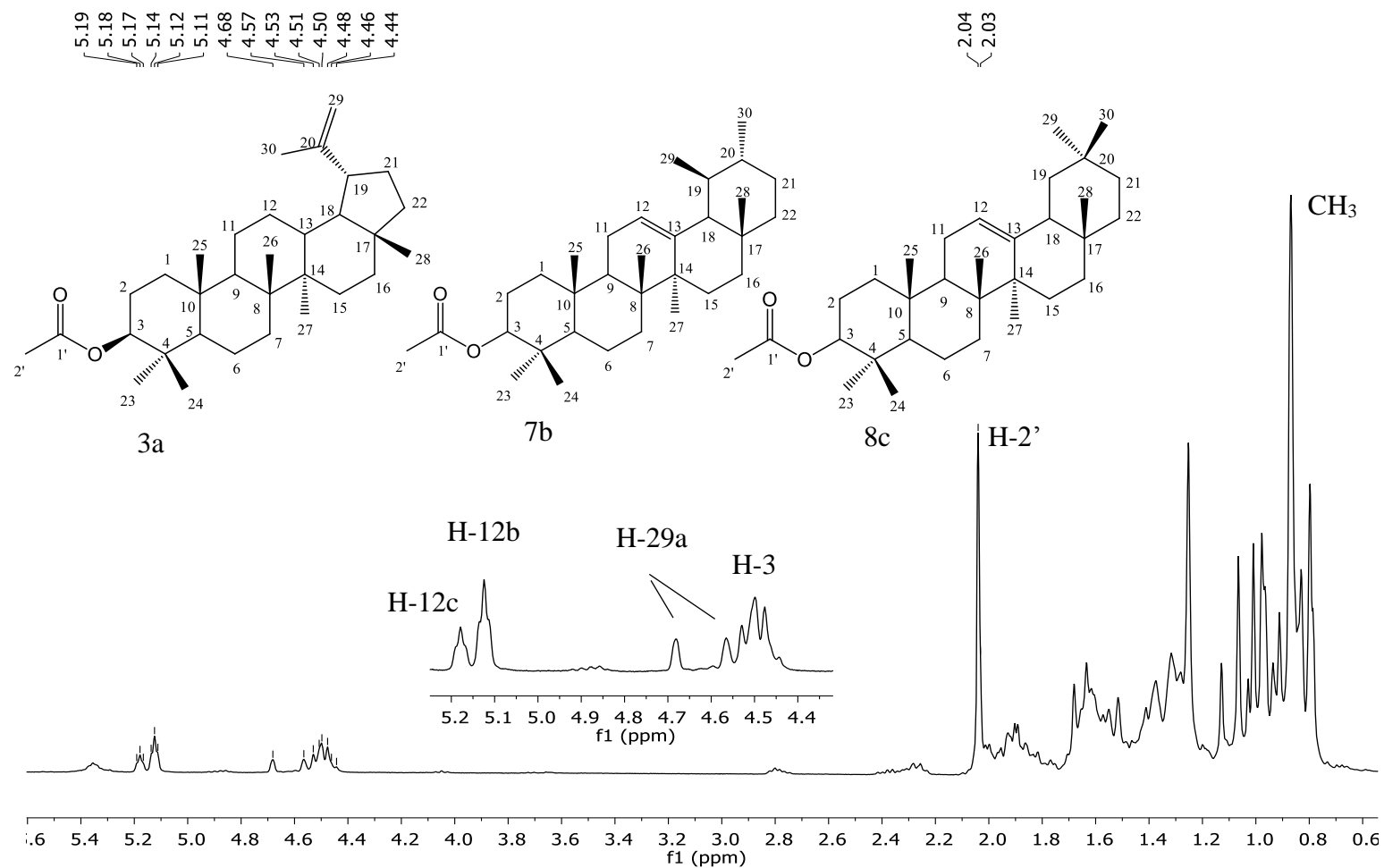


Figura 65: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$ ppm) acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

Nos espectros de RMN de ^{13}C , de ^1H e DEPT-135 (Figura 63, 64 e 65) foi observado os sinais referentes ao acetato de lupeol (**3**), acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**), identificados no presente trabalho, para amostras obtidas do extrato da raiz em hexano descrito no item 4.2. Através dos espectros de RMN, é possível destacar o acetato de α -amirina (**7**), como o componente majoritário para a fração F1.1a visto que os sinais referentes a este componente obtiveram maior intensidade comparado aos sinais atribuídos para os acetatos de lupeol (**3**) e β -amirina (**8**).

4.4 Isolamento e identificação de componentes do extrato da folha em acetato de etila

A massa obtida para o extrato das folhas em acetato de etila (EFAC) foi de 15,47 g e a marcha fitoquímica realizada indicou a presença de triterpenos em sua composição, após ser derivatizado e analisado por CG-EM (Figura 66).

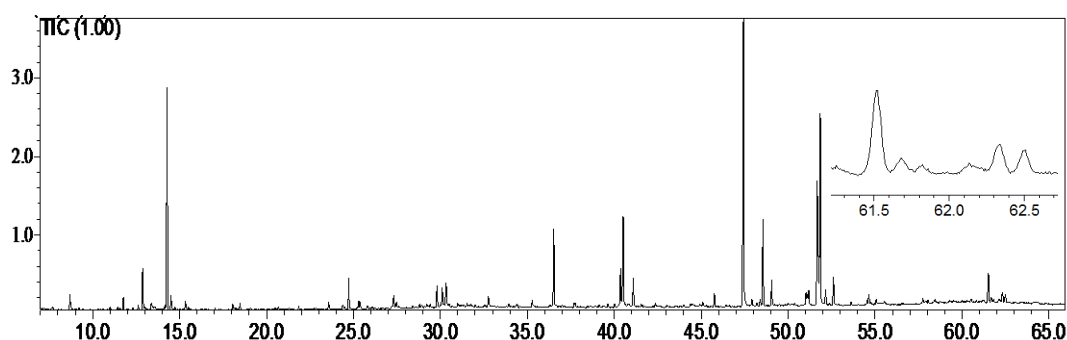


Figura 66: Cromatograma de íons totais do extrato em acetato de etila das folhas de *E. heterophylla*, e a região com componente apresentando espectro de massas com fragmentações comuns para triterpenos.

O cromatograma para o extrato EFAC disposto na figura 60 foi analisado no item 4.1, avaliando sua composição através do índice de retenção. Na região limite estabelecida pelo tempo de retenção dos padrões utilizados para calcular o índice de retenção, não foi possível identificar triterpenos. No cromatograma (Figura 60), observa-se uma região específica entre 60 a 65 minutos contendo picos com espectro de massas contendo fragmentações em m/z 189, 203, 214 e 218 características de triterpenos (Ogunkoya, 1981; Ayatollahi et al., 2011). Desta maneira o extrato foi submetido aos procedimentos cromatográficos, inicialmente realizando um pré-fracionamento por cromatografia a vácuo. Após o pré-fracionamento a fração (1), 8,4 g foi selecionada e submetida a cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e fase

móvel hexano-diclorometano 3:1 e 1:1 (v/v), obtendo a fração F1.4 com massa de 0,71 g. A fração F1.4 foi analisada por CG-EM, e submetida a reprecipitação obtendo-se a massa de 0,36 g. A amostra obtida foi submetida a cromatografia em coluna, com fase móvel hexano/diclorometano 3:1 (v/v), obtendo-se duas frações contendo o acetato de lupeol (**3**) (7,1 mg) e uma mistura contendo o acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**) (15,9 mg), caracterizados por CG-EM e RMN.

A figura 67 apresenta o cromatograma referente a amostra contendo o composto acetato de lupeol (**3**).

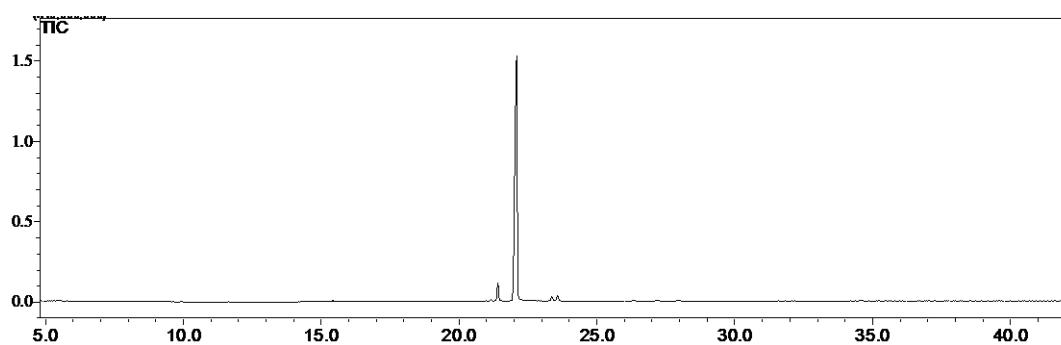


Figura 67: Cromatograma de íons totais do acetato de lupeol (**3**), obtido do extrato EFAC.

Os dados referentes aos espectros de massas e RMN, obtidos para esta fração, estão de acordo com os dados caracterizados para o composto acetato de lupeol (**3**), pois o mesmo, foi caracterizado no presente trabalho para o extrato ERH no item 4.2.

Na figura 68 pode-se observar o cromatograma referente a amostra contendo a mistura dos compostos acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**).

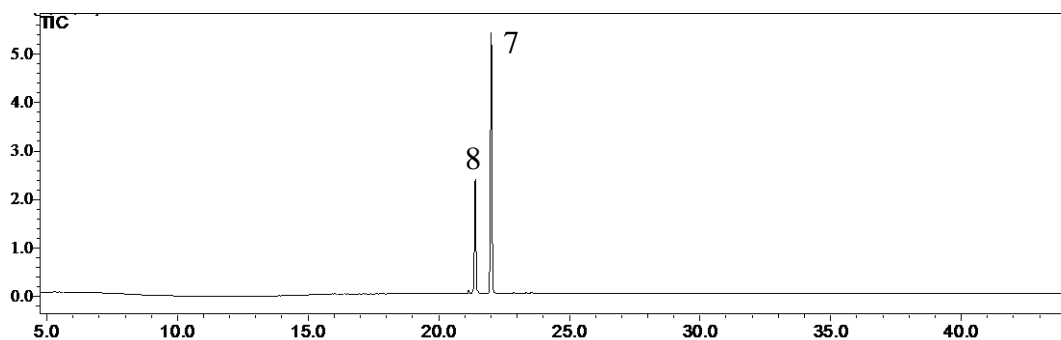


Figura 68: Cromatograma de íons totais do acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**), obtidos do extrato EFAC.

No cromatograma dispostos na figura 68, observa-se o composto majoritário acetato de α -amirina (**7**) (81,8%), e 18,2% do composto acetato de β -amirina (**8**). Os dados referentes aos espectros de massas e RMN, obtidos para esta fração, estão de acordo aos dados caracterizados para os compostos acetato de α -amirina (**7**) e acetato de β -amirina (**8**), pois os mesmos, foram caracterizados no presente trabalho para o extrato ERH no item 4.2.

4.6 Atividade alelopática dos extratos da planta *E. heterophylla*

Após a caracterização dos extratos das folhas e raízes de *E. heterophylla*, foram submetidos a ensaio do potencial fitotóxico sobre a germinação das sementes de sorgo, alface e pepino, avaliando-se a germinação e o crescimento do caule e raiz. Os dados obtidos foram comparados ao controle utilizado (Tween 80 0,5%), pelo teste de Tukey (5%). Os resultados obtidos para cada espécie testada estão apresentados nas tabelas e figuras a seguir.

A atividade dos extratos derivados de *E. heterophylla* sobre a germinação das sementes do sorgo (*Sorghum bicolor*), seguem dispostos na Tabela 15.

