

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu



PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ALELOPÁTICA DE *Myrcia bella* Cambess.

LUIZ LEONARDO SALDANHA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia

BOTUCATU - SP 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Julio de Mesquita Filho" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ALELOPÁTICA DE *Myrcia bella* Cambess.

LUIZ LEONARDO SALDANHA

PROF^a DR^a ANNE LÍGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO ORIENTADORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia

BOTUCATU - SP 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Saldanha, Luiz Leonardo.

Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de *Myrcia bella* Cambess. / Luiz Leonardo Saldanha. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro Capes: 20303009

1. Antioxidante. 2. Alelopatia. 3. Flavonoides. 4. Plantas medicinais – Uso terapêutico. 5. Agentes alelopáticos.

Palavras-chave: Antioxidante; Alelopatia; Flavonoides; HPLC-ESI-IT-MS; *Myrcia bella*.

Dedico este trabalho aos meus pais Tercílio e Isete, ao meu irmão Eduardo e à minha avó Maria, que sempre me deram amor e carinho tornando tudo isso um sonho...

Agradecimentos,

Agradeço especialmente a Prof^a. Dr^a. Anne L. Dokkedal Bosqueiro por acreditar no meu potencial desde a iniciação científica e abrir as portas do seu laboratório me dando liberdade para que eu pudesse aprender processos/métodos que tornaram esse trabalho de mestrado possível. Agradeço pelas discussões/orientações que me fizeram não somente conquistar um sonho, mas que também me fizeram ser a pessoa que sou hoje.

À Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos e ao Prof. Dr. Wagner Vilegas por me receberem nos seus laboratórios onde obtive valiosos ensinamentos que muito enriqueceram minha formação. Ainda agradeço especialmente aos alunos Lima-Neto, Claudinha, Fabi, Luiza, Aline, Leonardo, Marcelo Tangerina, Maria do Socorro, Fabiano, e Silvia pelas extensas discussões pertinentes ao trabalho e pelo excelente convívio quando estive em Araraquara.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela realização dos espectros de NMR e ao Dr. Alberto Camilo Alécio pelas longas horas de experimentos de MS.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes por ajudar no delineamento dos experimentos com DPPH e quantificação por HPLC além de disponibilizar o uso do HPLC.

Ao Prof. Dr. Osmar Cavassam pela ajuda durante o reconhecimento da área de coleta do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida por me receber em seu laboratório para os experimentos de alelopatia, além das discussões sobre o tema.

À Dr^a. Juliana Severi e ao Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida pela avaliação do meu trabalho durante o exame geral de qualificação e pelos conselhos que me deram.

Aos professores da banca por terem aceitado estar presentes na defesa e contribuírem para a finalização desse trabalho.

Aos amigos da Pós-Graduação Natália, Sarah, Ferdinanda, João Nelito e Thaís principalmente pela nossa amizade e companheirismo desde a graduação e pelas discussões nos "cafezinhos" sobre assuntos pertinentes à vida acadêmica e aos assuntos da vida.

Aos colegas de Pós-Graduação Pri, Nath e Laís pelo convívio, amizade, companheirismo e lembranças dos congressos que participamos durante o mestrado.

Ao sítio Beira Serra que sempre me acolheu neste lugar único durante as idas à Botucatu.

Ao Grigo principalmente pela nossa amizade e pelo tempo que me acolheu em Araraquara.

Ao Jardim Botânico Municipal de Bauru pelo apoio para as coletas do material vegetal.

A todos os funcionários do departamento de Botânica de Botucatu e do departamento de Ciências Biológicas de Bauru em especial a Nicole, que sempre estiveram disponíveis e empenhados para solucionar os assuntos da pesquisa.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação por todos os serviços realalizados e dúvidas esclarecidas.

À FAPESP pelo apoio financeiro e a CAPES pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo o meu sincero reconhecimento.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho

original".

(Albert Einstein)

SALDANHA, L. L. PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ALELOPÁTICA DE *Myrcia bella* Cambess. 2013. 162p. Dissertação – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

As plantas sempre desempenharam e continuam a desempenhar um papel fundamental na manutenção da vida humana, fornecendo alimentos e medicamentos principalmente. A utilização de plantas é uma prática comum na medicina tradicional brasileira e está fundamentada no acúmulo de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por grupos étnicos. Tribos indígenas e comunidades tradicionais do Brasil têm usado algumas espécies de Myrcia como adstringente, contra diabetes, diarréia, como diurético, para conter hemorragias, contra hipertensão e úlceras. Myrcia bella ocorre naturalmente no cerradão na região de Bauru. Tradicionalmente o estudo de produtos naturais de origem vegetal é feito com a utilização de métodos de isolamento e purificação de substâncias orgânicas associado às principais técnicas espectrométricas e espectroscópicas de identificação (UV, NMR, IR e MS); no entanto, todas as etapas envolvidas são demoradas. Considerando as técnicas de detecção atuais, a espectrometria de massas (MS), normalmente com ionização por *electrospray* (ESI) e combinada com um HPLC com detector de fotodiodos (PAD), parece ser a técnica mais importante e menos demorada para estudos de extratos vegetais orgânicos. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico do extrato EtOH 70% das folhas Myrcia bella utilizando as técnicas atuais de detecção, aliada à Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e a avaliar as atividades antioxidante e alelopática. Os resultados obtidos indicaram que o extrato EtOH 70% das folhas de M. bella possui compostos derivados de ácidos fenólicos e flavonoides heterosídeos e galoil heterosídeo. Amostras purificadas da fração nbutanólica, obtida por LLE do EtOH 70% possibilitaram a identificação de 22 compostos. A análise quantitativa do EtOH 70% mostrou que os flavonoides estão presentes em maior concentração quando comparado com os ácidos fenólicos. O composto quercetina-3-O-α-L-arabinofuranosídeo com 29,99 µg.mL⁻¹ foi o composto encontrado em maior concentração, seguido dos compostos quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo com 21,82 μ g.mL⁻¹, quercetina-*O*- β -D-rhamnopiranosídeo com 15,81 μ g.mL⁻¹ A metodologia desenvolvida por HPLC-ESI-IT-MS aliada a FIA-ESI-IT-MS foi capaz de detectar e identificar todos os compostos isolados, possibilitando a identificação de estruturas sem a necessidade de etapas de purificação. A análise por DPPH mostrou que o extrato EtOH 70% possui uma alta atividade ($IC_{50} = 8,23 \ \mu g.mL^{-1}$) no seqüestro de radicais livres quando comparado com a quercetina ($IC_{50} = 1,6 \ \mu g.mL^{-1}$) utilizada como padrão positivo . O estudo da atividade alelopática mostrou que o extrato EtOH 70% afetou a germinação de sementes e o desenvolvimento de raízes de *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare*. O extrato EtOH 70% foi capaz de inibir 69% da germinação das sementes, reduzir 74% o IVG e reduzir 62% o comprimento médio das raízes de *H. vulgare*. Para *C. sativus*, observou-se que o desenvolvimento das raízes e a velocidade da germinação foram reduzidos em 71% e 53%, respectivamente.

Palavras-chave: Cerrado, fitoterápicos. flavonoides heterosídeos, HPLC-PAD-ESI-MS, MYRTACEAE.

ABSTRACT

Plants have always played and continue to play a key role in maintaining human life, providing food and medicines. The use of plants is a common practice in traditional Brazilian medicine and is based on the accumulation of empirical knowledge about the action of plants by ethnic groups. Indigenous and traditional communities of Brazil have used some species of Myrcia as astringent, against diabetes, diarrhea, diuretic, to contain haemorrhaging, against hypertension and ulcers. Myrcia bella occurs naturally in the cerradão in Bauru. Traditionally, the study of natural products of plant origin is done with the use of methods for isolation and purification of organic compounds associated with the main techniques Spectrophotometric identification and spectroscopic (UV, IR, NMR and MS); However, all steps involved are time-consuming. Considering the current detection techniques, mass spectrometry (MS), typically with electrospray ionization (ESI) and combined with a HPLC with photodiodes array detector (PAD), seems to be the most important and least time-consuming technique for studies of organic plant extracts. Therefore, this study aimed to carry out the chemical study using current detection techniques, coupled with the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and to evaluate the antioxidant activitie and alelopathic effects of Myrcia bella EtOH 70% leaves extract. The results obtained indicated that the EtOH 70% extract of M. bella is rich in phenolic acids and flavonoids glycosides and galloil glycosides flavonoid. Purified samples of nbutanolic fraction, obtained by LLE of EtOH 70% extract allowed the identification of 22 compounds. Quantitative analysis of EtOH 70% extract showed that the flavonoids are present in higher concentration when compared with the phenolic acids. The compound quercetin-3-O- α -L-arabinofuranoside with 29.99 µg.ml-1 was the compound found in greater concentration, followed by the compounds quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside with 21.82 μ g.ml⁻¹, quercetin-O- β -D-rhamnopiranosídeo with 15.81 μ g.ml⁻¹ the methodology developed by HPLC-PAD-ESI-MS coupled with the FIA-ESI-IT-MS was able to detect and identify all isolated compounds, enabling the identification of structures without the need of purification steps. The analysis showed that the extract DPPH by EtOH 70% has a high activity (EC₅₀ 8.23 μ g.ml⁻¹) in the kidnapping of free radicals when compared with quercetin (EC₅₀ 1.6 μ g.ml⁻¹) used as standard. The study of allelopathic

activity showed that the extract EtOH 70% have affected seed germination and root development of *Hordeum vulgare* and *Cucumis sativus*. The EtOH 70% extract was able to inhibit seed germination in 69%, reduce the germination speed index in 74% and 62% the average length of the roots of *H. vulgare*. To *C. sativus*, it was observed that the roots development and the germination speed index were reduced in 71% and 53%, respectively.

