



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DO CAULE DE
Talinum triangulare (PORTULACACEAE) E
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTE, QUELANTE
E DE INIBIÇÃO DA ENZIMA TIROSINASE**

ANA PAULA DE OLIVEIRA AMORIM

Sob a Orientação da professora
Dr^a Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

e Co-orientação da professora
Dr^a Márcia Cristina Campos de Oliveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, Área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

Seropédica, RJ
Julho, 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

ANA PAULA DE OLIVEIRA AMORIM

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de Concentração em Química de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 10/07/2007

Dr^a Aurea Echevarria Aznar Neves Lima (DEQUIM-UFRRJ)
(Orientadora)

Dr^a Márcia Cristina Campos de Oliveira (DEQUIM-UFRRJ)
(Co-orientadora)

Dr^o Armando Ubirajara Oliveira Sabaa-Srur
(IN – Departamento de Nutrição Básica Experimental - UFRJ)

Dr^a Naomi Kato Simas
(DEPN – Farmanguinhos - FIOCRUZ)

Dr^o Heber dos Santos Abreu
(IF – Departamento de Produtos Florestais – UFRRJ)
Suplente

‘Então disse Deus: “cubra-se a terra de vegetação: plantas que dêem sementes e árvores cujos frutos produzam sementes de acordo com as suas espécies”. E assim foi. A terra fez brotar a vegetação: plantas que dão sementes de acordo com as suas espécies, e árvores cujos frutos produzem sementes de acordo com as suas espécies. E Deus viu que ficou bom.’

Gênesis 1: 11-12

Ao meu querido Deus pela fidelidade

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio Carlos e Creuzenir pelo o apoio, compreensão e incentivo;

Ao meu noivo, Flávio pelo amor, respeito, atenção, paciência e carinho;

Ao meu irmão, Igor pelo incentivo e apoio;

A minha avó Gessi pelo carinho e cuidado;

A minha família;

Aos meus amigos da Igreja em especial Erica, Elaine e Paulinha pelo incentivo, carinho e fé transmitida;

A professora Dr^a Márcia Cristina, pela amizade, ensinamentos, compreensão, paciência, respeito e orientação neste trabalho, meu sincero respeito e agradecimentos;

À professor Dr^a Aurea Echevarria, pelos ensinamentos, paciência e orientação neste trabalho, meu agradecimentos;

Aos colegas da pós-graduação: Cláudio, Camilla, Kênia, Regina, Andréa Janaina, Renata, Janaína, Rose, Ari, Alessandra, Catarina, Bauer, Vinícius, Adriano, Fábio, Ormino, Anivaldo, André e Eduardo;

Aos alunos de iniciação: Ana Carolina, Ana Paula, Amanda Esteves e Amanda Fraga;

A todos os professores pertencentes ao programa de pós-graduação em Química Orgânica da (UFRRJ);

A minha amiga Andressa Esteves pela ajuda, incentivo e apoio neste trabalho;

A amiga Cristiane pela ajuda, incentivo e carinho.

A Raquel, Cleber e Ildomar pela ajuda com os espectros;

A todos os técnicos: Francês, Fábio, Carlos, Eli, Maurício, Aldir, Osmar, Conceição, Andréa, Jorge, Renato;

A UFRRJ, por mais uma oportunidade e acolhimento;

A UENF, pela elaboração do espectro 2D de hidrogênio;

Desde já, a banca examinadora, pelas sugestões e correções sugeridas a este trabalho;

A CAPES, pelo auxílio e bolsa concedida;

A todos que, de alguma maneira me ajudaram na realização deste trabalho;

RESUMO

AMORIM, Ana Paula de Oliveira. **Estudo fitoquímico do caule de *Talinum triangulare* (Portulacaceae) e propriedades antioxidante, quelante e frente a enzima tirosinase.** 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

O presente trabalho descreve o estudo do caule da espécie *Talinum triangulare* (Portulacaceae), tendo sido realizada a prospecção química das frações clorofórmica e hidrometanólica, a quantificação de fenóis do extrato bruto e da fração e hidrometanólica, e a avaliação da interação com íons de Fe II do extrato polar. Além disso, foram avaliados a atividade antioxidante e o efeito inibitório frente a enzima tirosinase do extrato bruto e da fração hidrometanólica. Finalmente foi realizada a análise fitoquímica da fração clorofórmica.

A prospecção química feita com as frações clorofórmica e hidrometanólica revelou a presença de fenóis, flavonóides, catequinas e outros constituintes que caracterizaram metabólitos da via do ácido chiquímico e do acetato.

A quantidade de fenóis totais em *T. triangulare* foi determinada colorimetricamente, conforme o procedimento padrão de Folin-Ciocalteu e através de tratamento estatístico foi possível determinar a sua concentração no extrato bruto e na fração hidrometanólica, sendo observado maior concentração nesta última.

A espectrofotometria no UV-visível foi usada para avaliar a possibilidade de complexação do extrato polar do caule de *T. triangulare* com íons de Fe II. Os resultados obtidos foram comparados com os da amostra comercial de *Ginkgo biloba*, onde se observou que a espécie *T. triangulare* apresentou efeito semelhante ao do fitoterápico *Ginkgo biloba* usado clinicamente.

Os testes da atividade antioxidante com o extrato bruto e a fração hidrometanólica, realizado através do método DPPH, e da ação inibitória frente a enzima tirosinase, indicaram de forma comparativa, que em ambos a fração hidrometanólica apresentou maior potencial que o extrato bruto.

O estudo fitoquímico da fração clorofórmica permitiu isolar e caracterizar, através de dados espectroscópicos de RMN ^1H de ^{13}C , IV e CG-massas, a substância octadecanoato de metila (1), e as inéditas ácido (3E)-4-metil-3-[(octanoiloxi)acetiloxi]metil-3-heptenóico (2) e éster olean-9,12-dien-3-(β -D-glicopiranosil)-28,29-dimetil (3).

Palavras-chave: Talinum triangulare, atividade antioxidante, ácido acetiloxi e espergulagenato.

ABSTRACT

AMORIM, Ana Paula de Oliveira. **Phytochemical study of steam of *Talinum triangulare* and antioxidant, chelation, tyrosinase inhibition proprieties.** 2007. 95 f. dissertation (Magister Scientiae in Organic Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

The present work describes the *Talinum triangulare* (Portulacaceae) stem study, including the chemical screening and, the total phenols of the hydromethanolic fraction and the hydromethanolic extract. The Fe II interaction with crude extract and, the anti-oxidant and tyrosinase inhibitory effects on crude and chloroformic fractions were also evaluated. Further, the phytochemical analysis of the chloroformic fraction was performed.

The chemical screening of the chloroformic and methanolic fractions revealed phenols, flavonoids, catequines and the presence of other components, indicating the special metabolites of the chiquimic acid and acetate metabolic role.

The *T. triangulare* total phenols was determined by colorimetric method according to Folin-Ciocalteu pattern indicating, after statistic treatment, a larger phenols concentration in the hydromethanolic fraction when compared to the crude extract.

UV spectroscopy was used for the evaluation of Fe II complexes formation with polar extract of *T. triangulare* stem. The results were compared to the commercial sample of *Ginkgo biloba*, indicating a similar pattern to the clinically used phytotherapeutic.

The crude extract and hydromethanolic fraction antioxidant assays, performed using the DPPH method. The tyrosinase inhibitory effect was also evaluated indicating the hydromethanolic fraction as more effective, in same way as the antioxidant effect.

The phytochemical study of the chloroformic fraction permitted the isolation and characterization of the methyl octadecanoate (1), and the new (3E)-4-methyl-3-[[[(octanoyloxy)acetyl]oxy]methyl]-3-heptenoic acid (2) and olean-9,12-dien-3-(β -D-glucopyranosyl)-28,29-dimethyl ester (3), by spectroscopic methods such as NMR ^1H and ^{13}C , IR and GC-MS.

Key Words: *Talinum triangulare*, antioxidant activity, acetyloxy acid and espergulagenate.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Gerais de Plantas Invasoras	1
1.2	Generalidades da Família <i>Portulacaceae</i>	3
1.3	Aspectos Gerais de <i>Talinum triangulare</i>	6
1.3.1	Aspectos botânicos da espécie <i>Talinum triangulare</i>	10
1.4	O Uso de Plantas na Prevenção de Doenças	11
1.5	Atividade Antioxidante	14
1.6	Atividade frente à Enzima Tirosinase	17
1.7	Ação complexante, Antioxidante e Inibitória dos Polifenóis frente à Enzima Tirosinase	22
2	OBJETIVOS	25
3	PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1	Equipamentos e Reagentes	26
3.2.	Identificação da espécie <i>Talinum triangulare</i>	27
3.2.1	Preparação do extrato hidrometanólico	27
3.3	Prospecção Química de <i>Talinum triangulare</i>	27
3.4	Análise Espectrofotométrica no Ultravioleta da Solução Metanólica e em PBS do Caule da Fração Hidrometanólica do Caule de <i>Talinum triangulare</i>	28
3.4.1	Preparação da solução em metanol e em PBS do caule seco e moído e da fração hidrometanólica do caule de <i>Talinum triangulare</i>	28
3.4.2	Preparação da amostra comercial de <i>Ginkgo biloba</i> para análise espectrofotométrica	28
3.5	Dosagem de Fenóis Totais	29
3.5.1	Preparação do reagente de Folin-Ciocalteu	29
3.5.2	Preparação da curva padrão	29
3.5.3	Determinação dos fenóis totais	29
3.5.4	Análise estatística da determinação dos fenóis totais	30
3.6	Ensaio da Atividade Antioxidante	30
3.6.1	Preparação das amostras	30
3.6.2	Ensaio fotométrico do DPPH	31
3.6.3	Análise estatística da atividade antioxidante	31

3.7	Atividade Inibitória frente à Enzima Tirosinase	32
3.7.1	Análise estatística da atividade inibitória da enzima tirosinase	32
3.8	Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Caule de <i>Talinum triangulare</i>	33
3.8.1	Isolamento e purificação dos constituintes químicos da fração clorofórmica	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	Avaliação da Prospecção Química das Frações Hidrometanólica e Clorofórmica do Caule de <i>Talinum triangulare</i>	35
4.2	Avaliação da Capacidade de Complexação dos Íons de Fe II com o Caule e a Fração Hidrometanólica do Caule de <i>Talinum triangulare</i>	36
4.3	Determinação dos Fenóis Totais	39
4.4	Atividade Antioxidante	40
4.5	Atividade Inibitória Frente à Enzima Tirosinase	41
4.6	Identificação dos Constituintes Químicos da Fração Clorofórmica do Caule de <i>T. triangulare</i>	44
4.6.1	Identificação da substância 1	45
4.6.2	Identificação da substância 2	50
4.6.3	Identificação da substância 3	57
4.7	Proposta Biossintética para o Triterpeno Isolado	68
5	CONCLUSÃO	71
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

Figura 1.	Espécie <i>Portulaca oleracea</i>	4
Figura 2.	Compostos bioativos glicosilados isolados das partes aéreas de <i>Portulacaceae oleracea</i>	5
Figura 3.	<i>Talinum triangulare</i>	8
Figura 4.	Saponina extraída das raízes de <i>Talinum triangulare</i>	10
Figura 5.	Substâncias naturais de importância econômica e política: brazilina; brasileína; morina; conina	12
Figura 6.	Ginkgolídeos, quercetina e campferol isolados do extrato de <i>Ginkgo biloba</i>	13
Figura 7.	Mecanismo de ação do canferol sobre o radical DPPH	16
Figura 8.	Forma polimérica da melanina	18
Figura 9.	Diferença entre feomelanina e eumelanina	18
Figura 10.	Ação da enzima tirosinase sobre a Tirosina e L-Dopa	19
Figura 11.	As três formas da enzima tirosinase no processo de formação de pigmentação da melanina: metirosinase, oxitirosinase e dioxitirosinase	20
Figura 12.	Rota biossintética de formação da eumelanina envolvendo a enzima tirosinase	21
Figura 13.	Elementos estruturais importantes dos flavonóides para a atividade antioxidante e inibitória frente à enzima tirosinase	24
Figura 14.	Efeito hiperacrômico dos complexos Fe II/caule moído de <i>T. triangulare</i> em OH e Fe II/ folhas de <i>Ginkgo</i> em MeOH	37
Figura 15.	Efeito hiperacrômico dos complexos Fe II + caule moído de <i>T. triangulare</i> em PBS e Fe II + folhas de <i>Ginkgo</i> em PBS	37
Figura 16.	Efeito batocrômico dos complexos Fe II + fração hidrometanólica de <i>T. riangularre</i> e Fe II + extrato de <i>Ginkgo</i>	38
Figura 17.	Gráfico representando a curva de calibração do ácido gálico	39
Figura 18.	Gráfico % AA x (µg/mL) após tratamento estatístico para avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH	41
Figura 19.	Gráfico obtido da absorvância x concentração de amostra (µg/mL), para avaliação da atividade inibitória da enzima tirosinase	42
Figura 20.	Potencial inibitório do ácido ascórbico e da fração hidrometanólioca frente a enzima tirosinase	43
Figura 21.	Diferentes concentrações do potencial inibitório da fração	

	hidrometanólica (TTCM2) frente a enzima tirosinase	43
Figura 22.	Espectro IV da substância 1	45
Figura 23.	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da substância 1	46
Figura 24.	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, CDCl ₃) da substância 1	47
Figura 25.	Espectro de massas da substância 1	49
Figura 26.	Proposta de fragmentação da substância 1	49
Figura 27.	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, MeOD) da substância 2	51
Figura 28.	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, MeOD) da substância 2	52
Figura 29.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, MeOD) da substância 2	52
Figura 30.	Espectro bidimensional da correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (¹ H- ¹ H-COSY, 400 MHz) em MeOD da substância 2	53
Figura 31.	Espectro de massas e cromatograma da substância 2	55
Figura 32.	Proposta de fragmentação da substância 2	56
Figura 33.	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, MeOD) da substância 3	58
Figura 34.	Expansão do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, MeOD) da substância 3	58
Figura 35.	Espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, MeOD) da substância 3	60
Figura 36.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, MeOD) da substância 3	60
Figura 37.	Expansão do espectro de RMN ¹³ C (50 MHz, MeOD) da substância 3	61
Figura 38.	Parte A do composto 3 comparada com o ácido olean-12-en-3-(β-D-glicopiranosil)-28,29-dimetil	62
Figura 39.	Parte B do composto 3 comparada com o 3β, 16β-diacetoxiurs-9(11),12-dieno	63
Figura 40.	Parte C do composto 3 comparada com ácido olean-12-en-3-(β-D-glicopiranosil)-28,29-dimetil	64
Figura 41.	Espectro de massas da substância 3	65
Figura 42.	Proposta de fragmentação da substância 3	66
Figura 43.	Conversão do acetil-CoA em AMV. Enzimas: A-acetoacetil CoA tiolase; B MG-CoA sintase; C-HMG-CoA redutase	68
Figura 44.	Conversão do AMV em IPP. Enzimas: D- AMV quinase; E-mevalonato-5-fosfato quinase; F-mevalonato5-difosfato quinase	69
Figura 45.	Isomerização do IPP e reações através de prenil transferase. Enzimas A-IPP isomerase; B-prenil transferase	69

Figura 46. Proposta biossintética para o terpeno Olean-9,12-dien-3-(β -D-glicopiranosil), 28,29-dimetil éster isolado

70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Espécies do gênero <i>Talinum</i>	06
Tabela 2.	Informação nutricional da <i>T. triangulare</i>	09
Tabela 3.	Taxonomia de <i>Talinum triangulare</i>	10
Tabela 4.	Registro dos resultados da prospecção química da espécie <i>T. triangulare</i>	35
Tabela 5.	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 1 comparados com a literatura (PEREIRA Jr <i>et al.</i> , 1990)	48
Tabela 6.	Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C em MeOD da substância 2	54
Tabela 7.	Dados de RMN ^1H da substância 3 comparados com dados da literatura (LIMA <i>et al.</i> , 2004)	59
Tabela 8.	Dados de RMN ^{13}C da parte A da substância 3 comparados com dados da literatura (KOHDA <i>et al.</i> , 1992, VIANA <i>et al.</i> , 2004 e KIYOTA <i>et al.</i> , 2007)	62
Tabela 9.	Valores dos deslocamentos químicos atribuídos para a parte B de 3 em comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994 e LIMA <i>et al.</i> , 2004)	63
Tabela 10.	Valores dos deslocamentos químicos atribuídos para a parte C de 3 em comparação com dados da literatura (KOHDA <i>et al.</i> , 1992)	64

LISTA DE ESQUEMA

- Esquema 1.** Isolamento das substâncias 1-3 a partir da fração clorofórmica do caule de *T. triangulare* 34

LISTA DE ABREVIÇÕES

1D	unidimensional
2D	bidimensional
δ	deslocamento químico (ppm)
ν	estiramento
%AA	% da atividade antioxidante
AcOEt	acetato de etila
CC	cromatografia em coluna
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada preparativa
CDCl_3	clorofórmio deuterado
CD_3OD	metanol deuterado
CHCl_3	clorofórmio
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
cm	centímetro
COSY	COrrrelation SpectroscopY
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DPPH	2,2-difenil-picril-hidrazila
EC	Enzyme Collection
EM	espectrometria de massas
F	fração
g	gramas
Hex.	hexano
Hz	hertz
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
KBr	brometo de potássio
Kg	quilograma
m	múltiplo
M^+	íon molecular
MeOH	metanol
mg	miligrama

mL	mililitro
MHz	megahertz
mm	milímetro
m/z	relação massa/carga
nm	nanômetro
PBS	phosphate buffer saline
ppm	partes por milhão
q	quarteto
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
s	singleto
sl	singleto largo
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRRJ	Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais de Plantas Invasoras

Planta invasora é qualquer espécie não natural introduzida a um ecossistema e que nele se naturaliza, dispersando e alterando o espaço das plantas nativas (ZILLER, 2000).

O conhecimento da flora invasora de uma cultura é de importância capital para o equacionamento das medidas de controle. Este conhecimento, porém, não deve se limitar à identificação das espécies, mas sim, abranger dados biológicos, assim como de distribuição geográfica e ecologia das invasoras (ARANHA *et al.*, 1988)

O potencial das espécies invasoras em alterar sistemas naturais é extremamente significativo, sendo que elas são atualmente consideradas a segunda maior ameaça mundial à biodiversidade, só perdendo para a destruição de habitat pela exploração humana direta. A maior parte dos problemas ambientais é absorvida pelo próprio sistema e seus impactos são amenizados com o tempo, o que não ocorre com os processos de invasão, ao contrário, eles intensificam-se à medida que as invasoras ocupam cada vez mais o espaço das plantas nativas. As principais consequências são as perdas da biodiversidade e a modificação dos ciclos e características naturais dos ecossistemas atingidos, além da alteração fisionômica da paisagem natural, com certos prejuízos econômicos (ZILLER, 2000).

Certos ambientes parecem ser mais suscetíveis à invasão que outros. Alguns fatores são levados em consideração para explicar tal fato, tais como: quanto menor a diversidade e a riqueza natural de um ecossistema, mais suscetível à invasão ele seria, por apresentar funções ecológicas ainda não supridas (o que seria realizado pelas invasoras); as espécies invasoras, livres dos competidores, predadores e parasitas de suas áreas de origem, teriam vantagens competitivas em relação às nativas; quanto maior o grau de perturbação do ecossistema, mais fácil seria à dispersão e o estabelecimento de invasoras, em especial quando há redução da diversidade natural pela extinção de espécies ou devido à exploração excessiva; práticas erradas de manejo, como retirada de florestas, queimadas para preparo de terra, erosão e pastoreio excessivo contribuem para perda e fragilidade do meio a invasões. Ambientes abertos, como campos e cerrados, tendem a ser mais facilmente invadidos por espécies arbóreas que áreas florestais (<http://members.tripod.co.uk>).

Entre as características que ampliam o potencial de invasão de uma planta, estão à produção de sementes pequenas e em grande quantidade, com dispersão eficiente (em especial pelo vento) e alta longevidade do solo. Outros fatores favoráveis são: o crescimento rápido,

maturação precoce, reprodução realizada também por brotação, floração e frutificação mais longas, adaptação a áreas degradadas, eficiência reprodutiva e liberação de toxinas capazes de impedir o crescimento de outras plantas nas imediações (alelopatias) (ZILLER, 2000).

A invasão por plantas exóticas, por exemplo, tende a alterar propriedades ecológicas essenciais, como ciclo de nutrientes, produtividade, cadeias tróficas, estrutura da comunidade vegetal (densidade e dominância), distribuição da biomassa, taxas de deposição, processos evolutivos e relações entre plantas e polinizadores. Podem também modificar o ciclo hidrológico e o regime de incêndios, levando a seleção das espécies e em geral, ao empobrecimento do ecossistema (<http://members.tripod.co.uk>).

No Brasil, com uma flora exuberante e muito rica, o conhecimento das plantas invasoras é muito restrito. Sabe-se que o montante dos prejuízos ocasionados pelas plantas invasoras é indubitavelmente bem maior em áreas temperadas, não só pelo acentuado número de espécies presentes, mas, principalmente, pela precariedade dos meios de controle (ARANHA *et al.*, 1988).

Entre as espécies de árvores conhecidas como invasoras no Brasil, estão presentes alguns pinheiros (*Pinus elliotti* e *P. taeda*), a casuarina (*Casuarina equisetifolia*), o cinamomo (*Melia azedarach*), a uva-do-japão (*Hovenia dulcis*), o amarelinho (*Tecoma stans*), a vassoura vermelha (*Dodonaea viscosa*) e o alfeneiro (*Ligustrum japonicum*) (ZILLER, 2000).

Diversos aspectos são levados em consideração no momento de se classificar uma planta invasora. Um primeiro modo é classificá-lo quanto ao ciclo, assim elas seriam classificadas em anuais, bianuais e perenes (ARANHA *et al.*, 1988).

As anuais são aquelas que germinam, crescem, florescem, frutificam, produzem sementes e morrem no prazo máximo de um ano. As bianuais são plantas que se desenvolvem vegetativamente no primeiro ano e se reproduzem e morrem no segundo ano. As perenes são efetivamente invasoras de maior dificuldade no controle, embora não sejam as mais nocivas de modo geral. Podem ser subdivididas em perenes simples, que se reproduzem por sementes, por rizomas ou estolões, e perenes bulbosas, que se reproduzem por bulbos e ocasionalmente por sementes (ARANHA *et al.*, 1988).

No Brasil é fácil observar certa especificidade na composição florística de áreas utilizadas por anos seguidos com a mesma cultura. Um exemplo deste fato ocorre com a cultura algodoeira. Ao ser instalada uma cultura de algodão em área virgem, durante os primeiros anos de cultivo observa-se que a flora invasora é aquela comum da região. Entretanto, com a continuidade do cultivo por mais alguns anos, as condições tornam-se

propícias para determinadas espécies de invasoras, tais como: *Acanthospermum hispidum* DC., *Acanthospermum australe* (Loef.), *Cenchrus echinatus* L. e algumas outras menos expressivas. Um outro exemplo de especialidade de flora invasora ocorre na cultura cafeeira, onde as condições de meia-sombra existentes no interior da cultura favorecem grandemente a algumas espécies, tais como: *Amaranthus hybridus* L., *Portulaca oleracea* L. e *Tradescantia* spp., que são conhecidas por “trapoerabas” (ARANHA *et al.*, 1988).

1.2 Generalidades da Família *Portulacaceae*

Diante do contexto de plantas invasoras, destacou-se a família *Portulacaceae*, à qual pertence a planta estudada nesta Dissertação de mestrado, onde a maioria dos seus representantes é constituída por ervas anuais e carnosas, possuindo aproximadamente trinta gêneros e cerca de quinhentas espécies, predominando em regiões tropicais e subtropicais, principalmente africanas e americanas, podendo ocasionalmente ser encontradas algumas espécies na Europa, Ásia e Oceania. (RODRIGUES & FURLAN, 2003).

O gênero *Portulaca* é um dos mais numerosos desta família, com cerca de duzentas espécies de plantas rasteiras, suculentas anuais e bianuais, distribuídas nos trópicos e subtropicais, principalmente nas Américas, África e Austrália (RODRIGUES & FURLAN, 2003)

Neste gênero encontra-se a espécie *Portulaca oleracea* L. (**Figura 1**), conhecida popularmente no Brasil como beldroega-de-comer, beldroega-de-horta, beldroega-pequena, beldroega-vermelha, bredo, bredo de porco, caaponga, porcelana, salada de negro e verdolaca (www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm), (www.naturalnet.com.br/generos/Talinum.html), sendo as mais utilizadas na alimentação e na medicina popular, bem como uma das mais estudada e reportada na literatura.



Figura 1: Espécie *Portulaca oleracea* (<http://forum.funghiitaliani.it/indes>).

É uma planta anual, herbácea, carnosa e ramificada. Apresenta às vezes caules avermelhados, pela presença de antocianina, que dá cor às folhas, flores e frutos desses vegetais. As flores situam-se no ápice dos ramos e apresentam coloração amarela (www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm).

A beldroega ela foi uma das primeiras “verdura” utilizada pelo homem, tendo sido cultivada pelos antigos egípcios e também por milhares de anos na Índia e China. Durante a colonização dos Estados Unidos, foi intensamente consumida pelos pioneiros. Atualmente a França é o maior produtor europeu e também o maior consumidor da planta (www.ceunossasenhoradaconceicao.com.br/plantas/planta.asp).

A *Portulaca oleracea* foi pela primeira vez descrita na literatura médica chinesa no ano 500 a.C.. Na medicina popular, a erva era usada por ingestão para disenteria, enterite aguda, apendicite, mastite, hemorróidas e sangramento pós-parto e uso tópico para queimaduras, picadas de serpente e insetos, e eczema (www.ceunossasenhoradaconceicao.com.br/plantas/planta.asp). Recentes estudos mostram que o seu extrato pode ser utilizado no tratamento contra o câncer (SEO *et al.*, 2003).

Ao longo dos séculos, foi empregada na cura do escorbuto. Sua mucilagem (substância viscosa) confere-lhe virtudes emolientes, tanto para uso interno quanto externo (tumores) e uma recente pesquisa mostrou que também é uma rica fonte de ácidos gordurosos do tipo omega-3, os quais são considerados muito importantes para a prevenção de ataques cardíacos e fortalecedores do sistema imunológico (www.ceunossasenhoradaconceicao.com.br/plantas/planta.asp).

Na culinária essa planta pode ser aproveitada quase que totalmente, com exceção das raízes que são amargas e duras. O caule e as folhas são crocantes e têm sabor agridoce. As folhas podem ser cozidas e consumidas como legumes, conservadas em vinagre, mas sem consumo exagerado, pois essa espécie pode acumular oxalatos, que são substâncias tóxicas (www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm).