Tabela 15: Efeitos dos extratos de *E. heterophylla* sobre a germinação das sementes de sorgo

Tratamento		% de germinação	% de inibição*	Caule	% de inibição*	Raiz	% de inibição*
Controle		75,0 ± 8,7 a		4,5 ± 0,1 a		4,2 ± 1,2 a	
EFH	0,1 mg mL ⁻¹	81,7 ± 5,8 a	-8,9	2,5 ± 0,6 b	44,4	2,7 ± 0,3 a	35,7
	0,5 mg mL ⁻¹	70,0 ± 18,0 a	6,7	2,0 ± 0,3 b	55,5	2,6 ± 0,6 a	38,1
	1,0 mg mL ⁻¹	63,3 ± 5,8 a	15,6	2,6 ± 0,5 b	42,2	2,7 ± 0,9 a	35,7
	2,0 mg mL ⁻¹	63,3 ± 24,7 a	15,6	2,4 ± 0,5 b	46,7	2,9 ± 0,6 a	30,9
EFME	0,1 mg mL ⁻¹	78,3 ± 12,6 a	-4,4	3,2 ± 0,9 a	28,9	3,6 ± 1,3 a	14,3
	0,5 mg mL ⁻¹	80,0 ± 21,8 a	-6,7	2,8 ± 1,1 a	37,8	3,2 ± 1,1 a	23,8
	1,0 mg mL ⁻¹	65,0 ± 5,0 a	13,3	2,7 ± 0,3 a	40,0	3,5 ± 0,1 a	16,7
	2,0 mg mL ⁻¹	73,3 ± 12,6 a	2,3	2,8 ± 0,2 a	37,8	2,7 ± 0,1 a	35,7
EFMEAc	0,1 mg mL ⁻¹	55,0 ± 8,7 ab	26,7	1,8 ± 0,1 b	60,0	2,8 ± 0,4 ab	33,3
	0,5 mg mL ⁻¹	46,7 ± 20,2 ab	37,7	1,5 ± 0,6 b	66,7	1,5 ± 0,8 b	64,3
	1,0 mg mL ⁻¹	25,0 ± 17,3 bc	66,7	1,5 ± 0,2 b	66,7	1,6 ± 1,0 b	61,9
	2,0 mg mL ⁻¹	6,7 ± 5,8 c	91,1	1,0 ± 1,3 b	77,8	0,5 ± 0,5 b	88,1
EFAC	0,1 mg mL ⁻¹	81,7 ± 12,6 a	-8,9	3,2 ± 0,3 b	28,9	3,2 ± 0,4 ab	23,8
	0,5 mg mL ⁻¹	58,3 ± 7,6 ab	22,3	2,8 ± 0,6 bc	37,8	3,6 ± 1,1 ab	14,3
	1,0 mg mL ⁻¹	60,0 ± 5,0 ab	20,0	2,3 ± 0,3 bc	48,9	2,4 ± 0,5 ab	42,9
	2,0 mg mL ⁻¹	36,7 ± 10,4 b	51,1	2,2 ± 0,2 c	51,1	1,6 ± 0,3 b	61,9

Continuação.

Tabela 15: Efeitos dos extratos de *E. heterophylla* sobre a germinação das sementes de sorgo

Tratamento		% de germinação	% de inibição*	Caule	% de inibição*	Raiz	% de inibição*
Controle		75,0 ± 8,7 a		4,5 ± 0,1 a		4,2 ± 1,2 a	
ERH	0,1 mg mL ⁻¹	76,7 ± 18,9 a	-2,3	2,7 ± 0,4 b	40,0	2,9 ± 0,5 a	30,9
	0,5 mg mL ⁻¹	76,7 ± 16,1 a	-2,3	2,6 ± 0,4 b	42,2	2,7 ± 0,6 a	35,7
	1,0 mg mL ⁻¹	70,0 ± 21,8 a	6,7	2,4 ± 0,9 b	46,7	2,5 ± 0,6 a	40,5
	2,0 mg mL ⁻¹	71,7 ± 7,6 a	4,4	2,1 ± 0,9 b	53,3	2,3 ± 1,1 a	45,2
ERME	0,1 mg mL ⁻¹	63,3 ± 5,8 a	15,6	3,0 ± 0,3 b	33,3	2,8 ± 0,6 a	33,3
	0,5 mg mL ⁻¹	73,3 ± 5,8 a	2,3	2,3 ± 0,2 b	48,9	2,5 ± 0,1 a	40,5
	1,0 mg mL ⁻¹	63,3 ± 7,6 a	15,6	2,3 ± 0,5 b	48,9	2,2 ± 0,7 a	47,6
	2,0 mg mL ⁻¹	60,0 ± 17,3 a	20,0	2,1 ± 0,6 b	53,3	2,3 ± 1,4 a	45,2
ERMEAc	0,1 mg mL ⁻¹	71,7 ± 2,9 a	4,4	3,0 ± 0,4 b	33,3	3,6 ± 0,4 ab	14,3
	0,5 mg mL ⁻¹	53,3 ± 7,6 ab	28,9	2,2 ± 0,5 bc	51,1	2,2 ± 0,3 bc	47,6
	1,0 mg mL ⁻¹	60,0 ± 5,0 ab	20,0	2,0 ± 0,3 bc	55,5	2,3 ± 0,4 bc	45,2
	2,0 mg mL ⁻¹	33,3 ± 18,9 b	55,6	2,0 ± 0,3 c	55,5	1,6 ± 0,2 c	61,9

As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível do teste de Tukey a 5% de probabilidade. * em relação ao controle [solução aquosa de Tween 80 a 0,5% (m/v)]. Extrato das folhas em hexano (EFH), em metanol (EFME), em acetato de etila (EFAC), extrato das raízes em hexano (ERH), em metanol (ERME), fração obtida após acidificação de EFME (EFMEAc) e ERME (ERMEAc).

A porcentagem de germinação obtidas nos tratamentos utilizando os extratos EFH, EFME, ERH e ERME não diferiram estatisticamente do controle indicando que não houve atividade sobre as sementes de sorgo. O tratamento utilizando o extrato EFAC diferiu estatisticamente do controle indicando inibição a partir da concentração de 0,5 mg mL⁻¹ (22,3%), destacando a inibição de 51,1% da germinação em 2,0 mg mL⁻¹ (Tabela 15). O extrato EFMEAc inibiu o desenvolvimento das sementes ainda na concentração de 0,1 mg mL⁻¹ (26,7%). Na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ o extrato inibiu em 91,1% a germinação da semente. A porcentagem de germinação obtida no tratamento utilizando o extrato ERMEAc diferiu estatisticamente em relação ao controle, indicando que este extrato apresentou atividade sobre a germinação do sorgo, destacando-se a concentração de 2,0 mg mL⁻¹ que inibiu 55,6% da germinação das sementes (Tabela 15).

O efeito dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento médio do caule das sementes de sorgo estão dispostos na figura 69.

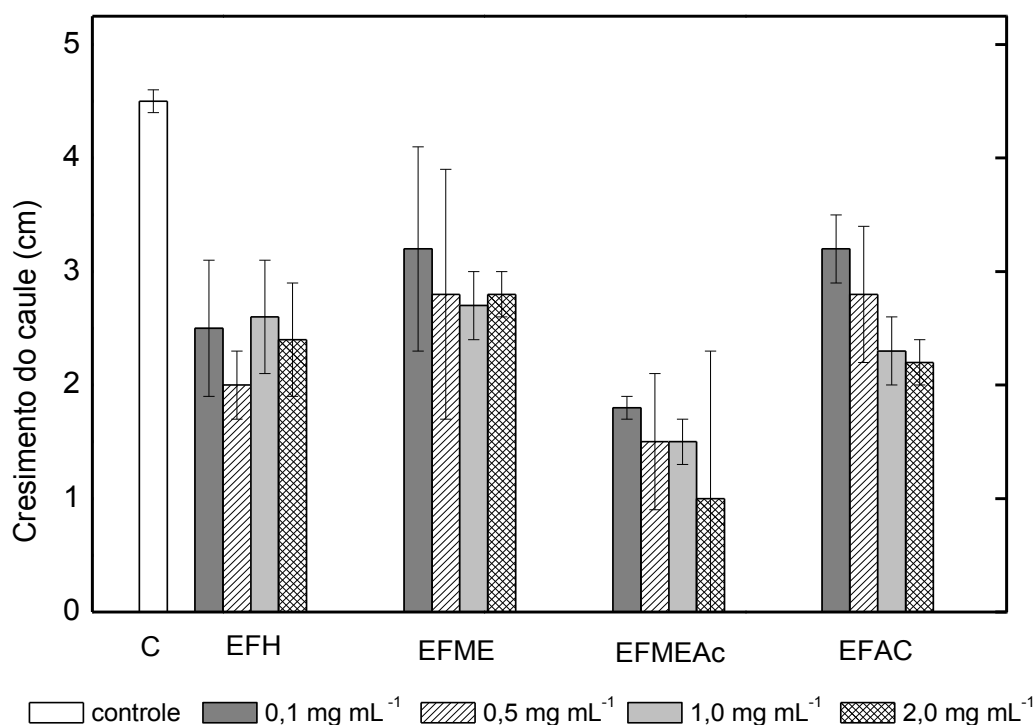


Figura 69: Atividade alelopática dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule de sorgo.

O tratamento com o extrato EFME obteve similaridade com o crescimento do caule em relação ao controle, indicando que não houve atividade para todas as

concentrações avaliadas. Os tratamentos com os extratos EFH, EFMEAc e EFAC diferiram estatisticamente do controle para todas as concentrações avaliadas (Tabela 15). O tratamento com o extrato EFH não diferiu no potencial de inibição entre as concentrações avaliadas indicando que não houve aumento na inibição do crescimento do caule em relação ao aumento da concentração (Figura 69). O tratamento com o extrato EFAC diferiu entre as concentrações avaliadas indicando aumento na inibição em relação ao aumento da concentração, destacando-se a inibição 51,1% para a concentração de 2,0 mg mL⁻¹. O tratamento com o extrato EFMEAc apresentou maior inibição comparado aos outros extratos, destacando-se a redução de 77,8% do crescimento do caule na concentração de 2,0 mg mL⁻¹.

As atividades dos extratos de *E. heterophylla* sobre o crescimento da raiz do sorgo seguem dispostos na figura 70.

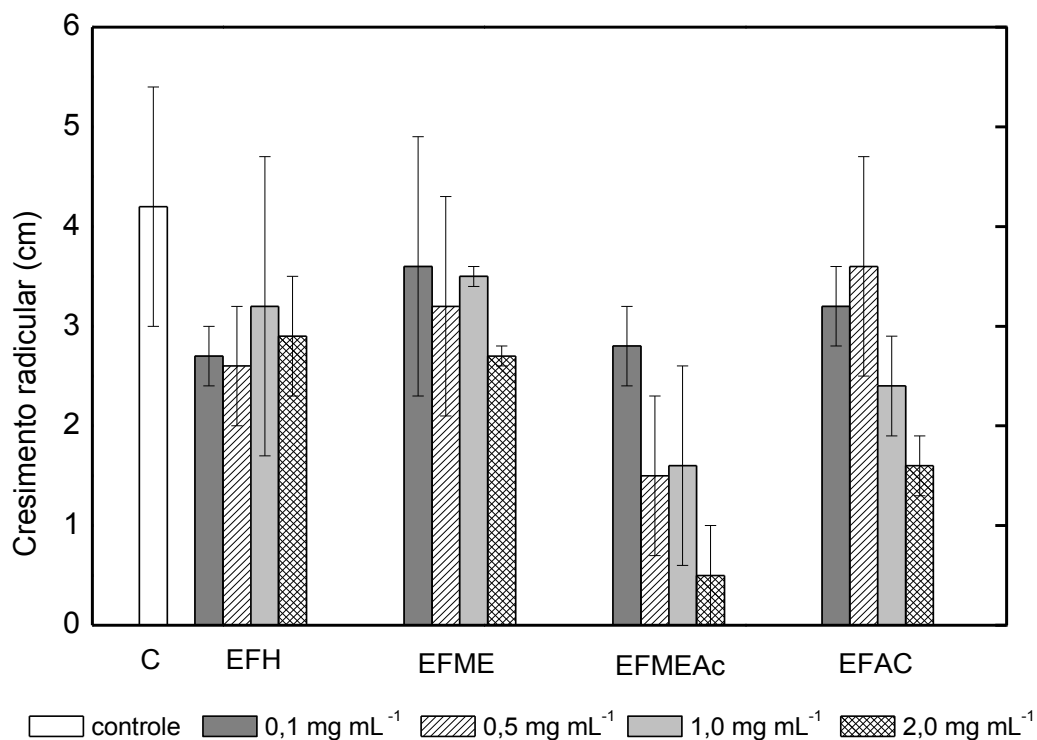


Figura 70: Atividade alelopática dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento de raízes de sementes de sorgo.

Os tratamentos utilizando os extratos EFH e EFME obtiveram similaridade ao crescimento do controle indicando que não houve atividade destes extratos para o parâmetro avaliado (Figura 70). Os tratamentos com os extratos EFMEAc e EFAC diferiram estatisticamente do controle para todas as concentrações avaliadas, indicando o

potencial de inibição do crescimento da raiz principalmente na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ onde inibiram em 88,1% e 61,9%, respectivamente (Tabela 15).

O potencial de inibição dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento do caule de sorgo está disposto na figura 71.