Keywords: Cerrado, phytotherapy. flavonoids glycosides, HPLC-PAD-ESI-MS, MYRTACEAE.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda		
δ	Deslocamento químico		
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization		
	(Ionizacao química em pressão atmosférica)		
d	Dubleto		
dd	Duplo dubleto		
Deoxyhex	Deoxyhexose		
DMSO-d ₆	Dimetilsulfoxo hexadeuterado		
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl		
ESI	Electrospray ionization (Ionização por		
	electrospray)		
EtOH	Etanol		
FIA	Flow Injection Analysis (Iserção direta da amostr		
	por fluxo controlado)		
FIA-ESI-IT-MS	Flow Injection Analysis -Electrospray Ionization		
	- Ion Trap - Mass Spectrometry (Espectrometria		
	de Massas acoplada a um ion-trapcom interface		
	de Ionização por Electrospray e inserção direta d		
	amostra)		
Gall	Galoil		
GPC	Gel Permeation Chromatography (Cromatografia		
	de Permeação em Gel)		
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		
	(Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)		
HPLC-ESI-IT-MS	High Performance Liquid Chromatography -		
	Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass		

	Spectrometry (Cromatografia Líquida de Alta
	Eficiência conectada a Espectrometria de Massas
	acoplada a um ion-trap com interface de
	Ionização por Electrospray)
HPLC-RI	High Performance Liquid Chromatography –
	Refraction Index (Cromatografia Líquida de Alta
	Eficiência acoplada a um detector de Índice de
	Refração)
HPLC-PAD	High Performance Liquid Chromatography -
	Photodiode Array Detector (Cromatografia
	Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector
	de Arranjo de Fotodiodos)
i.d.	Internal diameter (diâmetro interno)
IR	Infrared (Infravermelho)
IT	Ion Trap (Armadilha de íon)
J	Constante de acoplamento
LLE	Liquid-Liquid Extraction (extração líquido-
	líquido)
LOD	Limit of detection (Limite de Detecção)
LOQ	Limit of quantification (Limite de Quantificação)
m	Multipleto
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
	(Dessorção/Ionização por laser
$[M - H]^{-}$	Molécula desprotonada
m/z	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MS/MS	Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

	(Espectrometria de Massas)		
MS ⁿ	Multiple-stage mass spectrometry (Espectrometria de massa em mútiplos estágios)		
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)		
NP/PEG	Natural Products/Polyethylene glycol reagent		
Pent	Pentose		
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)		
QTOF	Quadrupole Time-of-Flight		
RDA	Retro-Diels-Alder		
R _f	Fator de retenção		
s SPE C ₁₈	Singleto Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida em fase reversa Sílica C ₁₈)		
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografia em Camada Delgada)		
TPC	Total Phenols Content (Conteúdo de Fenóis Totais)		
t _r	Tempo de Retenção		
triTOF	Triple Time-of-Flight (triplo Tempo de vôo em tandem)		
UV	Ultravioleta		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise por TLC das frações obtidas por LLE do EtOH 70% (gel de Sílica, CHCl₃ /MeOH /H₂O [64:32:7, v/v/v], revelador: anisaldeído/H₂SO₄). 1 – fração hexânica, 2 – fração diclorometânica, 3 – fração *n*-butanólica, 4 – fração intermediária, 5 – fração aquosa, 6 – Extrato EtOH 70%.

Figura 2. Análise por TLC das frações obtidas por LLE do EtOH 70% (gel de Sílica, CHCl₃ /MeOH /H₂O [64:32:7, v/v/v], revelador: $\mathbf{A} - UV$ (254 nm), $\mathbf{B} - NP/PEG$ sob luz UV (254 nm). 1 – fração hexânica, 2 – fração diclorometânica, 3 – fração *n*-butanólica, 4 – fração intermediária, 5 – fração aquosa 6 – Extrato EtOH 70%.

Figura 3. Curva analítica de calibração de soluções padrão de ácido gálico obtida por leitura da absorbância em 760 nm; $R^2 > 0,9991$; p < 0,0001.

Figura 4. Conteúdo de fenóis totais nas amostras obtidas por LLE e no extrato EtOH 70%, expresso em mg.g⁻¹ de extrato seco equivalentes a ácido gálico.

Figura 5. Porcentagem de germinação de sementes de *Hordeum vulgare* em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -40,28809 + -0,11517 * X; R² = -0,77054.

Figura 6. Porcentagem da média do índice de velocidade de germinação (IVG) de semente de *Hordeum vulgare* em relação ao controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -51,36919 + 0,09639* X; R² = -0,68343.

Figura 7. Porcentagem de comprimento médio das raízes de *Hordeum vulgare* em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -4,086,224 + -0.07679 * X; R^2 = -0,46117.

Figura 8. Porcentagem de germinação de sementes de *Cucumis sativus* em relação ao controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = $-0,9005+6,39659E-4*X; R^2 = 0,07717.$

......60

Figura 9 Porcentagem da média do índice de velocidade de germinação (IVG) de semente de *Cucumis sativus* em relação ao controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -33,73881 + -0,07058* X; R² = -0,67726.

Figura 10. Porcentagem de comprimento médio das raízes de *Cucumis sativus* em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -2,880,438 + -0.16013 * X; R² = -0,79677.

Figura 11. Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% obtido por HPLC-PAD. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente: 5-45% de **A** em **B** em 170 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm, Volume de injeção: 20 μ L. Forno de coluna: 40°C.

Figura 12. Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para compostos derivados de ácido gálico.

Figura 13. Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para flavonoides.

Figura 14. Análise por TLC das subfrações obtidas após separação por GPC em Sephadex[®] LH-20 (gel de Sílica, CHCl₃/MeOH /H₂O [75:23:2, v/v/v], revelador: anisaldeído/H₂SO₄).

Figura 15. Espectro de massas em primeira-ordem por ESI-IT-MS da fração 103-2, obtido em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

Figura 16. Espectro de massas em primeira-ordem obtido por ESI-IT-MS da fração 136-2, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

Figura 17. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 477, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

Figura 18. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 431, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

Figura 19. Espectro de massas de segunda-ordem por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 463, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 20A. Espectro de ¹ H-NMR da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 20B. Espectro de ¹ H-NMR da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 21. Espectro de ¹³ C-NMR da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 22. Espectro de HMBC da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 23. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.
Figura 24A. Espectro de ¹ H-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 24B. Espectro de ¹ H-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 24C. Espectro de ¹ H-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d ₆).
Figura 25. Espectro de ¹³ C-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d ₆).

Figura 26. Espectro de HMBC da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d₆).

Figura 27. Espectro de massas em segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 463 [M – H]⁻, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 28. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de $m/z = 433 [M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 29. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de $m/z = 479 [M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 30. Espectro de ¹H-NMR da fração 190-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

Figura 31. Espectro de ¹³C-NMR da fração 190-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

Figura 32. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de $m/z = 449 [M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 33. Espectro de ¹H-NMR da fração 190-3 (300 MHz, DMSO-d₆).

Figura 34. Espectro de ¹³C-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

100
 .100

Figura 35. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de $m/z = 615 [M - H]^2$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 36B. Espectro de ¹H-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

Figura 37. Espectro de ¹³C-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO- d_6).

Figura 38. Estrutura proposta para quercetina-(6''-O-galoil)-β-galactosídeo.

Figura 40. Espectro de massas da fração 274-MW: A – espectro em primeira-ordem da fração 274-MW. B – Espectro em segunda-ordem (MS/MS) do íon precursor de m/z 585. C – Espectro em terceira-ordem (MS/MS³) do íon produto de m/z 301.

Figura 41. Espectro de massas da fração 274-W: A – espectro em primeira-ordem da fração 274-W. B – Espectro em segunda-ordem (MS/MS) do íon precursor de m/z 631. C – Espectro de terceira-ordem (MS/MS³) do íon produto de m/z 317.

Figura 42. Cromatogramas e espectros de UV obtidos por HPLC-PAD de flavonoides heterosídeos e acetilados derivados de quercetina. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Isocrático: 40% de **A** em **B** por 40 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.

Figura 43. Cromatogramas e espectros de UV obtidos por HPLC-PAD de flavonoides heterosídeos e acetilados derivados de miricetina. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Isocrático: 40% de **A** em **B** por 40 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, λ = 254 nm, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.

Figura 44. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata para a quantificação de compostos derivados de ácidos fenólicos utilizando ácido gálico (A) e flavonoides utilizando quercetina (B).

Figura 45. Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *M. bella*. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente: 5-45% de **A** em **B** em 160 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL min⁻¹, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.

Figura 46. Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS do extrato EtOH 70% analisado em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 47. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 169, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 48. Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 191, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 49. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 433, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 50. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 51. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 449, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figra 52. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 479, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 53. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 463, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 54. Proposta de fragmentação baseado na nomenclatura de Ma et al. (1997) e Domon & Costello (1988) para miricetina-3-O-β-D-rhamnopiranosídeo detectada por ESI-IT-MS/MS no extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*.

Figura 55. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 585, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 56. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 601, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 57. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 615, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 58. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 631, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Figura 59. Cromatograma analítico obtido na análise por HPLC-ESI-MS do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente linear: 10-45% de **A** em **B** em 200 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), fluxo 0,8 mL.min⁻¹, $\lambda = 254$ nm. Volume de injeção: 20µL.

Figura 60. Compostos encontrados no extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. 138

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimentos envolvidos na obtenção do extrato EtOH 70% e frações de LLE.
Esquema 2. Estrutura de um flavonol com sistemas benzoil e cinamoil.
Esquema 3. Rota de fragmentação putativa da miricetina. A identificação dos fragmentos segue nomenclatura proposta por Ma et al. (1997).
Esquema 4. Formação do íon produto radical aglicona ($[Y_0 - H]^{-}$) por clivagem homolítica da ligação entre a aglicona e o acúcar com rearranio de H- concomitante.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equações obtidas com base na construção de curvas de calibração do extratoEtOH 70%, frações de LLE e da quercetina.

Tabela 2. Resultados obtidos na quantificação da atividade antioxidante por DPPH (IC_{50} em μ g.mL⁻¹) e conteúdo de fenóis totais (TPC) (mg GAE/g massa seca).

Tabela 3. Dados obtidos (%) na germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e desenvolvimento de raiz em *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare* em diferentes concentrações do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*.

Tabela 4. Distribuição das massas das frações após separação por GPC em Sephadex LH-20 e agrupamentos por TLC.

Tabela 5. Deslocamentos químicos de ¹³ C-NMR e ¹ H-NMR da fração 157-4.	
	.83

Tabela 6. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 157-5.

Tabela 7. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 190-2.

 Tabela 8. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 190-3.

 101

Tabela 9. Deslocamentos químicos de ¹³ C-NMR e ¹ H-NMR da fração 223. 102
Tabela 10. Deslocamentos químicos de ¹³ C-NMR e ¹ H-NMR da fração 237-2.
Tabela 11 . Dados de regressão linear para os padrões empregada na elaboração das curvas analíticas.
Tabela 12. Concentração dos derivados de ácido gálico e flavonoides no extrato EtOH70% das folhas de <i>M. bella</i> .
Tabela 13. Dados de precisão obtido dos analítos, expressos como RSD (%).
Tabela 14. Perda de massas características de flavonóis O-heterosídeos observadas nos espectros obtidos por ESI-IT-MS/MS ⁿ do extrato EtOH 70% das folhas de Myrcia bella.
Tabela 15. Dados obtidos por HPLC-PAD-MS (espectros no UV e íons detectados) e FIA-ESI-IT-MS/MS ⁿ (íons produtos) e identificação de compostos presentes no extrato

EtOH 70% das folhas de Myrcia bella.

107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Estudo Químico de Extratos Vegetais	
1.2. Cerrado	31
1.3. Myrcia DC. ex Guill	
1.4. Antioxidantes	
1.5. Alelopatia	35
2. OBJETIVOS	
3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Instrumentos	43
4.2. Material, reagentes e soluções	44
4.3. Coleta do material vegetal	45
4.4. Obtenção do extrato e frações	46
4.5. Procedimentos cromatográficos gerais	47
4.6. Determinação da atividade seqüestradora de radicais livres	47
4.7. Determinação do conteúdo de fenóis totais	47
4.8. Determinação da atividade alelopática	
4.9. Fracionamento por GPC	
4.10 Análise quantitativa dos compostos no extrato EtOH 70%	49
4.11 Validação dos dados	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	1430
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	1423

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estudo Químico de Extratos Vegetais

As plantas sempre desempenharam e continuam a desempenhar um papel fundamental na manutenção da vida humana, fornecendo alimentos e medicamentos principalmente. A utilização de plantas é uma prática comum na medicina tradicional brasileira e está fundamentada no acúmulo de conhecimentos empíricos sobre a ação dos vegetais por grupos étnicos (GOTTLIEB e KAPLAN, 1993).