A *Portulaca oleracea* contém muitos compostos biologicamente ativos e é uma fonte de diversos nutrientes, sendo rica em proteínas, vitaminas A, B e C, cálcio, fósforo e ferro (www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm). A quantidade desses compostos pode variar com as especificidades do plantio (por exemplo, data do plantio, qualidade do solo e fertilização) e a idade da planta. Apresenta algumas substâncias, tais como: alanina, alcalóides, oxalato de cálcio, beta-cianina, ácido linoléico, ácido oléico, norepinefrina, valina, lisina, oxalatos, noradrenalina, flavonóides, glicosídeos da antraquinona, etc. (www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/poltula.html).

Estudo fitoquímico realizado recentemente com as partes aéreas dessa verdura, onde o extrato bruto foi submetido à cromatografia *flash* a vácuo e purificação por HPLC, possibilitou isolar dois novos compostos bioativos glicosilados de origem natural o 3-hidroxi-1-(2-hidroxietil)-fenil-4-O-β-D-glicopiranosídeo (**1**) e 2-hidroxi-1-(3,4-Dihidroxifenil)-etil-4-O-β-D-glicopiranosídeo (**2**) (**Figura 2**) (SEO *et al.*, 2003).

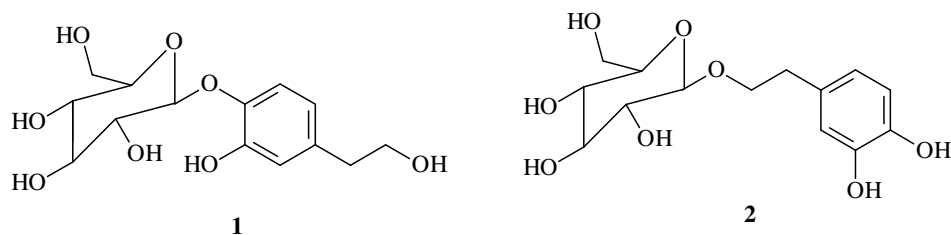


Figura 2: Compostos bioativos glicosilados isolados das partes aéreas de *Portulaca oleracea* (SEO *et al.*, 2003).

1.3 Aspectos Gerais de *Talinum triangulare*

Dentro do contexto de plantas invasoras, foi destacado a família *Portulacaceae*, à qual pertence a planta estudada nesta Dissertação de mestrado destacando o gênero *Talinum* que inclui cerca de cinquenta espécies distribuídas nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas do mundo (www.plantamed.com.br/gen/talinum.htm). Podendo citar a espécie *Talinum triangulare* que tem como sinônimo *Talinum fruticosum* auct. non (L.) Juss. (www.prota.org), sendo conhecida popularmente no Brasil como João Gomes, língua de vaca, major gomes, manjogomes e caruru do Pará (www.saude.gov.br).

Algumas espécies deste gênero e o ano em que foram identificadas estão indicados na **Tabela 1**, destacando-se a espécie estudada neste trabalho a *T. triangulare* (**Figura 3**).

Tabela 1. Espécies do gênero *Talinum* (www.plantamed.com.br/gen/talinum.htm).

Espécie	Ano da Identificação
<i>Talinum album</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum andrewsii</i> Sweet.	1826
<i>Talinum angustissimum</i> (Engelm.) Wooton & Standl.	1913
<i>Talinum appalachianum</i> W. Wolf.	1939
<i>Talinum attenuatum</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum calcaricum</i> S. Ware.	1967
<i>Talinum chrysanthum</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum ciliatum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum denticulatum</i> Poelln.	1933
<i>Talinum dichotomum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum dinteri</i> von Poellnitz	-
<i>Talinum esculentum</i> (Dinter & Schellenberg) Hedw.	-
<i>Talinum fallax</i> Poelln.	1933
<i>Talinum fruticosum</i> Willd.	1800
<i>Talinum galapagosum</i> (H. St. John) Hershkovitz.	1991
<i>Talinum gracile</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum humile</i> Greene.	1881
<i>Talinum longipes</i> Wooton & Standl.	1913
<i>Talinum marginatum</i> Greene.	1912

<i>Talinum mengesii</i> W. Wolf.	1920
<i>Talinum monandrum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum moritziana</i> Kl. ex Rohrb. in Mart.	1872
<i>Talinum napiforme</i> DC.	1828
<i>Talinum nocturnum</i> Bacigalupo.	1993
<i>Talinum okanoganense</i> English.	1934
<i>Talinum palmeri</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	1791
<i>Talinum paraguayense</i> Speg.	1921
<i>Talinum parvulum</i> Rose & Standl.	1911
<i>Talinum patens</i> (L.) Willd.	1799
<i>Talinum polygaloides</i> Gillies ex Arn.	1831
<i>Talinum portulacifolium</i> (Forssk.) Asch. ex Schweinf.	1896
<i>Talinum pulchellum</i> Wooton & Standl	1913
<i>Talinum pygmaeum</i> A. Gray.	1862
<i>Talinum racemosum</i> (L.) Rohrb.	1872
<i>Talinum revolutum</i> Kunth.	1823
<i>Talinum rosei</i> P. Wilson.	1932
<i>Talinum rugospermum</i> Holz.	1899
<i>Talinum sarmentosum</i> Engelm.	1850
<i>Talinum teretifolium</i> Pursh.	1814
<i>Talinum thompsonii</i> N.D. Atwood & S.L. Welsh.	1985
<i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd.	1799
<i>Talinum trichotomum</i> Desf.	1804
<i>Talinum tuberosum</i> (Benth.) P. Wilson.	1932
<i>Talinum umbellatum</i> Ruiz & Pav.	1798
<i>Talinum validulum</i> Greene.	1912
<i>Talinum wayae</i> Eastw	1934
<i>Talinum whitei</i> I.M. Johnst.	1940



Figura 3: *Talinum triangulare* (www.biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/2/)

A *T. triangulare* é uma planta perene geralmente encontrada em ambientes tropicais, adaptando-se bem ao tempo quente e úmido local, assim como à baixa fertilidade do solo, o que faz do seu cultivo uma atividade econômica importante para pequenos produtores, já que não requer alto custo para sua produção (http://ibws.nexenservices.com/talinum_triangulare.htm).

A *T. triangulare* é cultivada também na África Ocidental, na Ásia (Índia, Indonésia e Malásia) e na América do Sul (Peru) (http://ibws.nexenservices.com/talinum_triangulare.htm). Na Nigéria esta espécie é um importante vegetal cultivado para a alimentação, devido ao seu baixo custo e a não utilização de fertilizantes, como em outros cultivos agrícolas. Além disso, muitos depósitos de lixo têm sido convertidos em jardins de cultivo para essa planta, especialmente em cidades onde a sua demanda é alta (ADENNIYI; 1996).

No Brasil, é consumida, principalmente, na região norte, em especial, nos estados do Amazonas e do Pará, devido ao seu alto teor nutritivo (**Tabela 2**), podendo ser utilizada na alimentação infantil como substituto do espinafre (*Spinacea oleracea*) (RODRIGUES & FURLAN, 2003).

Tabela 2. Informação nutricional da *T. triangulare* (www.prota.org, www.pt.wikipedia.org/wiki/espinafre)

Informação Nutricional	Quantidade por porção de 100 g de <i>Talinum triangulare</i>	Quantidade por porção de 100 g de <i>Spinacea oleracea</i>
Valor energético	25 Kcal	20 Kcal
Água	90,8 g	91,0 g
Proteína	2,4 g	2,3 g
Carboidrato	4,4 g	-
Fibra	1,0 g	-
Ca	121 mg	80 mg
P	67 mg	40 mg
Fe	5,0 mg	3,0 mg
Tiamina	80 µg	105 µg
Riboflavina	180 µg	305 µg
Ácido ascórbico	31 mg	15 mg
Vitamina A	9 mg (retinol)	2,2 mg (retinol)

T. triangulare tem sido utilizada na medicina tradicional como tônico fortificante na Indonésia. Das raízes desta planta foram isoladas duas saponinas, uma delas foi identificada como “chikusetsusaponina IVa”, a outra é uma nova saponina proveniente do ácido oleanólico originado das raízes de *Panax ssp.* Esta saponina foi identificada através de análises espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C sendo elucidada como β-D-glicopiranosil-metil-spergulagenato-3-O-β-D-glucuronopiranosídeo (**Figura 4**) (KOHDA *et al.*; 1992).

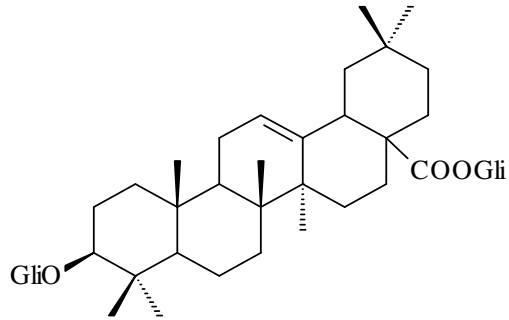


Figura 4: Saponina extraída das raízes de *Talinum triangulare* (KOHD *et al.*, 1992).

1.3.1 Aspectos botânicos da espécie *Talinum triangulare*

É uma espécie herbácea, ereta (80-100 cm de altura), caule suculento, obtuso, folhas alternadas, simples, suculentas, sem estípulas, flores bissexuadas, regulares, pedicelo longo, duas sépalas e cinco pétalas de cor rosa, ovário superior, frutos com muitas sementes de cor preta brilhante (www.prota.org). A taxonomia apresentada pela *T. triangulare* está apresentada na **Tabela 3**.

Tabela 3. Taxonomia de *Talinum triangulare*.

Reino: Plantae
Filo: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordem: Caryophyllales
Família: Portulacaceae
Gênero: <i>Talinum</i>
Espécie: <i>Talinum triangulare</i> (Jacq.) Willd

1.4 O Uso de Plantas na Prevenção de Doenças

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos muito antigos. A busca da cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (<http://www.achetudoergiao.com.br> e SANTOS *et al.*, 1998).

A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (SANTOS *et al.*, 1998).

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico, mesmo após o avanço tecnológico observado nos dias de hoje (VIEGAS *et al.*, 2006).

Um exemplo marcante de produtos naturais que causaram grande impacto na humanidade, e que de certa forma modificou o comportamento do homem moderno, foi à descoberta das substâncias alucinóginas. Os povos antigos utilizavam largamente bebidas alucinóginas em suas práticas religiosas e mágicas (HOSTETTMAM *et al.*, 2003). Na Grécia antiga, extratos de vegetais eram utilizados em execuções, como no caso de Sócrates, que morreu após a ingestão de uma bebida à base de cicuta, que continha a conina (**Figura 5**) (VIEGAS *et al.*, 2006).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores. Os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, diante da escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, muito cedo foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas (PINTO *et al.*, 2002).

Os viajantes sempre se abasteciam destes remédios antes de excursionarem por regiões pouco conhecidas. A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais (as especiarias), os quais determinaram as várias disputas de posse da nova terra e, por fim, a colonização portuguesa. Do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era obtido um corante de cor vermelho, o qual era muito utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média para tingir roupas, e também como tinta de escrever. Do lenho do pau-brasil era extraído a brazilina, um derivado catecólico que facilmente oxidava à brazileína, um fenoldienônico identificado como corante (**Figura 5**) (SANTOS *et al.* 1998).

Neste sentido, além do pau-brasil, que foi extraído de forma predatória do nosso território até quase sua extinção, muito outros produtos despertaram interesse por parte dos europeus que aportaram na terra recém-descoberta. A morina (**Figura 5**), obtida de *Chlorophora tinctoria*, foi outro corante natural exportado para a Europa, permanecendo em destaque no comércio até o desenvolvimento da química das anilinas na Alemanha e, até hoje é utilizada como indicador de açúcares em cromatografia em camada delgada (SANTOS *et al.*,1998).

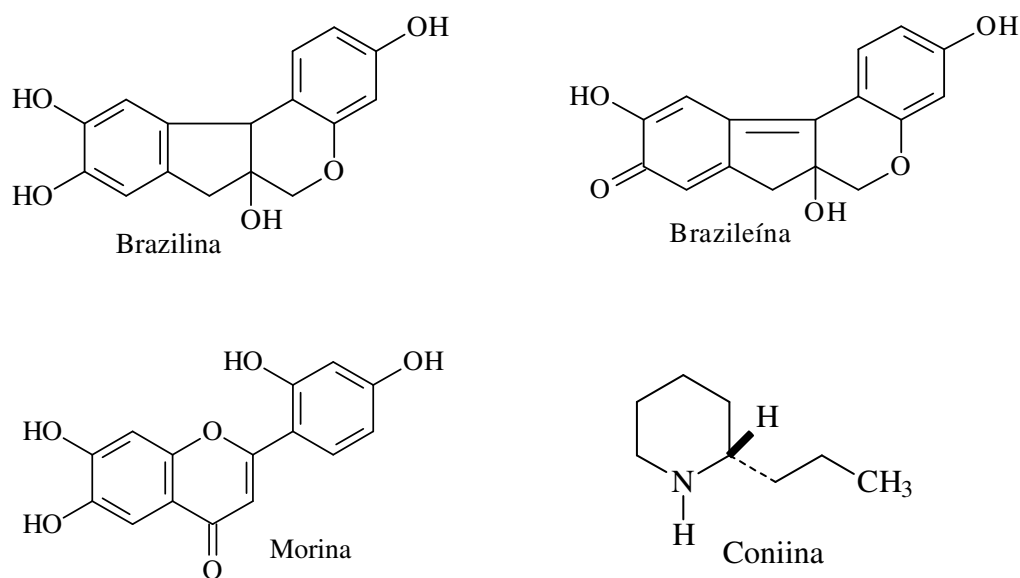


Figura 5: Substâncias naturais de importância econômica e política: brazilina; brazileína; morina; coniina (VIEGAS *et al.*, 2006 e SANTOS *et al.*,1998).

Podemos citar ainda o *Ginkgo biloba* que é um exemplo clássico utilizado na medicina chinesa. Esta espécie vegetal apresenta terpenos polioxigenados e seu extrato é utilizado no tratamento de problemas vasculares cerebrais e de memória já que possui propriedades neuroprotetoras (NAKANISHI, 2005). Do extrato dessa planta foram isolados os ginkgolídeos - A, B, C e M e os flavonóides quercetina e campferol (**Figura 6**) (BARA *et al.*, 2004).

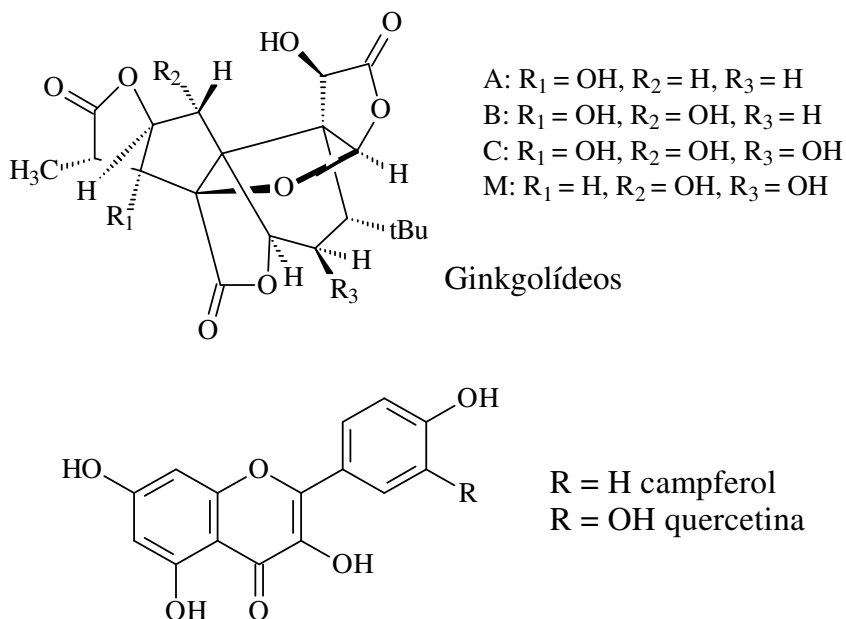


Figura 6: Ginkgolídeos, quercetina e campferol isolados do extrato de *Ginkgo biloba*.

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. No início da década de 1990 a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VIEGAS *et al.*, 2005).

Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais, onde preparações vegetais são comercializadas com rotulagem industrializada. Em geral, essas preparações não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa (VIEGAS *et al.*, 2005)

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes (VIEGAS *et al.*, 2005). Em 1995, o consumo de medicamentos caiu a níveis

alarmantes. Pesquisa SOS FARMA, descobriu que de 4000 famílias pesquisadas, 91,9% se automedicavam com ervas e 46,6% cultivavam nos seus quintais. Dados da Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica apontam que as vendas de medicamentos sintéticos cresceram 16% neste ano, enquanto o consumo de fitoterápicos subiu 20% (<http://www.achetudoergiao.com.br>).

1.5 Atividade Antioxidante

Há um grande número de relatos, nos últimos anos, sobre agentes antioxidantes e sua ação variada em algumas doenças. A grande maioria desses estudos tem se referido aos antioxidantes polifenólicos, por serem estes ativos em doenças crônicas degenerativas (MENSOR *et al.*, 2001). O uso de antioxidantes polifenólicos derivados de alimentos tem sido descrito, porém os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não são muito claros.

Em geral, antioxidantes são substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outros oxidantes (SOUSA *et al.*, 2007).

O papel dos radicais livres nos processos patológicos e de envelhecimento vem tornado-se uma área de grande interesse. Vários estudos têm sido enfatizados devido ao grande número de doenças causadas pelos radicais livres, dos quais podemos destacar: câncer, doenças vasculares, degeneração muscular, inflamações gastrointestinais, processos inflamatórios dentre outras (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004). As espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente formadas no organismo, estimando-se que cerca de 5% de todo oxigênio inspirado transforma-se em ERO. Estas espécies químicas, geralmente são inativadas pelas defesas antioxidantes do organismo (DANIEL, 2004).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA *et al.*, 2007).

Dentre a classe de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm chamado atenção, devido às suas propriedades redutoras e a sua função

química. Essas características desempenham papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA *et al.*, 2007).

Considerando diversos fatores estruturais das substâncias fenólicas, podemos tomar como exemplo os flavonóides, onde estudo realizado com esta classe mostrou a importância estrutural desses compostos na ação inibitória de radicais livres. Comparando as estruturas dos diferentes flavonóides podemos sugerir que os grupos hidroxila no anel C têm grande importância sobre a atividade seqüestradora de radicais. O método baseado na captura do radical livre 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH), utiliza-se para avaliar a habilidade dos flavonóides de transferir átomos de H para o radical. O canferol foi utilizado como exemplo para mostrar o mecanismo de ação do flavonóide sobre o radical DPPH, no qual podem ser observadas na **Figura 7**. Duas etapas distintas de reação foram observadas, a primeira rápida e a segunda mais lenta. O estágio rápido poderia ser possivelmente atribuído à presença da hidroxila em *para* no anel B, muito reativa, em tal caso a reação entre o flavonóide e o DPPH produz a quinona que é menos ativa (TSIMOGINIANNIS & OREOPOULOU, 2005).

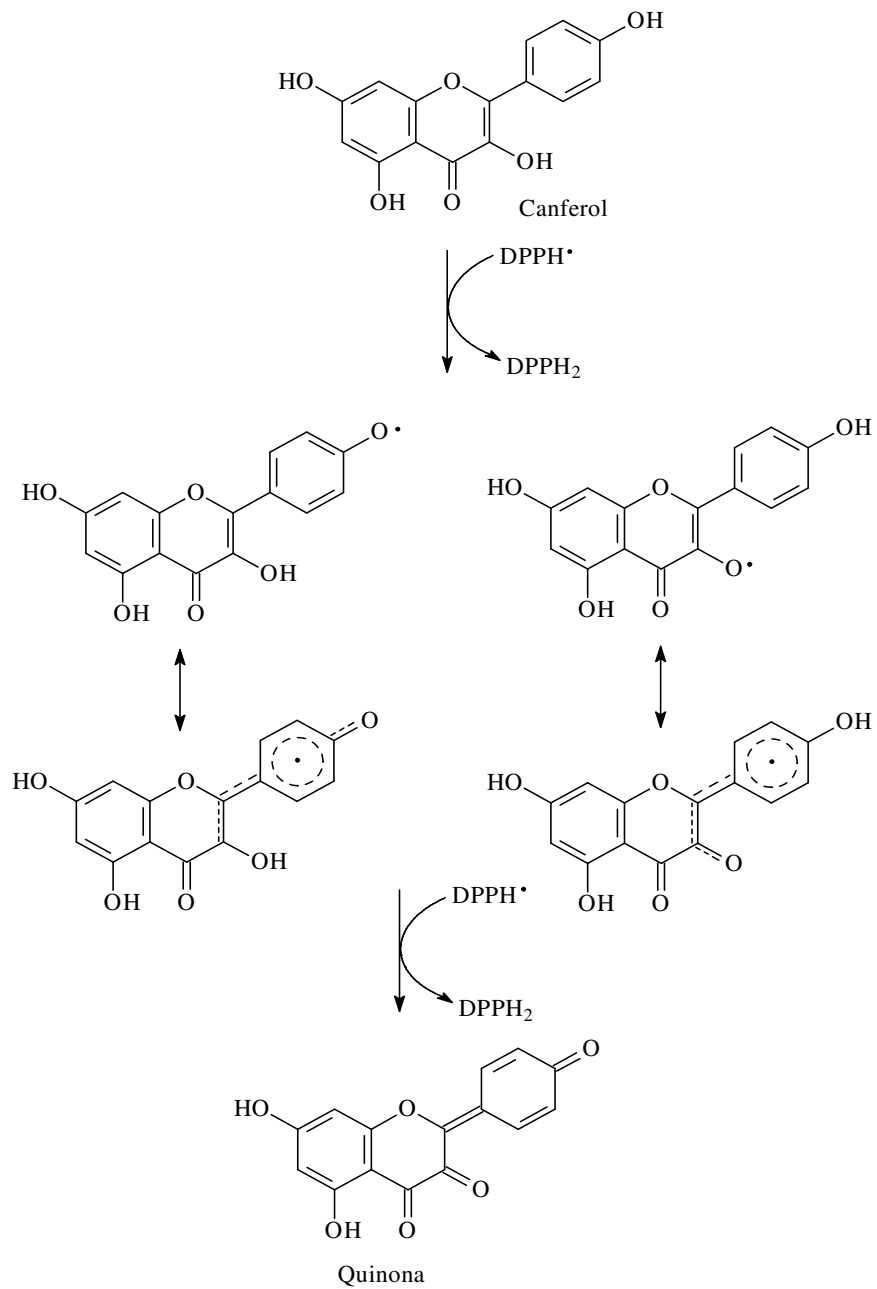


Figura 7: Mecanismo de ação do canferol sobre o radical DPPH (TSIMOGINIANNIS & OREOPOULOU, 2005)

1.6 Atividade frente à Enzima Tirosinase

A finalidade de emprego de fármacos sobre a pele pode ter o intuito de preservar suas características naturais, através de uma ação curativa ou, então a modificação da mesma, a fim de atender apelos estéticos. Um fator de preocupação e responsável pelas diferenças de tonalidades de pele são as discromias (toda e qualquer alteração patológica na cor da epiderme), que podem ser representadas por manchas mais escuras (hipercromias). A excessiva pigmentação na superfície da pele pode apresentar-se na forma de melasma, aparecimento de manchas causadas pela idade e também pela intensa exposição ao sol (raios UVA e UVB) dentre outras formas (CONCHOROSKI & CÔRREA, 2005).

A hiperpigmentação ocorre devido ao aumento da atividade da enzima tirosinase e do aumento do número de melanócitos (células onde ocorre a formação da melanina). Várias são as causas para o desenvolvimento da hiperpigmentação nos quais são: distúrbios hormonais, alergias, exposição aos raios UVA e UVB (CONCHOROSKI & CÔRREA, 2005).

A melanina é originada da oxidação da tirosina pela enzima tirosinase para dihidroxifenilalanina (DOPA), dentro de células especializadas denominadas melanócitos (derivada do grego melas: preto) e se constitui como polímero protéico (www.texascollaborative.org/.../topic3.htm) (**Figura 8**). Eumelaninas possuem alto peso molecular tendo uma coloração negro e marrom, e as feomelaninas são polímeros de coloração amarelo e marrom- avermelhado (MURRAY *et al.*, 1990). São encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais (**Figura 9**). Nos mamíferos, a melanina, tem o papel de determinar a cor da pele e dos cabelos, além de remover espécies reativas oxigenadas (ROS) da pele protegendo-a contra os raios U.VA e U.VB (KIM & UYAMA, 2005)

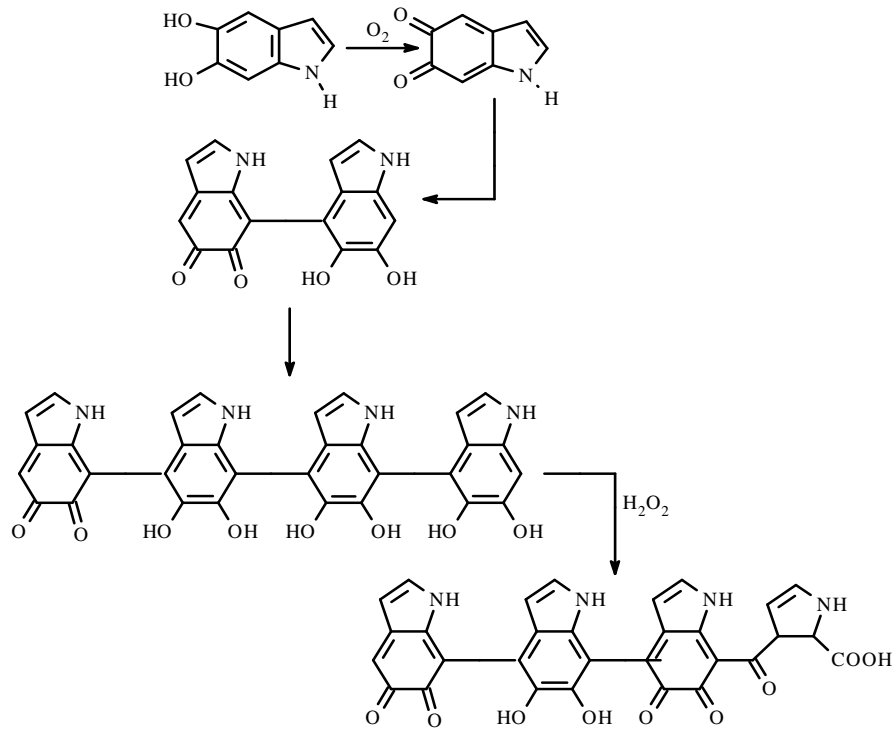


Figura 8: Forma polimérica da melanina
 (www.associazionefiorentinaornitologica.it/Art...).

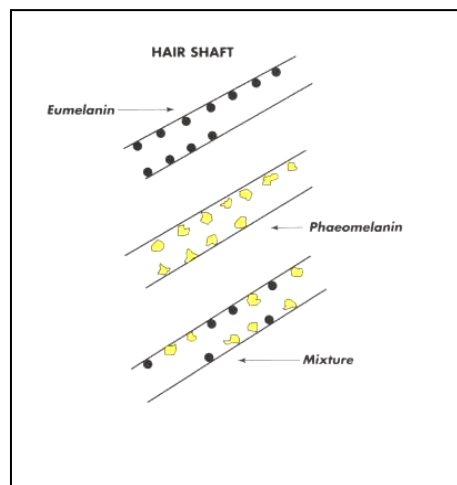


Figura 9: Diferença entre feomelanina e eumelanina
 (www.texascollaborative.org/.../topic3.htm).