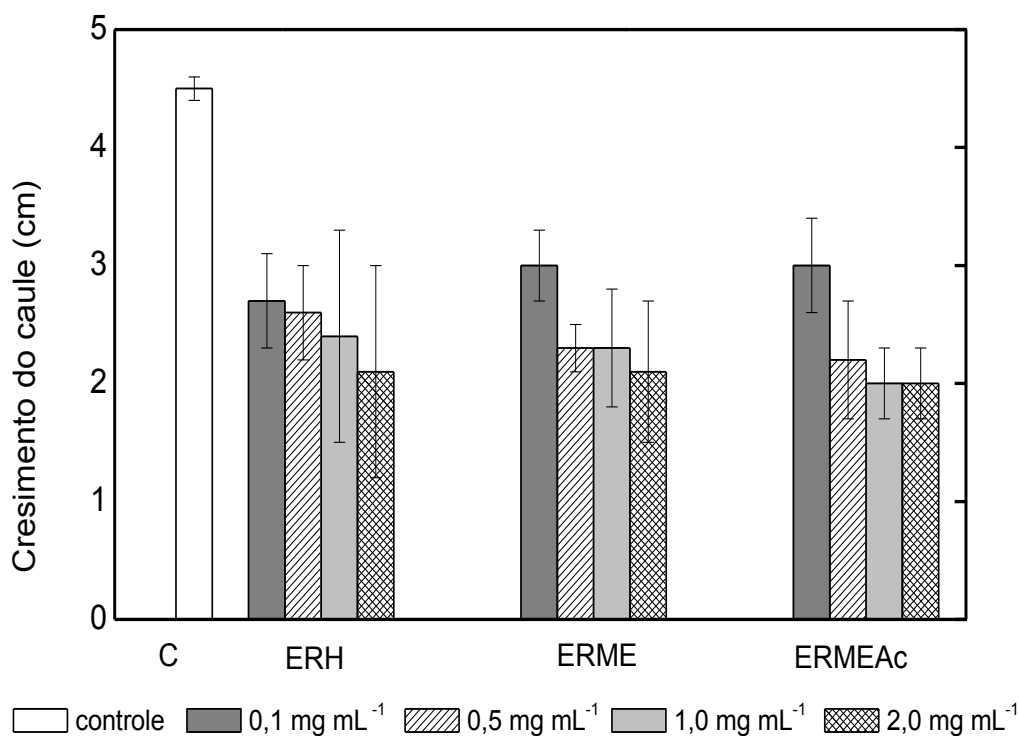


Figura 71: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre crescimento do caule de sementes de sorgo.

Os tratamentos avaliados diferiram estatisticamente do controle em todas as concentrações testadas, porém os tratamentos utilizando os extratos ERH e ERME não diferiram entre as concentrações testadas, indicando que o aumento da concentração não potencializou a inibição (Tabela 15). O tratamento com o extrato ERMEAc inibiu 51,1% do crescimento do caule ainda na concentração de 0,5 mg mL⁻¹, porém esta inibição não diferiu em relação as outras concentrações, indicando que o aumento da concentração a partir de 0,5 mg mL⁻¹ não implicou no aumento significativo da atividade sobre o desenvolvimento do caule (Figura 71).

Os resultados referentes a atividade dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento da raiz de sorgo estão dispostos na figura 72.

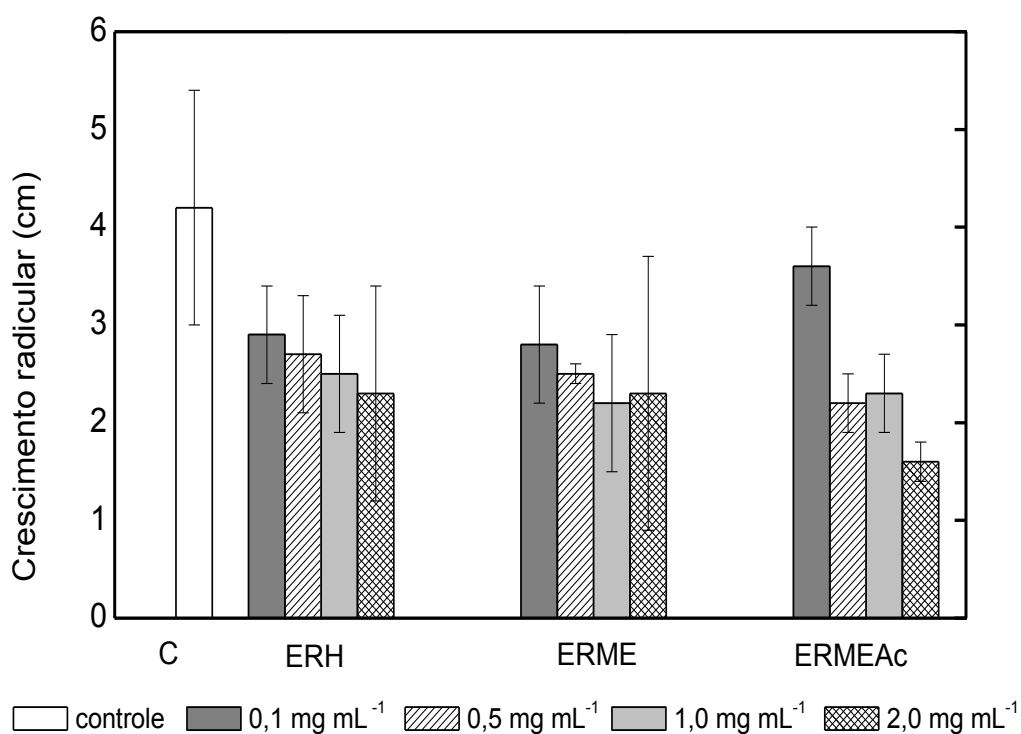


Figura 72: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento das raízes de sementes de sorgo.

Os tratamentos utilizando os extratos ERH e ERME obtiveram similaridade em relação ao controle indicando que não houve atividade sobre o crescimento da raiz das sementes de sorgo (Tabela 15). O extrato ERMEAc diferiu estatisticamente do controle a partir da concentração de 0,5 mg mL⁻¹, indicando potencial na inibição da raiz de sorgo, principalmente na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ com a inibição de 61,9% do desenvolvimento (Figura 72).

A atividade dos extratos derivados de *E. heterophylla* sobre a germinação das sementes do pepino (*Cucumis sativus*), seguem dispostos na Tabela 16.

Tabela 16: Efeitos dos extratos de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento das sementes de pepino

Tratamento		% de germinação	% de inibição*	Caule	% de inibição*	Raiz	% de inibição*
Controle		93,3 ± 2,9 a		1,8 ± 0,8 a		3,9 ± 1,0 a	
EFH	0,1 mg mL ⁻¹	93,3 ± 5,8 a	0,0	2,0 ± 0,2 a	-11,1	4,3 ± 0,6 a	-10,3
	0,5 mg mL ⁻¹	95,0 ± 5,0 a	-1,8	1,9 ± 0,3 a	-5,6	4,3 ± 0,9 a	-10,3
	1,0 mg mL ⁻¹	88,3 ± 10,4 a	5,4	1,7 ± 0,3 a	5,6	4,1 ± 1,1 a	-5,1
	2,0 mg mL ⁻¹	96,7 ± 2,9 a	-3,6	2,2 ± 0,2 a	-22,2	4,8 ± 0,7 a	-23,1
EFME	0,1 mg mL ⁻¹	93,3 ± 2,9 a	0,0	1,7 ± 0,3 a	5,6	3,7 ± 0,5 a	5,1
	0,5 mg mL ⁻¹	98,3 ± 2,9 a	-5,4	1,5 ± 0,2 a	16,7	3,0 ± 0,1 a	23,1
	1,0 mg mL ⁻¹	95,0 ± 0,0 a	-1,8	1,6 ± 0,2 a	11,1	3,8 ± 0,7 a	2,6
	2,0 mg mL ⁻¹	96,7 ± 5,8 a	-3,6	1,4 ± 0,1 a	22,2	3,8 ± 0,4 a	2,6
EFMEAc	0,1 mg mL ⁻¹	95,0 ± 5,0 a	1,8	1,9 ± a 0,3	-5,6	4,0 ± 0,6 a	-2,6
	0,5 mg mL ⁻¹	96,7 ± 2,9 a	-3,6	1,6 ± 0,3 ab	11,1	2,9 ± 0,3 a	25,6
	1,0 mg mL ⁻¹	80,0 ± 5,0 a	14,2	0,8 ± 0,1 ab	55,5	2,6 ± 0,1 ab	33,3
	2,0 mg mL ⁻¹	26,7 ± 11,5 b	71,4	0,7 ± 0,3 b	61,1	1,2 ± 0,6 b	69,3
EFAC	0,1 mg mL ⁻¹	100,0 ± 0,0 a	-7,2	1,1 ± 0,3 a	38,9	3,2 ± 0,80 a	17,9
	0,5 mg mL ⁻¹	96,7 ± 2,9 a	-3,6	1,2 ± 0,4 a	33,3	3,7 ± 0,48 a	5,1
	1,0 mg mL ⁻¹	93,3 ± 2,9 a	0,0	0,9 ± 0,1 a	50,0	3,4 ± 0,26 a	12,8
	2,0 mg mL ⁻¹	83,3 ± 20,2 a	10,7	0,7 ± 0,1 a	61,1	2,7 ± 0,08 a	30,8

Continuação.

Tabela 16: Efeitos dos extratos de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento das sementes de pepino

Tratamento		% de germinação	% de inibição*	Caule	% de inibição*	Raiz	% de inibição*
Controle		93,3 ± 2,9 a		1,8 ± 0,8 a		3,9 ± 1,0 a	
ERH	0,1 mg mL ⁻¹	93,3 ± 2,9 a	0,0	1,4 ± 0,3 a	22,2	3,4 ± 0,5 a	12,8
	0,5 mg mL ⁻¹	95,0 ± 8,7 a	-1,8	1,8 ± 0,1 a	0,0	3,9 ± 0,3 a	0,0
	1,0 mg mL ⁻¹	91,7 ± 10,4 a	1,7	1,6 ± 0,5 a	11,1	3,5 ± 0,7 a	10,3
	2,0 mg mL ⁻¹	98,3 ± 2,9 a	-5,4	1,5 ± 0,2 a	16,7	3,2 ± 0,3 a	17,9
ERME	0,1 mg mL ⁻¹	96,7 ± 5,8 a	-3,6	1,1 ± 0,2 a	38,9	2,6 ± 0,4 a	33,3
	0,5 mg mL ⁻¹	95,0 ± 8,7 a	-1,8	1,9 ± 0,3 a	-5,6	3,6 ± 0,7 a	7,7
	1,0 mg mL ⁻¹	88,3 ± 10,4 a	5,4	2,0 ± 0,2 a	-11,1	3,1 ± 0,0 a	20,5
	2,0 mg mL ⁻¹	93,3 ± 11,5 a	0,0	1,9 ± 0,4 a	-5,6	3,0 ± 0,3 a	23,1
ERMEAc	0,1 mg mL ⁻¹	93,3 ± 5,8 a	0,0	1,3 ± 0,2 ab	27,8	3,7 ± 0,3 a	5,1
	0,5 mg mL ⁻¹	95,0 ± 5,0 a	-1,8	1,5 ± 0,2 ab	16,7	3,8 ± 0,1 a	2,6
	1,0 mg mL ⁻¹	91,7 ± 2,9 a	1,7	1,3 ± 0,2 ab	27,8	3,3 ± 0,1 a	15,4
	2,0 mg mL ⁻¹	75,0 ± 10,0 b	19,6	0,6 ± 0,1 b	66,7	1,6 ± 0,4 b	59,0

As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível do teste de Tukey a 5% de probabilidade. * em relação ao controle [solução aquosa de Tween 80 a 0,5% (m/v)]. Extrato das folhas em hexano (EFH), em metanol (EFME), em acetato de etila (EFAC), extrato das raízes em hexano (ERH), em metanol (EFME), fração obtida após acidificação de EFME (EFMEAc) e ERME (ERMEAc).

Os ensaios fitotóxicos utilizando os extratos EFH, EFME, EFAC, ERH e ERME não diferiram estatisticamente em relação a porcentagem de germinação comparado ao controle, indicando que não houve atividade sobre este parâmetro para a germinação das sementes de pepino (Tabela 16). O extrato EFMEAc diferiu apenas na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ indicando uma inibição de 71,4% na germinação das sementes. O ensaio fitotóxico com o extrato ERMEAc diferiu do controle apenas na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ indicando inibição de 19,6%.

Os resultados referentes a atividade dos extratos das folhas de *E. heterophylla*, sobre o crescimento do caule das sementes de pepino, seguem dispostos figura 73.

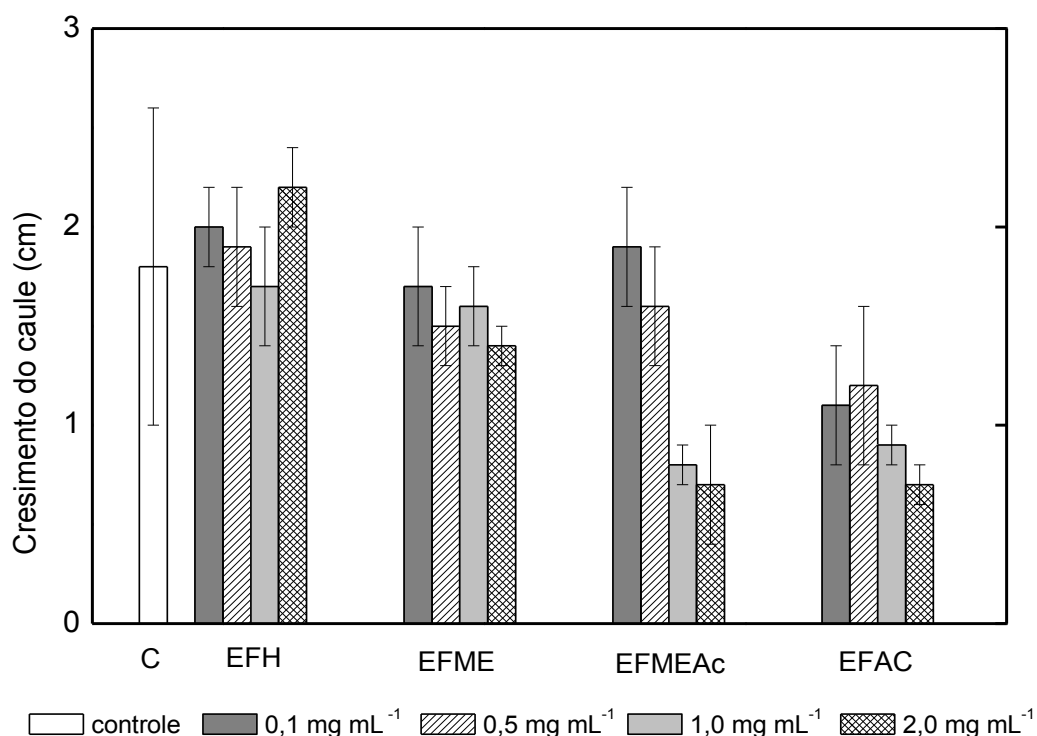


Figura 73: Atividade alelopática dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule de pepino.