A comercialização de plantas medicinais no Brasil ocorre livremente em mercados e feiras livres, sendo consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e até mesmo de sua identidade. Muitas espécies nativas usadas na terapia são comercializadas sem possuírem comprovação científica quanto à sua eficácia e segurança (NASCIMENTO et al., 2005a,b; MELO et al., 2004;SHANLEY e LUZ, 2003;).

Apesar das exigências da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para boas práticas na produção de medicamento dispor que a bula do produto fitoterápico contenha nomenclatura botânica oficial, a composição explícita na embalagem e a correspondência de marcadores e/ou princípios ativos, a presença de frases obrigatórias (ANVISA RDC n. 14/2010), o que se observa é a infração destas normas pela indústria, sendo necessária uma maior intensificação na vigilância de produtos à base de plantas medicinais no Brasil (MELO et al., 2004)

Dentre os requisitos fundamentais para o registro de medicamentos fitoterápicos está o conhecimento da composição química e da atividade farmacológica da planta, a fim de que se possam estabelecer critérios e metodologias para análise, controle de qualidade e preparo de formulações fitoterápicas(ANVISA RDC n. 17/2010). Uma vez que geralmente muitos compostos são encontrados em misturas complexas e em pequenas quantidades, se torna um desafio isolar e identificar o composto ativo (HAMBURGER e HOSTETTMAN, 1991). Muitas vezes a atividade biológica de uma espécie vegetal não está associada a uma única substância, mas está baseada na interação entre os diversos compostos nela presentes. Por esse e outros motivos o perfil cromatográfico de uma planta é um passo inicial no embasamento científico de uma medicina alternativa e determinante no controle químico de qualidade dos fitopreparados.

Tradicionalmente, o estudo de produtos naturais de origem vegetal é feito com a utilização de métodos de isolamento e purificação de substâncias orgânicas associados às principais técnicas espectrométricas e espectroscópicas de identificação, tais como a espectrometria de massas (*MS*), a ressonância magnética nuclear (*NMR*), a espectrofotometria de ultravioleta (*UV*) e a espectroscopia de infravermelho (*IR*) (ROBARDS e ANTOLOVICH, 2003). No entanto, as etapas de isolamento de substâncias aliada às técnicas empregadas nos processos de caracterização das estruturas são muito demoradas.

Considerando as técnicas de detecção atuais, a espectrometria de massas (*MS/MS* ou *MS*ⁿ) normalmente com ionização por *electrospray* (*ESI*) e combinada com um HPLC com detector de fotodiodos (*PDA*) parece ser a técnica mais importante para metodologias de "fingerprints" de matrizes vegetais (RIJKE et al., 2006; HARNLY e LIN, 2007; CUYCKENS e CLAEYS, 2000, 2002). Esta por sua vez, permite uma rápida tipificação da composição da matriz vegetal estudada através dos tempos de retenção e/ou propriedades espectrométricas/espectroscópicas, todas associados às características intrínsecas de cada substância, como polaridade, massa molecular, entre outros (SNYDER et al., 1997; ARDREY, 2003).

1.2. Cerrado

Considerado um dos principais "*hot spots*" do mundo (MYERS, et al., 2000), o Cerrado apresenta grande diversidade de espécies como constataram Mantovani e Martins (1993), Araujo et al. (1999), Ruggiero (2000) e Silva et al. (2002), em diferentes regiões do país. Leguminosae, Asteraceae, Annonaceae, Orchidaceae, Poaceae, Rubiaceae, Melastomataceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae, Malpighiaceae, Vochysiaceae e Lythraceae são as famílias mais representativas (CASTRO et al. 1999, GOMES et al., 2004).

O Cerrado ocupa 23% do território brasileiro, estendendo-se da margem da Floresta Amazônica até os Estados de São Paulo e Paraná (RATTER e DARGIE, 1992), tratando-se do segundo maior bioma do país, superado apenas pela Floresta Amazônica (RIBEIRO e WALTER, 1998). Esta enorme área é ocupada por um complexo vegetacional que inclui diferentes fisionomias, determinadas primeiramente pela ação do fogo ou pela distribuição dos tipos de solo (COUTINHO, 1982), ou pela combinação da ação dos fatores clima, solo, disponibilidade de água e nutrientes, geomorfologia e topografia, latitudes, pastejo e impacto de atividades antrópicas (RIBEIRO e WALTER, 1998).

No estado de São Paulo, o Cerrado apresenta-se na forma de manchas dispersas, associado a solos de baixa fertilidade, especialmente na Depressão Periférica e no Planalto Ocidental Paulista (RATTER et al., 1997). Para o Município de Bauru, localizado na porção centro-oeste do estado de São Paulo, o cerrado encontra-se isolado e circundado por florestas consideradas de transição entre tropical e subtropical (CAVASSAN, 1990).

Uma definição equívoca de alguns termos como "bioma" e "cerrado" pode trazer implicações imediatas na conservação das diferentes fisionomias do Cerrado como alerta Batalha, 2011. Procuramos nesse trabalho definir e usar esses termos de acordo com esse autor.

O cerrado *sensu* lato é um complexo de biomas distribuídos em mosaico (BATALHA, 2011; COUTINHO 2006), que leva em conta a associação da vegetação com a fauna e com os microrganismos (BOX E FUJIAWARA , 2005). Usando o conceito de bioma acuradamente e de acordo com a literatura internacional devemos considerar o cerrado *sensu lato* como formado por três biomas: o campo tropical, a savana e a floresta estacional. Campos tropicais são formações tropicais em que o estrato herbáceo é contínuo, com pequenos arbustos em baixas densidades (WOODWARD, 2008). Se seguirmos a classificação fisionômica de Coutinho (1978), incluímos no bioma de campo tropical o campo limpo. Já as savanas são formações tropicais em que o estrato herbáceo é quase contínuo, interrompido apenas por arbustos e árvores em densidades variáveis, e em que os principais padrões de crescimento estão associados às estações úmidas e secas alternantes (BOURLIÈRE E HADLEY 1983). No bioma de savana, portanto, incluímos o campo sujo, o campo cerrado e o cerrado *sensu stricto*. Florestas estacionais são formações em que predominam árvores de maior porte, cujas copas formam um dossel e cujos principais padrões de crescimento também estão

associados às estações úmidas e secas alternantes (WOODWARD 2008). No bioma de floresta estacional, incluímos, pois, o cerradão.

1.3. Myrcia DC. ex Guill.

O gênero *Myrcia* pertence à subtribo Myrciinae e é um dos maiores gêneros americanos de Myrtaceae, com mais de 300 espécies distribuídas do México até o sul do Brasil (MARCHIORI, 1997). Myrtaceae consiste por volta de 129 gêneros e 4600 espécies (MABBERLEY, 1997), muitas delas com atividades biológicas relatadas (GUIMARAES et al., 2009; DANIEL et al., 2009; VENDRUSCOLO et al., 2005)

Tribos indígenas e comunidades tradicionais do Brasil têm usado algumas espécies deste gênero como adstringente, contra diabetes, diarréia, como diurético, para conter hemorragias, contra hipertensão e úlceras (RUSSO et al., 1990).

Myrcia multiflora (Lam.) DC. é uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional na América do Sul no tratamento de *diabetes mellitus* (RUSSO et al., 1990; PEPATO et al., 1993; FERREIRA et al., 2006). O estudo fitoquímico das folhas de *M. multiflora* revelou a presença de flavanonas heterosídeos (myrciacitrinas I, II e III), flavanonas glicosídicas acetiladas (myrciacitrinas IV e V) acetofenonas heterosídeos (myrciafenona A e B) e flavonóis heterosídeos (YOSHIKAWA et al., 1998; MATSUDA et al., 2002). Dentre essas substâncias isoladas, uma atenção maior é dada às myrciacitrinas, que se mostram ser potentes inibidoras da atividade da aldose redutase e α -glucosidase e do aumento dos níveis de glicose sérica em camundongos com diabetes induzida por Alloxana(YOSHIKAWA et al. 1998).

Estudos farmacológicos demonstraram que o extrato foliar de *M. fallax* (Rich.)DC. apresentou atividade contra células de câncer além de atividade antidiabética (LIMBERGER et al., 2004) Os óleos essenciais de espécies deste gênero foram também investigados. Gottlieb e colaboradores em 1982 descreveram a composição do óleo volátil de *M. cuprea* (O. Berg) Kiaersk. caracterizando a presença de (E)-nerolidol. Henriques et al. (2004) analisaram a composição química do óleo volátil de folhas de várias espécies de *Myrcia* identificando como produtos majoritários linalol, pinenos, germacreno D, βcariofileno, α-bisabolol e selinenos. Apesar da grande importância farmacológica deste gênero, muitas espécies carecem de estudos químicos e biológicos. A busca por trabalhos na literatura atual que focam o estudo químico e biológico/farmacológico utilizando espécies de *Myrcia* é escasso (RUSSO et al., 1990; PEPATO et al., 1993; FERREIRA et al., 2006; REYNERTSON et al., 2006), sendo ausentes trabalhos desse tipo com *Myrcia bella*.

Espécies de *Myrcia* ocorrem naturalmente em diversos fragmentos de cerrado no estado de São Paulo (CARVALHO et al., 2010; GOMES et al., 2004; LATANSIO-AIDAR, et al., 2010; ISHARA, et. al., 2008). Na região de Bauru e Botucatu o gênero *Myrcia* aparece entre os gêneros mais ricos, sendo que *Myrcia bella* ocorre naturalmente nessa região (CAVASSAN, 2002; LATANSIO-AIDAR, et al., 2010; ISHARA, et. al., 2008)

Myrcia bella apresenta hábito arbóreo de pequeno porte, tricomas unicelulares dibraquiados, inflorescência na forma de panícula, flores pentâmeras, cálice aberto, brácteas decíduas, ovário com 4 lóculos, com 2 óvulos por lóculo, frutos coroados pelos lóbulos do cálice, tegumento rígido (LANDRUM e KAWASAKI, 1997).

1.4. Antioxidantes

Os organismos em geral são protegidos contra os danos causados pelos radicais livres, por enzimas como superóxido desmutase e catalase, ou compostos como ácido ascórbico, tocoferol e glutationa. Quando os mecanismos da proteção antioxidante se tornam ineficientes por fatores como idade, a deterioração das funções fisiológicas pode ocorrer, resultando em doenças e aceleração do envelhecimento. Entretanto, suplementos alimentares antioxidantes podem ser usados para ajudar o corpo humano a reduzir os danos oxidativos (MORAIS et al., 2006).

Radicais livres, como o ânion superóxido (O⁻²), radical hidroxila (⁻OH) e o radical peroxila (ROO⁻) são particularmente reativos e conhecidos por serem produtos biológicos na redução molecular do oxigênio (BIGLARI, ALKARKHI e EASA, 2008). Há grandes evidências que mostram a participação destes radicais livres em uma variedade de doenças. Podem causar dano às biomoléculas celulares tais como o ácido nucléico, as

proteínas, os lipídios e os hidratos de carbono, e conseqüentemente podem adversamente afetar funções imunes (PRAKASH et al., 2007).