O aparecimento de cores marrons decorrentes do processo enzimático em derivados de legumes e frutas, levando a diminuição de sua qualidade sabor e custo, é um fator que tem encorajado a indústria de alimentos e alguns grupos de pesquisa na busca novos potentes inibidores que a atuem de forma preventiva contra estes fatores (LEE, 2002).

O escurecimento dos alimentos e das plantas ocorre devido à presença do oxigênio proveniente da ação da enzima tirosinase que oxida alguns compostos fenólicos (L-DOPA) formando substâncias (quinonas) (LEE, 2002).

O processo enzimático fundamental de escurecimento é a transformação do difenol, assim como a L-Dopa, para a correspondente quinona. Quinonas são fortemente eletrofílicas, por isso podem sofrer ataques nucleofílicos da água, de alguns polifenóis, aminoácidos e proteínas (**Figura 10**). São substâncias que possuem sabor desagradável e ajudam no apodrecimento das frutas e legumes (KIM & UYAMA, 2005).

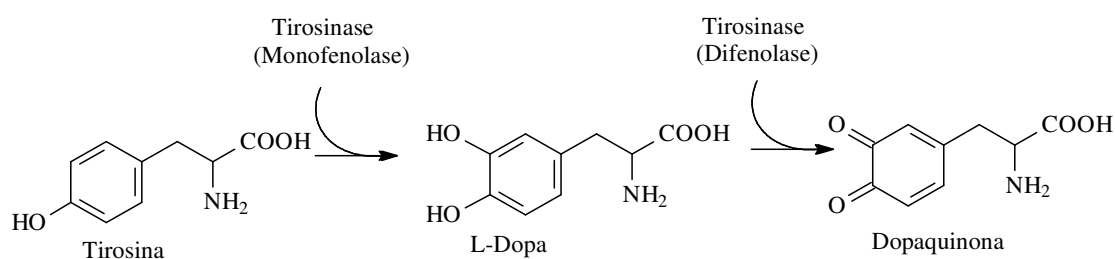


Figura 10: Ação da enzima tirosinase sobre a tirosina e L-Dopa (KIM & UYAMA, 2005).

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é a enzima chave envolvida na síntese da melanina (**Figura 10**) e é responsável pelo o escurecimento (cor marrom) nas frutas e nos vegetais, em plantas protegendo os ferimentos contra a ação dos insetos e patógenos (SHIMIZU *et al.*, 1999).

Na formação da pigmentação da melanina a tirosinase se apresenta de três formas diferentes que é a metirosinase, oxirosinase e dioxitirosinase (**Figura 11**).

A metirosinase é a forma sustentável da enzima, contém uma geometria tetragonal com dois íons de Cu (II) (antiferromagnético), que permite a ligação em ponte de outros ligantes como peróxidos ou compostos hidroxilados (KIM & UYAMA, 2005).

A oxirosinase possui geometria e estrutura eletrônica que são a chave para o entendimento da hidroxilação química da tirosinase. Consiste em dois átomos de Cu (II) e uma estrutura geométrica tetragonal, que possui unida duas ligações fortes com a histidina

(N), enquanto o oxigênio está ligado aos átomos de Cu na forma de peróxido, e ainda duas ligações coordenadas com moléculas de água (KIM & UYAMA, 2005).

A dioxitirosinase tem uma estrutura de bi-cobre [Cu (I) – Cu (I)], e o seu sítio ativo permite formar ligações em ponte com hidroxilas provenientes da água, uma situação parecida com que acontece com a metirosinase (KIM & UYAMA, 2005).

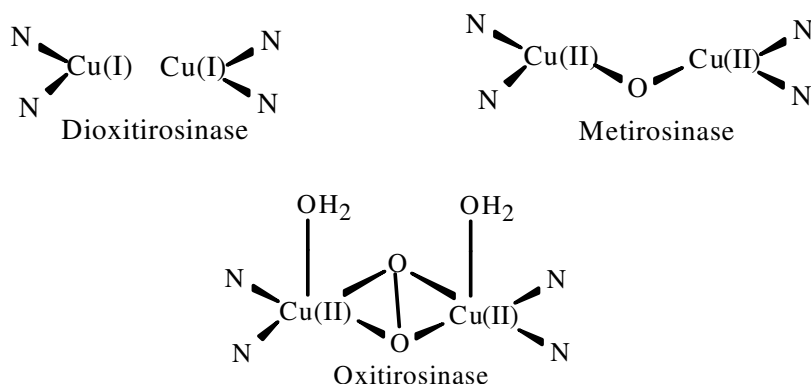


Figura 11. As três formas da enzima tirosinase no processo de formação de pigmentação da melanina: metirosinase, oxitirosinase e dioxitirosinase (KIM & UYAMA, 2005).

O processo de formação de melanina que envolve a enzima tirosinase tem um papel importante, onde a enzima introduz uma hidroxila na tirosina convertendo-a a L-DOPA, e em um segundo momento a enzima oxida a 3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) convertendo-a a dopaquinona. A conversão da dopaquinona implica em outras sucessivas reações de oxidação e ciclização, na qual a enzima age oxidando a 5,6-diidroxiindol (DHI), que permite a formação da melanina através da presença do composto indol-5,6-quinona (KIM & UYAMA, 2005). O processo de formação da melanina pode se acompanhado através da rota biossintética apresentado na **Figura 12**.

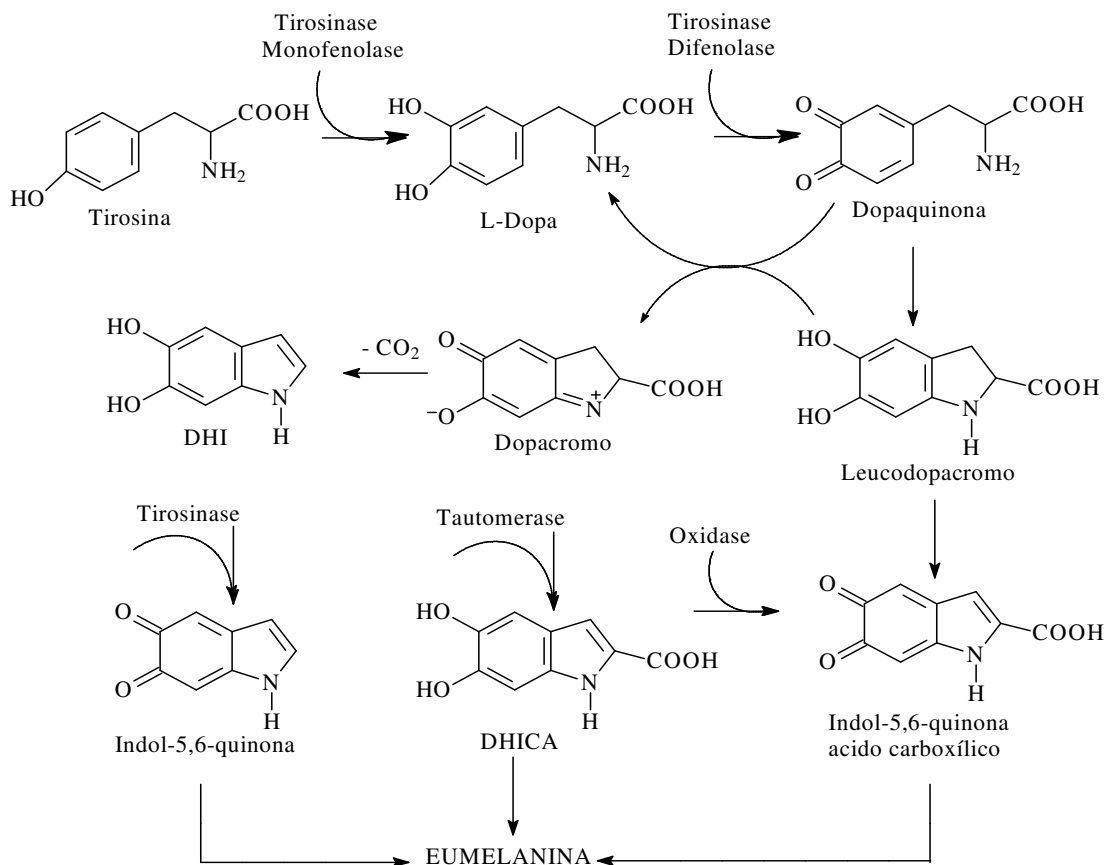


Figura 12: Rota biossintética de formação da eumelanina envolvendo a enzima tirosinase (KIM & UYAMA, 2005).

1.7 Ação Complexante, Antioxidante e Inibitória dos Polifenóis frente à Enzima Tirosinase

Os polifenóis são compostos de origem vegetal, que possuem anéis aromáticos com substituintes hidroxilados. Em sua maioria são potentes antioxidantes, e necessários para o bom funcionamento das células vegetais (www.teses-saudepublicatanino.htm).

A estrutura química do polifenol é especialmente adequada a sua ação antioxidante. Estudos “in vivo”, relatam que muitos polifenóis de origem natural se apresentam melhores antioxidantes do que as vitaminas E e C. Apresentam também grande capacidade de complexar metais de transição como cobre e ferro, atuando indiretamente como inibidores da ação catalítica desses metais no processo de formação de radicais livres, ao complexarem com estes metais (www.teses-saudepublicatanino.htm).

Os polifenóis possuem ações antitumorais e anticarcinogênicas, com um efeito inibidor de tumores através da formação de radicais livres estáveis, que inibem a peroxidação de lipídeos e outras substâncias. São usados como antimicrobianos (fungicidas e antibacterianos), e como reguladores do crescimento e germinação de plantas. Possuem característica de se combinarem com a proteína da pele dos animais, tornando-a imputrescível, por adsorverem os metais dissolvidos em água. Devido a essas propriedades podem ser muito bem empregados nas indústrias de curtimento, corrosivos, floculantes, bebidas, plásticos, etc (www.teses-saudepublicatanino.htm).

O papel dos radicais livres nos processos patológicos, nas doenças, nas intoxicações e no envelhecimento têm tornado-se de grande interesse. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são continuamente formadas no organismo, sendo estimado que cerca de 5% de todo oxigênio inspirado transforma-se em ERO. Estas espécies químicas, geralmente são inativadas pelas defesas antioxidantes do organismo. Todavia, quando geradas em excesso, seja por aumento de produção por processos mórbidos ou fatores ambientais, seja por redução da capacidade antioxidante, tornam-se deletérias para todas as estruturas orgânicas. Essa situação é agravada na presença de íons, tais como ferro e cobre. Os radicais livres têm sido implicados em lesões de células, membranas celulares, e várias condições clínicas como: injúrias da esquia, enfarte, câncer, artrite, várias doenças sanguíneas, doenças degenerativas, como Parkinson, Alzheimer (DANIEL, 2004 e REZENDE, 2005).

Diante deste contexto os flavonóides, compostos fenólicos, amplamente encontrado em frutas, folhas, sementes e em outras partes das plantas. Possuem atividades farmacológicas e bioquímicas, tais como antimicrobiana, antimutagênica, anticancerígena dentre outras

(OLIVEIRA, 2000). Os flavonóides contribuem para a ação antioxidante reduzindo os níveis de radicais livres e ainda protegem as células através do fenômeno da peroxidação das membranas lipídicas neutralizando os radicais livres, pode-se destacar ainda a sua ação inibitória sobre a enzima tirosinase.

Alguns flavonóides como a quercetina, canferol, morina, miricetina e rutina, além de agirem como antioxidantes, tem grande atividade inibitória frente à enzima tirosinase (canferol e quercetina), podendo também apresentar diversas atividades farmacológicas, tais como antiinflamatória, antialérgica, antiviral bem como anticâncer. Relatos recentes têm sugerido que substâncias flavonoídicas agem como protetoras contra as doenças do fígado, cardiovasculares e catarata (TSIMOGINIANNIS & OREOPOULOU, 2005).

O fator importante é a presença da hidroxila fenólica, que confere a capacidade antioxidante à substância. Contudo, a sua eficiência depende da sua localização na molécula, da estrutura e do número de hidroxilas presentes. A inibição da lipoperoxidação é influenciada por certo número de características estruturais dos flavonóides: 1) presença de um grupamento hidroxila na posição 3 do anel C; 2) a ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C; 3) o grupo carbonila na posição 4 do anel C; 4) o padrão e o número de grupos hidroxilas nos anéis A, B, e C; 5) a presença de açúcares; 6) a atividade quelante pela associação do grupo carbonila no carbono 4 e uma hidroxila no carbono 3 ou 5 (**Figura 13**) (TSIMOGINIANNIS & OREOPOULOU, 2005).

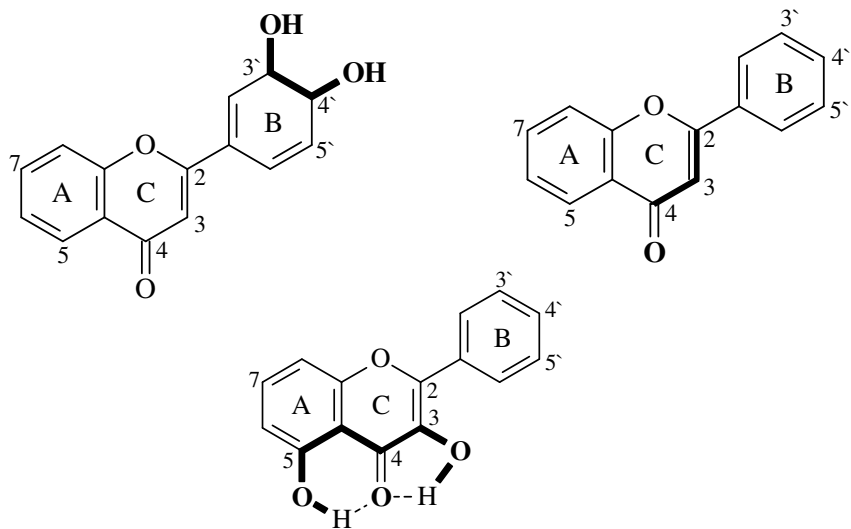


Figura 13: Elementos estruturais importantes dos flavonóides para a atividade quelante e antioxidante(TSIMOGINIANNIS & OREOPOULOU, 2005).

2 OBJETIVOS

- Quantificar os fenóis totais do extrato bruto e da fração hidrometanólica de *Talinum triangulare*;
- Avaliar a capacidade de complexação das soluções metanólica e em PBS do caule seco e moído e da fração hidrometanólica do caule de *Talinum triangulare* com íons de Fe II.;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e fração hidrometanólica de *Talinum triangulare*, através do método do DPPH;
- Avaliar a ação inibitória frente à enzima tirosinase (E.C.1.14.18.1) do extrato bruto e da fração hidrometanólica do caule de *Talinum triangulare*;
- Isolar e caracterizar os metabólitos secundários do caule de *T. triangulare* através de métodos cromatográficos e espectroscópicos;

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e Reagentes

Os espectros de absorção no ultravioleta (UV/visível) foram feitos em aparelho Shimadzu em um comprimento de onda fixo (λ) de 760 nm para quantificação de fenóis totais, e por varredura ($\lambda = 200 - 600$ nm) para o teste com a enzima tirosinase.

Os espectros obtidos na região de infravermelho (IV) foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer 1600/1605 FT-IR, em pastilhas de KBr.

Os espectros 1D e 2D de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker AC-200 [200 MHz (^1H) e 50 MHz (^{13}C)] da UFRRJ e Jeol [400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C)]. Como padrão interno para referência de deslocamento químico foi usado tetrametilsilano. Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa, HP-5880. Acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV, CG/EM Varian Saturn 2000 da UFRRJ.

Foi usado gel de sílica 230 - 400 e 70 - 230 mesh (marca Vetec), como fase estacionária, para a cromatografia em coluna. A cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e preparativa (CCDP) foi feita em placas de gel de sílica 60 PF₂₅₆ das marcas Merck e Vetec sobre suporte de vidro e espessura de 1 mm. As substâncias foram detectadas através de irradiação ultravioleta em 254 ou 365 nm e ou vapores de iodo.

Foram utilizadas placas de gel de sílica 60 PF₂₅₄ da Merck, para análise em CCDA e com reveladores foram usados vapores de iodo. Os solventes empregados durante todo o procedimento experimental foram de grau PA da Vetec e Merck .

Os reagentes utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antioxidante, atividade sobre a enzima tirosinase e quantificação dos fenóis totais foram das marcas Aldrich e Sigma.

3.2 Identificação da Espécie e Preparação dos Extratos Hidrometanólico, Metanólico e em Acetato de Etila

3.2.1 Identificação da espécie *Talinum triangulare*

O material vegetal para estudo da espécie *Talinum triangulare* constituiu-se do caule, e foi coletado em Guapimirim-RJ e identificada pelo Professor Msc. Pedro Germano Filho (Instituto de Biologia, Departamento de Botânica – UFRRJ) e a aluna Ivollanda Magali Rodrigues da Silva (graduanda em Ciências Agrícolas – UFRRJ). Uma exsicata desta espécie (SBR 26906) está depositada no Herbário RBR, IB-UFRRJ.

3.2.2 Preparação do extrato hidrometanólico

O caule de *Talinum triangulare* após coletado foi cortado em pequenos pedaços, com cerca de três centímetros cada, e pesados antes e após a secagem, em estufa com temperatura aproximada de 35 °C. Após a secagem, foram obtidos 403 g do caule seco, havendo uma perda aproximada de 90 % de água,

Todo material seco foi moído em moinho de facas, e tratado com 1000 mL de uma solução hidroalcolica (80% de metanol: 20% de água destilada), sendo deixado em repouso durante quarenta e oito horas por trinta dias, sendo posteriormente concentrado em aparelho rota-vapor.

Após o extrato hidrometanólico ser concentrado até um volume de 600 mL, realizou-se a partição com (3 x 150 mL) de CHCl₃ com o auxílio do funil de separação, obtendo-se as frações hidroalcolica e clorofórmica, que foram utilizadas para a realização da avaliação dos constituintes encontrados no vegetal, através da prospecção química e posterior isolamento e purificação das substâncias.

Após concentrada a fração hidrometanólica e a clorofórmica, foi obtido uma massa final do extrato hidrometanólico seco, correspondente a 10,0 g indicando 2,5 % do caule seco de *T. triangulare*.

3.3 Prospecção Química de *Talinum triangulare*

A prospecção química dos constituintes químicos do caule do vegetal foi feita seguindo os tópicos especiais, com algumas adaptações, contidos em textos de fitoquímica, farmacognosia e análise orgânica (MATOS, 1997). Neste teste foram utilizadas as frações hidrometanólica [metanol-água (8:2)] e a clorofórmica (extrato hidrometanólico após a partição), para prospecção de constituintes químicos polares e poucos polares (SEPULVIDA, 2005).

3.4 Análise Espectrofotométrica no Ultravioleta da Solução Metanólica e em PBS do Caule da Fração Hidrometanólica do Caule de *Talinum triangulare*

3.4.1 Preparação da solução em metanol e em PBS do caule seco e moído e da fração hidrometanólica do caule de *Talinum triangulare*

As soluções das amostras de caule seco moído e da fração hidrometanólica *Talinum triangulare* foram preparados (SEPULVIDA, 2005) utilizando quatro soluções abaixo:

- 50 mg da fração hidrometanólica em 2,5 mL de metanol (Concentração = 20 g/L).
- 50 mg da fração hidrometanólica em 2,5 mL de solução tampão de PBS (C = 20g/L).
- 50 mg do caule seco e moído em 5 mL de metanol (C = 10 g/L).
- 50 mg do caule seco e moído em 5 mL de solução tampão (C = 10 g/L).

A solução de Fe II (25 μ M) foi preparada utilizando $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em PBS (pH = 7,0). A solução FeSO_4 foi adicionada à solução da fração hidrometanólica e da fração obtida a partir do caule seco, sendo posteriormente analisadas em espectrofotômetro de UV-visível na faixa de comprimento de onda (λ) de 200 a 600 nm.

3.4.2 Preparação da amostra comercial de *Ginkgo biloba* para análise espectrofotométrica

Foram preparadas soluções com amostra comercial de *Ginkgo biloba* com o extrato das folhas secas e com as folhas secas de cápsula com excipiente q.s.p 330 mg no qual cada cápsula continha \approx 4,8 mg de ginkgoflavonóides e 1,2 mg de terpenolactonas. Para o preparo das soluções foram utilizados 40 mg do extrato das folhas da amostra comercial em 10 mL de MeOH e PBS (4 mg/mL) e 40mg das folhas secas em 10 ml de MeOH e PBS (4 mg/mL) (SILVA *et al.*, 2005).

3.5 Dosagem de Fenóis Totais

3.5.1 Preparação do reagente de Folin-Ciocalteu

A solução do reagente de Folin-Ciocalteu foi preparado utilizando 38 mL de água, a qual foram adicionados 5,5 g de tungstato de sódio di-hidratado, 2 g de ácido fosfomolibidênico e 2,5 mL de ácido fosfórico. A mistura foi mantida em refluxo por 2 horas após foi resfriada e diluída com água até completar um volume de 50 mL, onde apresentou uma solução de cor esverdeada (www.stanford.edu/group/vitousek/folin.html).

3.5.2 Preparação da curva padrão

Preparou-se uma solução padrão em água de milli-Q do ácido gálico (1 mg/mL) e coletaram-se alíquotas de diferentes volumes (10, 20, 50 e 100 μ L) e adicionou-se posteriormente 2,5 mL do Reagente Folin-Ciocalteu, após 5 minutos acrescentou-se 2 mL de Na₂CO₃ (14 %). Deixou-se as alíquotas em repouso por 2 h e posteriormente foram feitas análises das absorvâncias em UV/Visível à temperatura ambiente em um comprimento de onda (λ) de 760 nm, sendo a água de água de milli-Q utilizada como branco (SILVA *et al.*, 2006)

3.5.3 Determinação dos fenóis totais

Foram pesadas três amostras independentes de 5 mg do extrato bruto (hidrometanólico) e da fração hidrometanólica (obtida após partição com CHCl_3), e adicionados 5 mL de água de milli-Q, obtendo três soluções estoques independentes (1,0, 1,1 e 1,0 mg/mL). Das soluções estoques foram retiradas alíquotas de 2 mL e acrescentados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e após 5 minutos adicionou-se 5 mL de solução de Na_2CO_3 (14 %). A amostra foi deixada em repouso por 2 h e as análises foram feitas em UV/Visível em espectrofotômetro à temperatura ambiente, lendo-se as absorvâncias no comprimento de onda (λ) de 760 nm, sendo a água de milli-Q utilizada como branco. Os valores das absorvâncias foram submetidos a dados estatísticos (SILVA *et al.*, 2006).

3.5.4 Análise estatística da determinação dos fenóis totais

A quantidade de fenóis do extrato bruto e da fração hidrometanólica do caule de *T. triangulare* foram calculadas a partir da equação $Y=0,13739 (\pm 0,14269) + 168,89137 (\pm 11,4949773) X$, obtida por regressão linear dos valores experimentais da solução padrão do ácido gálico (1 mg/mL), sendo no eixo da abscissa, colocadas as concentrações da amostra e no eixo das ordenadas as absorvâncias medidas em comprimento de onda (λ) de 760 nm. A equação obtida por regressão linear mostrou um bom coeficiente de correlação ($r^2 \geq 0,9954$). Os dados de no mínimo três experimentos independentes foram tratados estatisticamente, sendo que o valor médio obtido foi utilizado, de forma comparativa, correspondendo a massa da amostra em 100 g de caule. Nos experimentos foi assumida margem de erro $\leq 10 \%$.

3.6 Ensaio da Atividade Antioxidante

3.6.1 Preparação das amostras

Do extrato bruto (hidrometanólico) e da fração hidrometanólica (obtida após partição com CHCl_3), do caule de *Talinum triangulare* separou-se 10 mg e solubilizou-se em 10 mL de metanol obtendo-se uma solução estoque de concentração de 1,0 mg/mL.

3.6.2 Ensaio fotométrico do DPPH

Partindo da solução estoque 1,0 mg/mL, contendo o extrato bruto e a fração hidrometanólica, respectivamente, foram feitas cinco diluições 710; 355; 178; 88,8; 44,4 e 22,2 µg/mL, sendo adicionados em microplacas de 96 poços, em volumes de 71 µL das respectivas soluções. Em seguida foram adicionados aos poços 29 µL de DPPH 0,3 mM. A microplaca foi fechada e coberta com papel alumínio e a reação foi mantida no escuro a temperatura ambiente. Depois de 30 minutos os valores de absorvância foram medidos a 570 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a fórmula seguinte:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} + Abs_{branco}) * 100}{Abs_{controle}} \right\}$$

Onde:

$Abs_{amostra}$ = absorvância da amostra + DPPH

Abs_{branco} = absorvância do branco (solvente)

$Abs_{controle}$ = absorvância do controle (solvente + DPPH)

71 µL de metanol e 29 µL de DPPH foram usados como controle negativo e todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.6.3 Análise estatística da atividade antioxidante

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva que captura 50 % do radical livre DPPH) foram calculados a partir da equação obtida por regressão linear dos dados experimentais, sendo no eixo da abscissa colocadas as concentrações da amostra e no eixo das ordenadas as porcentagem da atividade antioxidante. As equações obtidas por regressão linear de cada experimento mostraram um bom coeficiente de correlação ($r^2 \geq 0,80$). Os dados de no mínimo três experimentos independentes foram tratados estatisticamente, sendo o CE_{50} correspondente ao valor médio obtido dessas experiências, e expresso como $CE_{50} \pm$ desvio padrão (DP). Nos experimentos foi assumida margem de erro $\leq 10\%$ (MENSOR *et al.*, 2001).

3.7 Atividade Inibitória frente à Enzima Tirosinase

O teste de atividade inibitória frente a enzima tirosinase foi realizado tendo como substrato L-DOPA. A mistura reacional em tampão fosfato (50 mM, pH = 6,8) foi obtida com os substratos L-DOPA (0,17 mM), EDTA (0,022 mM), tirosinase (50 - 100 unidades) e material teste em concentrações variadas. Para amostra com extrato bruto a fração hidrometanólica as concentrações utilizadas foram: 50,0 16,6, 6,6 e 3,3 µg/mL respectivamente. Para observação do efeito de inibição da enzima foram feitas leituras no UV-visível a 475 nm, no tempo inicial (logo após a adição da enzima) e após 10, 20 e 30 minutos. Como inibidor padrão foi usado o ácido ascórbico (0,3 mM). A DI_{50} foi obtida por tratamento estatístico.