O crescimento do caule no ensaio fitotóxico com o extrato EFMEAc diferiu estatisticamente do controle a partir da concentração de 0,5 mg mL⁻¹ indicando inibição de 11,1%, o aumento da inibição foi observado de acordo com o aumento da concentração visto que em 2,0 mg mL⁻¹ obteve-se inibição de 61,1% (Tabela 16). Os tratamentos com os extratos EFH, EFME e EFAC não diferiram estatisticamente do controle indicando que não houve atividade sobre o crescimento do caule das sementes de pepino (Figura 73).

Os efeitos dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre a inibição do crescimento da raiz de pepino seguem dispostos na figura 74.

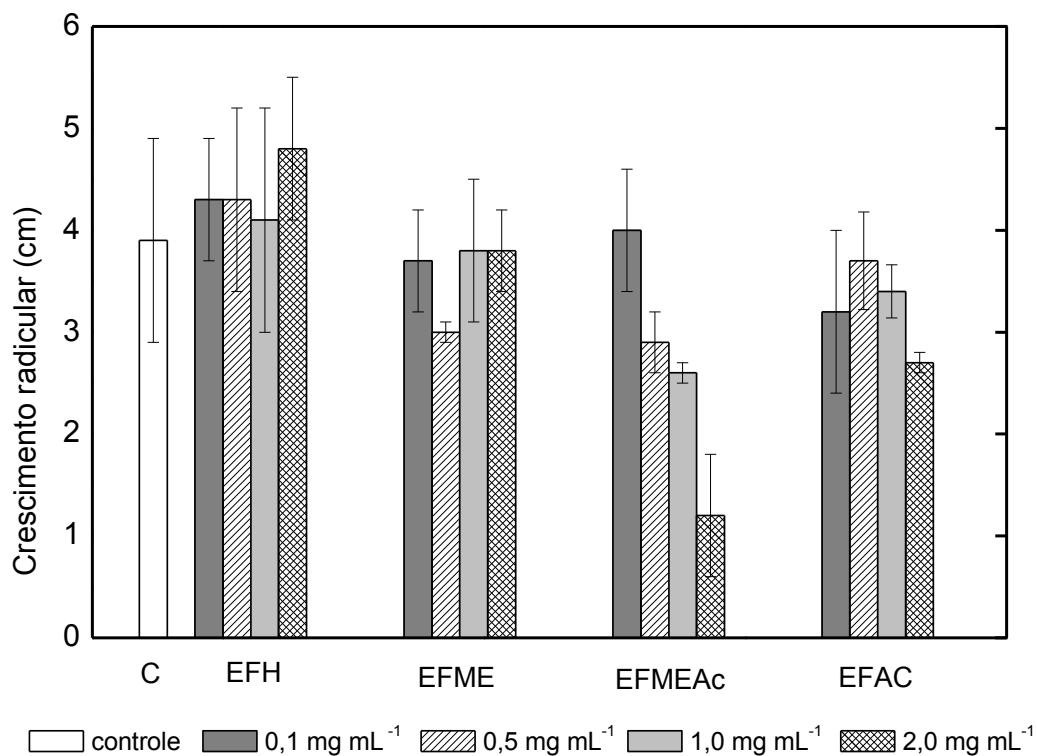


Figura 74: Atividade alelopática dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento da raiz de pepino.

O ensaio utilizando o extrato EFMEAc diferiu estatisticamente do controle no crescimento das raízes de pepino na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ indicando 69,3% de inibição (Tabela 16). Os tratamentos com os extratos EFH, EFME e EFAC não diferiram estatisticamente do controle indicando que não houve atividade para estes extratos sobre o crescimento da raiz de pepino (Figura 74).

Os resultados referentes as atividades dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule de pepino seguem dispostos na figura 75.

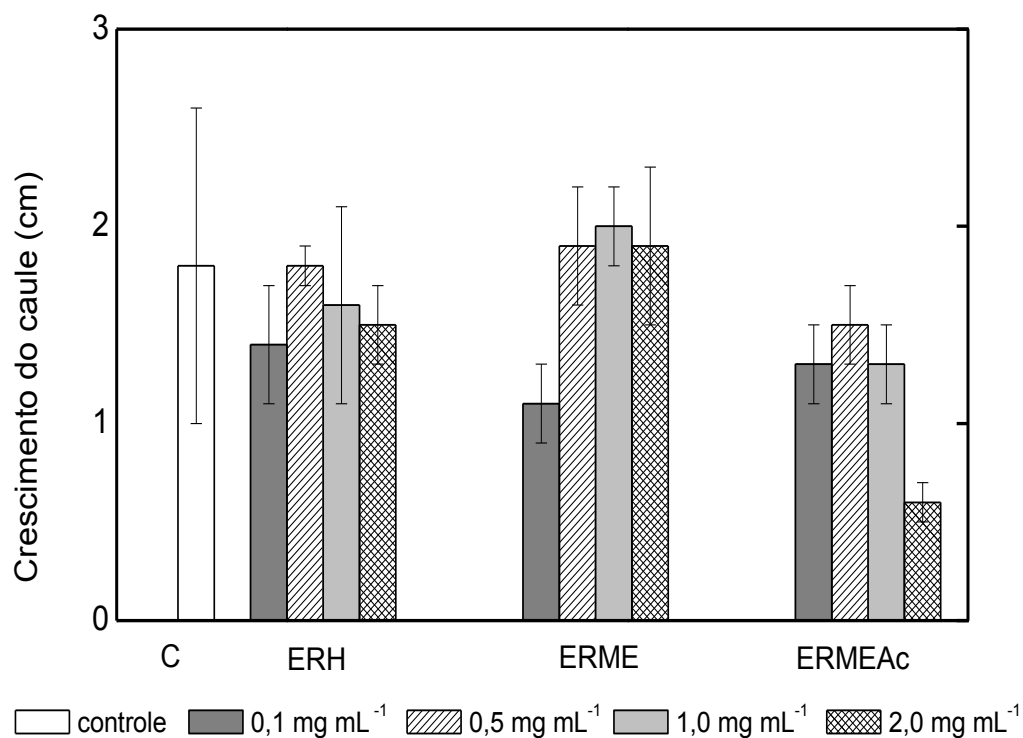


Figura 75: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule de pepino.

O ensaio fitotóxico com extrato ERMEAc diferiu estatisticamente do controle, na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ indicando 66,7% de inibição do crescimento do caule de pepino (Tabela 16). Os tratamentos com os extratos ERH, ERME não diferiram estatisticamente do controle indicando que não houve atividade destes extratos sobre o crescimento do caule de pepino (Figura 75).

Os resultados da inibição do crescimento das raízes de pepino avaliadas frente aos extratos das raízes de *E. heterophylla* estão dispostos na figura 76.

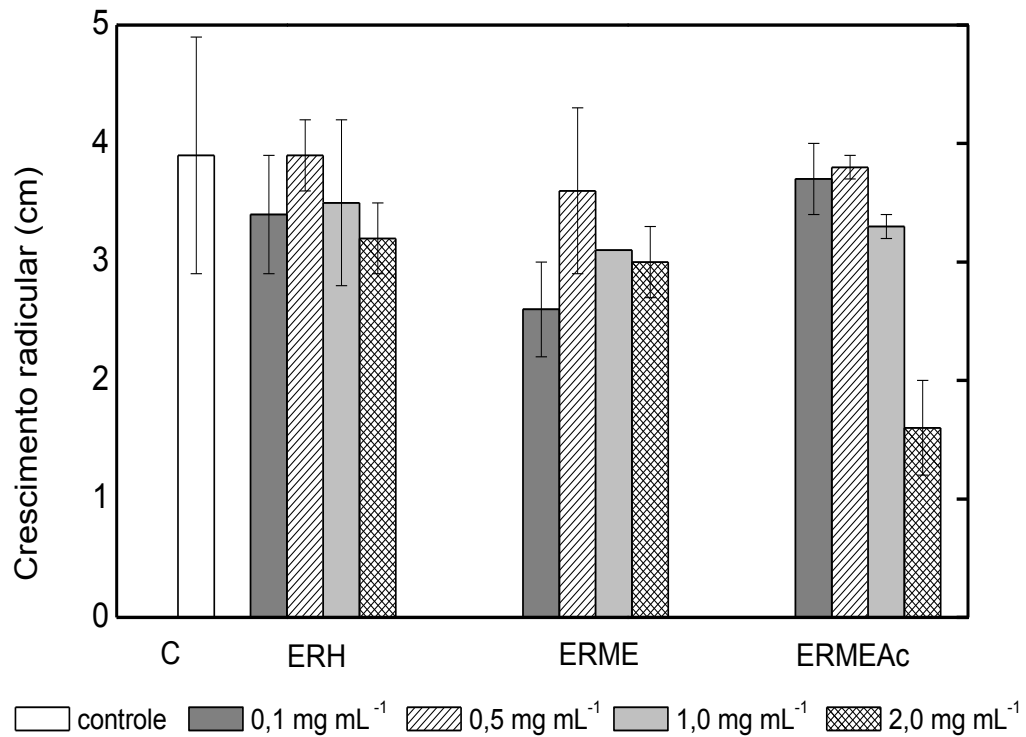


Figura 76: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento da raiz de pepino.

A atividade do extrato ERMEAc foi observada na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ indicando 59,0% de inibição do crescimento das raízes de pepino (Tabela 16). Os ensaios com os extratos ERH e ERME não diferiram estatisticamente do controle indicando que não houve atividade destes extratos sobre o crescimento das raízes de pepino (Figura 76).

A atividade dos extratos derivados de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento das sementes da alface (*Lactuca sativa*), seguem dispostos na Tabela 17.

Tabela 17: Efeitos dos extratos de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento das sementes de alface

Tratamento		% de germinação	% de inibição*	Caule	% de inibição*	Raiz	% de inibição*
Controle		71,7 ± 7,6 a		0,47 ± 0,04 a		1,5 ± 0,14 a	
EFH	0,1 mg mL ⁻¹	73,3 ± 2,9 a	-2,2	0,59 ± 0,01 a	-20,3	1,5 ± 0,10 a	0,0
	0,5 mg mL ⁻¹	76,7 ± 5,8 a	-7,0	0,55 ± 0,08 a	-17,0	1,4 ± 0,08 a	7,1
	1,0 mg mL ⁻¹	68,3 ± 11,5 a	4,7	0,52 ± 0,09 a	-10,6	1,3 ± 0,17 ab	13,3
	2,0 mg mL ⁻¹	71,7 ± 7,6 a	0,0	0,45 ± 0,01 a	4,2	1,0 ± 0,10 b	33,3
EFME	0,1 mg mL ⁻¹	71,7 ± 11,5 a	0,0	0,50 ± 0,04 a	-6,4	1,4 ± 0,12 a	7,1
	0,5 mg mL ⁻¹	75,0 ± 8,7 a	-4,6	0,40 ± 0,04 ab	14,9	0,9 ± 0,12 b	40,0
	1,0 mg mL ⁻¹	63,3 ± 7,6 a	11,7	0,35 ± 0,05 b	25,5	0,8 ± 0,15 bc	49,7
	2,0 mg mL ⁻¹	61,7 ± 7,6 a	13,9	0,29 ± 0,02 b	38,3	0,6 ± 0,06 c	60,0
EFMEAc	0,1 mg mL ⁻¹	70,0 ± 10,0 a	2,4	0,55 ± 0,02 a	-17,0	1,2 ± 0,16 ab	20,0
	0,5 mg mL ⁻¹	61,7 ± 12,6 a	13,9	0,42 ± 0,07 ab	10,6	0,8 ± 0,14 bc	49,3
	1,0 mg mL ⁻¹	36,7 ± 7,6 b	48,8	0,27 ± 0,04 bc	42,5	0,4 ± 0,03 cd	73,3
	2,0 mg mL ⁻¹	5,0 ± 5,0 c	93,0	0,17 ± 0,15 c	63,8	0,3 ± 0,28 d	81,3
EFAC	0,1 mg mL ⁻¹	52,0 ± 13,2 b	27,5	0,39 ± 0,03 a	17,0	0,9 ± 0,15 b	40,0
	0,5 mg mL ⁻¹	4,0 ± 8,7 c	94,4	0,09 ± 0,15 b	80,8	0,1 ± 0,20 c	93,3
	1,0 mg mL ⁻¹	0,0 c	100	0,0 ± b	100,0	0,0 c	100
	2,0 mg mL ⁻¹	0,0 c	100	0,0 ± b	100,0	0,0 c	100

Continuação.