O interesse pelos flavonoides tem aumentado recentemente devido a sua gama de efeitos farmacológicos, explicado pela sua capacidade de inibir a atividade de algumas enzimas e pela sua atividade antioxidante. Os efeitos dos flavonoides são reconhecidos como potenciais candidatos para serem usados no tratamento de diversas doenças, como câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer e doenças relacionadas com a idade. Todos os efeitos dos flavonoides estão parcialmente associados às propriedades de seqüestro de radicais livres (INGRAM et al., 1997; BLOCK, PATTERSON e SUBAR, 1992; FREI, 1995; GEI, 1995; GILLMAN et al., 1995; NESS e POWLES, 1997; PETERSON e DWYER, 1998).

Diferentes experimentos para avaliar a atividade de sequestro das espécies reativas de oxigênio (ROS) dos flavonoides demonstram que a doação do elétron é mais favorável nas moléculas que apresentam grupo hidroxila no carbono 3 (MENDES et al., 2012) e no anel B (BORS et al., 1990). Alguns trabalhos sugerem que essa característica é principalmente influenciada pela ligação dupla entre o C2 e C3 e pela hidroxila no C3. Van Acker et al. (1996) ainda descrevem que a combinação da dupla ligação no C2-C3 e a função cetona no C4 são elementos estruturais essenciais para uma atividade antioxidante potente, possivelmente através de ligações com ¹H, o qual participa do deslocamento de elétron. A ligação dupla entre o C2 e C3 em conjugação com a cetona no C4 são responsáveis pelo deslocamento de elétrons no anel-B.

Por outro lado, Amic et al. (2003) sugerem que a ligação dupla entre o C2 e C3 no anel-C não seja um pré-requisito para atividade antioxidante e que o padrão de substituição no anel-B e/ou a presença do grupo hidroxila no C3 seja mais efetiva.

1.5. Alelopatia

O fenômeno da Alelopatia foi definido pela primeira vez em 1937 como a influência de uma planta no crescimento e estabelecimento de outra planta através da liberação de compostos químicos no ambiente (RICE, 1984). Posteriormente verificou-se que essa interação acarreta resposta, positiva ou negativa, da planta sensível a tais substâncias chamadas de aleloquímicos, as quais são produzidas no metabolismo

secundário (TORRES et al., 1996; INDERJIT e NILSEN, 2003). Desde sua primeira definição a alelopatia passou por alterações, e mais recentemente a Sociedade Internacional de Alelopatia a define como:

"qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e vírus que influencia no crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e na agricultura; estudo das funções de metabólitos e seus significados na organização dos sistemas biológicos, a origem e evolução dos mecanismos envolvendo interações planta-planta, planta-microorganismos, planta-vírus, planta-inseto, planta-solo" (MALLIK E INDERJIT 2002).

A maioria dos aleloquímicos é caracterizada como compostos ativos em multisítios, que podem interferir em vários processos fisiológicos de uma planta alvo. A maioria dos efeitos, como redução na germinação e desenvolvimento das raízes, cloroses, diminuição da absorção de íons e anormalidades fisiológicas, morfológicas e anatômicas são causadas por uma variedade de relações específicas entre os aleloquímicos e o sistema celular e/ou molecular. Portanto, a atividade dos aleloquímicos não pode ser explicada por um único modo de ação (BAIS et al., 2003; CZARNOTA et al., 2001; REIGOSA et al., 2004).

Outros efeitos adicionais como peroxidação lipídica, mudança na geração de energia e mudanças no conteúdo de água foram observados. Alguns desses sintomas podem estar relacionados à indução de estresse oxidativo secundário. A sobrevivência da planta sob estresse alelopático depende de mecanismos de resistência que levam à desintoxicação, como por exemplo: conjugação, seqüestro e oxidação dos aleloquímicos, que pode estar ligado paralelamente com o estresse oxidativo. Um trabalho realizado por Reigosa et al. (2004) sugere que o processo de desintoxicação pode ser o principal alvo e mais importante sítio de ação dos aleloquímicos.

Um dos efeitos dos aleloquímicos em células de plantas alvo é desregular a produção e o acúmulo de *ROS* (BAIS et al. 2003). Esse efeito acompanha a ativação do sistema antioxidante celular, envolvendo a atividade de enzimas antioxidantes como também o aumento da síntese de moléculas antioxidantes: glutationa, ascorbato e tocoferol (CRUZ -ORTEGA et al. 2002).
A atividade alelopática dos flavonoides está relacionada basicamente à estrutura molecular e à concentração utilizada. Em baixas concentrações, flavonoides podem acarretar efeitos promotores de crescimento inicial de raízes (MACIAS et al., 1997; PARVEZ et al., 2004; WORSHAM, 1987), talvez devido ao melhor reaproveitamento de substâncias vitais para a célula como enzimas, co-enzimas, transportadores de elétrons e proteínas. Altas concentrações dos flavonoides, por outro lado, podem agir como agente hiperpolarizador de membrana e alterar os mecanismos das bombas atepeásicas, tornando os flavonoides tóxicos para as células, reduzindo o crescimento.

2. OBJETIVOS

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram:

Objetivos gerais

- Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a composição química de espécies vegetais nativas dos biomas do Cerrado;

- Realizar o estudo químico e avaliar as atividades antioxidante e alelopática do extrato EtOH 70% padronizado das folhas de *Myrcia bella* Cambess.

Objetivos específicos

- Avaliar o potencial antioxidante e a atividade alelopática do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*;

- Efetuar a quantificação dos principais metabólitos secundários presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*;

- Desenvolver metodologias eficientes e rápidas, que permitam reconhecer a composição química do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*;

- Traçar o perfil químico do extrato EtOH 70% utilizando técnicas hifenizadas (HPLC-PAD-ESI-MS e FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ).

3. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, de investigação de uma série de plantas incluídas no projeto temático: "FITOTERÁPICOS PADRONIZADOS COMO ALVO PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS", incluído no Programa BIOTA/FAPESP (Proc. nº. 09/52237-9).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Instrumentos

As separações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico, gradiente quaternário) modelo PU-2089S Plus (Jasco[®]), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 200 - 900 nm, modelo MD-2015 Plus (Jasco[®]), injetor automático modelo AS-2055 (Jasco[®]) com *loop* de 50 µL e forno de coluna modelo CO-2060 Plus. O software Jasco *ChromPass* (Versão 1.8.1.6) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados cromatográficos.

As separações cromatográficas no modo semi preparativo foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, com bomba isocrática modelo Pump K120 (Knauer®), acoplada a um detector de índice de refração modelo *Smartline* 2300 (Knauer®) e integrador modelo L250 E (Knauer®).

Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas modelo LCQ FLEET (Thermo scientific, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi analisada no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS², MS³) realizadas em uma interface do tipo ion-trap (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ), sob as seguintes condições: voltagem do capilar -20 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 275 °C, gás de arraste (N_2) fluxo 12 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi m/z 50-1000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa (full-scan) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa m/z estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento. O software Xcalibur versão 1.0 (Thermo scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos. Para os experimentos de HPLC-ESI-MS o equipamento foi acoplado a um cromatógrafo modelo Accela High Speed LC (Thermo cientific[®]).

Nas análises em modo analítico foi usada coluna de fase reversa imobilizada com octadecilsilano, modelo Luna C_{18} (2) 100A (Phenomenex[®]) de 250 x 4,6 mm i.d., com partículas com tamanho médio de 5 µm com coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm i.d. No modo semi-preparativo foi usada uma coluna de fase reversa C_{18} , modelo Luna C_{18} (2)100A de 250 x 10 mm i.d. com partículas de tamanho médio de 5 µm.

As leituras de absorbâncias em microplacas foram realizadas em um espectrofotômetro modelo BioTek *PowerWave*TM utilizando microplacas de 96 poços.

As pesagens de extratos, amostras purificadas, padrões comerciais e reagentes para o preparo de soluções estoque, foram realizadas em balança analítica modelo AZ-214 M-power (Sartorius[®]) com precisao de 0,01 mg e pesagem máxima de 210 g.

As soluções padrão de calibração foram preparadas a partir de alíquotas das soluções estoque por meio de micropipetas de alta precisão, modelo Eppendorf Research[®] plus com volume variável de 1-20,10-100 e 100-1000 µL.

Os extratos orgânicos em soluções foram concentrados em rotaevaporador com banho maria modelo Heizbad-VAP (Heidolph[®]), equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac valve tec (Heidolph[®]) e banho circulador de água (Heidolph[®]).

Os experimentos de ¹H-NMR e ¹³C-NMR 1-D e experimentos de ¹H-NMR e ¹³C-NMR 2D: *g*-HMBC foram realizados em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 300 MHz (7,0 T) (Bruker[®]) e/ou em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 500 MHz (11,7 T) (Varian[®] Inova).

No fracionamento por Cromatografia de Permeação em Gel foi utilizado sistema de coluna de Sephadex LH-20 (Pharmacia[®]) (85 x 2,5 cm i.d.), com bomba peristáltica modelo P1 18-1110-91 (Pharmacia[®]) e coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]).

4.2. Material, reagentes e soluções

Ácido gálico e quercetina (Sigma Aldrich®) foram usados como padrões. Demais metabólitos não disponíveis comercialmente foram isolados e caracterizados por ¹H-NMR e ¹³C-NMR. Todos os padrões e amostras foram armazenadas em vials de 2 mL e mantidos em freezer a -20° C.

Nas triagens das frações por cromatografia em camada delgada, foram utilizadas placas de silicagel em suporte de alumínio (Whatman[®]), 20x20 cm, e 250 μ m de espessura, e como reveladores, exposição à luz ultravioleta (254 nm) e *spray* de solução anisaldeído/H₂SO₄, seguido de aquecimento em estufa a 120 °C.

O radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich[®]) foi utilizado na determinação da atividade seqüestradora de radicais livres. Para a determinação do conteúdo de fenóis totais foi utilizado o reagente Folin-Ciocauteau (Dinâmica[®]) e carbonato de sódio anidro P.A. (Dinâmica[®]).

Hexano, diclorometano, metanol, etanol e *n*-butanol (Synth[®]) P.A. foram utilizados nos procedimentos de extração. Metanol (Tedia[®]) e ácido fórmico (Synth[®]) grau HPLC, além de água Milli-Q (Millipore[®]) foram utilizados na preparação de amostras, padrões e como fase móvel em HPLC.

No preparo das amostras para os experimentos de NMR foram utilizados piridinad₅ e dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_{6} , Cambridge Isotope Laboratories, Inc).

As vidrarias utilizadas no preparo dos padrões foram imersas por 24 h em solução de Extran (Merck®) 3% (v/v), para remoção de contaminantes. O material foi enxaguado em água deionizada e seco a temperatura ambiente.

4.3. Coleta do material vegetal

A coleta do material foi realizada no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da rodovia Comandante João Ribeiro de Barros - SP 225 (22°20'30" S e 49°00'30" W). Foram coletados 1,379 kg de folhas de *Myrcia bella* para o estudo fitoquímico em novembro de 2010. Dois ramos férteis foram utilizados para identificação e herborização. Exsicatas (*vouchers* químicos) foram incluídas no herbário da FC/UNESP (UNBA) sob número de registro 5508. Uma duplicata da exsicata foi enviada para o Prof. Dr Marcos Eduardo Guerra Sobral, especialista em Myrtaceae da Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Ciências Naturais.