3.7.1 Análise estatística da atividade inibitória da enzima tirosinase

Os valores de CI_{50} (concentração efetiva que inibe 50 % do substrato L-Dopa ou tirosina) foram calculados a partir da equação obtida por regressão linear dos dados experimentais, sendo no eixo da abscissa colocadas as concentrações da amostra e no eixo das ordenadas a porcentagem inibitória da enzima tirosinase. As equações obtidas por regressão linear de cada experimento mostraram um bom coeficiente de correlação $r^2 \geq 0,9369$ para as amostras com o extrato bruto e $r^2 \geq 0,9934$ para as amostras com a fração hidrometanólica. Os dados de no mínimo três experimentos independentes foram tratados estatisticamente, sendo o CI_{50} correspondente ao valor médio obtido dessas experiências, e expresso como $CI_{50} \pm$ desvio padrão (DP). Nos experimentos foi assumida margem de erro $\leq 10\%$.

$$\% \text{ de inibição} = (B_{30} - B_0) - (A_{30} - A_0) \times 100$$

Onde:

B_0 = valor da abs. da L-DOPA + tirosinase no tempo inicial.

B_{30} = valor da abs. da L-DOPA + enzima após 30 min.

A_0 = abs. L-DOPA + enzima + amostra no tempo inicial.

A_{30} = valor da abs. L-DOPA + enzima + amostra após 30 min.

3.8 Isolamento e Purificação dos Constituintes Químicos do Caule de *Talinum triangulare*

3.8.1 Isolamento e purificação dos constituintes químicos da fração clorofórmica

A fração clorofórmica (3,21 g) foi fracionada através de cromatografia em coluna de gel de sílica (CC), sendo eluída com misturas de solventes $C_6H_{14}/CHCl_3$, $CHCl_3$, $CHCl_3/MeOH$ até 100 % de MeOH, obtendo-se o total de 506 frações recolhidas em vidros de 20 mL. A comparação das frações foi acompanhada através de CCDA e a revelação foi realizada com vapores de iodo. As frações com substâncias análogas foram reunidas da seguinte forma: 121- 130, 276 - 285, 286 - 290, 301 - 370. As demais frações coletadas foram analisadas, porém não foi obtido resultado satisfatório.

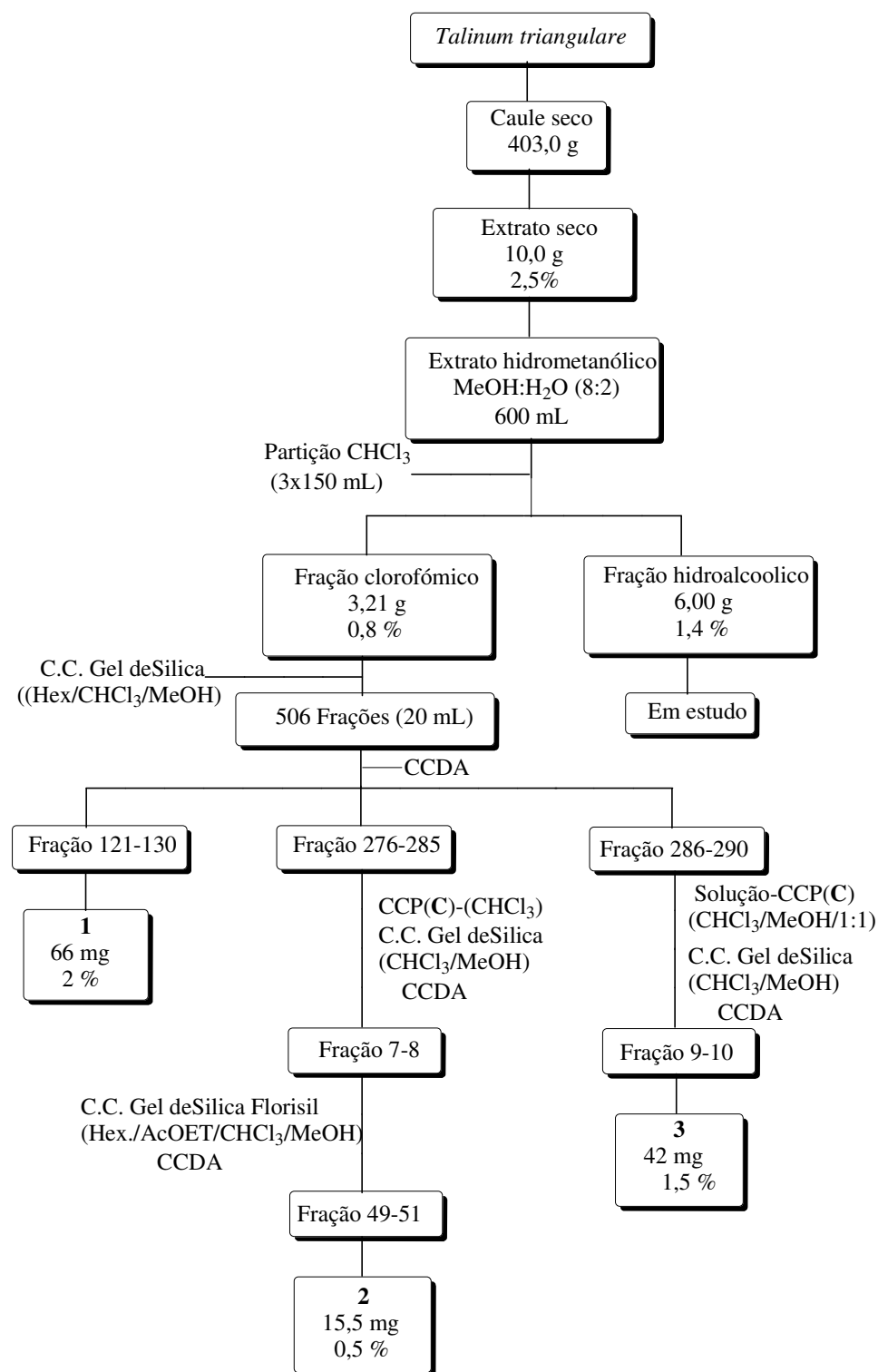
Do conjunto de frações 121 - 130 foi isolado um óleo amarelo e viscoso contendo 66 mg denominado substância **1**, sendo caracterizada como um éster de cadeia longa alifática e saturada.

O conjunto de frações 276 - 285 foi submetido à CCP e eluída em $CHCl_3$, sendo analisada através CCDA onde apareceram quatro manchas diferenciadas denominadas de: **A** (base), **B** (meio 1), **C** (meio 2), e **D** (superior). A porção **C** foi posteriormente cromatografada em CC, onde foi eluída com os solventes $CHCl_3/MeOH$ em ordem crescente de polaridade (5 em 5 %) em um total de 30 subfrações coletadas em vidros de 10 mL, onde as novas subfrações comuns, de acordo com CCDA, foram reunidas de 7 - 8 e 16 - 28.

O conjunto de novas subfrações 7-8 foram reunidas e submetidas à coluna de óxido de alumínio neutro (Florisil) e eluída com os solventes Hex/AcOEt/ $CHCl_3/MeOH$, em ordem crescente de polaridade totalizando novas 50 subfrações, sendo reunida em 49 - 51, de acordo com a semelhança analisada através de CCDA, fornecendo a substância **2**, que se apresentou como óleo viscoso com 15,9 mg, caracterizado como ácido graxo.

A parte líquida do conjunto de frações 286 - 290 foi submetida a CCP e eluída com $CHCl_3/MeOH$ (1:1) sendo detectadas três manchas diferentes denominadas **A** (base), **B** (meio), **C** (superior). A parte **C** da preparativa foi submetida à CC com solventes $CHCl_3/MeOH$ em ordem crescente de polaridade reunindo-se novas subfrações fornecendo a substância **3** (subfrações 9 - 10, 42 mg), sendo caracterizado como um triterpeno pertencente ao grupo dos espergulagenatos.

O Esquema 1 ilustra os procedimentos experimentais realizados.



Esquema 1: Isolamento das substâncias 1 - 3 a partir da fração clorofórmica do caule de *T. triangulare*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Prospecção Química das Frações Hidrometanólica e Clorofórmica do Caule de *Talinum triangulare*

As frações hidrometanólica e clorofórmica foram utilizadas para a realização da avaliação dos constituintes encontrados no vegetal, através da prospecção química e posterior isolamento e purificação dos principais metabólitos especiais.

Os resultados da prospecção química das frações hidrometanólica e clorofórmica do caule de *T. triangulare* revelou a presença de fenóis, flavonóides, catequinas e outros constituintes que caracteriza metabólitos da via do ácido chiquímico e da via do acetato. Os metabólitos encontrados a partir da prospecção estão relacionados na **Tabela 4**. (SEPULVIDA, 2005).

Tabela 4 – Registro dos resultados da prospecção química da espécie *T. triangulare*.

Classes de metabólitos especiais	Fração Hidrometanólica	Fração Clorofórmico
Ácidos fixos fortes (alto peso molecular)	+++	O
Alcalóides	O	O
Antocianidinas	O	O
Antocianinas	O	O
Auronas	O	O
Bases quaternárias	+++	+++
Catequinas	+++	+
Chalconas	O	O
Esteróides	O	+
Fenóis	++	+
Flavonas	++	+
Flavonóis	++	+
Flavanonas	++	+
Flavanonóis	++	+

Leucoantocianidinas	O	O
Saponinas	+++	O
Taninos hidrolizáveis	O	O
Taninos condensados	O	+
Triterpenóides	O	O
Xantonas	+	+

Forte: +++ Médio: ++ Fraco: + Ausente: O

4.2 Avaliação da Capacidade de Complexação dos Íons de Fe II com o Caule e a Fração Hidrometanólica do Caule de *Talinum triangulare*

O teste de complexação com íons de Ferro II com a solução metanólica e em PBS obtida do caule seco e da fração hidrometanólica (obtida após a partição líquido-líquido do extrato hidrometanólico com CHCl_3), foi realizado utilizando a espectrofotometria de UV-visível na faixa de 200 a 600 nm (SILVA *et al.*, 2005 e SEPULVIDA, 2005). As amostras do caule seco em solução de metanol na concentração de 20 mg/mL e em PBS 10 mg/mL, apresentaram efeitos hipercrômicos nos espectros de ultravioleta, após adição da solução de FeSO_4 (25 μM) nas **Figuras 14 e 15**, respectivamente.

O efeito hipercrômico apresentado pelo complexo de íons de Fe II com a solução metanólica e em PBS do caule seco da planta foi comparado com os resultados obtidos com a amostra comercial das folhas do fitoterápico *Ginkgo biloba*. A análise das curvas de UV-visível revelou que este fitoterápico possui propriedade complexante com íons Fe II de modo similar ao apresentado pelo caule da *T. triangulare* (efeito hipercrômico), podendo ser claramente observado nas **Figuras 14 e 15**.

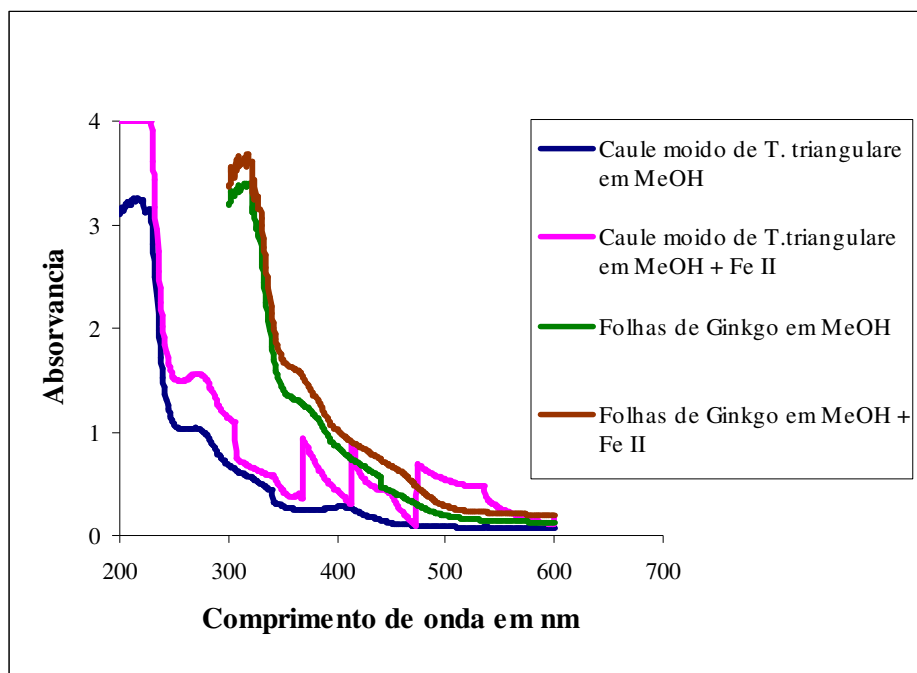


Figura 14: Efeito **hipercrômico** dos complexos Fe II/caule moído de *T. triangulare* em MeOH e Fe II/ folhas de *Ginkgo* em MeOH.

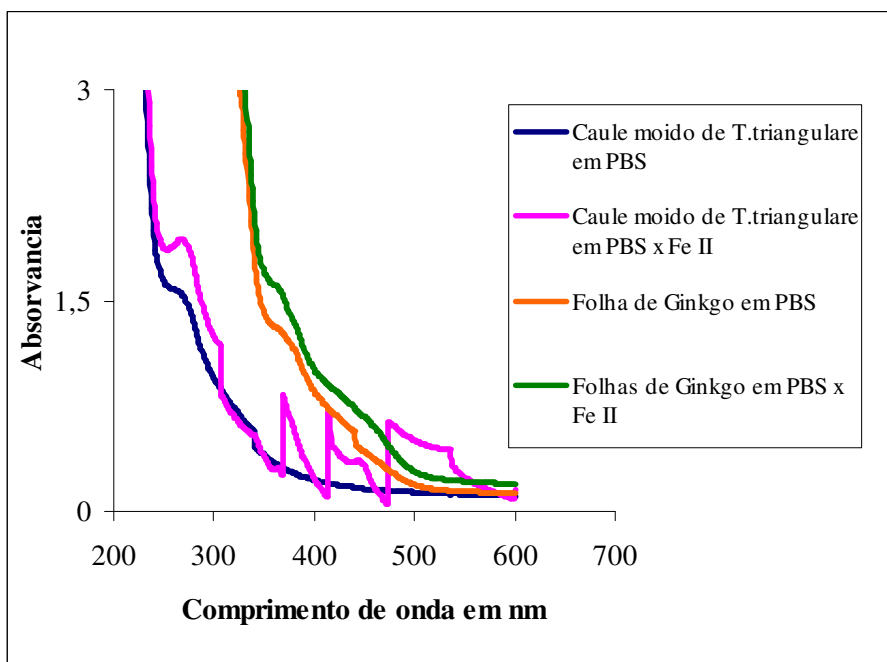


Figura 15: Efeito **hipercrômico** dos complexos Fe II + caule moído de *T. triangulare* em PBS e Fe II + folhas de *Ginkgo* em PBS.

A solução obtida da fração hidrometanólica em metanol (C = 20 mg/mL) apresentou efeito batocrômico (deslocamento da curva para maior comprimento de onda) quando submetida a solução de FeSO₄ (25µM), indicando, assim, a formação do complexo desta amostra com íons Fe II. Os resultados do teste obtidos com a fração hidrometanólica foram comparados com a análise feita com o extrato da amostra comercial de *Ginkgo biloba* em MeOH, e com o seu respectivo complexo formado na presença de Fe II. O gráfico na **Figura 16** mostra as curvas de absorção das amostras da fração hidrometanólica do caule de *T. triangulare* e da amostra comercial do extrato de *Ginkgo* na ausência e presença de Fe II. A espécie *T. triangulare* apresentou efeito semelhante ao do fitoterápico *Ginkgo biloba* usado comercialmente.

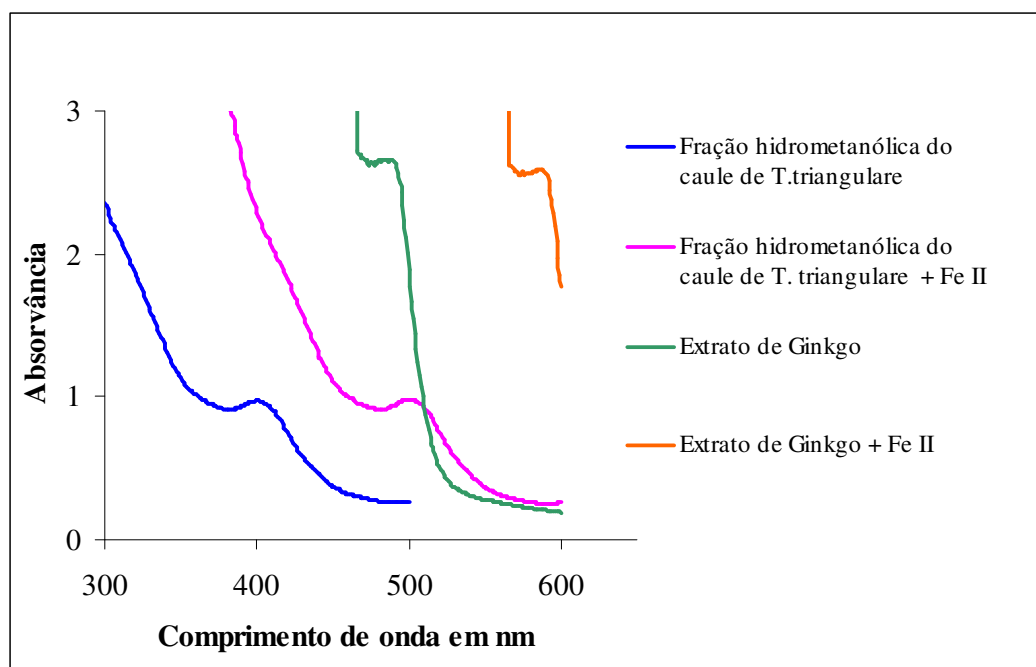


Figura 16: Efeito **batocrômico** dos complexos Fe II + fração hidrometanólica de *T. triangulare* e Fe II + extrato de *Ginkgo*.

Atualmente existem diferentes variantes do extrato de *Ginkgo biloba*, disponíveis entre eles o Egb 761, Lt 1379 e extrato 2 GE. Estes extratos diferem no processo de extração e também na sua composição. Os principais constituintes do extrato incluem flavonóides, terpenóides (*ginkgolídeos* e *bilobalídeos*) e ácidos orgânicos. No entanto, a grande variedade de produtos a base de extratos de *Ginkgo biloba* contém 24% de flavonóides e 6% de terpenóides (NAKANISHI, 2005).

O extrato de *Ginkgo biloba* aumenta o fluxo sanguíneo periférico e cerebral sendo o efeito neuroprotetor atribuído aos vários constituintes como: flavonóides e terpenóides. A interação com metais, como o ferro, resulta na prevenção da formação de radicais livres, protegendo os tecidos corporais contra o estresse oxidativo além de reduzirem a incidência de algumas doenças degenerativas como Alzheimer (NAKANISHI, 2005).

Sendo assim, é esperado que a espécie *T. triangulare* por conter fenóis e complexar com íons Fe II, de modo semelhante ao *Ginkgo biloba*, também possa apresentar propriedades neuroprotetoras.

4.3 Determinação dos Fenóis Totais

A quantidade de fenóis totais em *T. triangulare* foi determinada colorimetricamente, conforme o procedimento padrão de Folin-Ciocalteu. A substância usada para obtenção da curva padrão foi o ácido gálico. Alíquotas (10, 20, 50 e 100 µL) de uma solução estoque de ácido gálico (C = 1 mg/mL) foram submetidas ao método de Folin-Ciocalteu e com as absorvâncias obtidas em λ 760 nm foi confeccionado o gráfico da **Figura 17**. Através da equação da reta obtida a partir do gráfico, foi determinada a concentração de fenóis totais do extrato bruto e da fração hidrometanólica do caule de *T. triangulare*.

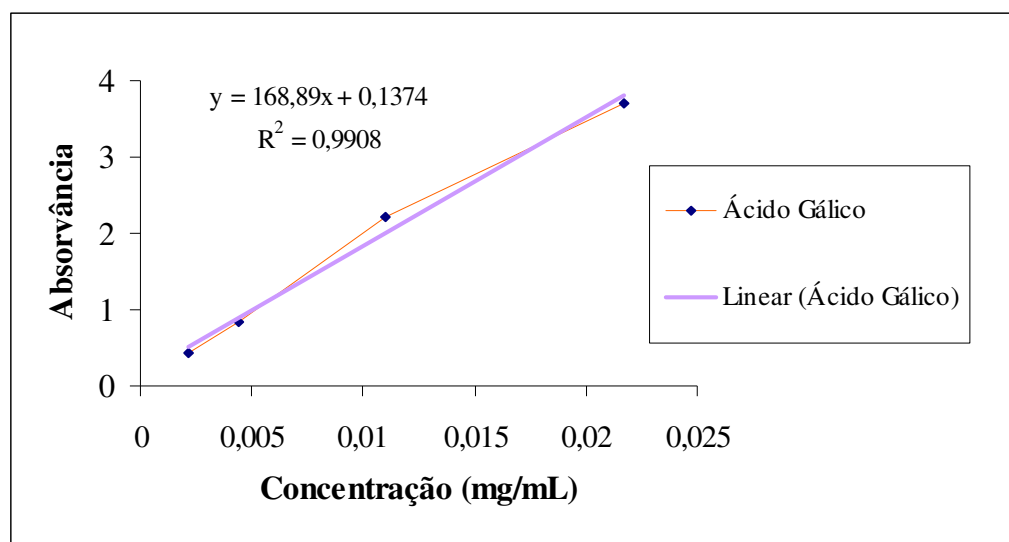


Figura 17: Gráfico representando a curva de calibração do ácido gálico.

Usando a curva padrão de ácido gálico ($R^2 = 0,9908$), a concentração de fenóis totais obtida para o extrato bruto e para a fração hidrometanólica do caule de *T. triangulare* foi de 0,1400 g e 0,5853 g por 100 g de caule de *T. triangulare*, respectivamente. Estes valores mostraram que a fração hidrometanólica possui maior concentração de fenóis devido a ter sido submetida à partição com clorofórmio (menos polar), o qual carrega com ele substâncias de baixa e média polaridade, possibilitando assim, que substâncias polares fiquem concentradas na fração hidrofílica.

Os resultados obtidos, foram comparados com teores de fenóis totais dos extratos brutos metanólicos da casca e folha de *T. brasiliensis*, relatados na literatura, onde observou-se que para o extrato da casca dessa espécie apresenta 0,763 g e o extrato da folha 0,667 g por 100 g da planta. Confirmando assim, um alto teor fenólico na fração hidrometanólica de *T. triangulare* que foi de 0,583 g por 100 g de caule (SOUZA *et al.*, 2007).

4.4 Atividade Antioxidante

O teste da atividade antioxidante foi realizado utilizando o radical livre estável DPPH (0,3 mM) e soluções estoques do extrato bruto (1,0 mg/mL) e da fração hidrometanólica (1,0 mg/mL). As misturas reacionais foram deixadas no escuro por 30 minutos, e os valores de absorvância foram medidos a 570 nm. Os resultados obtidos, após tratamento estatístico, da avaliação da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH do extrato bruto e da fração hidrometanólica estão representados na **Figura 18**.

O extrato bruto apresentou uma atividade de captura do DPPH com o valor de $EC_{50} = 526,11 \mu\text{g/mL}$, e a fração hidrometanólica $EC_{50} = 518,11 \mu\text{g/mL}$, sendo observado uma maior atividade antioxidante para a fração hidrometanólica.

Este resultado está de acordo com os dados obtidos para fenóis totais e complexação com Fe II da fração hidrometanólica, pois quanto maior a concentração de fenóis, maior o poder complexante com alguns íons metálicos e, maior também, o seu poder antioxidante.

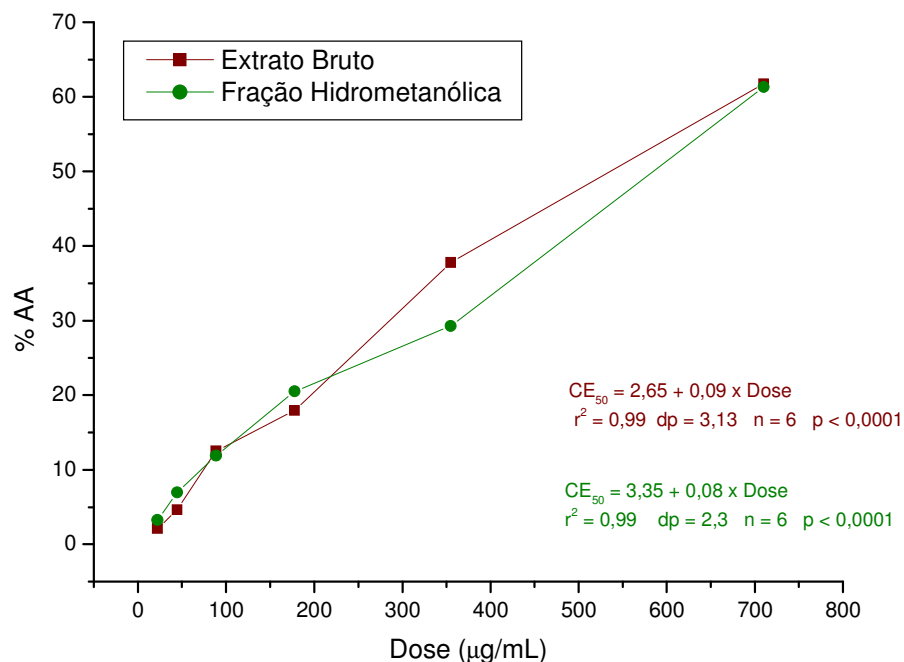


Figura 18: Gráfico % AA x dose ($\mu\text{g/mL}$) após tratamento estatístico para avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH.

4.5 Atividade Inibitória Frente à Enzima Tirosinase

Amostras do extrato bruto e da fração hidrometanólica com concentrações variadas do caule de *T. triangulare* foram submetidas ao teste de atividade inibitória frente à enzima tirosinase, tendo como substrato a L-DOPA (0,17 mM), em meio de tampão fosfato (50 mM, pH = 6,8). As absorvâncias foram lidas a 475 nm, conforme descrito detalhadamente na parte experimental. O extrato bruto e a fração hidrometanólica apresentaram atividade inibitória frente a enzima tirosinase, onde obteve-se um maior potencial com a fração hidrometanólica. O potencial inibitório foi calculado através do gráfico da absorvância contra a concentração da amostra, representado pelo o **gráfico da Figura 19**. A dose responsável por inibir 50 % da ação da enzima (DI_{50}) para o extrato bruto foi de 13,3 $\mu\text{g/mL}$ e para a fração hidrometanólica 6,6 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos com os testes para a atividade antioxidante, e a enzima tirosinase foram analisados de forma comparativa. Foi observado que em ambos, a fração hidrometanólica teve maior potencial que o extrato bruto e a espécie *T. triangulare* possuía

propriedades biológicas semelhantes a outras espécies, que também, apresentam fenóis na sua constituição química.