Tabela 17: Efeitos dos extratos de *E. heterophylla* sobre o desenvolvimento das sementes de alface

Tratamento		% de germinação	% de inibição*	Caule	% de inibição*	Raiz	% de inibição*
Controle		71,7 ± 7,6 a		0,47 ± 0,04 a		1,5 ± 0,14 a	
ERH	0,1 mg mL ⁻¹	75,0 ± 5,0 a	-4,6	0,47 ± 0,06 a	0,0	1,8 ± 0,09 a	-20,0
	0,5 mg mL ⁻¹	80,0 ± 5,0 a	-11,6	0,54 ± 0,05 a	-14,9	1,9 ± 0,24 a	-26,7
	1,0 mg mL ⁻¹	71,7 ± 12,6 a	0,0	0,52 ± 0,04 a	-10,6	1,9 ± 0,05 a	-26,7
	2,0 mg mL ⁻¹	68,3 ± 14,4 a	4,7	0,38 ± 0,01 b	19,1	1,7 ± 0,20 a	-13,3
ERME	0,1 mg mL ⁻¹	83,3 ± 15,3 a	-16,2	0,48 ± 0,01 a	-2,1	1,5 ± 0,30 ab	0,0
	0,5 mg mL ⁻¹	58,3 ± 16,1 a	18,7	0,38 ± 0,07 ab	19,1	1,2 ± 0,23 ab	20,0
	1,0 mg mL ⁻¹	51,7 ± 17,6 a	27,9	0,39 ± 0,07 ab	17,0	1,1 ± 0,26 ab	26,7
	2,0 mg mL ⁻¹	50,0 ± 5,0 a	30,3	0,34 ± 0,02 b	27,6	0,9 ± 0,22 b	40,0
ERMEAc	0,1 mg mL ⁻¹	61,7 ± 11,5 a	13,9	0,41 ± 0,10 ab	12,8	1,3 ± 0,23 a	13,3
	0,5 mg mL ⁻¹	35,0 ± 5,0 b	51,2	0,24 ± 0,08 bc	48,9	0,6 ± 0,14 b	60,0
	1,0 mg mL ⁻¹	6,7 ± 2,9 c	90,6	0,14 ± 0,04 cd	70,2	0,2 ± 0,03 bc	86,7
	2,0 mg mL ⁻¹	0,0 c	100,0	0,0 d	100,0	0,0 c	100,0

As médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível do teste de Tukey a 5% de probabilidade. * em relação ao controle [solução aquosa de Tween 80 a 0,5% (m/v)]. Extrato das folhas em hexano (EFH), em metanol (EFME), em acetato de etila (EFAC), extrato das raízes em hexano (ERH), em metanol (ERME), fração obtida após acidificação de EFME (ERMEAc) e ERME (ERMEAc).

Os ensaios fitotóxicos com os extratos EFH, EFME, ERH e ERME não diferiram estatisticamente do controle em relação à germinação das sementes de alface indicando que não houve atividade sobre este parâmetro (Tabela 17). O ensaio fitotóxico com o extrato EFMEAc diferiu estatisticamente do controle a partir da concentração de 1,0 mg mL⁻¹ inibindo 48,8% da germinação em 2,0 mg mL⁻¹ o extrato inibiu 93,0% da germinação das sementes. O extrato EFAC diferiu do controle a partir da concentração 0,1 mg mL⁻¹ inibindo 27,5% da germinação, e a partir de 1,0 mg mL⁻¹ o extrato inibiu completamente o desenvolvimento das sementes. O ensaio com o extrato ERMEAc proporcionou inibição ainda na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ inibindo 51,2% da germinação, em 2,0 mg mL⁻¹ o extrato inibiu completamente a germinação das sementes de alface (Tabela 17).

A atividade dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule de alface, está disposta na figura 77.

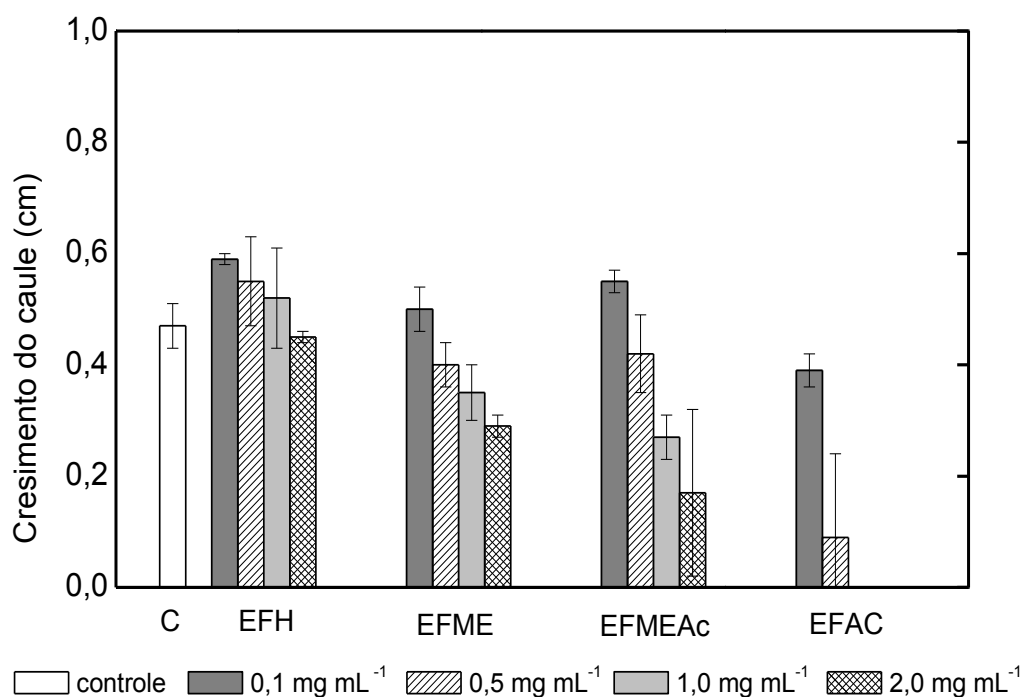


Figura 77: Atividade alelopática dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule das sementes de alface.

O ensaio fitotóxico do extrato EFME diferiu estatisticamente do controle a partir da concentração de 1,0 mg mL⁻¹ inibindo 25,5% do crescimento do caule, em 2,0 mg mL⁻¹ o extrato inibiu 38,3%. O tratamento com o extrato EFMEAc diferiu do controle a partir da concentração 1,0 mg mL⁻¹ inibindo 42,5% do crescimento do caule, em 2,0 mg mL⁻¹

o extrato inibiu 63,8% do desenvolvimento das sementes. O maior potencial de inibição foi provocado pelo extrato EFAC, inibindo 80,0% do crescimento do caule ainda na concentração de 0,5 mg mL⁻¹, a partir de 1,0 mg mL⁻¹ não houve germinação (Tabela 17). O ensaio fitotóxico como o extrato EFH não diferiu estatisticamente do controle em relação ao crescimento do caule das sementes de alface indicando que não houve atividade sobre este parâmetro (figura 77).

Os resultados referentes a atividade dos extratos das folhas de *E. heterophylla* frente ao crescimento da raiz de alface seguem dispostos na figura 78.

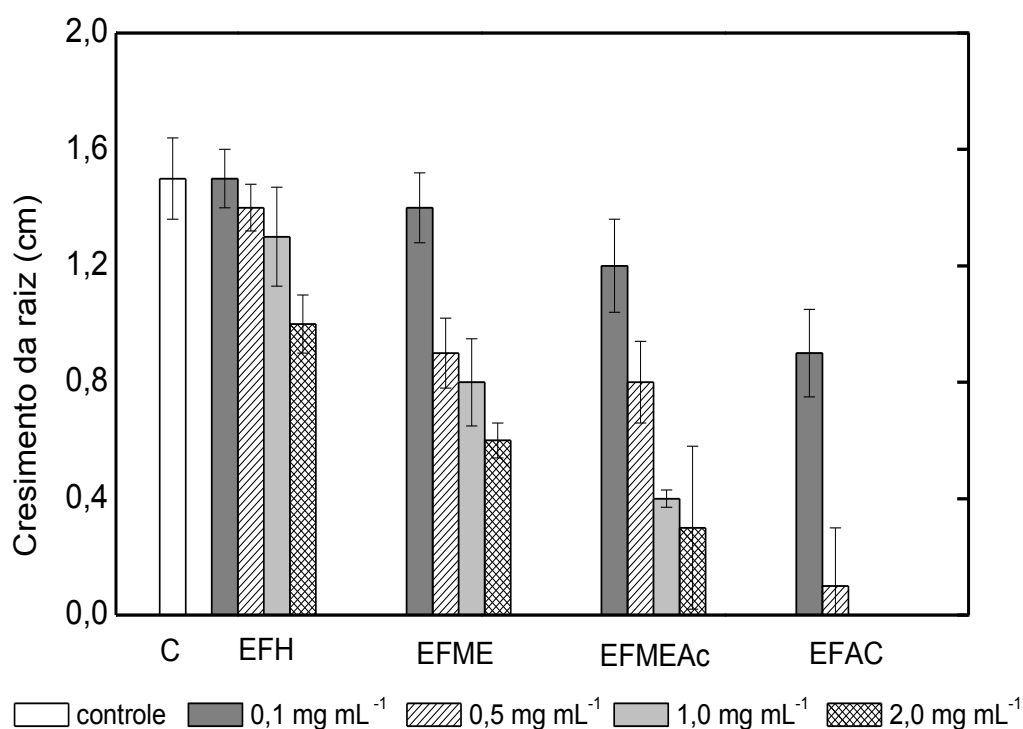


Figura 78: Atividade alelopática dos extratos das folhas de *E. heterophylla* sobre o crescimento das raízes das sementes de alface.

O ensaio fitotóxico com o extrato EFH diferiu estatisticamente do controle em relação ao crescimento das raízes de alface na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ apresentando uma inibição de 33,3% (Tabela 17). O ensaio com o extrato EFME diferiu estatisticamente do controle a partir da concentração de 0,5 mg mL⁻¹ inibindo 40,0% do crescimento das raízes, em 2,0 mg mL⁻¹ o extrato inibiu 60,0% do desenvolvimento. O tratamento com o extrato EFMEAc diferiu do controle a partir da concentração 0,5 mg mL⁻¹ inibindo 49,3% do crescimento das raízes, o extrato obteve aumento na inibição em

relação a concentração inibindo 81,3% do crescimento em $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. O ensaio com o extrato EFAC inibiu o desenvolvimento das raízes ainda em $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ inibindo 40,0% do crescimento, a partir de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ não houve germinação (Figura 78).

Os resultados da atividade dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule das sementes de alface estão dispostas na figura 79.

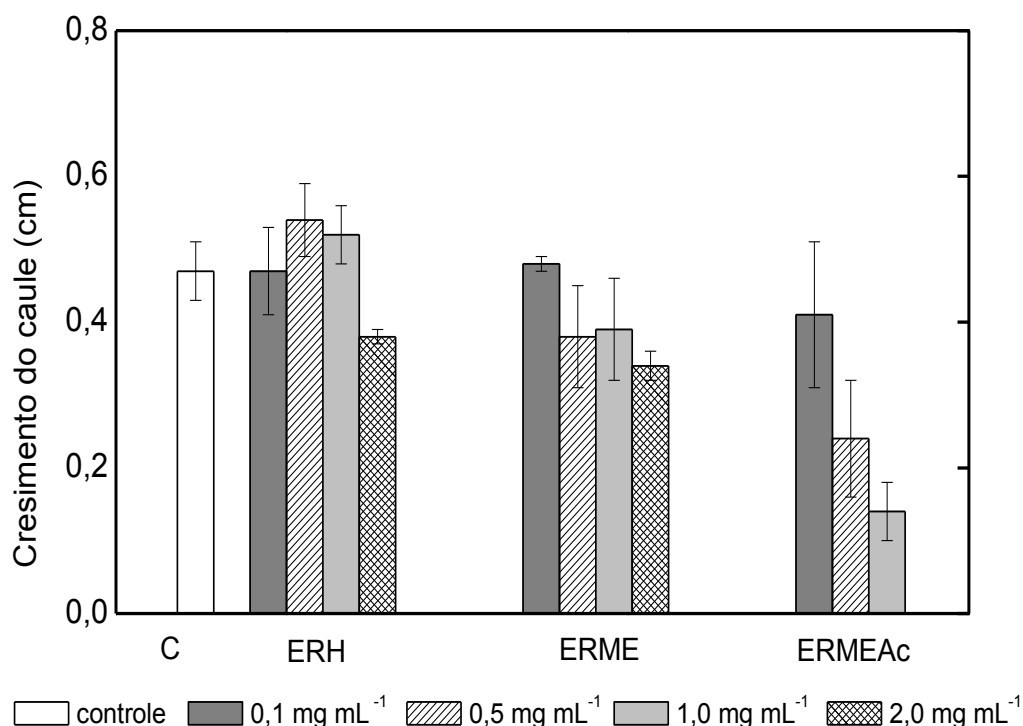


Figura 79: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento do caule de sementes de alface.