4.4. Obtenção do extrato e frações

As folhas de *M. bella* foram secas em estufa a 45°C por 48 horas. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas, a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos, sendo posteriormente pesados, embalados, etiquetados e armazenados em local seco e escuro.

A extração foi feita por percolação do pó com EtOH 70% (PRISTA, 1995). O material moído (686 g) foi previamente intumescido com 2 L de etanol 70% (v/v) durante 2 horas em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador ficou entre 1-2,0 mL.min⁻¹.Kg de material vegetal.

Após a extração, a solução foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C, e posteriormente à remoção total dos solventes orgânicos, as amostras foram armazenadas em recipientes tarados. Uma alíquota de 10 g do extrato EtOH 70% foi submetida à partição líquido-líquido (LLE) entre diferentes solventes orgânicos contra fase aquosa. Foram feitas partições com hexano, diclorometano, *n*-butanol. O esquema 1 exemplifica as etapas realizadas para a obtenção do extrato padronizado EtOH 70% por percolação e suas frações por LLE.



Esquema 1. Procedimentos envolvidos na obtenção do extrato EtOH 70% e frações de LLE.

4.5. Procedimentos cromatográficos gerais

Para as análises cromatográficas uma alíquota de 10 mg do EtOH 70% foi solubilizada em MeOH:H₂O (1:1, v/v) e filtrada em filtro de seringa com membrana de PTFE com poro de 0,45 μ m. As separações cromatográficas foram realizadas com uma coluna de fase reversa (C₁₈) e a fase móvel composta de uma mistura de MeOH:H₂O acidifcados. Como fase móvel utilizou-se os solventes MeOH + Ácido Fórmico 0,1% (**A**) e H₂O + Ácido Fórmico 0,1% (**B**) e um gradiente exploratório de 5-100 de A em B em 120 minutos com manutenção de 100% de MeOH por mais 5 minutos para se obter o perfil cromatográfico do extrato EtOH 70%.

4.6. Determinação da atividade seqüestradora de radicais livres

A determinação da atividade antioxiadante do extrato EtOH 70% e suas frações foi realizada utilizando o radical DPPH utilizando metodologia previamente descrita por Pauletti et al., 2003. Uma alíquota de 4 mg foi suspensa em 100 mL de MeOH. Apartir de uma solução estoque de 10 mg.mL⁻¹, foram preparadas amostras na faixa de 0,01 – 1 mg.mL⁻¹ para a construção das curvas analíticas de cada amostra.O volume final das soluções (amostra + DPPH) foi ajustado para 1 mL. As amostras foram analisadas em triplicata (n = 9), utilizando quercetina como padrão (EC₅₀ = 1.6 µg.mL⁻¹). Após 30 min de incubação a absorbância das amostras (Absi) foi lida em 517 nm; MeOH + DPPH foram utilizados como valor controle (Abs0). A porcentagem do efeito sequestrante das amostras foi calculada usando a seguinte equação: I% = [(Abs0 - Absi)/Abs0] x 100. Os resultados foram expressos comomédia ± erro padrão da média.

4.7. Determinação do conteúdo de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais no extrato e nas frações foi determinado pelo método Folin - Ciocalteu (WATERMAN e MOLE, 1994). Uma alíquota de 100 μ L das amostras foi adicionada a 150 μ L de Folin - Ciocalteu (previamente diluído em água 0,667: 9,333 v/v) e 50 µL de carbonato de sódio 10%. Após 60 minutos em temperatura ambiente a absorbância foi lida em um espectrofotômetro a 760 nm. As amostras foram avaliadas em triplicata (n = 9), na concentração final de 0,1 mg.mL⁻¹. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em mg.g⁻¹ de extrato equivalentes a ácido gálico utilizando a equação baseada na curva de calibração do ácido gálico.

4.8. Determinação da atividade alelopática

As espécies selecionadas como plantas testes para o estudo alelopático foram *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare*. As sementes foram colocadas para germinar em câmara BOD a 25°C em condição de luz constante (4 lâmpadas fluorescentes de 20 Watts) sobre uma folha de papel de filtro umedecido com 8 mL de solução aquosa do extrato EtOH 70%. Vinte e cinco sementes de cada espécie estudada foram colocadas, com 5 repetições , em placas de Petri de vidro com 9 cm de diâmetro, tendo como substrato papel de filtro umedecido com extratos em diferentes concentrações e lacradas com papel filme PVC. As concentrações utilizadas foram: 10, 20, 40, 80, 160, 320 mg.mL⁻¹. A avaliação da germinação foi feita diariamente, durante cinco dias, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentarem 2 mm de raiz, aproximadamente. Os dados foram apresentados em seguindo a seguinte equação: I% = (100*T/C)-100; onde I% = porcentagem em relação ao controle, T = tratamento com diferentes concentrações e C = controle.

4.9. Fracionamento por GPC

A fração *n*-butanol (3,0 g) foi solubilizada em MeOH 100% (12,0 mL) com auxílio de banho ultra-som por 10 minutos; Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos, separando-se o precipitado do sobrenadante. O sobrenadante foi em seguida filtrado e cromatografado em coluna de Sephadex[®] LH-20. A amostra foi eluída com MeOH 100%, . Frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em coletor automático a cada 10 minutos. As frações obtidas foram eluídas e analisadas sob luz UV e reveladas por borrifamento com solução de anisaldeído/H₂SO₄; a placa foi posteriormente

levada a uma estufa a 100 C°. Estas frações foram reunidas por TLC, de acordo com a coloração e o $R_{\rm f}$.

4.10 Análise quantitativa dos compostos no extrato EtOH 70%

Para a quantificação dos compostos presentes no extrato EtOH 70% foi empregado o método de calibração externa. Os padrões comerciais ácido gálico e quercetina foram utilizados para a construção da curva analítica por HPLC-PAD. Uma solução estoque contendo 100 μ g.mL⁻¹ de cada padrão foi preparada e solubilizada em MeOH:H₂O (7:3, v/v). As soluções padrão cobrindo intervalos lineares com dez níveis de concentração (1-500 μ g.mL⁻¹) foram feitas a partir de diluições das soluções estoque e o volume final ajustado para 1 mL. Cada amostra foi preparada e injetada em triplicata e a resposta de absorção obtida em 280 nm para os compostos derivados de ácidos fenólicos e 360 nm para os derivados de flavonoides. Ao final, as áreas médias sob os picos cromatográficos das amostras foram calculadas e os valores obtidos interpolados em função da concentração usando regressão linear. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão das injeções.

4.11 Validação dos dados

Linearidade, Determinação do Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Precisão

A partir das curvas analíticas foram obtidos os coeficientes linear (a) e angular (b), os coeficientes de correlação (r^2) e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). O limite de detecção (LOD) foi determinado como o sinal equivalente a 3,3 vezes o valor entre a razão do coeficiente linear (a) pelo coeficiente angular (b) (3,3 x a/b) obtidos pela equação da reta da curva analítica de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta razão (10 x a/b) (RIBANI et al., 2004).

Para o teste de repetitividade, os padrões foram avaliados em triplicatas com concentrações dentro da curva de calibração. Para a varibilidade *intra-day*, soluções de cada padrão foram analisadas em 1 dia. Para *inter-day* cada padrão foi analisado em três

dias consecutivos. As análises foram realizadas com soluções padrão contendo 50, 100 e $200 \ \mu g.mL^{-1}$ de cada padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise por TLC do extrato EtOH 70% e frações obtidas por LLE

O processo de extração por percolação das folhas secas de *Myrcia bella* teve um rendimento de 28%. O extrato EtOH 70% obtido e as frações obtidas por LLE foram analisadas por TLC a fim de se obter um perfil sobre as classes de compostos presentes. As frações hexânica (1) com 0,43 g e diclorometânica (2) com 0,3 g apresentaram compostos mais apolares em relação às demais frações obtidas por LLE. Já as frações *n*-butanólica (3) com 3,8 g e aquosa (5) com 3,6 g apresentaram compostos de média a alta polaridade. Uma fase intermediária não solúvel em nenhum dos solventes utilizados, com 1,8 g, foi obtida. Após remoção total da fase móvel utilizada, as TLC foram reveladas com anisaldeído/H₂SO₄, NP/PEG e/ou UV (254 nm). A revelação com anisaldeído/H₂SO₄ (Figura 1) evidenciou manchas de arroxeadas e amarelas sugerindo a presença de derivados de terpenos e compostos fenólicos (WAGNER, BLADT e ZGAINSKI, 2003) nas frações 3, 4, 5 e no extrato (6).



Figura 1. Análise por TLC das frações obtidas por LLE do EtOH 70% (gel de Sílica, CHCl₃/MeOH /H₂O [64:32:7, v/v/v], revelador: anisaldeído/H₂SO₄). 1 – fração hexânica, 2 – fração diclorometânica, 3 – fração *n*-butanólica, 4 – fração intermediária, 5 – fração aquosa, 6 – Extrato EtOH 70%.

As manchas presentes nas TLC sob luz UV (Figura 2) apresentaram fluorescência escura (manchas púrpuras, amostras: 3, 4, 5 e 6) e posteriormente ao borrifamento do revelador NP/PEG apresentaram coloração amarelo-alaranjado fluorescente sob luz UV, sugerindo a presença de flavonóis derivados de quercetina e miricetina e seus glicosídeos, além de manchas azul claras , que sugerem a presença de ácidos fenólicos carboxílicos (WAGNER, BLADT e ZGAINSKI, 2003).



Figura 2. Análise por TLC das frações obtidas por LLE do EtOH 70% (gel de Sílica, $CHCl_3$ /MeOH /H₂O [64:32:7, v/v/v], revelador: **A** – UV (254 nm), **B** - NP/PEG sob luz UV (254 nm). 1 – fração hexânica, 2 – fração diclorometânica, 3 – fração *n*-butanólica, 4 – fração intermediária, 5 – fração aquosa 6 – Extrato EtOH 70%.

Portanto, uma primeira análise cromatográfica por TLC do extrato EtOH 70% e das frações obtidas por LLE indicou a presença de compostos fenólicos como ácidos fenólicos e flavonoides derivados de miricetina e quercetina. Flavonoides são conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes e também por apresentarem atividade farmacológica relacionada à inibição da atividade enzimática. A indicação da presença de flavonóis como miricetinas e quercetinas no extato EtOH 70% que possuem em comum a ligação dupla do C2 e C3, função cetona no C4 e grupo pirogalol e catecol respectivamente, nos indica um grande potencial antioxidante e consequentemente atividade biológica (BORS, et al., 1990; MENDES et al., 2012; VAN ACKER et al., 1996)

Portanto, a fim de se explorar o potencial biológico desse extrato, testes para avaliar a atividade antioxidante e alelopática foram realizados. Além disso, uma maneira de se determinar rapidamente o conteúdo de fenóis totais (TPC) desse extrato foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocauteu.

Determinação do conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante

O conteúdo de fenóis totais nas amostras obtidas por LLE e no extrato EtOH 70%, foi expresso em mg/g de extrato seco equivalentes a ácido gálico utilizando a equação baseada na curva de calibração do ácido gálico (Figura 3). Uma solução estoque contendo $100 \ \mu g/mL^{-1}$ de ácido gálico foi preparada e solubilizada em MeOH 100%. As soluções

padrão cobrindo intervalos lineares com seis níveis de concentração (1; 2,5; 5; 10; 20; 40 μ g/mL⁻¹) foram feitas a partir de diluições das soluções estoque e o volume final das soluções ajustados para 1 mL.