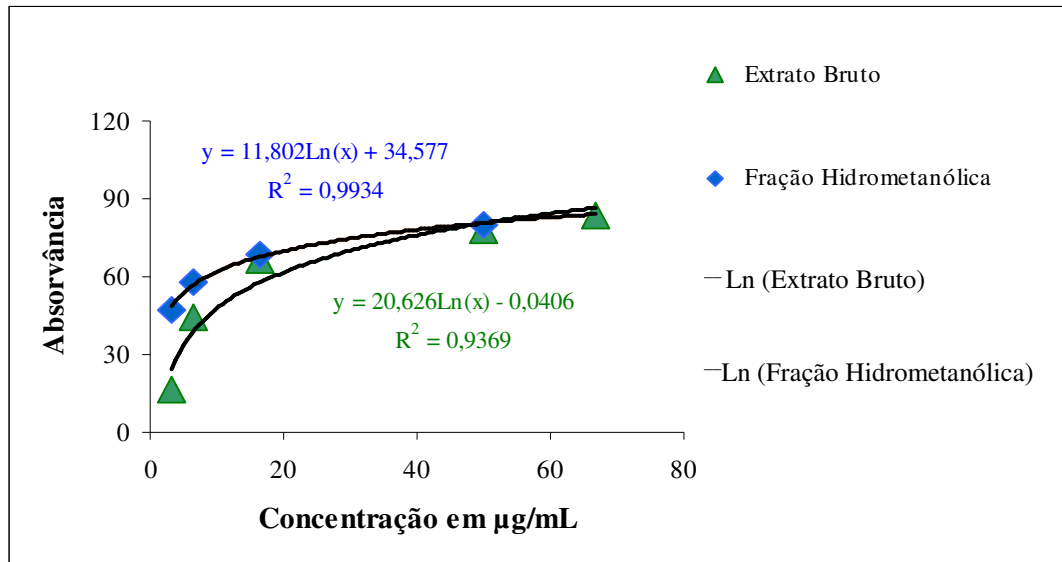


Figura 19: Gráfico obtido da absorvância x concentração de amostra ($\mu\text{g/mL}$), para avaliação da atividade inibitória da enzima tirosinase.

A absorvância medida no teste de inibição da enzima tirosinase, estava diretamente relacionada com o processo de formação da dopacromona (forma oxidada da L-DOPA). Quanto maior era a intensidade da curva de absorção, maior era a quantidade de dopacromona formada. Essa curva de absorção diminuía frente a algum componente inibidor dessa enzima presente no meio. Por isso, foi realizada a análise detalhada do poder de inibição, da fração hidrometanólica sobre a enzima tirosinase. Os resultados obtidos mostrou (**Figura 20**) a variação das curvas de absorção, que representou a formação da dopacromona (L-DOPA 0,17 mM), o potencial do inibidor padrão (ácido ascórbico 0,5 mM) e a fração hidrometanólica (3,3 $\mu\text{g/mL}$ dose mínima), permitindo afirmar que a fração hidrometanólica teve um potencial inibitório, frente a enzima tirosinase, maior do que o inibidor padrão (ácido ascórbico).

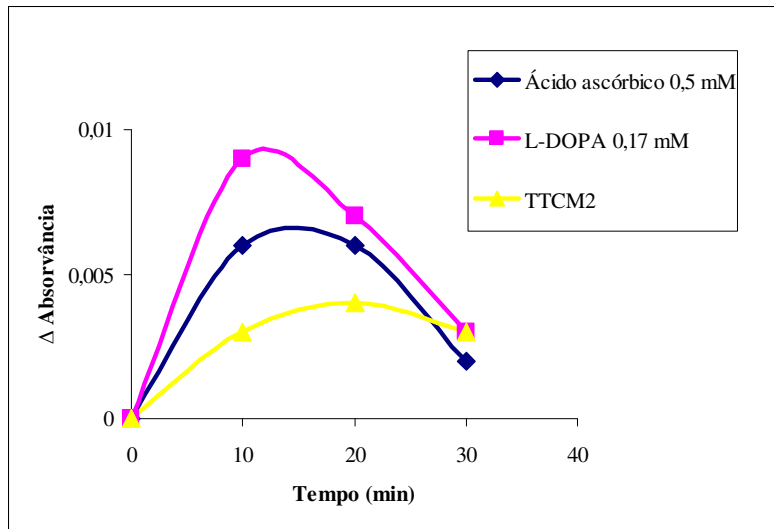


Figura 20: Potencial inibitório do ácido ascórbico e da fração hidrometanólioca frente à enzima tirosinase.

A **Figura 21** mostra o resultado da representação cinética feita através da análise no ultravioleta em 475 nm, nas doses 6,6 e 3,3 $\mu\text{g/mL}$ da fração hidrometanólica do caule de *T. triangulare* medidas no tempo zero, 10, 20 e 30 minutos, após a adição da enzima. As curvas mostraram que no intervalo de tempo de zero a 30 minutos houve redução, na formação da dopacromona, indicando inibição da enzima tirosinase frente as diferentes doses da fração hidrometanólica. Foi importante observar, que a dose inibitória após os 30 minutos, na presença da enzima, não apresentou mais nenhum efeito significativo sobre ela.

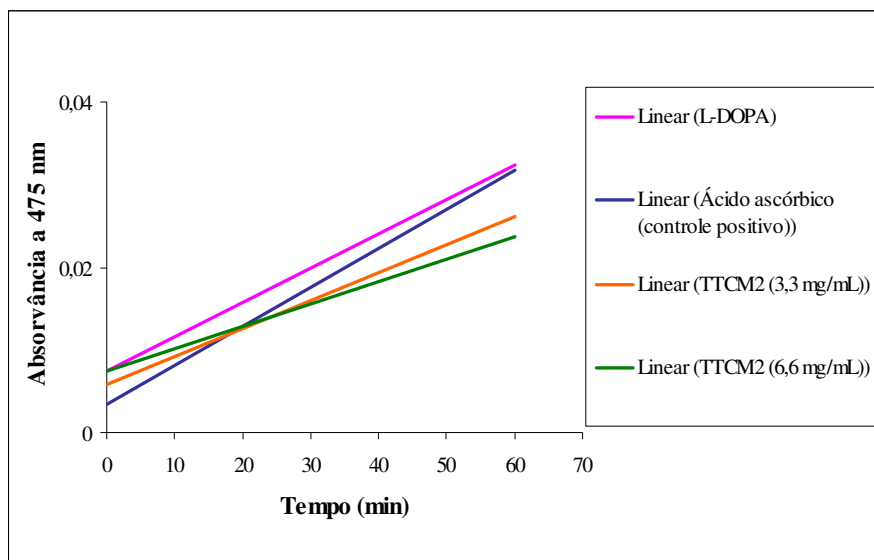
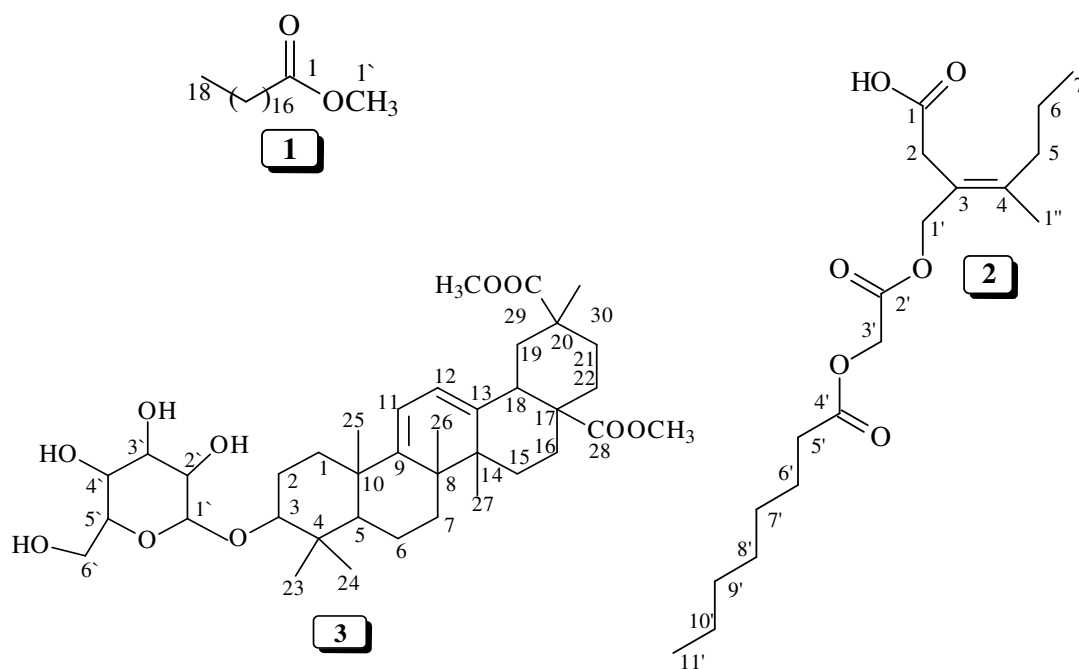


Figura 21: Diferentes concentrações do potencial inibitório da fração hidrometanólica (TTCM2) frente a enzima tirosinase.

4.6 Identificação dos Constituintes Químicos da Fração Clorofórmica do Caule de *T. triangulare*

O estudo de *T. triangulare* proporcionou a preparação do extrato hidrometanólico [MeOH:H₂O (8:2)] a partir de 403 g do caule, no qual foi obtido em volume de 600 mL, que posteriormente foi submetido a partição com clorofórmio (3 x 150 mL). A fração clorofórmica foi separada e concentrada, resultando em uma massa de 3,20 g, correspondendo a 0,8 % de rendimento.

A fração clorofórmica possibilitou através dos métodos cromatográficos (C.C. Gel de sílica, CCDA e CCP) o isolamento e purificação de três substâncias que analisando-se por técnicas espectrofotométricas (CG-massas, IV, RMN de ¹H e ¹³C) foram identificadas como: octadecanoato de metila (**1**), ácido (3E)-4-metil-3-{[(octanoiloxi)acetiloxi]metil-3-heptenóico (**2**) e o éster olean-9,12-dien- 3-(β-D-glicopiranosil)-28,29-dimetil (**3**).



4.6.1 Identificação da substância 1

O conjunto de frações de 121-130 revelou um óleo amarelo viscoso, caracterizado como o éster graxo octadecanoato de metila, o qual foi submetido à análise espectrofotométrica de IV, RMN ^1H e ^{13}C e CG-massas.

Os dados de IV (**Figura 22**) permitiram observar as seguintes bandas características $\nu_{\text{cm}^{-1}}$: 2924-2854 (CH_3 e CH_2), 1724 ($\text{C}=\text{O}$) e 1170 ($\text{C}-\text{O}$) de éster alifático.

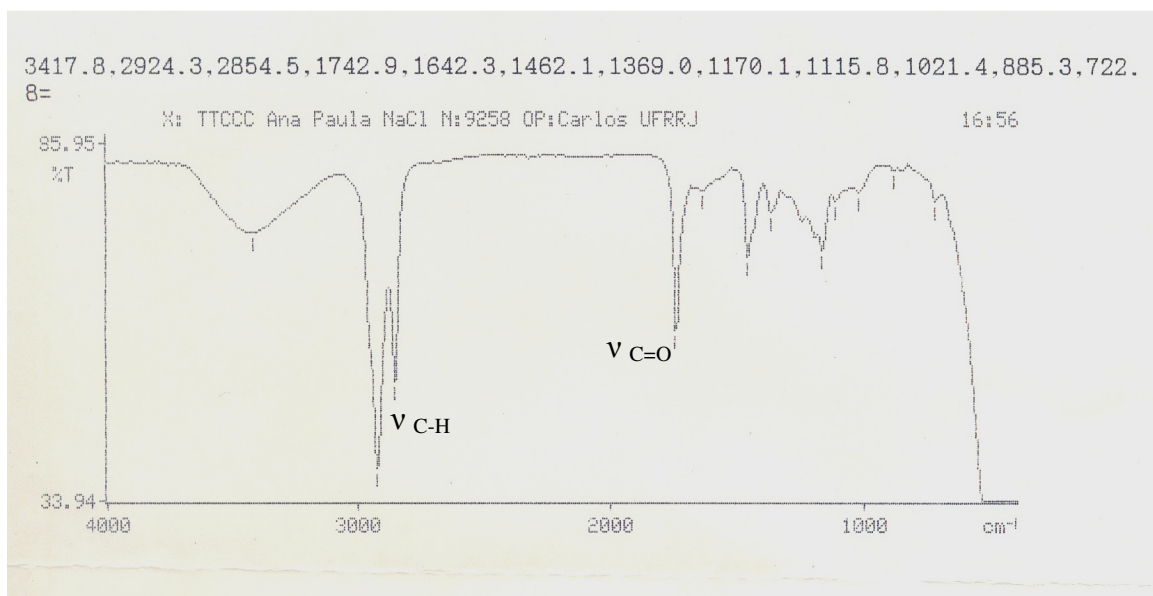
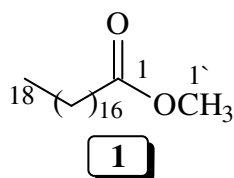


Figura 22: Espectro IV da substância 1 .

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais (**Figura 23**) característicos em δ 1,58 (m) referente aos grupos CH_2 de éster graxo, δ 0,87 (d) de metila terminal, δ 3,62 (sl) indicando a presença de carbono carbinólico, e em δ 2,26 (t) referente ao H ligado ao carbono 2.

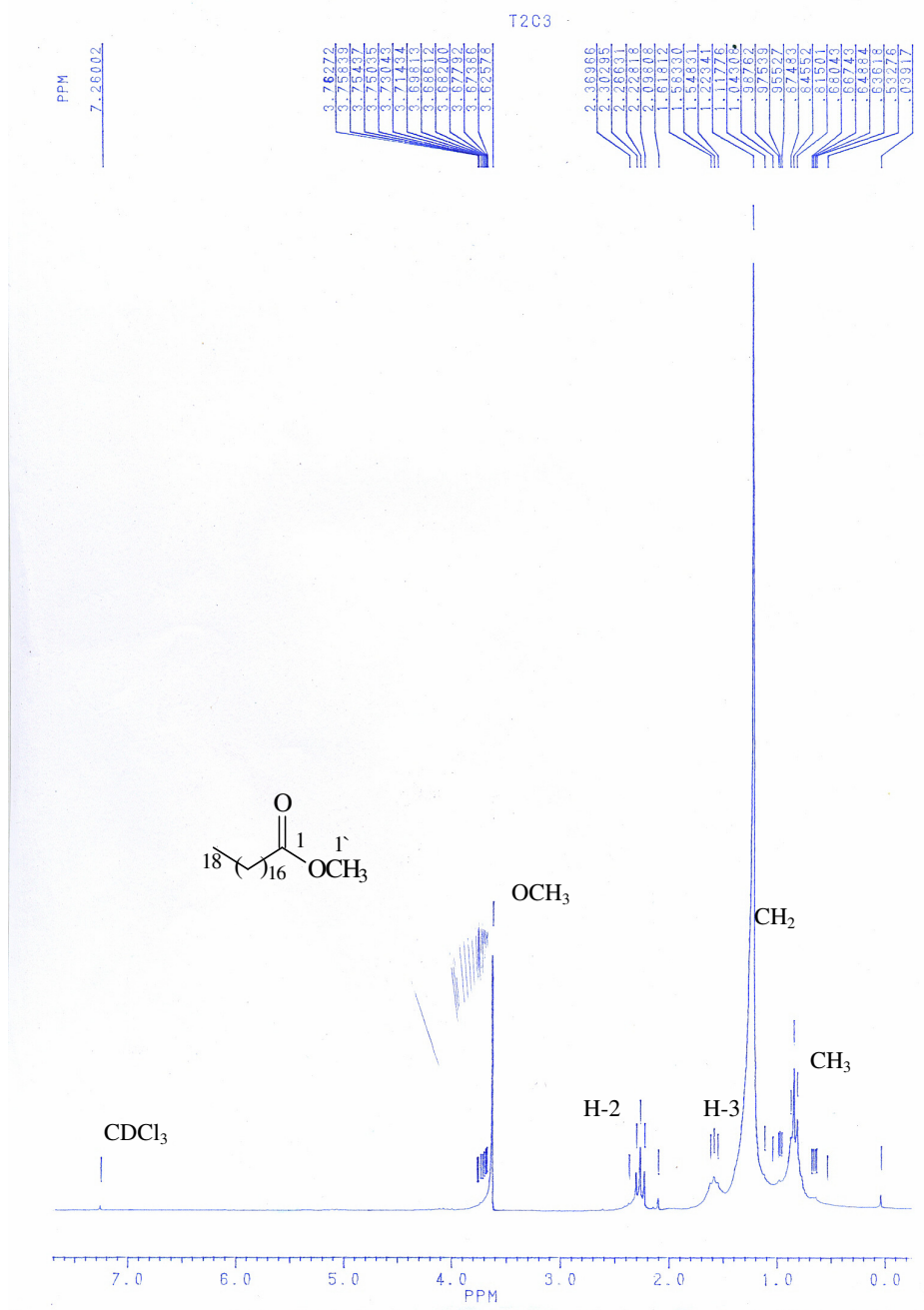


Figura 23: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

O espectro de RMN ^{13}C (**Figura 24**) apresentou sinal em δ 174,00 referente a carbono carbonílico de éster C-1, e um intenso sinal em δ 29,49 representando os carbonos alifáticos do éster de C-3 ao C-14 e ainda um sinal em δ 51,43 referente a metoxila de éster. A **Tabela 4** indica os dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **1**, comparados com a literatura (PEREIRA Jr *et al.*,1990).

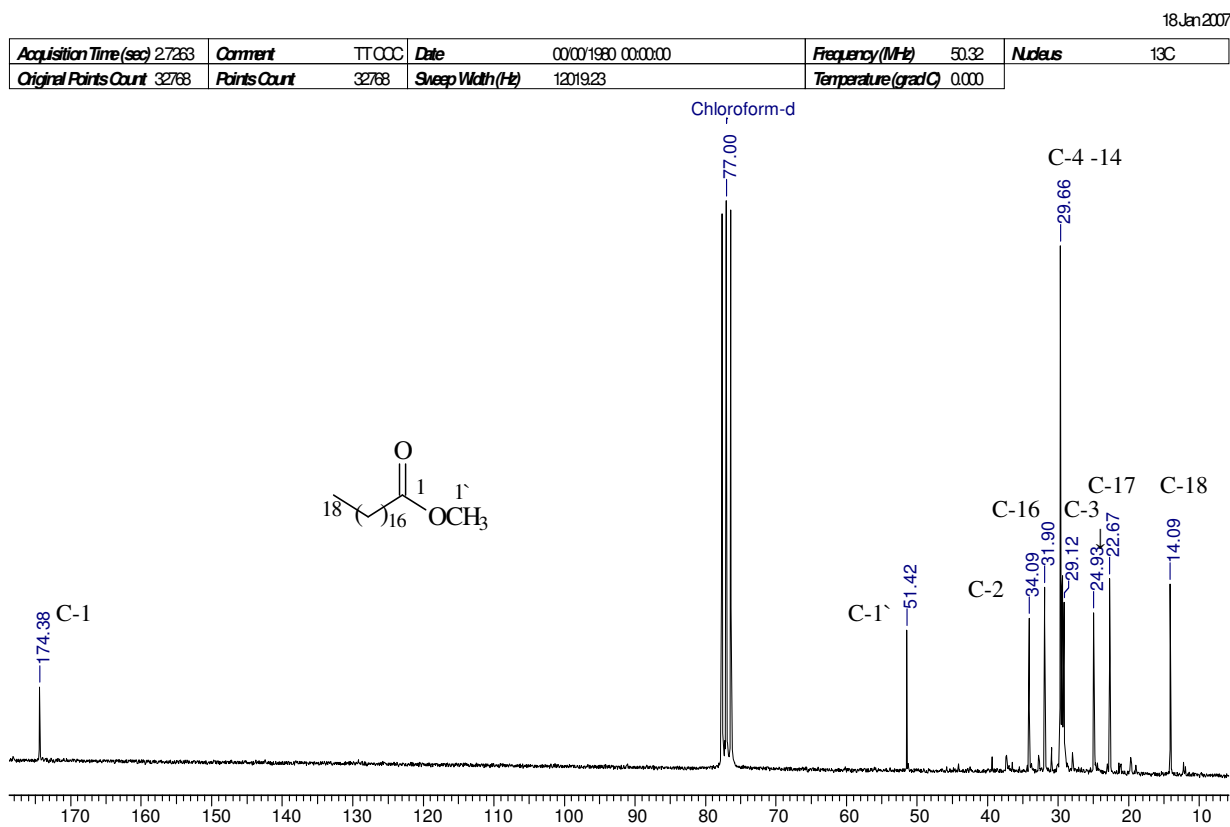


Figura 24: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da substância **1**.

Tabela 5: Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **1** comparados com a literatura (PEREIRA JR *et al.*,1990)

C	δH	δC	δC Octadecanoato de metila
1	-	174,00	173,00
2	2,26 (t, 8 Hz)	34,10	34,14
3	1,58 (m)	24,93	25,01
4	1,22 – 0,84 (m)	29,66	29,21
5	1,22 – 0,84 (m)	29,66	29,31
6	1,22 – 0,84 (m)	29,66	29,50
7-14	1,22 – 0,84 (m)	29,66	29,67
15	1,22 – 0,84 (m)	29,12	29,41
16	1,22 – 0,84 (m)	31,91	31,97
17	1,22 – 0,84 (m)	22,67	22,73
18	1,22 – 0,84 (m)	14,09	14,10
1'	3,62 (s)	51,43	Não consta na referência

O espectro de massas (**Figura 25**) apresentou o pico do íon molecular M^+ 285 e como pico base o fragmento m/z 271 (100%) referente à perda de $\cdot\text{CH}_3$ da metoxila do éster. A **Figura 26** apresenta a proposta de fragmentação para a perda de metila na substância **1**.

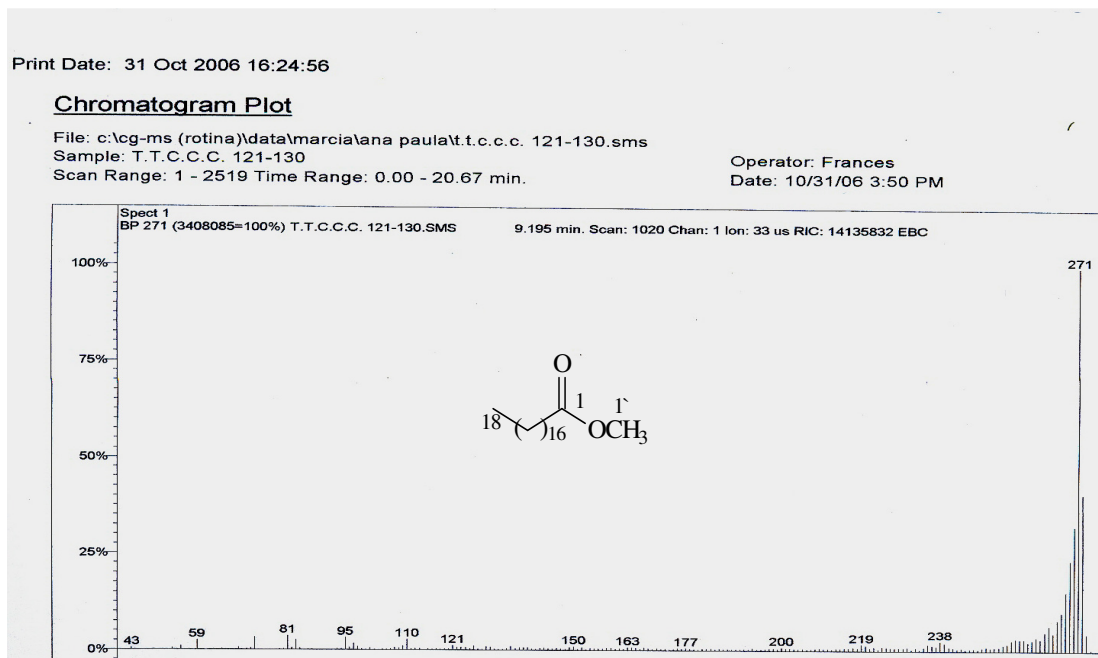


Figura 25: Espectro de massas da substância **1**.

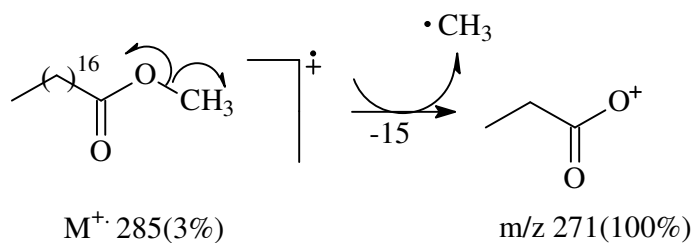
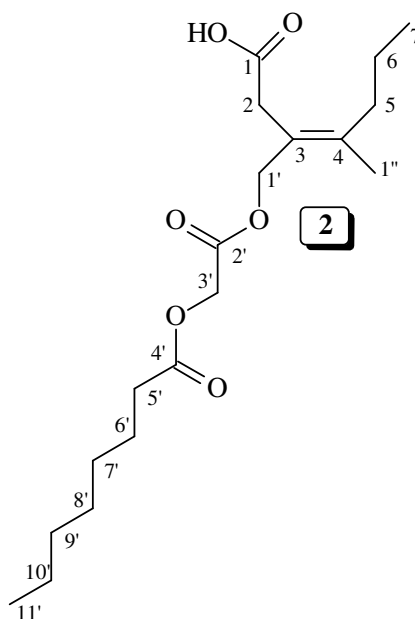


Figura 26: Proposta de fragmentação para perda do grupo metila da substância

1.

4.6.2 Identificação da substância 2

A substância **2** foi obtida como óleo viscoso, e identificada a partir da análise dos espectros de CG-massas, RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação dos deslocamentos químicos com dados registrados na literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 1994), foi possível concluir que a substância **2** corresponde ao ácido (3E)-4-metil-3-[[[(octanoiloxi)acetil]oxi]metil-3- heptenóico.



O espectro de RMN de ^1H (**Figura 27**) apresentou sinais característicos em δ 8,53 (sl) referente a hidroxila de ácido, δ 0,85 – 0,88 (d) hidrogênios ligados às metilas terminais, δ 1,88 (sl) assinalando a metila ligada a carbono olefínico, singletos em δ 3,63, 3,98 e 4,01 indicando a presença de carbonos carbinólicos, em δ 2,15 (t) sinal atribuído ao CH_2 ligado aos carbonos carbonílico e multipletos em δ 1,27 e 1,57 referentes aos hidrogênios da cadeia alifática (CH_2).