O ensaio fitotóxico com extrato ERH diferiu do controle na concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ inibindo 19,1% no crescimento do caule da semente de alface (Tabela 17). O ensaio fitotóxico com o extrato ERME reduziu o crescimento do caule em 27,6% na concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. O ensaio com o extrato ERMEAc obteve atividade ainda na concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ inibindo 12,8%, em $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ o extrato inibiu 70,2% do crescimento do caule em $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ não houve germinação (Figura 79).

Os resultados da atividade fitotóxica dos extratos das raízes de *E. heterophylla* sobre o crescimento das raízes das sementes de alface estão dispostas na figura 80.

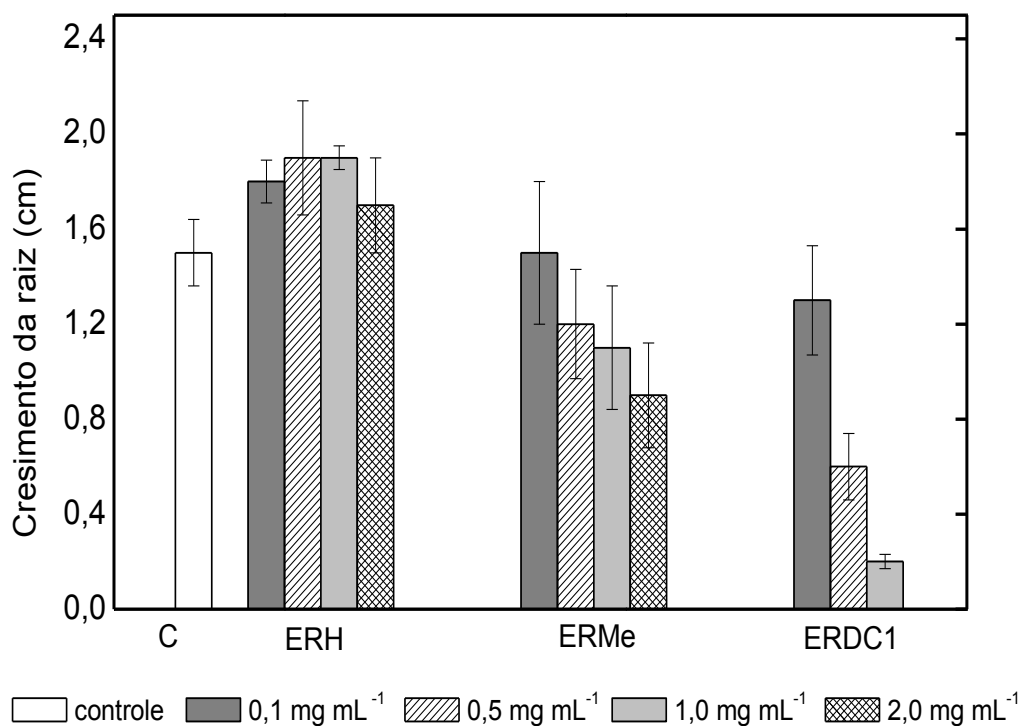


Figura 80: Atividade alelopática dos extratos das raízes de *E. heterophylla* frente ao crescimento da raiz de sementes de alface.

O ensaio fitotóxico com o extrato ERH não diferiu em relação ao controle indicando que não houve inibição do mesmo em relação ao crescimento da raiz, por outro lado o extrato ERME inibiu em 40,0% o crescimento da raiz de alface na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ (Tabela 17). O ensaio com o extrato ERMEAc diferiu do controle ainda na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ inibindo em 60,0% o crescimento das raízes, na concentração de 2,0 mg mL⁻¹ não houve germinação (Figura 80).

Os ensaios fitotóxico sobre as sementes de alface, foram os que obtiveram maior inibição do desenvolvimento em comparação as outras espécies avaliadas. Os ensaios fitotóxicos sobre as sementes de pepino obtiveram baixa inibição, com exceção ao ensaio utilizando o extrato EFMEAc na concentração de 2 mg mL⁻¹ inibindo 71,4% da germinação, 61,1% crescimento do caule e 69,3% crescimento da raiz. Os ensaios fitotóxico do extrato EFMEAc obtiveram atividade significativa sobre as três sementes avaliadas. O maior potencial de inibição observado para este extrato, foi para as sementes de sorgo em 91,1% da germinação, 77,8% crescimento do caule e 88,1% crescimento da raiz na concentração de 2 mg mL⁻¹. Os ensaios fitotóxicos utilizando o extrato EFAC obtiveram inibição considerável frente as sementes de sorgo e alface, o mesmo inibiu completamente a germinação de alface ainda na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. O extrato ERMEAc inibiu completamente a germinação de alface na maior concentração testada (2

mg mL⁻¹). Este extrato também inibiu de maneira considerável o desenvolvimento das sementes de sorgo em 55,6% na germinação, 55,5% crescimento do caule e 61,9% crescimento da raiz.

Os pesquisadores Mohamed-Saleem & Fawusi (1983), observaram uma redução da germinação das sementes de tomate em ensaio fitotóxico utilizando solos contendo resíduos de decomposição de *Euphorbia heterophylla*. Os pesquisadores Gusman *et al.* (2011), avaliaram o potencial fitotóxico dos extratos aquosos de *Bidens pilosa*, *Cyperus rotundus* e *Euphorbia heterophylla* sobre a germinação das sementes de alface, tomate, repolho e rabanete. O extrato aquoso da planta *E. heterophylla* inibiu de maneira significativa todas as espécies de sementes testadas, principalmente a partir da concentração de 50% (m/v). Diferentes espécies do gênero *Euphorbia* spp. apresentam atividade alelopática relatada entre estas *Euphorbia helioscopia*, *E. hierosolymitana*, *E. prostrata*, *E. hirta* e *E. dracunculoides* (Alsaadawi *et al.*, 1990; Tanveer *et al.*, 2012; Abu-Romman, Shatnawi & Shibli, 2010; Pathare; Kolse & Pandhure, 2014; Madany & Saleh, 2015).

Os extratos que proporcionaram maiores inibições frente as sementes avaliadas apresentaram em suas composições diferentes tipos de ácidos graxos com atividade fitotóxica relatada. A fração ERMEAc obteve em sua composição 35,4% de ácidos graxos identificados, sendo que após a hidrólise teve um aumento para 72,9%. A fração EFMEAc obteve em sua composição 9,6% de ácidos graxos identificados e após a hidrólise aumentou para 55,6%. O extrato EFAC obteve 14,8% de ácidos graxos e 17,6% de ésteres de ácidos graxos, após a hidrólise o total de ácidos graxos aumentou para 43,1%. O extrato EFAC e as frações EFMEAc e ERMEAc apresentaram em comum os componentes majoritários ácidos palmítico, linoleico, α -linolênico e esteárico distribuídos em diferentes concentrações. Os extratos EFME e ERME não proporcionaram inibição significativa nos testes fitotóxico em comparação aos resultados obtidos para as frações EFMEAc e ERMEAc correspondentes. Este menor efeito fitotóxico pode estar associado a grande quantidade de carboidratos presentes nestes extratos metanólicos. Desta forma os componentes ativos possivelmente os ácidos graxos estão menos concentrados em comparação a quantidade encontrada nas frações EFMEAc e ERMEAc.

Os pesquisadores Aliotta *et al.* (1990), avaliaram a atividade fitotóxica de componentes isolados da planta *Typha latifolia* sobre a inibição do desenvolvimento de algas marinhas. Entre os compostos isolados os ácidos α -linolênico e linoleico apresentaram potencial na inibição de diferentes algas. Pinto *et al.* (2013) avaliaram a

atividade alelopática do óleo de milho e girassol e do produto da reação de esterificação dos óleos para formação de ésteres metílicos dos compostos majoritários ácidos palmítico, esteárico, linoleico e oleico. Estes pesquisadores avaliaram os testes fitotóxicos sobre a germinação das sementes de alface e cebola e destacaram o potencial de inibição das sementes de cebola para todos os óleos avaliados antes e após a reação de esterificação.

4.7 Atividade antibacteriana

Os extratos, frações e compostos isolados de *E. heterophylla* foram submetidos a avaliação da atividade antibacteriana, com cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 29214, através dos métodos por diluição na concentração de 400 µg mL⁻¹ e difusão na concentração de 2 mg mL⁻¹. As amostras não proporcionaram inibição dos micro-organismos nas concentrações avaliadas.

Apesar dos extratos e compostos de *E. heterophylla* não apresentarem efeito antibacteriano nas concentrações avaliadas no presente trabalho, alguns dos compostos isolados apresentam atividade relatada na literatura sobre outras bactérias e em diferentes concentrações. Os compostos β-sitosterol e acetato de lupeol apresentam atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, na concentração de 8 mg mL⁻¹, descrito por Awolola *et al.* (2014). Os pesquisadores Kuo *et al.* (2014), avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes triterpenos, entre estes, o pseudo taraxasterol e o acetato de β-amirina sobre *E. coli*, estes compostos obtiveram concentração mínima inibitória em 1,2 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹ respectivamente. O taraxasterol possui atividade antibacteriana sobre *S. aureus* relatada por Villarreal *et al.* (1994), apresentando concentração mínima inibitória em 12,5 µg mL⁻¹.

Os pesquisadores Fred-Jaiyesimi & Abo (2010), avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes frações do extrato etanólico de *E. heterophylla* sobre *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Klebsiella pneumoniae*. Os autores relataram a atividade do extrato em etanol sobre as bactérias *S. albus*, *P. mirabilis*, *S. typhi* e *K. pneumoniae* em todas as concentrações avaliadas (22,5, 45 e 90 mg mL⁻¹). Os pesquisadores Ekundayo & Ekekwe (2013), avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos aquoso e etanólico das plantas *Jatropha curcas* e *Euphorbia heterophylla*, frente as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *Staphylococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores relataram que os extratos

de *E. heterophylla* apresentaram efeito antibacteriano positivo, destacando-se o extrato aquoso com concentração mínima inibitória em 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. faecalis* e *P. aeruginosa* e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. aureus* e *E. coli*.

CONCLUSÃO

Os extratos obtidos da planta *Euphorbia heterophylla* apresentaram em sua composição diferentes tipos de componentes com atividade biológica relatadas, os quais contribuem para o potencial bioativo dos extratos. O extrato EFAC e as frações ERMEAc e EFMEAc apresentaram em sua composição diferentes tipos de ácidos graxos, sendo os principais os ácidos palmítico, linoleico, α -linolênico e esteárico. Além disso todos os extratos apresentaram teste positivo para triterpenos. Foram isolados do extrato ERH os compostos β -sitosterol, acetato de lupeol, acetato de taraxasterol, acetato de pseudo-taraxasterol, acetato de germanicol, hexanoato de germanicol e duas misturas, uma contendo β -sitosterol + estigmaterol e outra com acetato de α -amirina + acetato de β -amirina. Foram isolados do extrato EFAC o acetato de lupeol e uma mistura de acetato de α -amirina + acetato de β -amirina. Os extratos das folhas e raízes em metanol e hexano apresentaram baixa atividade fitotóxica sobre as sementes de sorgo, pepino e alface. O extrato da folha em acetato de etila apresentou atividade fitotóxica com maior potencial sobre as sementes de alface. As frações ERMEAc e EFMEAc apresentaram atividade alelopática para todas as sementes das espécies avaliadas, destacando-se o feito sobre as sementes de sorgo e alface. Os extratos e compostos não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações e nos métodos testados. Os resultados obtidos sobre a atividade alelopática dos extratos de *E. heterophylla*, não foram expressivos suficiente para serem indicados e explorados como possíveis herbicidas botânicos. Porém de acordo com o efeito fitotóxico dos extratos, estima-se que a planta possa interferir levemente na germinação e desenvolvimento de outras espécies em culturas agrícolas, desta forma, contribuindo para sua competitividade.

REFERÊNCIAS

Abreu, C. M; Price, S. L; Shirk, E. N; Cunha, R. D; Pianowski, L. F; Clements, J. E; Gama, L. Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of *de novo* infection and activation of viral LTR. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. a97257, 2014.

Abreu, V. G; Takahashi, J. A; Duarte, L. P; Piló-Veloso, D; Junior, P. A; Alves, R. O; Alcântara, A. F. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 615-621, 2011.

Abu-Romman, S; Shatnawi M; Shibli, R. Allelopathic effects of spurge *Euphorbia hierosolymitana* on wheat *Triticum durum*. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 7, p. 298-302, 2010.

Ahmed, Y; Rahman, S; Akhtar, P; Islam, F; Rahman, M; Yaakob, Z. Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii*. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 5, p. 2939-2943, 2013.