Figura 3. Curva analítica de calibração de soluções padrão de ácido gálico obtida por leitura da absorbância em 760 nm; $R^2 > 0,9991$; p < 0,0001.

As amostras obtidas por LLE foram dissolvidas em MeOH 100% e analisadas por espectrofotômetro na concentração final de 0,1mg.mL⁻¹. O resultado obtido das leituras de absorbância de cada amostra foi interpolado em função da concentração usando a regressão linear. As amostras foram avaliadas em triplicatas (n = 9). Todos os dados foram apresentados com média ± desvio das leituras. O conteúdo de fenóis totais das amostras foi calculado utilizando seguinte equação:

$$TPC = 0.01 + 0.01748 * X$$

Os resultados obtidos após o cálculo do TPC (Figura 4), mostram que a fração *n*butanólica com 404,7 \pm 4,8 mg GAE/g por peso seco, apresentou o maior conteúdo de fenóis totais, seguido do extrato EtOH 70% com 267,7 \pm 5,4 mg GAE/g e das frações diclorometânica com 165,8 \pm 16 mg GAE/g, fração aquosa com 164,8 \pm 6,6 mg GAE/g e fração hexânica com 37,9 \pm 16,9. O alto valor de \pm SEr na fração hexânica foi devido à dificuldade encontrada para dissolver a amostra no mesmo solvente utilizado para todas amostras (MeOH 100%), já que esta é composta majoritariamente por compostos apolares.



Figura 4. Conteúdo de fenóis totais nas amostras obtidas por LLE e no extrato EtOH 70%, expresso em $mg.g^{-1}$ de extrato seco equivalentes a ácido gálico.

A determinação da atividade seqüestradora de radicais do extrato EtOH 70% e das frações obtidas por LLE foi realizada utilizando o radical DPPH. Os resultados obtidos foram expressos baseados nas curvas analíticas obtidas a partir de leituras de soluções padrões de amostras do EtOH 70% e das frações obtidas por LLE em diferentes concentrações em 510 nm (Tabela 1).

Amostra	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Coeficiente de correlação (r)
Hexano	-1,41307	0,38334	0,99883
CH_2Cl_2	4,18035	0,69959	0,99311
<i>n</i> -butanol	5,39104	0,85013	0,9957
H_2O	17,8988	1,45974	0,9579
EtOH 70%	- 4.263	7828	0.9991
Quercetina	-1,65178	64208,4	0,9976

Tabela 1. Equações obtidas com base na construção de curvas de calibração do extrato EtOH 70%, fraçõesde LLE e da quercetina.

Os resultados obtidos na quantificação da atividade antioxidante pelo método do DPPH (IC₅₀) foram expressos na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos na quantificação da atividade antioxidante por DPPH (EC_{50} em µg.mL⁻¹) e conteúdo de fenóis totais (TPC) (mg GAE/g massa seca).

	DPPH	TPC
Hexano	$135,76 \pm 7,92$	$37,9 \pm 16,9$
Diclorometano	$59,04 \pm 6$	$165,8 \pm 16$
<i>n</i> -BuOH	$5,41 \pm 0,36$	$404,7 \pm 4,8$
H ₂ O	$22,57 \pm 1,43$	$164,8 \pm 6,6$
EtOH 70%	$8,23 \pm 2,15$	$267,7 \pm 5,4$
Quercetina	$1,6 \pm 0,42$	

*Valores apresentados \pm SEr (n = 9).P < 0,0001;

Os resultados obtidos sugerem que a fração *n*-butanólica foi mais ativa em relação às outras amostras, com $\text{EC}_{50} = 5,41 \pm 0,36 \ \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguida do extrato EtOH 70% com $\text{CE}_{50} = 8,23 \pm 2,15$ e das frações aquosa com $\text{CE}_{50} = 22,57 \pm 1,43 \ \mu\text{g.mL}^{-1}$, diclorometânica com $\text{CE}_{50} = 59.04 \pm 6 \ \mu\text{g.mL}^{-1}$ e fração hexânica com $\text{CE}_{50} = 135,76 \pm 7,92 \ \mu\text{g.mL}^{-1}$. Numa análise conjunta dos dados obtidos no cálculo do conteúdo de TPC e os valores obtidos de CE_{50} nos testes utilizando DPPH nota-se que o aumento do TPC é acompanhado de uma melhora na atividade sequestradora de radicais livres. A análise de *Pearson* (correlação linear) revelou uma alta relação entre os dados (r) = -0.8410.

Avaliação da atividade alelopática do extrato EtOH 70%

Os resultados obtidos indicaram que o extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella* afetou a germinação de sementes e o desenvolvimento de raízes de *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare*. Os efeitos do extrato nos dois processos foram evidentes em todas as concentrações utilizadas, porém mais acentuado nas frações com maior concentração. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados obtidos (%) na germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e desenvolvimento de raiz em *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare* em diferentes concentrações do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*.

	Cucumis sativus		Hordeum vulgare			
	Germinação (%)	IVG (%)	Raiz (%)	Germinação (%)	IVG (%)	Raiz (%)
10 mg.mL ⁻¹	0	-21	-7,5	-40,8	-47,8	-22,7
20 mg.mL ⁻¹	0	-41	-35,8	-42,8	-52,4	-45,8
40 mg.mL ⁻¹	-2	-32,7	-40,1	-28,5	-39,7	-38,5
80 mg.mL^{-1}	-1	-48,5	-48,9	-59,1	-76,9	-79,3
160 mg.mL ⁻¹	-2	-53,2	-71,9	-73,4	-77,1	-44,5
320 mg.mL ⁻¹	0	-50,5	-69,3	-69,3	-74,6	-62,9

*Dados para n=5. I% = (100*T/C)-100.

Os dados obtidos foram analisados e o valor obtido para cada amostra foi interpolado em função da concentração usando regressão linear. Desta forma, as regressões lineares são apresentadas e discutidas nas figuras abaixo.

A germinação das sementes de *H. vulgare* (Figura 5) foi afetada pela presença do extrato em todas as concentrações utilizadas. Observou-se que a porcentagem de germinação das sementes submetidas aos tratamentos foi reduzida em relação ao controle, principalmente nas concentrações maiores. Na concentração de 10 mg.mL⁻¹ a porcentagem de inibição da germinação foi de 40%, e na concentração de 320 mg.mL⁻¹ a porcentagem inibição foi de 69%. No entanto, a maior porcentagem de inibição da germinação de 160 mg.mL⁻¹ com 73%.



Figura 5. Porcentagem de germinação de sementes de *Hordeum vulgare* em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -40,28809 + -0,11517 * X; $R^2 = -0,77054$.

O índice de velocidade de germinação (IVG) calculado para as sementes de *H. vulgare* (Figura 6), submetidas a diferentes concentrações do extrato EtOH 70%, também foi estatisticamente diferente quando comparado com o grupo controle. Observou-se que os tratamentos com diferentes concentrações reduziram o IVG em 47% na concentração de 10 mg.mL⁻¹ e em 74% na concentração de 320 mg.mL⁻¹, sendo as concentrações de 80 e 160 mg.mL⁻¹ as mais ativas com 76 e 77% de redução do IVG.



Figura 6. Porcentagem da média do índice de velocidade de germinação (IVG) de semente de *Hordeum vulgare* em relação ao controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -51,36919 + 0,09639* X; R² = -0,68343.

O desenvolvimento das raízes de *H. vulgare* (Figura 7) diferiu estatisticamente quando comparado com grupo controle. Observou-se que o comprimento médio das raízes de *H. vulgare* apresentou uma redução de 20% na concentração de 10 mg.mL⁻¹, e chegando a 62 % de redução na concentração de 320 mg.mL⁻¹.



Figura 7. Porcentagem de comprimento médio das raízes de *Hordeum vulgare* em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = $-4,086,224 + -0.07679 * X; R^2 = -0,46117.$

Já as análises dos dados obtidos da germinação de sementes de *C. sativus* (Figura 9), nos sugerem que não houve efeito por nenhum dos tratamentos utilizados, não diferindo estatisticamente em relação ao grupo controle. Esses dados sugerem que o extrato não exerceu atividade inibitória do processo de germinação das sementes de *C. sativus*.



Figura 8 Porcentagem de germinação de sementes de *Cucumis sativus* em relação ao controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -0,9005+ 6,39659E-4* X; $R^2 = 0,07717$.

Por outro lado, a análise dos dados obtidos no cálculo da velocidade de germinação de sementes de *C. sativus* (Figura 10) mostra que o extrato afetou o IVG em todas as concentrações utilizadas quando comparado com o grupo controle. Na concentração de 10 mg.mL⁻¹ o IVG apresentou uma redução de 20%, e nas concentrações de 160 e 320 mg.mL⁻¹ redução de 53% e 50% de redução respectivamente.



Figura 9. Porcentagem da média do índice de velocidade de germinação (IVG) de semente de *Cucumis sativus* em relação ao controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = -33,73881 + -0,07058* X; R² = -0,67726.

A análise dos dados obtidos sobre o comprimento médio das raízes de *C. sativus* (Figura 8) submetidas aos tratamentos em diferentes concentrações do extrato EtOH 70%, sugere uma redução no tamanho médio quando comparado com o grupo controle. Na concentração de 10 mg.mL⁻¹ o comprimento médio das raízes apresentou redução 7% e, na concentração de 320 mg.mL⁻¹, o comprimento médio sofreu redução de 69%.



Figura 10. Porcentagem de comprimento médio das raízes de *Cucumis sativus* em relação ao grupo controle em diferentes concentrações de extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Y = $-2,880,438 + -0.16013 * X; R^2 = -0,79677.$

A análise das regressões lineares obtidas a partir dos dados coletados, mostra que o extrato EtOH 70% das folhas de *M. bella* foi ativo em todas as etapas observadas para *Hordeum vulgare*, sendo capaz de inibir 73% da germinação das sementes (Figura 5), reduzir 77% o IVG (Figura 6) e reduzir 62% o comprimento médio das raízes (Figura 7). Para *Cucumis sativus*, observou-se que o desenvolvimento das raízes (Figura 8) e a velocidade da germinação (Figura 10) foram reduzindos em 71% do tamanho médio das raízes e em 53% o IVG. Porém, o extrato não apresentou efeito inibitório durante a etapa de germinação das sementes (Figura 9).

Esses dados sugerem que os compostos presentes no EtOH 70% interferiram nos processos fisiológicos destas duas espécies, podendo atuar como aleloquímicos. O perfil obtido nas TLC apresentadas anteriormente indicou a presença de flavonóis derivados de quercetina e miricetina e seus glicosídeos, além de ácidos fenólicos carboxílicos. Os resultados das análises de fenóis totais indicaram um conteúdo alto destas substâncias na fração *n*-butanólica e no extrato EtOH 70%. Os resultados obtidos na quantificação da atividade antioxidante sugerem que a fração *n*-butanólica é mais ativa que as outras amostras, seguida do extrato EtOH 70%.