Acquisition Time(sec)	7.999	Comment	a495litcc	Date	30Jan2007090456
File Name	G700001	Frequency(MHz)	200.13	Nucleus	¹ H
Original Points	32768	Points	32768	Resolution	0.49323
Temperature(degrees C)	27.000	Relaxation	2.00	Method	MOD

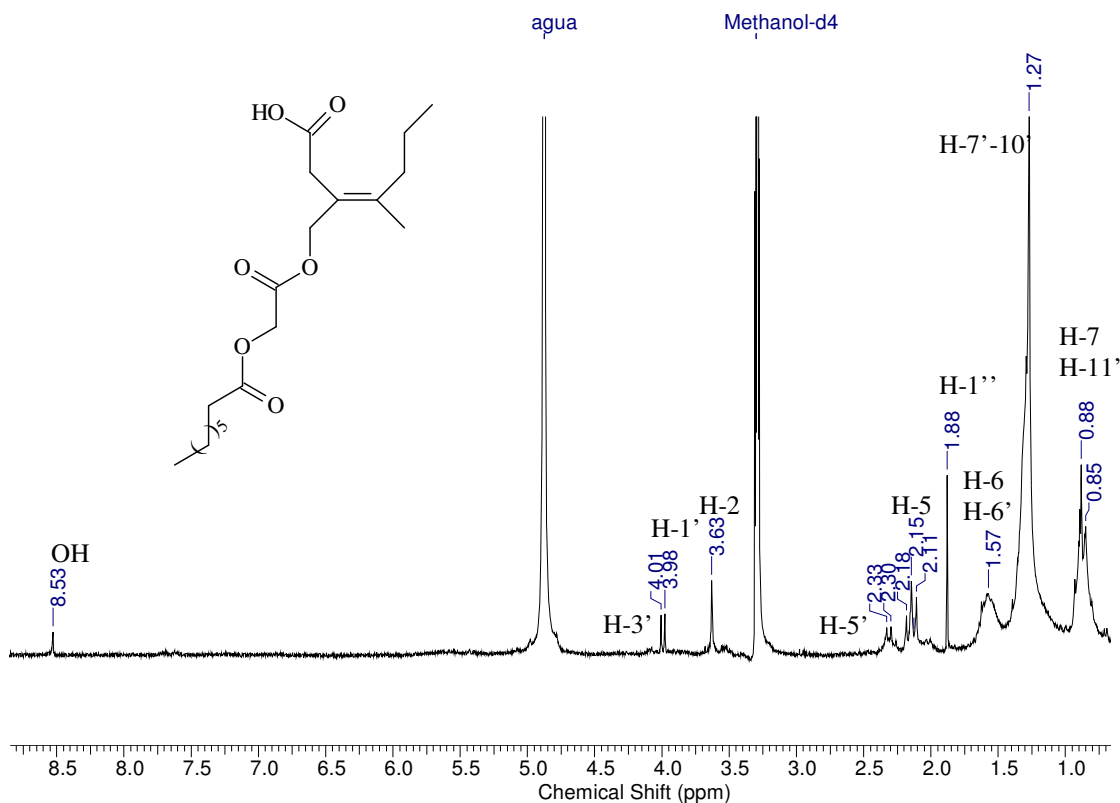


Figura 27: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da substância **2**.

O espectro de RMN de ¹³C (**Figura 28** e a expansão na **Figura 29**) apresentou sinais em δ 168,91 e 173,83, referentes a carbonos carbonílicos de éster C-2' e C-4', respectivamente, e em δ 180,91 carbono carbonílico de ácido C-1. Apresentou, também, sinais em δ 128,46 e 130,98 indicando a presença de carbonos olefínicos, em δ 22,30, 29,36, 31,65 e 33,64 atribuídos a carbonos metilênicos, em δ 62,97 e 66,25 referentes aos carbonos carbinólicos (C-1' e C-3'), e ainda, δ 22,18 indicando a metila ligado ao carbono olefínico e em δ 13,02 referente as metilas terminais. A **Tabela 4** indica os dados de RMN de ¹H e ¹³C para a substância **2**.

Acquisition Time(sec)	2.7263	Comment	a4951ttcc	Date	00'00'1980 00:00:00
Frequency(MHz)	50.32	Nucleus	¹³ C	Original Points Count	32768
Temperature(grad C)	0.000			Points Count	32768
				Sweep Width(Hz)	12019.23

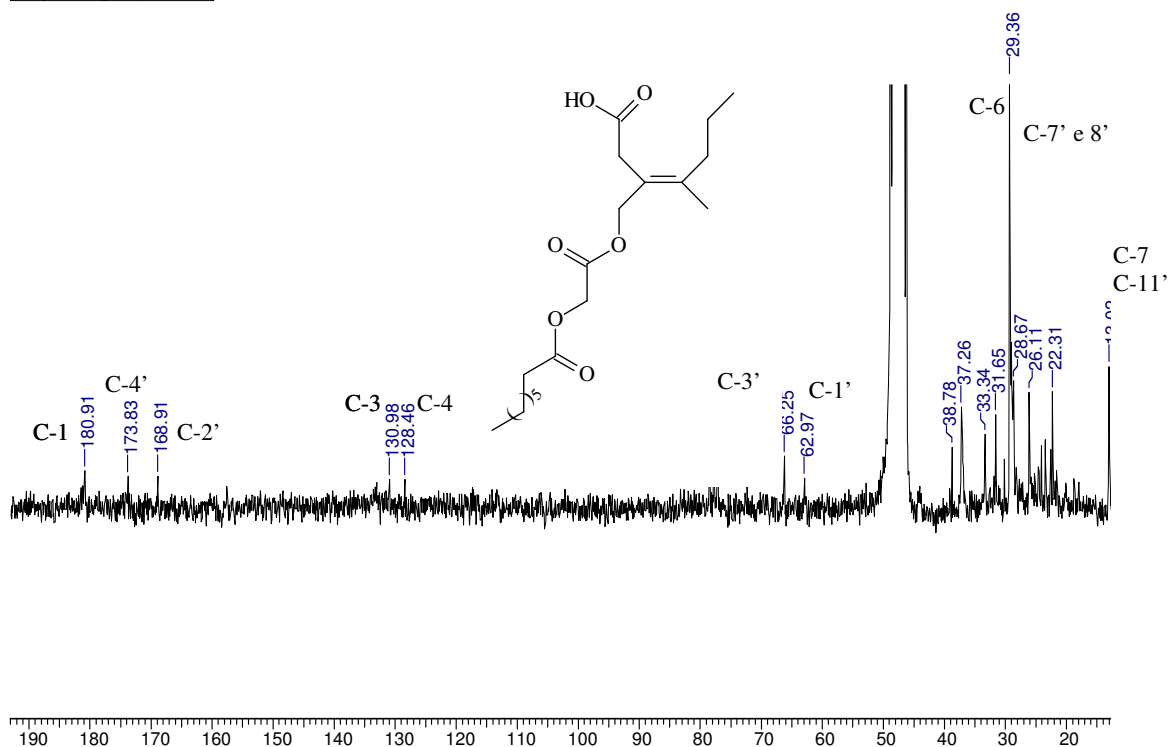


Figura 28: Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) da substância 2.

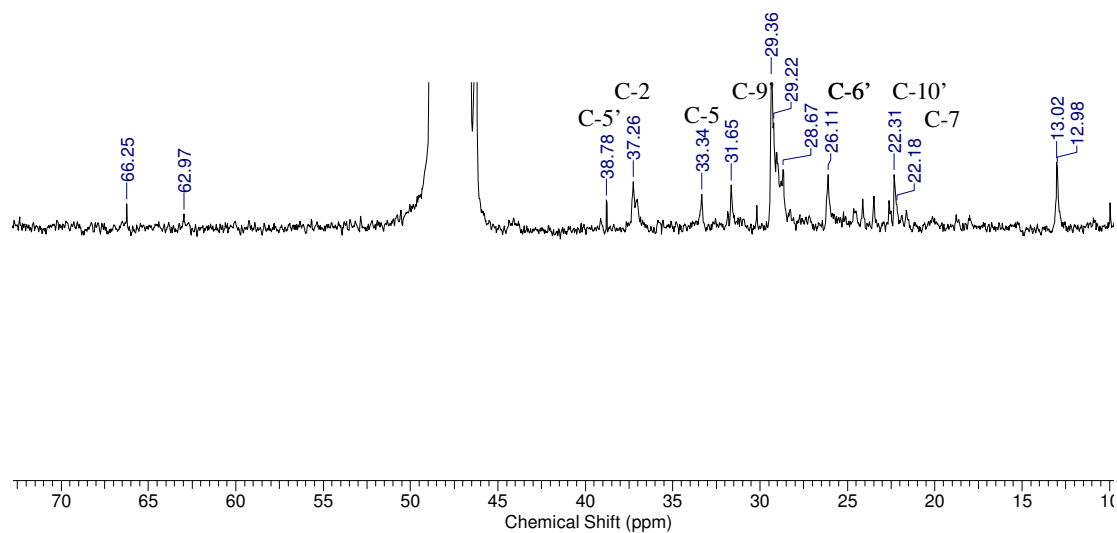


Figura 29: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância 2.

O espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear de hidrogênio-hidrogênio (^1H - ^1H -COSY) (**Figura 30**), permitiu através dos deslocamentos químicos apresentados, observar as correlações entre os sinais δ 2,15 e δ 1,57 representando o acoplamento entre os H-5 e H-6, a correlação entre os deslocamentos δ 2,33 com δ 1,57 representando o acoplamento entre os H-5' e H-6', H-6' e H-7' e δ 1,57 com δ 0,85-0,88 o que indicou o acoplamento entre H-10' e H-11. Apresentou, também, os sinais em δ 4,01, δ 3,98 e δ 1,88 referentes ao singletos dos H-3', H-1' e H-1'', que não acoplaram com nenhum outro hidrogênio, ajudando assim a confirmar a estrutura proposta. A **Tabela 4** indica os dados de ^1H - ^1H -COSY para a substância 2.

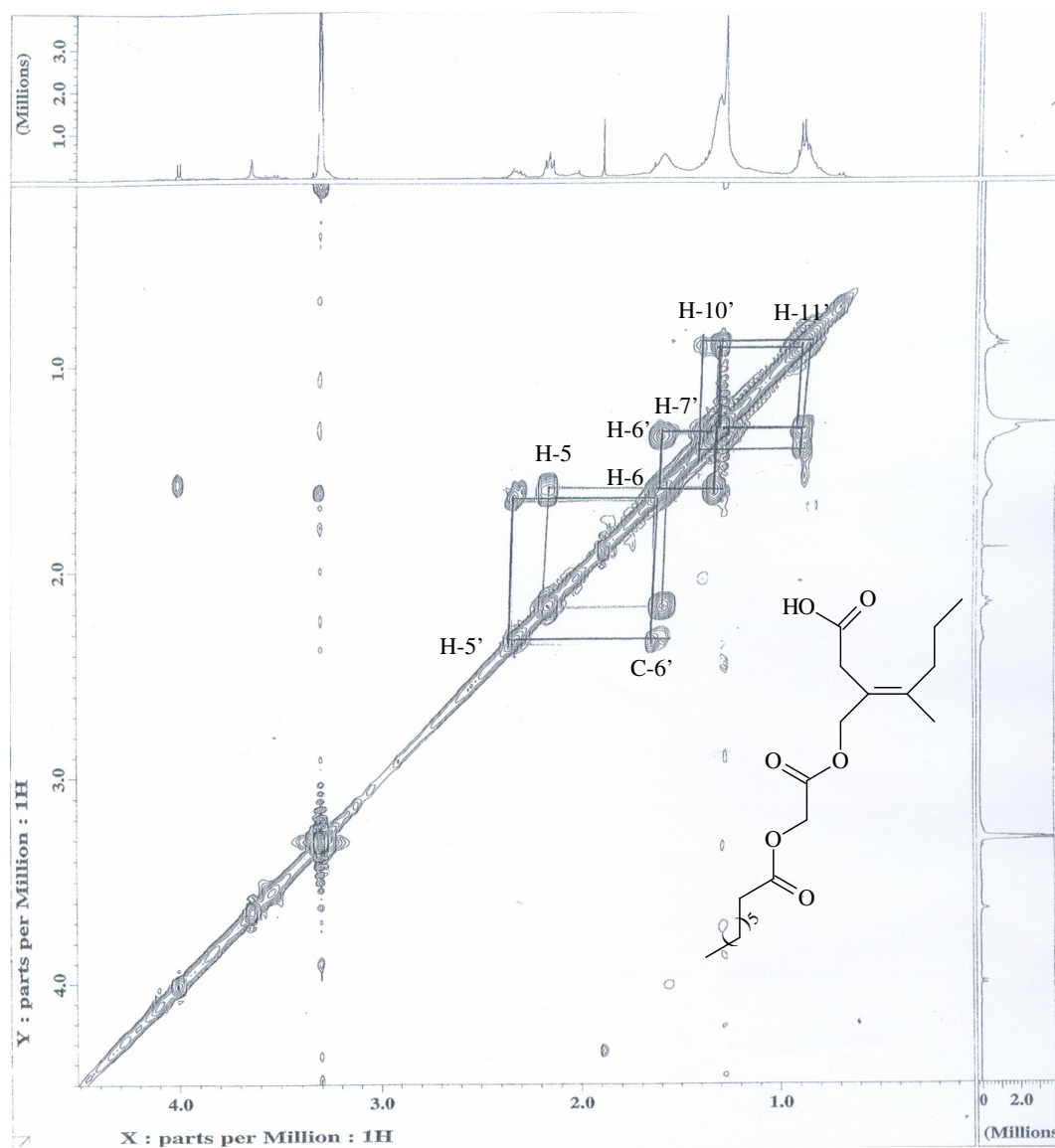


Figura 30: Espectro bidimensional da correlação homonuclear hidrogênio-hidrogênio (^1H - ^1H -COSY, 400 MHz) em MeOD da substância **2**.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C em MeOD da substância **2**.

C	δH	δC	^1H - ^1H -COSY
1	-	180,91	
2	3,63 (sl)	37,26	
3	-	130,98	
4	-	128,46	
5	2,15 (t, Hz)	33,34	H-6
6	1,57 (m)	29,36	H-5
7	0,85-0,88	12,98	
1'	3,98 (sl)	62,97	
2'	-	168,91	
3'	4,01 (sl)	66,25	
4'	-	173,83	
5'	2,33 (m)	38,78	H-6'
6'	1,57 (m)	26,11	H-5' e H-7'
7'	1,27 (m)	28,67	H-6'
8'	1,27 (m)	29,36	
9'	1,27 (m)	31,65	
10'	1,27 (m)	22,30	H-11'
11'	0,85-0,88	13,02	H-10'
1''	1,88	22,18	

O espectro de massas (**Figura 31**) ajudou na identificação da substância **2**, onde foi possível observar o pico correspondente ao íon molecular M^+ 371, e os picos m/z 129 (60%), 111 (100%), 83 (30%) e 55 (40%). A **Figura 32** mostra o esquema de fragmentação sugerido para **2**.

Chromatogram Plot

File: c:\cg-ms (rotina)\data\marcialana paula\A-49-51 t.t.c.c. sms
Sample: A-49-51 T.T.C.C.
Scan Range: 1 - 5127 Time Range: 0.00 - 40.99 min.

Operator: Frances
Date: 3/16/07 7:51 AM

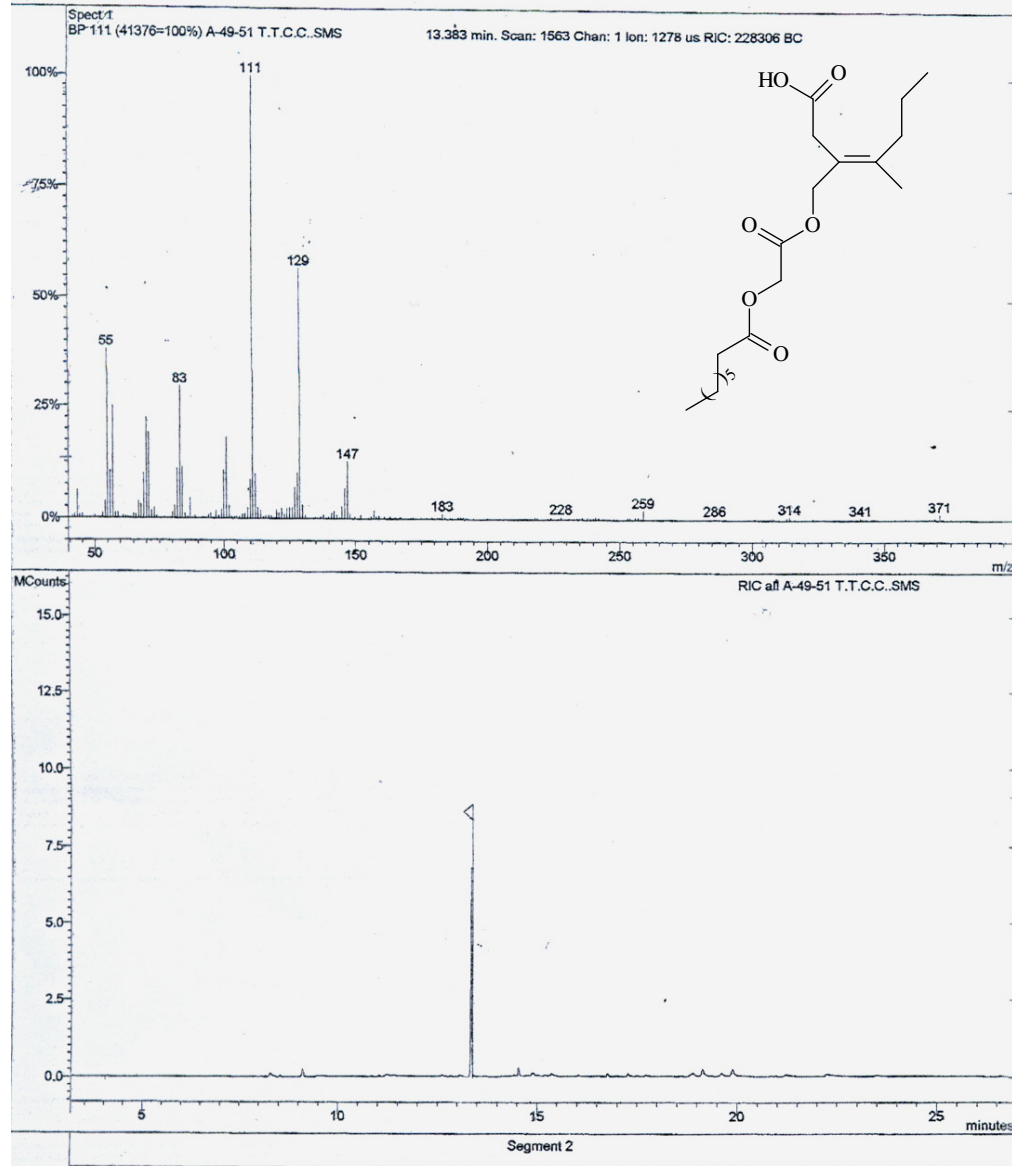


Figura 31: Espectro de massas e cromatograma da substância **2**.

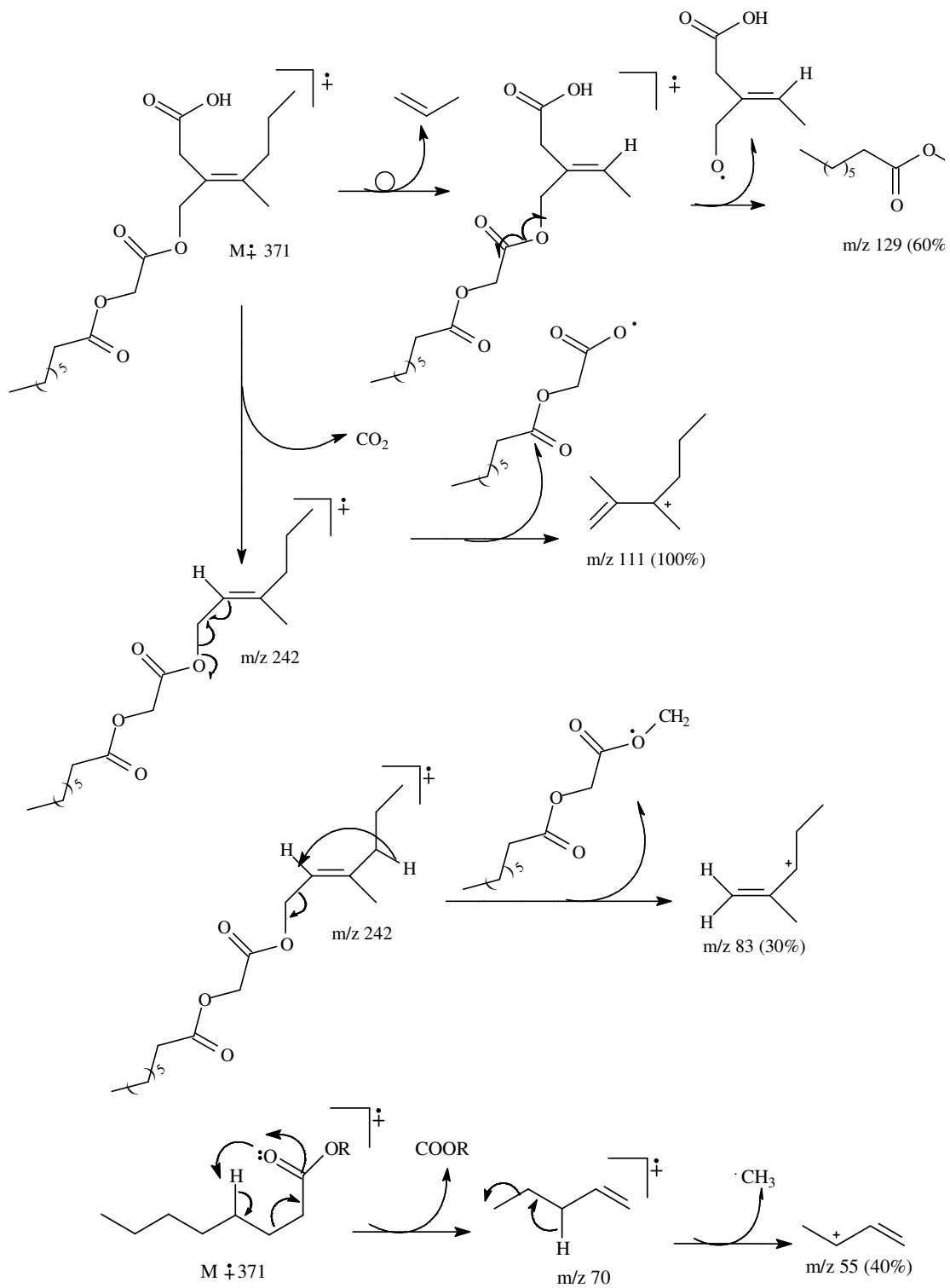
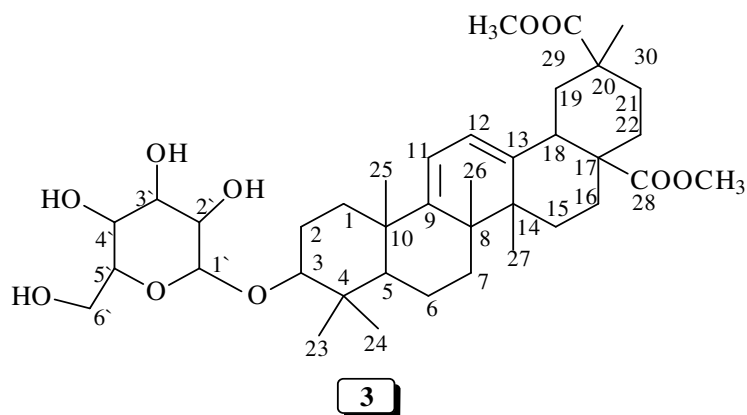


Figura 32: Proposta de fragmentação da substância 2.

4.6.3 Identificação da substância 3

A substância **3** foi isolada e caracterizada como um sólido pastoso de cor esverdeada, e a proposta para esta estrutura foi baseada em dados comparativos da literatura em diferentes estruturas moleculares.



O espectro de RMN de ^1H desta substância apresentou sinais (**Figuras 33 e 34**) característicos δ 1,70-1,28 referentes aos grupos CH_2 do esqueleto terpênico e hidrogênios ligados aos C - 25 e 26, em δ 0,89 e 0,86 (sl) de grupos metílicos em δ 4,09-3,62 (m) indicando a presença de uma unidade de açúcar em δ 3,64 (sl) indicando os hidrogênios dos carbonos carbinólicos, e ainda o sinal em δ 5,24 (dd) caracterizou a presença de hidrogênios olefínicos. A **Tabela 7** indica os valores dos deslocamentos químicos observados para **3** e os correspondentes dados da literatura obtidos para as estruturas dos grupos ursanos, amirina e oleananos (LIMA *et al.*, 2004).

7 Jul 20

Acquisition Time (sec)	7.9299	Comment	C 9-10	Date	30 Nov 2006 14:06:38
File Name	C:\Documents and Settings\Laboratório22\Meus documentos\Ana Paula\PAULA_002001r				
Frequency (MHz)	200.13	Nucleus	¹ H	Number of Transients	32
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	4132.23	Temperature (degree C)	27.000

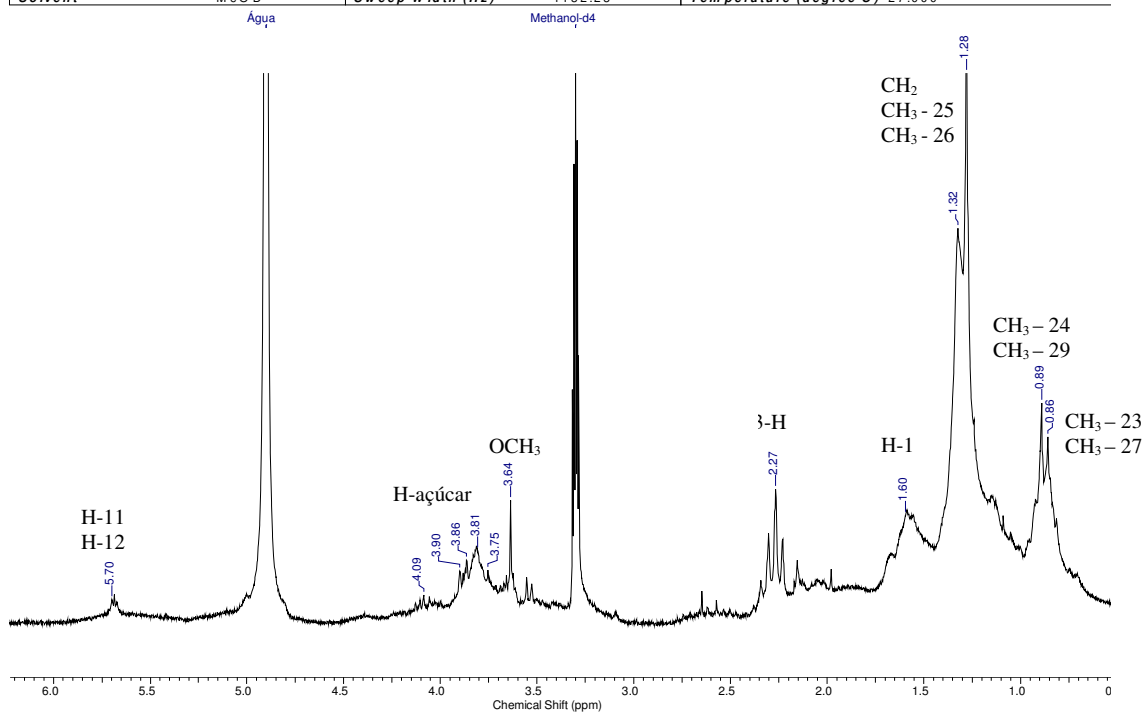


Figura 33: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da substância **3**.