Aliotta, G; Greca, M. D; Monaco, P; Pinto, G; Pollio, A; Previtiera, L. In vitro algal growth inhibition by phytotoxins of *Typha latifolia* L. **Journal of chemical Ecology**, v. 16, n. 9, p. 2637-2646, 1990.

Alqasoumi, S. I; Basudan, O. A; Al-Rehaily, A. J; Abdel-Kader, M. S. Phytochemical and pharmacological study of *Ficus palmata* growing in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 5, p. 460-471, 2014.

Alsaadawi, I. S; Sakeri, F. A; Al-Dulaimy, S. M. Allelopathic inhibition of *Cynodon dactylon* (L.) pers. and other plant species by *Euphorbia prostrata* L. **Journal of chemical ecology**, v. 16, n. 9, p. 2747-2754, 1990.

Annapurna, A; Hatware, K. Effect of aqueous extract of *Euphorbia heterophylla* on blood glucose levels of alloxan induced diabetic rats. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 669-672, 2014.

Asperger, A; Engewald, W; Fabian, G. Thermally assisted hydrolysis and methylation—a simple and rapid online derivatization method for the gas chromatographic analysis of natural waxes. **Journal of analytical and applied pyrolysis**, v. 61, n. 1, p. 91-109, 2001.

Awolola, G. V; Koorbanally, N. A; Chenia, H; Shode, F. O; Baijnath, H. Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of *Ficus sansibarica* Warb. subsp. *sansibarica* (Moraceae) extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 3, p. 124-131, 2014.

Ayatollahi, A. M; Ghanadian, M; Afsharypour, S; Abdella, O. M; Mirzai, M; Askari, G. Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 10, n. 2, p. 287, 2011.

Ayoola, G. A; Coker, H. A; Adesegun, S. A; Adepoju-Bello, A. A; Obawe, K; Ezennia, E. C; Atangbayila, T. O. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1019-1024, 2008.

Babaamer, Z; Sekhri, L; Al-Jaber, H; Al-Qudah, M; Zarga, M. A. Extraction and identification of triterpenoids from *Pergularia Tomentosa* L. **Ḥawliyyāt al-‘Ulūm wa-al-Tiknūlūjiyā**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2013.

Bahmani, M; Zargar, A; Rafieian-Kopaei, M. Identification of medicinal plants of Urmia for treatment of gastrointestinal disorders. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 4, p. 468-480, 2014.

Barbehenn, R. V; Constabel, C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1551-1565, 2011.

Basma, A. A; Zuraini, Z; Sasidharan, S. A transmission electron microscopy study of the diversity of *Candida albicans* cells induced by *Euphorbia hirta* L. leaf extract *in vitro*. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 1, n. 1, p. 20-22, 2011.

Besbes, M; Guérineau, V; Touboul, D. Isolation and structure elucidation of acetylcholinesterase lipophilic lupeol derivatives inhibitors from the latex of the Tunisian *Periploca laevigata*. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S2767-S2772, 2017.

Bhattacharjee, I; Chatterjee, S. K; Ghosh, A; Chandra, G. Antibacterial activities of some plant extracts used in Indian traditional folk medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S165-S169, 2011.

Biesboer, D. D; D'Amour, P; Wilson, S. R; Mahlberg, P. Sterols and Triterpenols in latex and cultured tissues of *Euphorbia pulcherrima*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1115-1118, 1982.

Bourgaud, F; Gravot, A; Milesi, S; Gontier, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant science**, v. 161, n. 5, p. 839-851, 2001.

Bravetti, M. M. D. M; Vico, R. V; Carpinella, M. C; Ferrayoli, C. C; Palacios, S. M. Phytotoxic phenylpropanoids isolated from *Ophryosporus charua* (Griseb.) Hieron. **Phytochemistry**, v. 138, p. 145-151, 2017.

Bringmann, G; Schlauer, J; Rischer, H; Wohlfarth, M; Mühlbacher, J; Buske, A; Adam, G. Revised structure of antidesmone, an unusual alkaloid from tropical *Antidesma* plants (Euphorbiaceae). **Tetrahedron**, v. 56, n. 23, p. 3691-3695, 2000.

Bruni, R; Muzzoli, M; Ballero, M; Loi, M. C; Fantin, G; Poli, F; Sacchetti, G. Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild *Euphorbia* species. **Phytotherapy**, v. 75, n. 1, p. 50-61, 2004.

Buszewska-Forajta, M; Bujak, R; Yumba-Mpanga, A; Siluk, D; Kaliszan, R. GC/MS technique and AMDIS software application in identification of hydrophobic compounds of grasshoppers' abdominal secretion (*Chorthippus* spp.). **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 102, p. 331-339, 2015.

Chaturvedula, V. S. P; Prakash, I. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 9, p. 239-242, 2012.

Chen, Y. F; Ching, C; Wu, T. S; Wu, C. R; Hsieh, W. T; Tsai, H. Y. *Balanophora spicata* and lupeol acetate possess antinociceptive and anti-inflammatory activities in vivo and in vitro. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, West Valley Road, CLSI document M100-S15, 2005.

Cui, W; Iwasa, K; Tokuda, H; Kashihara, A; Mitani, Y; Hasegawa, T; Mukai, C. Potential cancer chemopreventive activity of simple isoquinolines, 1-benzylisoquinolines, and protoberberines. **Phytochemistry**, v. 67, n. 1, p. 70-79, 2006.

Di, G. E. N. G; Li-Tao, Y. I; Yao, S. H. I; Zhi-Da, M. I. N. Structure and antibacterial property of a new diterpenoid from *Euphorbia helioscopia*. **Chinese journal of natural medicines**, v. 13, n. 9, p. 704-706, 2015.

Dutra, R. C; Campos, M. M; Santos, A. R; Calixto, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

Edeoga, H. O; Okwu, D. E; Mbaebie, B. O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African journal of biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 685-688, 2005.

Ekundayo, E. O; Ekekwe, J. N. Antibacterial activity of leaves extracts of *Jatropha curcas* and *Euphorbia heterophylla*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 44, p. 5097-5100, 2013.

Fabiyi, O. A; Atolani, O; Adeyemi, O. S; Olatunji, G. A. Antioxidant and Cytotoxicity of β -Amyrin acetate fraction from *Bridelia ferruginea* Leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 981-984, 2012.

Falodun, A; Okunrobo, L. O; Uzoamaka, N. Phytochemical screening and anti-inflammatory evaluation of methanolic and aqueous extracts of *Euphorbia heterophylla* Linn (Euphorbiaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 6, p. 529-531, 2006.

Farhan, H; Rammal, H; Hijazi, A; Daher, A; Reda, M; Annan, H; Badran, B. Chemical composition and antioxidant activity of a Lebanese plant *Euphorbia macroclada* schyzoceras. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 7, p. 542-548, 2013.

Fingolo, C. E; Santos, T. D. S; Kaplan, M. A. C. Triterpene esters: natural products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4247-4256, 2013.

Foley, M. E; Anderson, J. V; Chao, W. S; Dođramacı, M; Horvath, D. P. Initial changes in the transcriptome of *Euphorbia esula* seeds induced to germinate with a combination of constant and diurnal alternating temperatures. **Plant molecular biology**, v. 73, n. 1-2, p. 131-142, 2010.

Fred-Jaiyesimi, A. A; Abo, K. A. Phytochemical and Antimicrobial analysis of the crude extract, petroleum ether and chloroform fractions of *Euphorbia heterophylla* Linn Whole Plant. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 16, p. 1-4, 2010.

Freire, C. S. R; Silvestre, A. J. D; Neto, C. P. Identification of new hydroxy fatty acids and ferulic acid esters in the wood of *Eucalyptus globulus*. **Holzforschung**, v. 56, n. 2, p. 143-149, 2002.

Furr, M; Mahlberg, P. G. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 2, p. 153-159, 1981.

Gao, L; Chen, F; Li, X; Xu, S; Huang, W; Ye, Y. Three new alkaloids from *Veratrum grandiflorum* Loes with inhibition activities on Hedgehog pathway. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 19, p. 4735-4738, 2016.

Gazziero, D. L; Brighenti, A. M; Maciel, C. D; Christofolleti, P. J. Resistência de amendoim-bravo aos herbicidas inibidores da enzima als1. **Planta Daninha**, v. 16, n. 2, p. 117, 1998.

Ghosh, R. K; Shamurailatpam, D; Ghosh, A; Sentharagai, S; Labar, A; Nongmaithem, D; Kole, R. K. Use of botanical herbicides in system intensification. **Indian Journal of Weed Science**, v. 47, n. 4, p. 401-407, 2015.

González, A. G; Fraga, B. M; González, P; Hernandez, M. G; Ravelo, A. G. ¹³C NMR spectra of olean-18-ene derivatives. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 1919-1921, 1981.

Gusman, G. S; Yamagushi, M. Q; Vestena, S Potencial alelopático de extratos aquosos de *Bidens pilosa* L., *Cyperus rotundus* L. e *Euphorbia heterophylla* L. Iheringia. **Série Botânica**, v. 66, n. 1, p. 87-98, 2011.

Gutiérrez, A; Del Río, J. C; González-Vila, F. J; Martín, F. Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. **Holzforschung**, v. 53, n. 5, p. 481-486, 1999.

Halilu, M. E; October, N; Balogun, M; Agunu, A; Abubakar, A; Abubakar, M. S. Isolation and Characterization of Steroids from Petroleum Ether Extract of Stem Bark of *Parinari curatellifolia* Planch ex. Benth (Chrysobalanaceae). **Journal of Natural Sciences Research**, v. 3, n. 6, 2013.

Halket, J. M; Przyborowska, A; Stein, S. E; Mallard, W. G; Down, S; Chalmers, R. A. Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids—potential for pattern recognition and automated identification of metabolic disorders. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 13, n. 4, p. 279-284, 1999.

Hassan, R. A.; Hassan, E. M.; Ibrahim, N. A.; Nazif1, N. M. Triterpenes and cytotoxic activity of *Acokanthera oblongifolia* Hochst. growing in Egypt. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, p. 1677-1686, 2015.

Hua, J; Liu, Y; Xiao, C. J; Jing, S. X; Luo, S. H; Li, S. H. Chemical profile and defensive function of the latex of *Euphorbia peplus*. **Phytochemistry**, v. 136, p. 56-64, 2017.

Huang, Y; Liu, Y; Liu, Y; Song, H; Wang, Q. C ring may be dispensable for β -carboline: design, synthesis, and bioactivities evaluation of tryptophan analog derivatives based on

the biosynthesis of β -carboline alkaloids. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 3, p. 462-473, 2016.

Ibrahim, S. R; Mohamed, G. A; Shaala, L. A; Banuls, L. M. Y; Van Goietsenoven, G; Kiss, R; Youssef, D. New ursane-type triterpenes from the root bark of *Calotropis procera*. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 490-495, 2012.

Iijima, K; Kiyohara, H; Tanaka, M; Matsumoto, T; Cyong, J. C; Yamada, H. Preventive effect of taraxasteryl acetate from *Inula britannica* subsp. japonica on experimental hepatitis in vivo. **Planta medica**, v. 61, n. 01, p. 50-53, 1995.

Isidorov, V. A; Kotowska, U; Vinogorova, V. T. GC identification of organic compounds based on partition coefficients of their TMS derivatives in a hexane-acetonitrile system and retention indices. **Analytical sciences**, v. 21, n. 12, p. 1483-1489, 2005.

Isidorov, V. A; Lech, P; Żółciak, A; Rusak, M; Szczepaniak, L. Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of metabolites from the needles and roots of pine seedlings at early stages of pathogenic fungi *Armillaria ostoyae* attack. **Trees**, v. 22, n. 4, p. 531, 2008.

Isidorov, V. A; Rusak, M; Szczepaniak, L; Witkowski, S. Gas chromatographic retention indices of trimethylsilyl derivatives of mono- and diglycerides on capillary columns with non-polar stationary phases. **Journal of Chromatography A**, v. 1166, n. 1, p. 207-211, 2007.

Iyer, D; Patil, U. K. Efficacy of Stigmast-5-en-3 β -ol Isolated from *Salvadora persica* L. as Antihyperlipidemic and Anti-tumor agent: Evidence from animal studies. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S849-S855, 2012.

Jamal, A. K; Yaacob, W. A; Din, L. B. A chemical study on *Phyllanthus reticulatus*. **Journal of Physical Science**, v. 19, n. 2, p. 45-50, 2008.

James, O; Friday, E. T. Phytochemical composition, bioactivity and wound healing potential of *Euphorbia heterophylla* (Euphorbiaceae) leaf extract. **International Journal on pharmaceutical and biomedical research**, v. 1, n. 1, p. 54-63, 2010.

Jia, Z; Tian, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. **Desalination**, v. 247, n. 1-3, p. 423-429, 2009.

Joycharat, N; Plodpai, P; Panthong, K; Yingyongnarongkul, B. E; Voravuthikunchai, S. P. Terpenoid constituents and antifungal activity of *Aglaia forbesii* seed against phytopathogens. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 88, n. 9, p. 937-944, 2010.

Kamel, A; Al-Mutlaq, K. Selective herbicidal activity of an indole alkaloid isolated from *Rhazya stricta* Decne. growing in Saudi Arabia. **Fourteenth Australian Weeds Conference**, p. 270-273, 2004.