Na literatura, muitos flavonoides são caracterizados como aleloquímicos (MOROZ E KAMISSARENKO, 1983; SHALABY, 2001; DE MARTINO et al., 2012). Basile e colaboradores (2000) demonstraram que os flavonoides quercetina, rutina e apigenina inibiram a germinação de sementes e o desenvolvimento de epicótilo e raízes em *R. sativus.* Flavonóis isolados de *Pluchea lanceolata* foram capazes de inibir a germinação de feijões em concentrações muito baixas (DAKSHINI, 1994). O extrato de *Festuca arundinacea* é conhecido por seus efeitos de redução na germinação e crescimentos de plantas alvo (GILMORE, 1977; SMITH E MARTIN, 1994; SPRINGER, 1996; BERTIN et al., 2003). O estudo químico de frações ativas do extrato de *Festuca arundinacea* revelou a presença de flavonóis e flavonóis glicosilados derivados de quercetina, kaempferol e isorhamenitina, além da presença de alcaloides pirrolizidínicos (BERTOLDI et al.,2012). Os flavonóis presentes no extrato foram considerados os responsáveis pela atividade alelopática (BUER, et al. 2010; TAYLOR e GROTEWOLD, 2005). Parvez et al. (2004) observaram efeitos inibitórios da quercetina no desenvolvimento de *Arabidopsis*

thaliana como atraso no crescimento e desenvolvimento. Esses efeitos foram relacionados à redução da taxa fotossintética e de transpiração.

Flavonoides parecem atuar primeiramente como inibidores da germinação e do sistema de transferência de energia dentro da célula. Alguns flavonoides são potentes inibidores do metabolismo energético, bloqueando as funções dos cloroplastos e absorção de oxigênio pelas mitocôndrias (EINHELLIG, 2004; MORELAND E NOVITSKI 1988).

Alguns flavonoides, através da regulação dos níveis de *ROS* intracelular, foram capazes de inibir a germinação e o crescimento de *Arabidopsis thaliana* (BAIES et. al., 2003). Substâncias antioxidantes como o ácido ascórbico e (-)-catequinas foram capazes de bloquear o aumento dos níveis de *ROS*, além de induzir a atividade de genes relacionados ao estresse oxidativo e as vias de síntese de fenilpropanoides e terpenoides (BAIES, et al. 2003). A exposição das raízes de *C. sativus* a ácidos fenólicos como ácido ferúlico e *p*-cumárico, também gerou o aumento dos níveis de H_2O_2 e da atividade da enzima peroxidase (POLITYCKA et al., 2004). A ativação do sistema enzimático antioxidante é acompanhada por sérios danos na membrana. Isso pode ser conseqüência da peroxidação lipídica, indicada pela presença do malonaldeído em espécies em condições de estresse (BOGATEK et al. 2005, POLITYCKA 1996, YU et al. 2003).

Em estudos relacionando estrutura-atividade, os grupos substituintes presentes no anel-B de flavonoides, parecem ser os responsáveis pela atividade alelopática (BENINGER, et. al., 2005, DE MARTINO et al., 2012; MACIAS, et al., 1997; PARVEZ, et. al., 2004; ROLIM DE ALMEIDA, 2008; TSANUO, et. al., 2003). Flavonas metoxiladas parecem ter um maior potencial inibitório, porém os flavonóis também são ativos; as glicosilações aparentemente não influenciam na atividade biológica. A hidroxila no C3 do anel-C e no C5 do anel-A, que caracterizam os flavonóis, parecem não ser tão importantes para a atividade biológica quando comparados com as flavonas. Essas classes de compostos compartilham estruturalmente a função cetona (carbonila) no C4 e a dupla ligação entre o C2 e C3. Mas, adicionalmente, a conjugação entre a função cetona (C4) e a ligação dupla entre C2 e C3 parecem ser importantes para a atividade alelopática (DE MARTINO et al., 2012)

Os efeitos do extrato EtOH 70% sobre a germinação das sementes de *H. vulgare* e *C. sativus* podem estar relacionado com a mobilização de substâncias no tecido de reserva

dessas sementes. Nos primeiros estágios do processo de germinação, enzimas do ciclo dos glicoxalatos desempenham um papel importante na mobilização de triacilgliceratos e têm sua atividade maximizada em tecidos de reserva devido à metabolização de lipídeos (MCLAUGHLIN e SMITH 1994). A mobilização de reserva é um evento que normalmente ocorre rapidamente no início do processo de germinação, porém quando em condições de estresse alelopático, este evento parece ser atrasado ou inibido por aleloquímicos (MUSCOLO et al. 2001). Estes efeitos foram atribuídos à capacidade dos aleloquímicos em reduzir a atividade de enzimas como isocitrato liase (ICL), responsáveis pela glicólise e oxidação da pentose-fostafato, o que mantém o suprimento adequado de energia (ATP) e esqueletos de carbono para a biossíntese de compostos orgânicos. Adicionalmente, foi sugerido que a redução da atividade enzimática da ICL é um efeito secundário dos aleloquímicos, relacionada a danos nas proteínas (MUSCOLO et al. 2001). MAFFEI et. al. (1999) demonstraram que ácidos benzóicos com metoxila substituída no anel, foram capazes de inibir a germinação de sementes de C. sativus reduzindo a atividade de enzimas e proteínas ICL. Esses dados sugerem que os ácido fenólicos e flavonoides presentes no EtOH70% agiram não somente na atividade da enzima, mas também na expressão gênica da ICL. Portanto, a inibição da germinação de H. vulgare pode ter sido decorrente de danos gerados pelos aleloquímicos, reduzindo a atividade de enzimas, mas também alterando a expressão gênica, o que levou à inibição da germinação. No caso do atraso na germinação de C. sativus, somente a atividade enzimática pode ter sido alterada, atrasando o processo de germinação, que se refletiu nos dados obtidos pelo IVG.

Considerando os dados químicos obtidos, podemos sugerir que os flavonoides, principalmente os derivados de quercetina e os ácidos fenólicos presentes no EtOH 70% estariam atuando como aleloquímicos, alterando processos fisiológicos e por consequência o desenvolvimento das espécies estudada. Portanto, a inibição e/ou atraso da germinação das sementes, pode estar relacionada à habilidade dos flavonoides em alterar a homeostase enzimática celular (NICOLLIER E THOMPSON, 1982). Já as alterações na demanda energética para células vegetais (PARVEZ, et. al., 2004) e regulação dos níveis de *ROS* intracelulares (BAIES, et. al., 2003) estariam relacionadas à diminuição do tamanho das raízes.

Análise por HPLC-PAD

O *screening* por HPLC-PAD do extrato EtOH 70% (Figura 11), resultante da percolação das folhas de *M. bella* torna evidente a complexidade dessa matriz quando observado o tempo total de uma corrida. Essa situação se deu pelo alto número de metabólitos detectados com polaridade similar quando utilizada uma coluna C_{18} com 250 x 4.6 mm i.d. de partículas com tamanho médio de 5 µm.



Figura 11. Perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% obtido por HPLC-PAD. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente: 5-45% de **A** em **B** em 170 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, $\lambda = 254$ nm, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.

Com auxílio do detector PAD realizando varredura na faixa espectral de 200-600 nm, obteve-se espectros na região do UV para os picos eluídos. Foi verificado que uma primeira parte do cromatograma I (tr entre 0 e ~75min), apresentou picos com bandas de absorção do sistema benzílico, com máximos na região do UV em 210-220 nm e entre 260-280 nm (Figura 12), sugerindo a presença de compostos derivados do ácico gálico (STICHER, 2008).



Figura 12. Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para compostos derivados de ácido gálico.

Uma segunda parte **II** (tr entre ~75 e 170 min), apresentou picos com bandas de absorção típicos de flavonoides (Figura 13), os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel-A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel-B (MERKEN e BEECHER, 2000).



Figura 13. Bandas de máximo de absorção na região do UV ilustradas para flavonoides.

A Banda I é associada à absorção do anel B (sistema cinamoil) e a Banda II é atribuída ao anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil (Esquema 2).



Esquema 2. Estrutura de um flavonol com sistemas benzoil e cinamoil.

Separação dos constituintes químicos por GPC

Separações de compostos orgânicos utilizando sistemas de cromatografia de permeação em gel utilizando solventes orgânicos são amplamente utilizadas na investigação de produtos naturais (LINSKENS e JACKSON, 1992). Durante o processo de separação cromatográfica por GPC foram coletadas 366 frações e a triagem foi feita por TLC (Figura 14). Na avaliação das frações, vários sistemas de eluição foram testados, e posteriormente o sistema que apresentou melhor resolução foi selecionado.

Após a triagem as frações foram reagrupadas de acordo com as suas semelhanças (R_f e coloração) em subfrações.



Figura 14. Análise por TLC das subfrações obtidas após separação por GPC em Sephadex[®] LH-20 (gel de Sílica, CHCl₃/MeOH /H₂O [75:23:2, v/v/v], revelador: anisaldeído/H₂SO₄).

A revelação das TLC com anisaldeído/H₂SO₄ evidenciou manchas de coloração arroxeadas e amarelo/alaranjado, sugerindo a presença de derivados de ácidos fenólicos,

terpenos e flavonoides (WAGNER, BLADT e ZGAINSKI, 2003). A partir das análises por TLC foi possível verificar que a separação preliminar por GPC concentrou os terpenos e ácidos fenólicos nas frações coletadas no início do processo de separação, e os flavonoides nas frações coletadas posteriormente.

Depois de reagrupadas, as subfrações foram secas até remoção total de solventes e suas massas determinadas. A tabela 3 mostra a distribuição das massas das subfrações obtidas após o procedimento de separação por GPC da fração *n*-butanólica. A massa total das frações significativamente menor que a massa inicial pode ser atribuída ao precipitado formado no processo de centrifugação da amostra, que foi separado da amostra antes que essa fosse aplicada à coluna.

Subfração	Agrupamento	Massa (g)
25	25-32	0,0093
33	33-42	0,0439
43	43-52	0,0560
53	53-102	0,3863
103	103-124	0,0864
125	125-128	0,0094
129	129-130	0,0370
131	131-133	0,0281
134	134-135	0,0140
136	136 – 146	0,0732
147	147-156	0,0663
157	157-164	0,1251
165	165-169	0,0700
170	170-178	0,1075
179	179-189	0,1115
190	190-210	0,1269
211	211-214	0,0151
215	215-222	0,0297
223	223-230	0,0268
231	231-236	0,0208
237	237-269	0,1460
270	270-273	0,0176
274	274-309	0,1500
310	310-324	0,0308
325	325-331	0,0182
332	332-366	0,0343
	Massa Total	1,805

Tabela 4. Distribuição das massas das frações após separação por GPC em Sephadex LH-20 e agrupamentos por TLC.

Isolamento dos compostos por HPLC-RI semi-preparativo

As subfrações reagrupadas após separação por cromatografia em GPC foram analisadas novamente por TLC, e as frações contendo analitos com características de flavonoides e massa suficiente para os experimentos foram escolhidas para os procedimentos de separação por HPLC-RI.