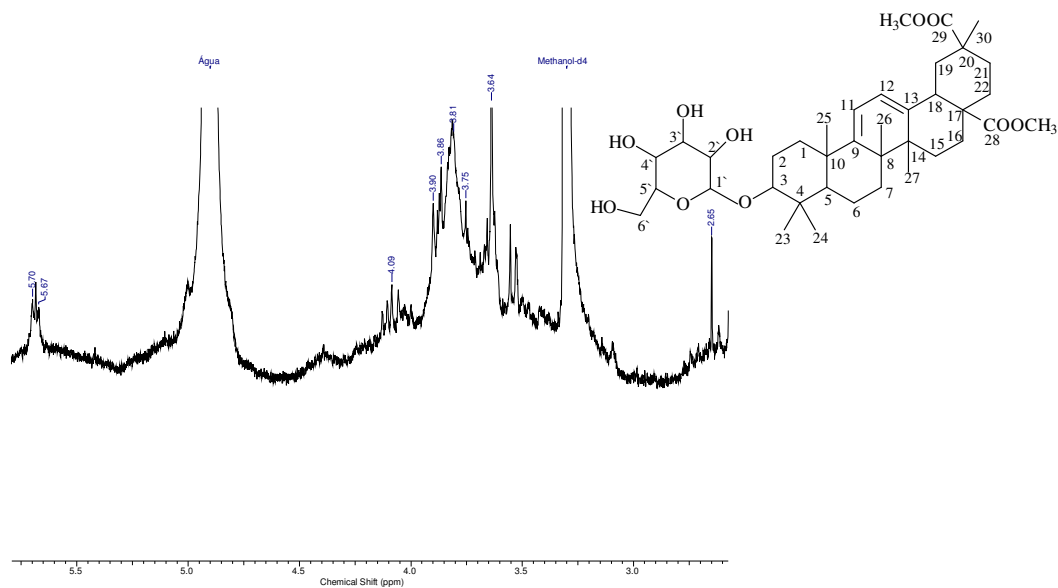


Figura 34: Expansão do espectro de RMN ¹H (200 MHz, MeOD) da substância

3.

Tabela 7: Deslocamentos químicos de RMN ^1H da substância **3**, comparados com dados da literatura (LIMA *et al.*, 2004)

H	δH	δH da literatura
1	1,60 (m)	1,52
2	1,28-1,60 (sl)	1,28-1,70
3	2,27 (t)	3,23
5	1,28-1,60 (sl)	1,28-1,70
6	1,28-1,60 (sl)	1,28-1,70
7	1,28-1,60 (sl)	1,28-1,70
11	5,69 (d)	1,28-1,70
12	5,70 (d)	5,24
15	1,28-1,60 (sl)	1,28-1,70
16	1,28-1,60 (sl)	1,28-1,70
23	0,86	0,77
24	0,89	0,97
25	1,28 (sl)	1,06
26	1,28 (sl)	1,05
27	0,86	0,82
29	0,89	0,82
O-CH ₃	3,64	3,63
H-açúcar	3,53-4,09 (m)	3,50-4,09

Iniciamente, considerando a estrutura como um todo, foi possível caracterizar à partir do espectro de RMN ^{13}C os sinais (**Figuras 35 e 36**) em δ 155,44 e 114,91, δ 129,37 e 1135,16 referentes aos carbonos olefínicos C-9, C-11, C-12, C-13, respectivamente. Apresentou, ainda, um sinal intenso em δ 176,52 referente aos carbonos carbonílicos de éster C-28 e C-29, e sinais característicos da unidade de açúcar em δ 103,88 e 76,63 - 62,64 que indicaram a presença de uma unidade de glicose. Apresentou, também, sinais em δ 55,03 e 55,31 referentes às metoxilas de éster. De acordo com a literatura o sinal correspondente ao C-19 aparece na região de absorção do solvente δ 46 - 49 (MeOD). Os deslocamentos químicos indicados acima e a

comparação com os dados da literatura permitiram determinar a substância **3** como éster olean-9,12-dien-3-(β -D-glicopiranosil)-28,29-dimetil.

Acquisition Time (sec)	2.7263	Comment	C9-10	Date	00/00/1980 00:00:00	Frequency (MHz)	50.32
Nucleus	^{13}C	Original Points Count	32768	Points Count	32768	Sweep Width (Hz)	12019.23
Temperature (grad C)	0.000						

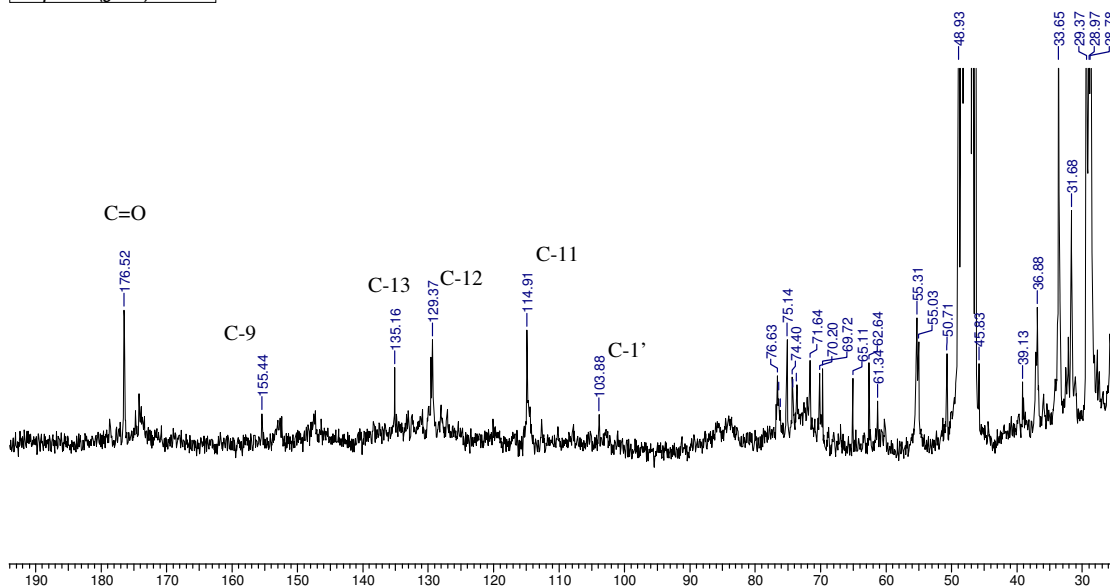


Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância **3**.

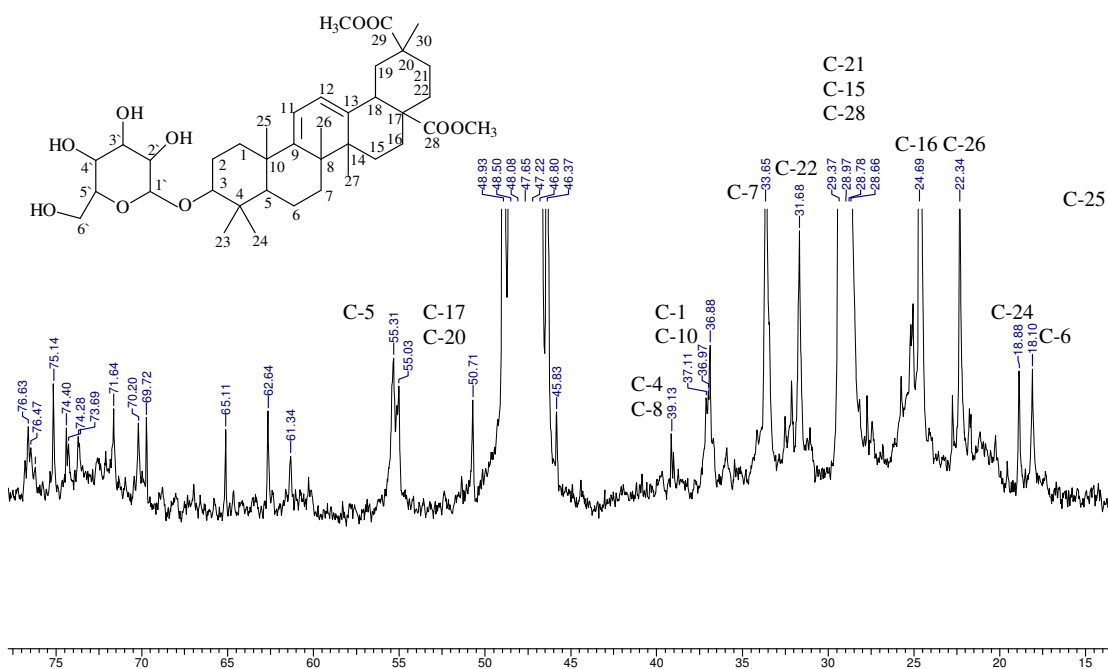


Figura 36: Expansão do espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, MeOD) da substância

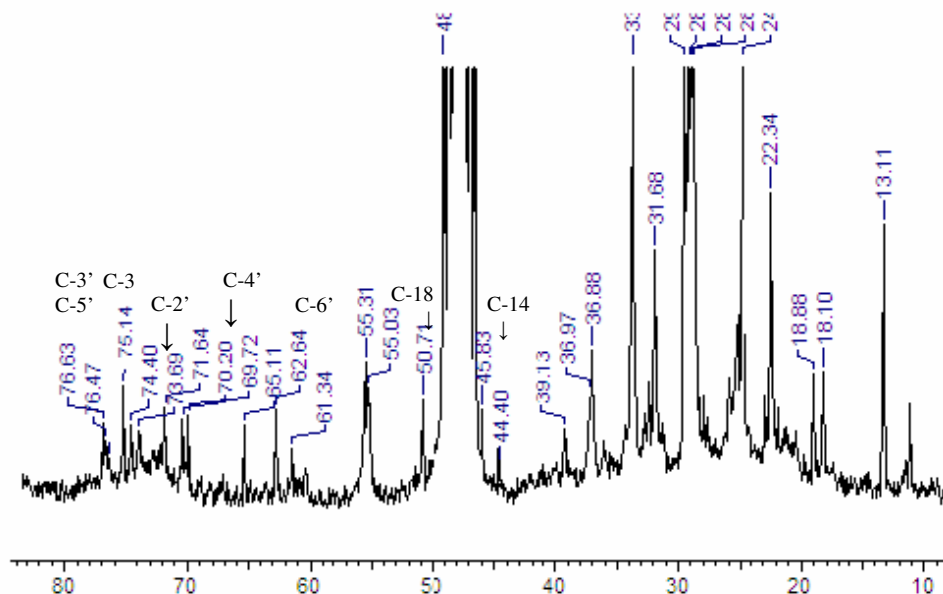


Figura 37: Expansão do espectro de RMN ¹³C (50 MHz, MeOD) da substância 3.

A partir dessas informações, a estrutura foi então, dividida em três partes, **A**, **B** e **C** de acordo com a semelhança dos deslocamentos químicos de triterpenos que pertenciam ao grupo espergulagenatos.

Os deslocamentos químicos de RMN ¹³C da parte **A** (**Figura 38**) foi comparada ao correspondente ácido olean-12-en-3-(β-D-glicopiranosil)-28,29-dimetil e outros triterpenos que continham açúcar ligado ao C-3. A **Tabela 8** indica os valores dos deslocamentos químicos atribuídos para as partes **A** de **3** em comparação com dados da literatura (KOHDA *et al.*, 1992, VIANA *et al.*, 2004 e KIYOTA *et al.*, 2007).

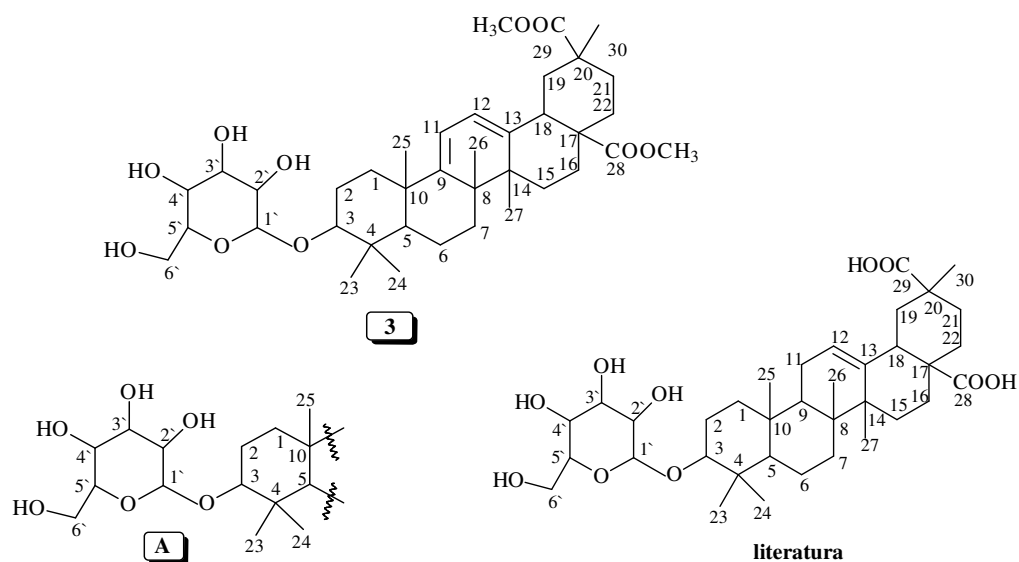


Figura 38: Parte A do composto **3** comparada com o ácido olean-12-en-3-(β -D-glicopiranosil)-28,29-dimetil (VIANA *et al.*, 2004).

Tabela 8: Deslocamentos químicos de RMN¹³C da parte A, da substância **3**, comparados com dados da literatura (KOHDA *et al.*, 1992, VIANA *et al.*, 2004 e KIYOTA *et al.*, 2007).

C(A)	δ C	δ C da Literatura
1	36,88	38,7
2	24,69	26,3
3	75,14	74,3
4	39,14	39,5
5	55,31	55,9
10	36,88	37,0
23	28,60	28,4
24	18,88	17,1
25	13,11	15,6
1'	103,88	100,7
2'	71,64	73,4
3'	76,64	76,7
4'	70,20	70,1
5'	76,63	76,7
6'	62,64	61,0

A parte **B** (**Figura 39**) apresentou deslocamentos químicos de RMN ^{13}C que foram comparados aos triterpenos que possuem sistemas dieno - 9(11), 12 pertencentes ao grupo dos ursanos, tal como 3β , 16β - diacetoxiurs-9(11),12-dieno. A **Tabela 9** indica os valores dos deslocamentos químicos atribuídos para as partes **B** de **3** em comparação com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994 e LIMA *et al.*, 2004).

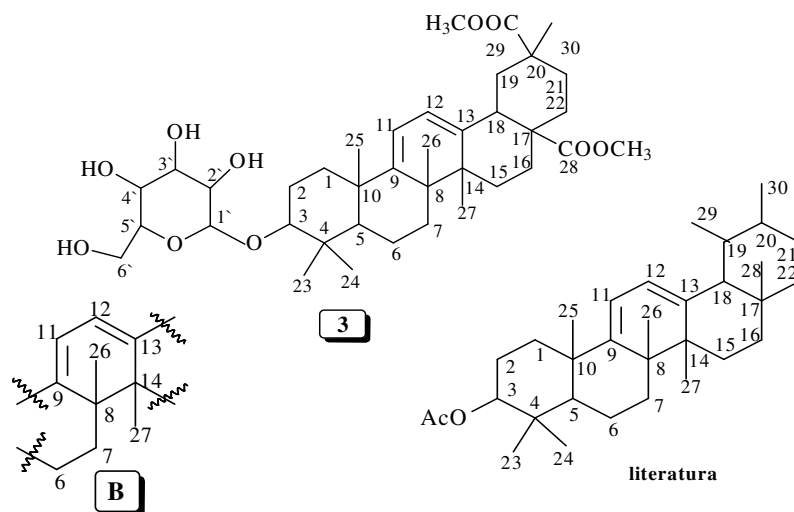


Figura 39: Parte **B** do composto **3** comparada com o 3β , 16β - diacetoxiurs-9(11),12-dieno (LIMA *et al.*, 2004).

Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da parte **B** da substância **3** comparados com dados da literatura (MAHATO & KUNDU, 1994 e LIMA *et al.*, 2004).

C(B)	δC	δC da Literatura
6	18,10	18,2
7	33,65	35,0
8	39,13	42,2
9	155,44	154,2
11	114,91	115,1
12	129,16	123,0
13	135,16	141,4
14	44,40	43,1
26	22,34	22,2
27	24,69	25,5

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C da parte **C** (**Figura 40**) da substância **3** foi comparado aos correspondentes valores do ácido olean-12-en-3-(β -D-glicopiranosil)-28,29-dimetil. A **Tabela 10** indica os valores dos deslocamentos químicos atribuídos para a parte **C** de **3** em comparação com dados da literatura (KOHDA *et al.*, 1992)

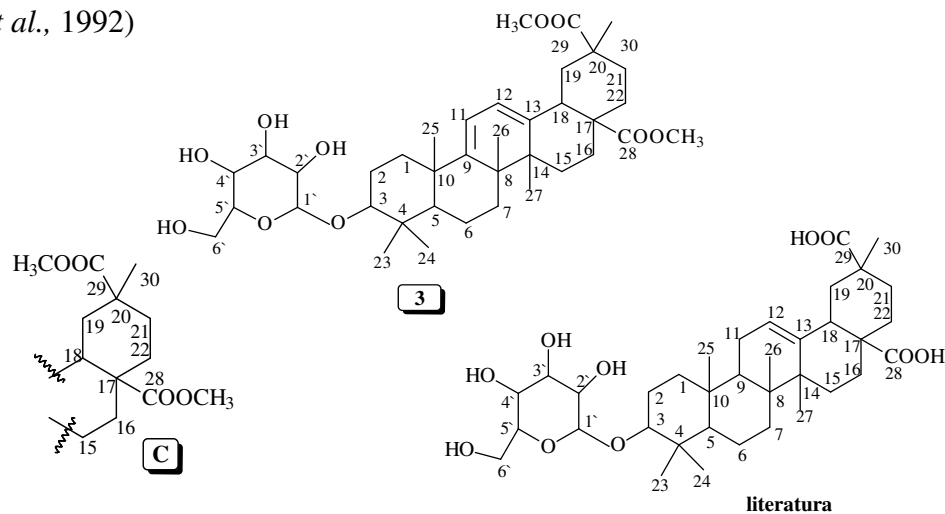


Figura 40: Parte **C** do composto **3** comparada com ácido olean-12-en-3-(β -D-glicopiranosil)-28,29-dimetil (KOHDA *et al.*, 1992).

Tabela 10: Dados de RMN ^{13}C da parte **C** da substância **3** comparados com dados da literatura (KOHDA *et al.*, 1992).

C(C)	δC	δC da Literatura
15	28,97	28,4
16	24,5	23,2
17	45,83	46,5
18	50,71	52,8
19	46,8	43,2
20	45,83	44,0
21	29,37	31,2
22	31,68	34,8
28	176,52	179,8
29	176,52	177,3
30	28,97	27,9
2 x OCH ₃	55,03	-

O espectro de massas (**Figura 41**) mesmo não apresentando o íon molecular auxiliou a confirmar a estrutura, pois o espectro forneceu picos m/z 412 (100%), 382 (73%), 269 (23%) e 91 (15%) característicos da fragmentação de substâncias terpênicas. A **Figura 42** apresenta a proposta de fragmentação para a substância **3**.

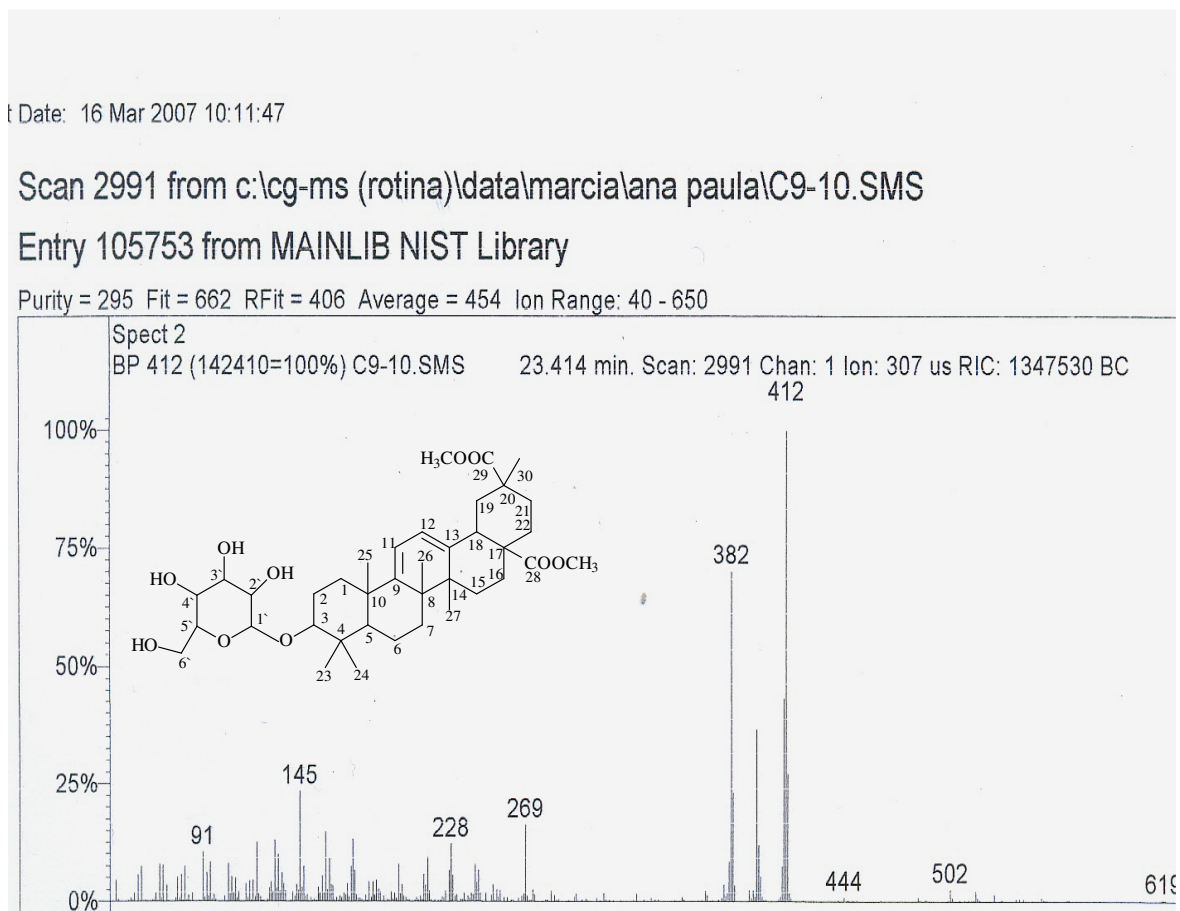
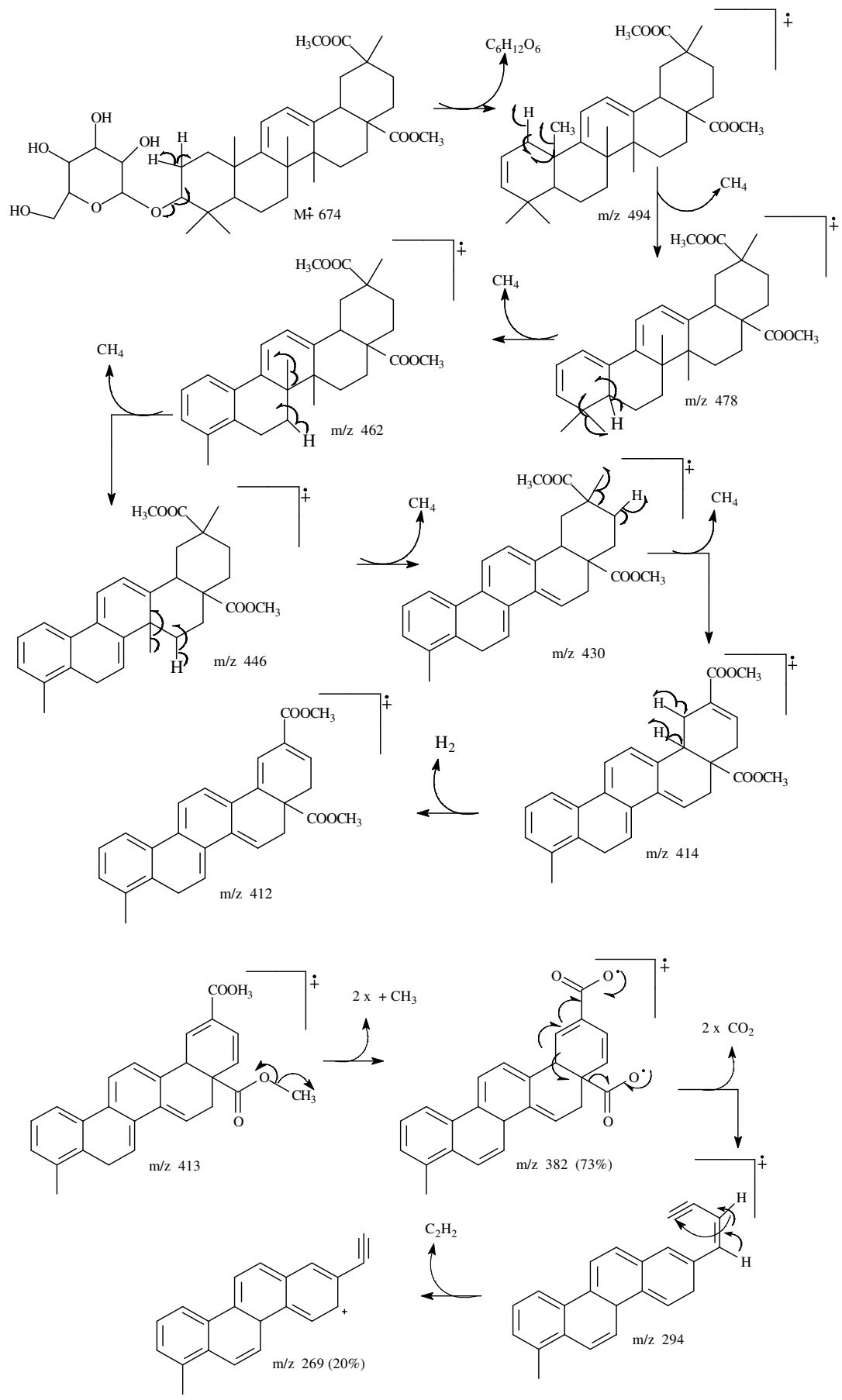


Figura 41: Espectro de massas da substância **3**.