Kern, K. A; Pergo, E. M; Kagami, F. L; Arraes, L. S; Sert, M. A; Ishii-Iwamoto, E. L. The phytotoxic effect of exogenous ethanol on *Euphorbia heterophylla* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 1095-1101, 2009.

Khalilov, L. M; Khalilova, A. Z; Shakurova, E. R; Nuriev, I. F; Kachala, V. V; Shashkov, A. S; Dzhemilev, U. M. PMR and ¹³C NMR spectra of biologically active compounds. XII. Taraxasterol and its acetate from the aerial part of *Onopordum acanthium*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 39, n. 3, p. 285-288, 2003.

Kirimer, N. E; Tunalier, Z; Başer, K. H. C; Cingi, I. Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparation. **Planta medica**, v. 63, n. 06, p. 556-558, 1997.

Kone, W. M; Atindehou, K. K; Terreaux, C; Hostettmann, K; Traore, D; Dosso, M. Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 43-49, 2004.

Kotowska, U; Biegańska, K; Isidorov, V. A. Screening of Trace Organic Compounds in Municipal Wastewater by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 1, 2012.

Kouakou, N. D. V; Grongnet, J. F; Assidjo, N. E; Thys, E; Marnet, P; Catheline, D; Legrand, P; Kouba, M. Effect of a supplementation of *Euphorbia heterophylla* on

nutritional meat quality of Guinea pig (*Cavia porcellus* L.). **Meat science**, v. 93, n. 4, p. 821-826, 2013.

Kuo, P. C; Chen, G. F; Yang, M. L; Lin, Y. H; Peng, C. C. Chemical constituents from the fruits of *Forsythia suspensa* and their antimicrobial activity. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

Layne, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. **Methods in enzymology**, v. 3, p. 447-454, 1957.

Li, Q; Yang, K. X; Zhao, Y. L; Qin, X. J; Yang, X. W; Liu, L; Luo, X. D. Potent anti-inflammatory and analgesic steroidal alkaloids from *Veratrum taliense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 274-279, 2016.

Liu, Z. H; Li, Q; Chang, S; Yang, Z. Y; Han, N; Yin, J. Protective effect of hexahydrobenzo[c]phenanthridine alkaloids isolated from *Corydalis ambigua* var. *amurensis* on myocardial ischemia-hypoxia cells. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p 258–262, 2016.

Loizou, S; Lekakis, I; Chrousos, G. P; Moutsatsou, P. β -Sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 4, p. 551-558, 2010.

Luz, L. E. C; Kanunfre, C. C; Paludo, K. S; Silva Justo, A; Petry, V. K; Lemes, B. M; Khan, I. A. Cytotoxic biomonitoring study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of ethnopharmacology**, v. 183, p. 29-37, 2016.

Machado, D. N. M; Júnior, S. F. P; Conserva, L. M; Lemos, R. P. L. Quinoline alkaloids from *Sebastiania corniculata* (Euphorbiaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 33, n. 5, p. 555-558, 2005.

Madany, M. M; Saleh, A. M. Phytotoxicity of *Euphorbia helioscopia* L. on *Triticum aestivum* L. and *Pisum sativum* L. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 141-151, 2015.

Maurya, R; Srivastava, A; Shah, P; Siddiqi, M. I; Rajendran, S. M; Puri, A; Yadav, P. P. β -Amyrin acetate and β -Amyrin palmitate as antidyslipidemic agents from *Wrightia tomentosa* leaves. **Phytomedicine**, v. 19, n. 8, p. 682-685, 2012.

Miresmailli, S; Isman, M. B. Botanical insecticides inspired by plant–herbivore chemical interactions. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 1, p. 29-35, 2014.

Mohamed-Saleem, M. A; Fawusi, M. O. A. A note on the effects of tropical weed decomposition on seed germination and seedling growth of some agricultural crops. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 10, n. 4, p. 347-352, 1983.

NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS document M7-A6, 6^o Ed, v. 23, n. 2, 2003.

Noble, R. L. The discovery of the vinca alkaloids—chemotherapeutic agents against cancer. **Biochemistry and cell biology**, v. 68, n. 12, p. 1344-1351, 1990.

Nothias-Scaglia, L. F; Dumontet, V; Neyts, J; Roussi, F; Costa, J; Leyssen, P; Paolini, J. LC-MS 2-Based dereplication of *Euphorbia* extracts with anti-Chikungunya virus activity. **Phytotherapy**, v. 105, p. 202-209, 2015.

Ogunkoya, I. Application of mass spectrometry in structural problems in triterpenes. **Phytochemistry**, v. 20, n. 1, p. 121-126, 1981.

Okeniyi, S.O; Adedoyin, B. J; Garba, S. Phytochemical Screening, Cytotoxicity, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Stem and Leave Extracts of *Euphorbia heterophylla*. **Journal of Biology and Life Science**, v. 4, n. 1, 2012.

Okoye, N. N; Ajaghaku, D. L; Okeke, H. N; Ilodigwe, E. E; Nworu, C. S; Okoye, F. B. C. beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 11, p. 1478-1486, 2014.

Olea, R. S. G; Roque, N. F. Análise de Misturas de Triterpenos por RMN de ¹³C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p-278-281, 1990.

Palit, P; Mandal, S. C; Bhunia, B. Total steroid and terpenoid enriched fraction from *Euphorbia neriifolia* Linn offers protection against nociceptive-pain, inflammation, and in vitro arthritis model: An insight of mechanistic study. **International Immunopharmacology**, v. 41, p. 106-115, 2016.

Pathare, S. N; Kolse, S. R.A. A.V; Pandhure N. B. Allelopathic effect of *Euphorbia hirta* and *Parthenium hysterophorus* leaf extracts on seed germination and seed elongation of *Capsicum annum*. **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**, v. 3, n. 1, p-348-354, 2014.

Pathomwichaiwat, T; Ochareon, P; Soonthornchareonnon, N; Ali, Z; Khan, I. A; Prathanturarug, S. Alkaline phosphatase activity-guided isolation of active compounds and new dammarane-type triterpenes from *Cissus quadrangularis* hexane extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 160, p. 52-60, 2015.

Patra, A; Jha, S; Murthy, P. N; Sharone, A. Isolation and characterization of stigmast-5-en-3 β -ol (β -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders. **International Journal of Pharma Sciences and Research**, v. 1, n. 1, p. 95-100, 2010.

Pino, J. A; Mesa, J; Muñoz, Y; Martí, M. P; Marbot, R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2213-2223, 2005.

Pinto, M. E. A; Silva, N. L; Siqueira, E. P; Santos, F. J. L; Santos Lima, L. A. R. Efeito alelopático dos ésteres metílicos dos ácidos graxos obtidos de óleos de milho e girassol. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, p. 44-48, 2013.

Portillo, A; Vila, R; Freixa, B; Adzet, T; Cañigüeral, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93-98, 2001.

Pradhan, D; Biswasroy, P; Suri, K. A. Isolation of berberine from *Berberis vulgaris* Linn. and standardization of aqueous extract by RP-HPLC. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 1, n. 2, p. 106-111, 2013.

Rafińska, K; Pomastowski, P; Wrona, O; Górecki, R; Buszewski, B. *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. **Phytochemistry Letters**, 2016.

Rizzardi, M. A; Roman, E. S; Borowski, D. Z; Marcon, R. Interferência de populações de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea ramosissima* isoladas ou em misturas sobre a cultura de soja. **Planta Daninha**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2004.

Reynolds, W. F; Sawyer, J. F; Enriquez, R. G; Escobar, L. I; Chavez, M. A; Shoolery, J. N. Total assignment of the ^{13}C spectrum of taraxasteryl acetate by ^{13}C - ^{13}C connectivity experiments and determination of the stereochemistry of taraxasterol by X-ray diffraction. **Canadian journal of chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1048-1054, 1985.

Rodríguez-Solana, R; Salgado, J. M; Domínguez, J. M; Cortés-Diéguez, S. Characterization of fennel extracts and quantification of estragole: Optimization and comparison of accelerated solvent extraction and Soxhlet techniques. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 528-536, 2014.

Rojas, L. B; Grignon-Dubois, M; Rezzonico, B; Usubillaga, A. Pentacyclic triterpenes from *Sarcostemma clausum*. **Chemistry of natural compounds**, v. 40, n. 6, p. 565-568, 2004.

Seleem, D; Pardi, V; Murata, R. M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 76, p. 76-83, 2016.

Shan, L. Y; Thing, T. C; Ping, T. S; Awang, K; Mohd, N. Cytotoxic, antibacterial and antioxidant activity of triterpenoids from *Kopsia singaporensis* Ridl. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 815-822, 2014.

Silva, A. C; Lima, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology**, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.

Silva, F. D. A. S; Azevedo, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

Silva, J. R. D. A; Rezende, C. M; Pinto, Â. C; Pinheiro, M. L; Cordeiro, M. C; Tamborini, E; Bolzani, V. D. S. Triterpenic esters from *himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 702-704, 1998.

Silva, N. L. A; Miranda, F. A. A; Conceição, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

Silvério, F. O; Barbosa, L. C. A; Maltha, C. R. A; Silvestre, A. J. D; Veloso, D. P; Gomide, J. L. Characterization of lipophilic wood extractives from clones of *Eucalyptus urograndis* cultivate in Brazil. **Bioresource**, v. 2, n. 2, p. 157-168, 2007.

Singh, A. B; Yadav, D. K; Maurya, R; Srivastava, A. K. Antihyperglycaemic activity of α -amyrin acetate in rats and db/db mice. **Natural product research**, v. 23, n. 9, p. 876-882, 2009.

Srisurichan, S; Pornpakakul, S. Triterpenoids from the seedpods of *Holarrhena curtisii* King and Gamble. **Phytochemistry Letters**, v. 12, p. 282-286, 2015.

Suwito, H; Heffen, W. L; Cahyana, H; Suwarso, H. P. Isolation, transformation, anticancer, and apoptosis activity of lupeyl acetate from *Artocarpus integra*. **5th International Conference and Workshop on Basic and Applied Sciences**: v. 1718, n. 1, p. 080004-1718, 2016.

Tanveer, A; Kamran Jabbar, M; Kahliq, A; Matloob, A; Nadeem Abbas, R; Mansoor Javaid, M. Efectos alelopáticos de fracciones acuosas y orgánicas de *Euphorbia dracunculoides* Lam. sobre la germinación y crecimiento de plántulas de garbanzo y trigo. **Chilean journal of agricultural research**, v. 72, n. 4, p. 495-501, 2012.

Tian, J. K; Xu, L. Z; Zou, Z. M; Yang, S. L. Three novel triterpenoid saponins from *Lysimachia capillipes* and their cytotoxic activities. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 54, n. 4, p. 567-569, 2006.

Tomaz, M. A; Costa, A. V; Rodrigues, W. N; Pinheiro, P. F; Parreira, L. A; Rinaldo, D; Queiroz, V. T. Chemical composition and allelopathic activity of the Eucalyptus essential oil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 5, p. 475-483, 2014.

Uemura, D; Hirata, Y. The isolation and structures of two new alkaloids, milliamines A and B, obtained from *Euphorbia millii*. **Tetrahedron Letters**, v. 12, n. 39, p. 3673-3676, 1971.

Vamsidhar, I; Mohammed, A. H; Nataraj, B; Rao, C. M; Ramesh, M. Antinociceptive activity of *Euphorbia heterophylla* roots. **Phytotherapy**, v. 71, n. 5, p. 562-563, 2000.

Vargas, L; Nohatto, M. A; Agostinetto, D; Bianchi, M.A; Gonçalves, E. M; Toledo, R.E. Resposta de biótipos de *Euphorbia heterophylla* a doses de glyphosate. **Planta daninha**, v. 29, 2011.

Varnava, K. G; Gabrieli, C; Konstantinidou, M; Kokkalou. Phytochemical analysis with biological activities of *Calendula officinalis* (Asteraceae), growing wild in Mount Athos. **International Journal of Research in Pharmacy & Science**, v. 6, n. 2, 2016.

Villarreal, M. L; Alvarez, L; Alonso, D; Navarro, V; Garcia, P; Delgado, G. Cytotoxic and antimicrobial screening of selected terpenoids from Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 42, n. 1, p. 25-29, 1994.

Vlietinck, A. J; Van Hoof, L; Totte, J; Lasure, A; Berghe, D. V; Rwangabo, P. C; Mvukiyumwami, J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 31-47, 1995.

Xiong, X; Yao, M., Fu, L., Ma, Z. Q., & Zhang, X. The botanical pesticide derived from *Sophora flavescens* for controlling insect pests can also improve growth and development of tomato plants. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 13-18, 2016.

Yan, R. Y; Wang, H. Q; Liu, C; Chen, R. Y; Yu, D. Q. Three new water-soluble alkaloids from the leaves of *Suregada glomerulata* (Blume) Baill. **Phytotherapy**, v. 82, n. 2, p. 247-250, 2011.

Yuan, W. J; Yang, G. P; Zhang, J. H; Zhang, Y; Chen, D. Z; Li, S. L; Hao, X. J. Three new diterpenes with cytotoxic activity from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 176-179, 2016.