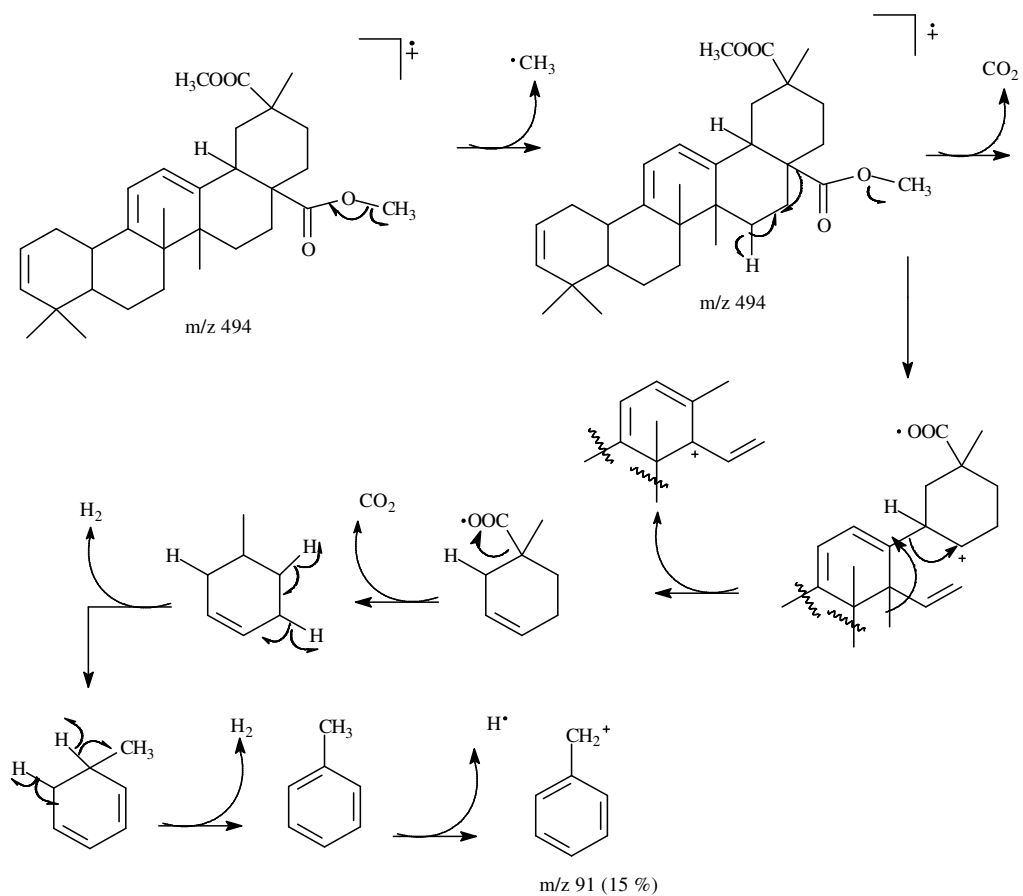


Figura 42: Proposta de fragmentação da substância 3.

4.7 Proposta Biossintética para o Triterpeno Isolado

Os terpenóides C_{30} são formados pela condensação “cabeça-cabeça” de duas unidades de farnesil pirofosfato (FPP) formando o esqualeno. Mais de 4000 triterpenos já foram isolados, com 40 esqueletos diferentes sendo os mais comuns os anéis pentacíclicos, como a β -amirina (OLIVEIRA, 2000).

Os terpenos são uma classe de substâncias provenientes da via pirofosfato de isopentenila, que da mesma forma que os esteróides, origina o esqualeno pela fusão cauda-cauda de duas moléculas de farnesil pirofosfato (DEWICK, 2000).

A biossíntese de isoprenóides foi inicialmente elucidada através do estudo de esteróides em animais e fungos. A chave para a biossíntese dos terpenóides foi a descoberta da via do ácido mevalônico (AMV) e mais tarde da via do acetil-CoA na formação do isopentenil pirofosfato (IPP), o qual é isomerizado a dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (**Figura 43 e 44**).

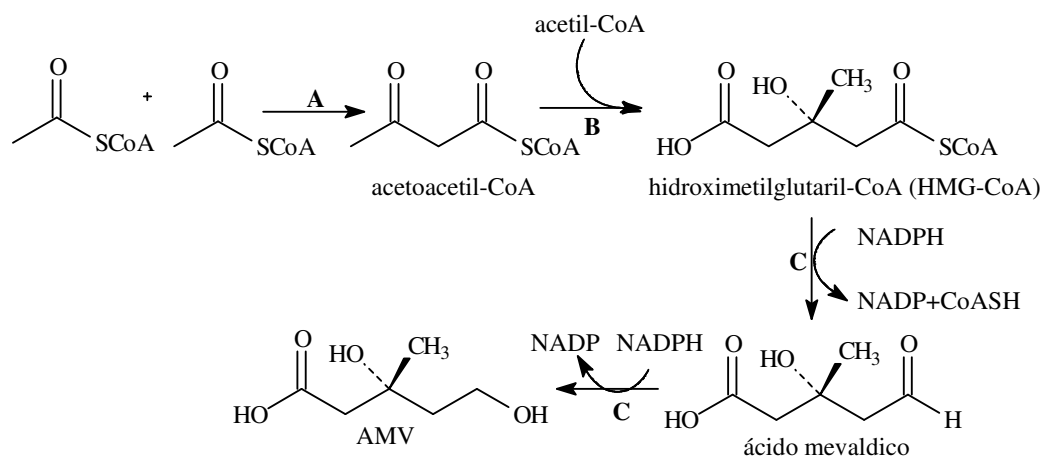


Figura 43: Conversão do acetil-CoA em AMV. Enzimas: **A** - acetoacetil CoA tiolase; **B** - HMG-CoA sintase; **C** - HMG-CoA redutase.

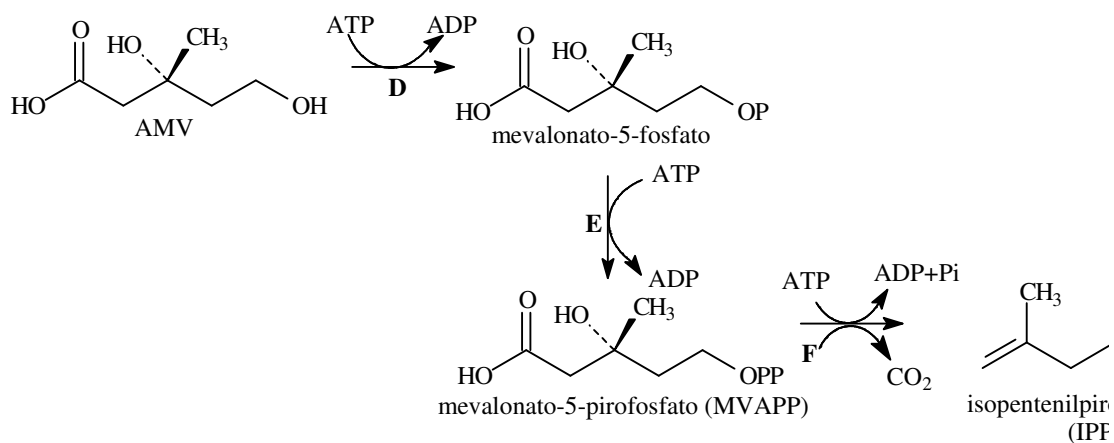


Figura 44: Conversão do AMV em IPP. Enzimas: **D** - AMV quinase; **E** - mevalonato-5-fosfato quinase; **F** - mevalonato5-difosfato quinase.

O DMAPP age como doador do grupo prenila à molécula de IPP, formando o geranyl pirofosfato (GPP) através da reação ee condensação “cabeça-cauda”. O GPP também age como doador de prenila a outra unidade de IPP formando FPP, as reações de condensação “cabeça- cauda” continuam sequencialmente formando prenil pirofosfato de alto peso molecular (**Figura 45**). Os terpenóides são formados por várias ciclizações, rearranjos, perda ou ganho de átomos de carbono através do arranjo linear das unidades isoprênicas (MANN, 1994 e DEWICK, 2000).

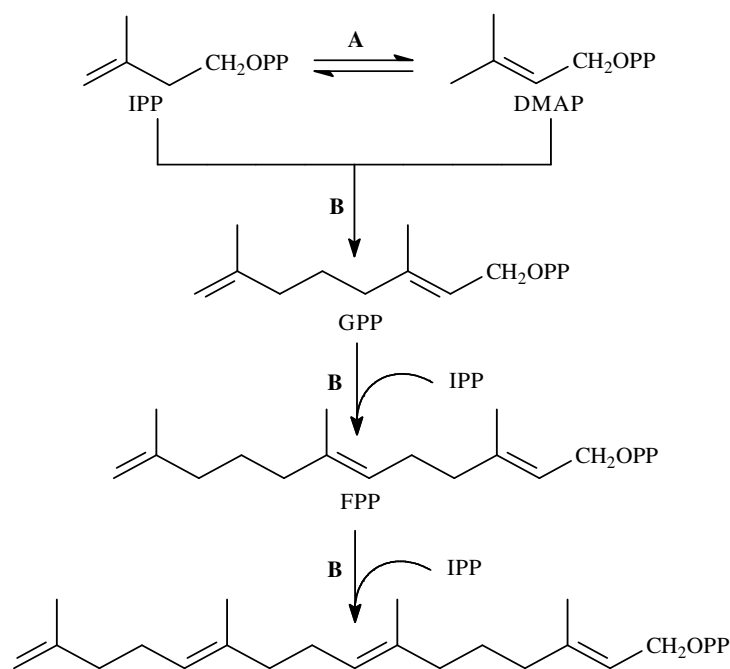


Figura 45: Isomerização do IPP e reações através de prenil transferase. Enzimas **A** -IPP isomerase; **B** - prenil transferase.

A formação dos terpenos envolve o óxido de esqualeno em sua forma “cadeira-cadeira-bote” que é ciclizado para gerar o cátion damarenil e, conseqüentemente, o cátion lupenil que pode ser estabilizado pela formação de um novo anel de cinco membros pela e de um anel de 6 membros, gerando o cátion oleanil, que posteriormente é estabilizado pela perda de hidrogênio formando uma ligação dupla entre os carbonos 12 e 13 representando o esqueleto básico da β -amirina (**Figura 46**) (MANN, 1994 e TORSSSELL, 1997).

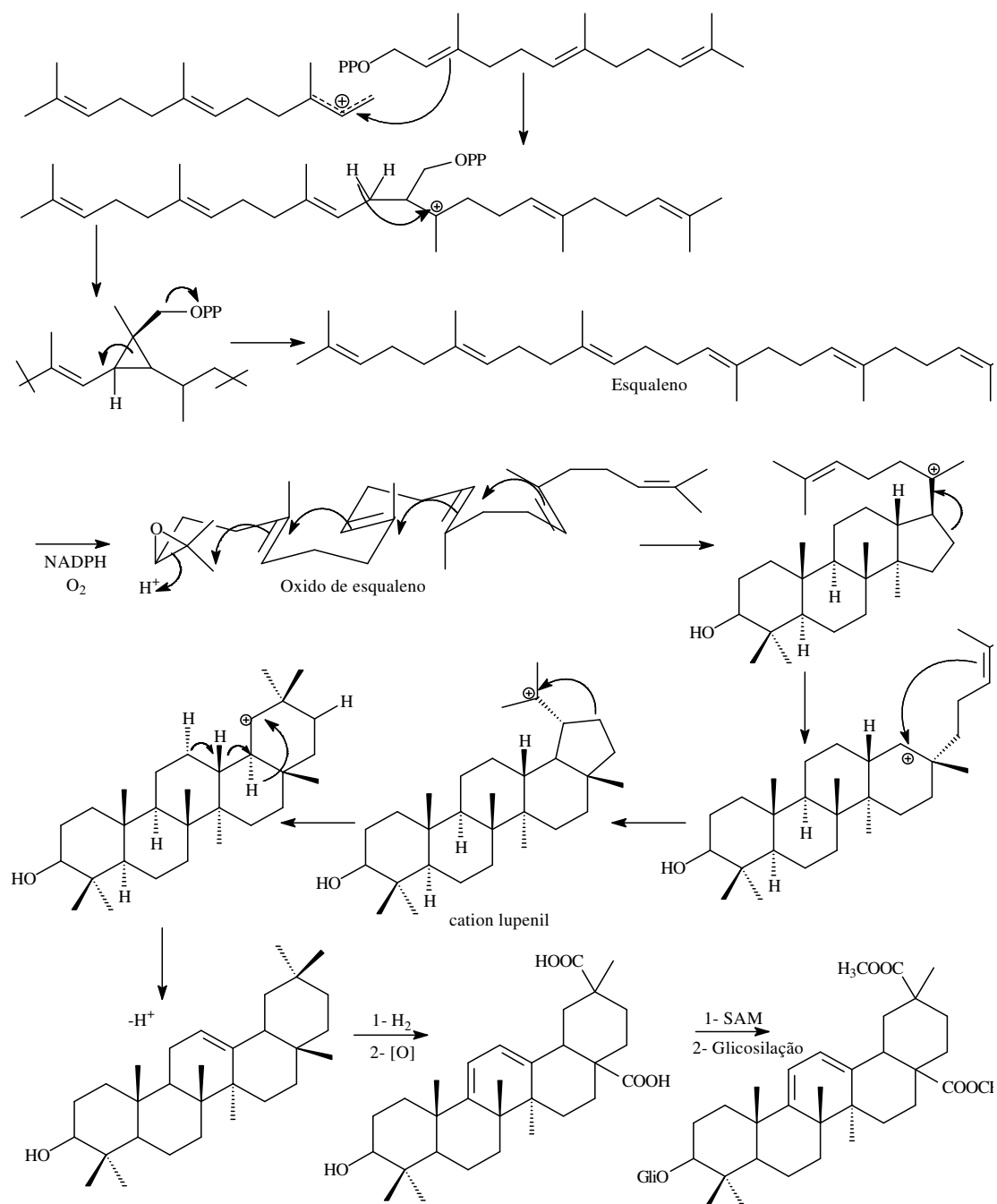


Figura 46: Proposta biossintética para substância **3**, o terpeno éster olean-9,12-dien-3-(β -D-glicopiranosil) 28, 29-dimetil.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho gerou novas informações quanto a química da família Portulacaceae e em particular para o gênero *Talinum*, pois este é o primeiro estudo químico realizado com o caule da espécie *Talinum triangulare*.

A análise dos resultados da prospecção química feita com as frações hidrometanólica e clorofórmica revelou a presença de fenóis, flavonóides, catequinas e outros constituintes que caracterizaram metabólitos da via do ácido chiquímico e do acetato.

A quantificação de fenóis utilizando a curva padrão de ácido gálico, resultou em uma concentração de fenóis totais 0,1400 g para o extrato bruto (hidrometanólico) e 0,5853 g para a fração hidrometanólica, por 100 g de caule de *T. triangulare*, respectivamente. Estes valores mostraram que a fração hidrometanólica apresenta maior concentração de fenóis.

A avaliação da capacidade de formação de complexo da espécie vegetal com íons Fe II, apresentou efeito semelhante ao do fitoterápico *Ginkgo biloba* usado clinicamente. Sendo assim, é esperado que a espécie *T. triangulare* por conter fenóis e complexar com íons Fe II, de modo semelhante ao *Ginkgo biloba*, também possa apresentar propriedades neuroprotetoras.

A avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH, revelou que o extrato bruto apresentou uma atividade de captura do radical livre com o valor de $EC_{50} = 526,11 \mu\text{g/mL}$, e a fração hidrometanólica $EC_{50} = 518,11 \mu\text{g/mL}$, sendo observado um maior efeito para a fração hidrometanólica.

O teste realizado com a enzima tirosinase, apresentou um ação inibitória com valor de $DI_{50} = 13,3 \mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto e para a fração hidrometanólica de $6,6 \mu\text{g/mL}$ indicando um maior potencial de inibição para a fração hidrometanólica.

Os resultados apresentados pela fração hidrometanólica estão coerentes para amostras que contêm teor considerável de fenóis, visto que, possuem capacidade complexante com íons metálicos e atividade antioxidante.

O estudo fitoquímico da fração clorofórmica permitiu isolar e identificar três substâncias, sendo um éster (octadecanoato de metila), um ácido acetiloxi insaturado inédito {ácido (3E)-4-metil-3-[(octanoiloxi)acetiloxi]metil-3-heptenóico} e o triterpeno (ester olean-9,12-dien- 3-(β -D-glicopiranosil)- 28,29-dimetil), também ainda não relatado na literatura.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENNIYI, A. A. Determination of cadmium, cooper, iron, lead, manganese, and zinc in water leaf (*Talinum triangulare*) in dumpsites. *Niger*, 22 (2), 259-262, **1996**.

ALJADI, A. M. & KAMARUDDIN, M. Y., Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513-518, **2004**.

ARANHA, C.; LEITÃO, H. F. F. E YAHN, C. A. Sistemática de Plantas Invasoras. *Instituto Campineiro de Ensino Agrícola*, 1ª Ed., **1988**.

AKINDAHUNZIA, A. A. & SALAWU S. O., Phytochemical screening and nutrient-antinutrient composition of selected tropical green leafy vegetables. *African Journal of Biotechnology*, 4 (6), 497-501, **2005**.

AURORA, A., NAIR, M., GAND STRANSBURG, G, M., Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 356 (2), 133, **1998**.

BARA, M. T. F., CIRILO, H. N., OLIVEIRA, V. Determinação de Ginkgoflavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias primas e produtos acabados. *Revista eletrônica de Farmácia*, 1 (1), 1-7, **2004**.

BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M., Química Medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. *Editora ARTMED*, 53-59, **2002**.

COLLINS, C. H.; BRAGA G. L. E BONATO P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. 7ª Ed. *Editora Unicamp*, **1997**.

CONCHOROSKI, D. D. & CÔRREA, G. G. Tratamento de hiperchromia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. *Informa*, 17 (3), 4, **2005**.

DEWICK, P. M., Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach. 2ª Ed., *John Wiley e Sons*, 507, **2002**.

DANIEL, J. F. DE S. Metabólitos especiais isolados de *Ouratea hexasperma* (Ochnacea), *Dipladenia martiana* (Apocynacea) e de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae). Tese de Doutorado, UFRRJ, 293-294, **2004**.

ESPÍN, J. C. & WICHERS, H. J. Effect of captropil on mushroom tyrosinase activity in vitro. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1544, 289-300, **2001**.

HOSTETTMAM, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C., Princípios Ativos de Plantas Superiores. *EduFScar, São Carlos*, **2003**.

http://ibws.nexenservices.com/talinum_triangulare.html acessado em 19/01/06.

<http://forum.funghiitaliani.it/index> acessado em 20/02/2006.

<http://imagens.google.com.br/> acessado em 01/04/2006

<http://www.achetudoergiao.com.br> acessado em 10/01/2007

<http://members.tripod.co.uk> acessado em 25/07/2007

KIM, Y. J. & UYAMA, H. Review: Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective. *CMLS, Cell Molecular Life Science*, 62, 1707-1723, **2005**.

KIYOTA, N., SHINGU, K., YAMAGUCHI, K., YOSHITAKE, Y., HARANO, K., YOSHIMITSU, H., IKEDA, T., NOHARA, T. New C₂₈ steroidal glycosides from *Tubocapsicum anomalum*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 55 (1) 34-36, **2007**.

KOHDA, H.; YAMOAKA, Y.; MORINAGA, S.; ISHAK, M.; DARISE, M. Saponins from *Talinum triangulare*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40 (9), 2557-2558, **1992**.

KOBAYASHI Y., VIEIRA W. D. PROTTER B., SAKAI C. AND IMOKAWA G. Modulation of melanogenic protein expression during the pheomelanogenesis *Journal Cells Science*, 108, 2301-2309, **1995**.

IANSSEN, C. & COL. *Livro de resumos do XVII Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 897, **2002**.

LEE, H. S., Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* Root - derived materials. *J. Agriculture Food Chemistry*, 50, 1400-1403, **2002**.

LIMA, M. P., BRAGA, P. A. C., MACEDO, M. L., SILVA, M. F. G. F., FERREIRA, A. G., FERNANDES, J. B., VIEIRA, P. C. Phytochemistry of *Rattinnickia burserifolia*, *Talinum rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic implications. *Journal Brazilian Chemistry Society*, 15 (3), 385-394, **2004**.

MAHATO, S. B. & KUNDU, A. P. Review Article Number 98 - ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37 (6), 1517-1575, **1994**.

MANN, J., Chemical Aspects of Biosyntheses, 1^a ed. *Oxford University press*. *New York*, **1994**.

MATOS, F. J. & ABREU. Introdução à Fitoquímica Experimental, 2^a Ed., *Fortaleza: Edições UFC*, **1997**.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J. E NACOULMA, O. G., Determination of the phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91 (3), 571-577, **2005**.

MENSOR , L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T. C. DOS, COUBE, C. S., LEITÃO S. G., Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15, 127-130, **2001**.

MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. Harper: Bioquímica. 6ª Ed., **1990**.

NANQUIN Z.; SHUQUN S.; SHENGMIN S.; JIN-WOO J.; NAISHENG B., MUKUND V. K.; ROBERT T. R.; CHI-TANG H., Triterpene, saponins from *Debittered Quinoa (Chenopodium quinoa) seeds*. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50 (4), 865-867, **2002**.

NAKANISHI, K. Terpene trialactones from *Ginkgo biloba*: from ancient times to the 21st century. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 4987-5000, **2005**.

NAKANISHI, T., INATOMI, Y., MURATA, H., ISHIDA, S., FUJINO, Y., MIURA, K., YASUNO, Y., INADA, A., LANG, F. A., MURATA, J. Triterpenes and flavonol glucuronides from *Oenothera cheiranthifolia*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 55 (2) 334-336, **2007**.

OLIVEIRA, M. C. C.; Constituintes Químicos de *Luxemburgia Nobilis eichl*. Tese de Doutorado. *UFRRJ*, **2000**.

PEREIRA JR, O. L., WOLTER, W., ROCHA, A. F. I., CARVALHO, M. G., BRAZ, R., Diterpenos isolados de *Guarea carinata*. *Química Nova* 13 (4), 247-249, **1990**.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., SILVA, V. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. A., Produtos Naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, 25 (1), 45-61, **2002**.

REZENDE, A. D. Prospecção química das folhas de *Talinum triangulare (Jacq.) Willd. (Portulacaceae)*. Monografia, *UFRRJ*, **2005**.

RODRIGUES, M. I. A. & FURLAN, A., Livro de resumos do 54º Congresso Nacional de Botânica 3ª Reunião Amazônica de Botânica Local do Evento: Universidade da Amazônia - *UNAMA*, R0165-1, **2003**.

SANTOS, N. P., PINTO, C. ALENCASTRO, R. B. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil Imperial. *Química Nova*, 21 (5), 666-670, **1998**.

SEO, Y., SHIN, J., LEE, B., LEE, D. S., Two Biophenolic Glycosides from *Portulaca oleracea*. *Journal of the Korean Chemical Society*, 47 (1), 43-46, **2003**.

SHIMIZU, K., KONDO, R., SAKAI, K., LEE, S., SATO, H. The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. *Planta Medica*, 64, 408-412, **1998**.

SHIMIZU, K., KONDO, R., SAKAI, K. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenos and related 4-substituted resorcinols: struture-activity investigations. *Planta Medica*, 66, 11-15, **2000**.

SILVA, I. M. R., SILVA, A. C. S. B., GRYNBERG, N., OLIVEIRA, M.C.C. Avaliação da interação de amostras comerciais de *Ginkgo biloba* com íons de Fe⁺⁺. 43º Congresso Científico do HUPE, UERJ, **2005**.

SILVA, T. M. S., CAMARA, C. A., LINS, A. C. DA S., BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, E. M. S. DA, FRITAS, B. M., SANTOS, F. DE A. R. DOS. Chemical composition and free scavengig activity of pollen loads from stingless bee *Melípona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507-511, **2006**.

SILVA, S., GOMES, L., LEITÃO, F. COELHO, A. V., VILAS BOAS, L., Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea L.* fruits and leaves. *Food Science Technology Institute*, 12 (5), 385-396, **2006**.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L., Pratical HPLC Method Development. *New York, John Wiley are Sons*, **1998**.

SEPULVIDA, F. C. Prospecção Química de extratos do caule de *Talinum triangulare (Jacq.) Willd. (Portulacaceae)*. Monografia, UFRRJ, **2005**.

SILVERSTEIN, R. M.; ASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. *Guanabara Koogan*, 5^a Ed., 221, **1994**.

SOUSA, C. M. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, L. S. C., ARAÚJO, D. D., CAVALCANTE, L.C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30 (2), 351-355, **2007**.

TORSSELL, K. B. G., Natural Product Chemistry: a Mechanistic, Biosynthetic and Ecological Approach. 2^a Ed. *Kristianstads Boktryckeri AB. Sweden*, **1997**.

TSIMOGIGIANNIS, D. I. & OREOPOULOU, V. The contribution of C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 140-146, **2006**.

VIANA, F. A., BRAZ, R., POULIQUEN, Y. B. M., ANDRADE, M., SNTIAGO, G. M. P., RODRIGUES, E. Triterpenoid saponins from stem bark of *Pentaclethra macroloba*. *Journal Brazilian Chemical Society*, 15 (4), 595-602, **2004**

VIEGAS JR, C., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28 (3), 519-528, **2005**.

VIEGAS JR, C., BOLZANI, V. S., ELIEZER J. B. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, 29 (2), 326-337, **2006**.

www.naturalnet.com.br/generos/Talinum.html acessado em 12/10/2005

www.saude.gov.br acessado em 23/11/2005.

www.ceunossasenhoraconceicao.com.br/plantas/planta acessado em 19/01/2006

www.ansci.cornell.edu/plants/medicinal/politula.html acessado em 19/01/2006

www.plantamed.com.br/gen/Talinum.htm acessado em 22/01/2006

www.agridata.mg.gov.br/beldroega.htm acessado em 20/02/2006

www.plantasmedicinales.org acessado em 20/02/2006

www.prota.org acessado em 03/03/2006

www.teses-saudepublicatanino.htm acessado em 12/06/2006

www.associazionefiorentinaornitologica.it/Art... acessado em 12/06/2006

www.texascollaborative.org/.../topic3.htm acessado em 12/06/2007

www.texascollaborative.org/.../topic3.htm acessado em 12/01/2007

www.stanford.edu/group/vitousek/folin.html acessado em 12/01/2007

www.pt.wikipedia.org/wiki/espinafre acessado em 11/10/2007

www.biotech.tipo.gov.tw/plantjpg/2/ acessado em 11/07/2007

ZILLER, S. R. Plantas exóticas invasoras: a ameaça de contaminação biológica. *Revista Ciência Hoje*, 30 (178), 77-79, **2000**.