A solubilização das amostras a serem injetadas compreende um processo importante. Cuidados devem ser tomados quanto à escolha do solvente utilizado nessa etapa, pois a força de eluição do solvente utilizado para a solubilização da amostra deve ser compatível com a força de eluição da fase móvel. A incompatibilidade pode prejudicar a separação dos compostos, causando um espalhamento longitudinal da amostra ao longo da coluna quando a força de eluição da amostra for mais forte que a fase móvel. A situação ideal é quando o solvente de injeção é mais fraco que a força de eluição da fase móvel, pois os analitos tendem a permanecer no topo da coluna, sendo seletivamente eluídos de acordo com a variação da força de eluição da fase móvel (MAJORS, 2004).

Assim, após a otimização de todos os parâmetros, a separação dos constituintes químicos das frações flavonoídicas foi realizada com o sistema HPLC com detector de índice de refração semi-preparativo e coluna de fase reversa (C₁₈) descritos na seção experimental. A fase móvel empregada foi MeOH (A) + H₂O (B), sendo 40% de **A** em **B** (isocrático), fluxo de 2,0 mL.min⁻¹. Em cada corrida cromatográfica foram aplicados, com o auxílio de uma seringa, 60-80 μ L de amostra, na concentração final de 100 mg.mL⁻¹. Todas as amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (40:60 v/v) e filtradas em filtros de seringa com poro de 0,45 μ m. Picos individuais eluídos da coluna foram coletados por múltiplas injeções da amostra e concentrados por evaporação a pressão reduzida e secos totalmente.

As frações contendo flavonoides foram selecionadas e analisadas. Após as etapas de isolamento, as substâncias desconhecidas foram caracterizadas usando técnicas de elucidação estrutural comumente empregada, tais como UV, NMR e MS.

Identificação dos compostos isolados

Atualmente, métodos de espectrometria de massas (MS) estão suficientemente desenvolvidos para tornarem possível a identificação estrutural, pelo menos em parte, de substâncias como flavonoides heterosídeos. Apesar de as técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) serem preferidas para completa elucidação estrutural, as técnicas de MS podem contribuir de forma significativa já que é possível analisar amostras com quantidades muito menores de compostos isolados. Portanto, nos casos em que a massa total do composto isolado não foi suficiente para realizar análises por NMR, os compostos foram caracterizados somente por MS.

Caracterização das agliconas por espectrometria de massas

A análise de estruturas de flavonoides é realizada mais frequentemente no modo positivo, enquanto o modo negativo é considerado algumas vezes mais complexo, de difícil interpretação. Altas energias de colisão são necessárias para gerar uma fragmentação adequada no modo negativo, e algumas vezes, íons diagnósticos na determinação estrutural estão ausentes. Porém, o modo negativo é mais sensível na análise de flavonoides (DE RIJKE et al., 2003; SWATSITANGE et al., 2000; CUYCKENS E CLAEYS, 2002; CARERI et al., 1999; MAURI et al., 1999; FABRE et al., 2001), e o comportamento da fragmentação é diferente, gerando informações adicionais e complementares sobre a estrutura analisada. A clivagem do anel C pelo mecanismo de fragmentação retro-Diels-Alder (RDA) gera íons ^{i,j}A⁻ e ^{i,j}B⁻, dando informações sobre o número e tipo de constituintes no anel-A e anel-B (Esquema 3). A análise por MS e mecanismos de fragmentação de várias agliconas no modo negativo tem sido estudada por Fabre et al. (2001). O fragmento ^{1,3}A⁻ é frequentemente o íon produto majoritário no modo negativo. O grau de hidroxilação do anel B interfere no padrão de fragmentação. Por exemplo, flavonóis contendo dois ou mais grupos hidroxila no anel-B, por exemplo, quercetina e miricetina, com íons correspondentes à $[^{1,2}A - H]^-$ e $[^{1,2}B + H]^-$ podem ser detectados (FABRE et al., 2001; CUYCKENS et al., 2000), enquanto que no caso do anel B desprovido de substituição, a energia de colisão necessária para obtenção de fragmentos é muito maior, gerando vários íons produtos (HUGHES et al., 2001).



Esquema 3. Rota de fragmentação putativa da miricetina. A identificação dos fragmentos segue nomenclatura proposta por Ma et al. (1997).

Assim, os íons produtos de m/z abaixo dos valores da aglicona (m/z 317), como m/z 179 (^{1,2}A⁻), 151 (^{1,3}A⁻) e 137 (^{1,2}B⁻) (Esquema 3) são típicos do mecanismo de fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e m/z 137 corresponde à fragmentação típica do anel-B trihidroxilado (MA et al., 1997). A presença desses três fragmentos de m/z 317 da aglicona é característica do composto miricetina.

Caracterização dos O-substituintes por espectrometria de massas

Métodos de espectrometria de massas também podem ser aplicados à obtenção de informação sobre o carboidrato e a ligação na aglicona. Alguns autores mostram também ser possível, em alguns casos específicos, identificar a posição do carboidrato, a ligação entre os carboidratos e a identidade estereoquímica do açúcar terminal (WARIDEL et al., 2004; CUYCKENS E CLAEYS, 2004). Clivagem da ligação de unidades *O*-substitu idas e a reação de rearranjo do H (Esquema 4) leva à eliminação do resíduo monossacarídeo, por exemplo, 162 Da (hexose), 146 Da (deoxihexose), 132 Da (pentose), tornando possível a identificação da sequência dos substituintes (WOLFENDER, et al., 1992).


Esquema 4. Formação do íon produto radical aglicona ($[Y_0 - H]^{-}$) por clivagem homolítica da ligação entre a aglicona e o açúcar com rearranjo de H- concomitante.

O radical aglicona ($[Y_0 - H]$) é formado pela clivagem homolítica como ilustrado no esquema 3 e, concomitantemente, uma reação de rearranjo no C₃-O⁻pode ocorrer com a participação de um átomo de um hidrogênio hidroxil do açúcar (LI E CLAYES, 1994).

A formação do radical aglicona como íon produto usando ESI-MS/MS no modo negativo, tem sido correlacionada com a atividade antioxidante dos flavonoides. Abundância desses íons para os flavonóis (3-OH) depende diretamente do padrão de hidroxilação do anel-B e da natureza e posição dos açúcares. A relação de abundância do íon produto radical aglicona, gerado pela clivagem homolítica da ligação 3-*O*-glicosídica, aumenta de acordo com o aumento de substituições de hidroxilas no anel-B.

Portanto, considerando o perfil flavonoídico das amostras escolhidas para isolamento e caracterização, análises por FIA-ESI-IT-MS foram realizadas no modo negativo.

Os dados obtidos nas técnicas de NMR foram comparados com a literatura disponível (AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1994; LU E FOO, 1997; ANDERSEN e MARKHAM, 2006)

A caracterização dos compostos isolados e/ou detectados na fração *n*-butanólica é descrita e discutida a seguir.

Fração 103

A fração 103 contendo 80 mg foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, dando origem a 7 mg de uma substância isolada (103-2). Experimentos de massas (ESI-IT-MS) no modo negativo foram realizados a fim de se obter informações sobre a massa e estrutura desse composto.

O espectro de massas em primeira-ordem obtido da fração 103-2 (Figura 15) apresentou pico intenso referente ao íon de m/z 197 [M - H]⁻. Esse íon foi atribuído ao composto galato de etila.



Figura 15. Espectro de massas em primeira-ordem obtido por ESI-IT-MS da fração 103-2, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

O espectro de ¹H-NMR apresentou sinal em δ 6,92 (2H, s) relativo ao próton aromático; picos em δ 1,24 (3H, t, J = 7,2 Hz) e em δ 4,18 (2H, q, J = 7,2) referentes aos hidrogênios etílicos. O espectro de ¹³C-NMR apresentou dois sinais referentes ao grupo etílico em (δ 14,6 e δ 60,0), quatro sinais aromáticos (δ 109,1, δ 120,1, δ 138,9 δ 146,2) e o sinal referente à carbonila esterificada (δ 166,3), confirmando a identificação deste composto como galato de etila.

Fração 136

A fração 136 contendo 73 mg foi submetida à separação cromatográfica, dando origem a 3 frações. O espectro de massas de primeira-ordem obtido da fração 136-2 por ESI-IT-MS (Figura 16) apresentou pico intenso referente ao íon precursor de m/z 169 [M - H]⁻. Análise por ¹H-NMR da fração 136-2 apresentou sinal dos hidrogênios aromáticos em δ 6,9 (2H, s), assim confirmando a substância como sendo o ácido gálico.



Figura 16. Espectro de massas em primeira-ordem obtido por ESI-IT-MS da fração 136-2, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

A fração 136-3 contendo 2 mg foi analisada por ESI-IT-MS evidenciando um sinal intenso de m/z 447. Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 447 [M – H]⁻ (Figura 17) produziu o íon produto de m/z 285 [M – 162 – H]⁻ após a perda de 162 Da. Esse padrão de fragmentação foi atribuído ao composto kaempferol-*O*-hexosídeo.



Figura 17. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 477, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

Análise por ESI-IT-MS da fração 136-4 contendo 3 mg evidenciou uma mistura de compostos de m/z 431 e de m/z 461. Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 431 [M – H]⁻ (Figura 18) gerou o íon produto de Y_0^- de m/z 285 [M – 146 – H]⁻ após a perda de 146 Da. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma deoxihexose *O*-substituída na aglicona do flavonoide. Esse composto foi identificado como kaempferol-*O*-deoxyhexosídeo.



Figura 18. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 431, em modo negativo. Para condições experimentais veja: Material e Métodos.

Fração 157

A fração 157 contendo 125 mg foi submetida à separação cromatográfica, dando origem a duas frações puras, 157-4 contendo 19 mg e a fração 157-5 contendo 25 mg. O espectro de massas obtido por ESI-IT-MS da substância 157-4 (Figura 19) apresentou pico intenso referente ao íon de m/z 463 [M - H]⁻. A fragmentação em segunda ordem MS/MS do íon precursor de m/z 463 resultou na perda de 162 Da formando um íon produto Y_0^- de m/z 301 [M - 162 - H]⁻. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-*O*-hexosídeo.



Figura 19. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 463, em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O espectro ¹H-NMR (Figuras 20A-B) obtido dessa fração mostrou sinais de hidrogênios aromáticos em δ 6,81 (1H, d, J = 8,5 Hz; H-5²), δ 7,53 (1H, d, J = 2,5 Hz; H-2²) e δ 7,66 (1H, dd, J = 8,5, J = 2,5 Hz; H-6²) típicos do anel-B de quercetina, além dos sinais em δ 6,19 (1H, d, J = 2 Hz; H-6) e δ 6,40 (1H, d, J = 2 Hz; H-8). O pico em δ 5,36 (1H, d, J = 7,5 Hz) sugere uma unidade de β-D-galactopiranosídeo. Os demais deslocamentos presentes no espectro de ¹H-NMR foram compatíveis com a literatura (HARBORNE, 1994). O espectro de ¹³C-NMR (Figura 21) apresentou 15 sinais relativos à aglicona além de 6 sinais referentes à unidade de açúcar. O espectro de HMBC (Figura 22) mostra a correlação do H anomérico em δ 5,36 com o C3 do anel em δ 133,5, confirmando a posição da ligação do açúcar na estrutura do flavonoide. Portanto este composto foi caracterizado como quercetina-3-*O*-β-D-galactopiranosídeo. A tabela 5 apresenta os deslocamentos observados no espectro de ¹H-NMR e ¹³C-NMR.



Figura 20A. Espectro de ¹H-NMR da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 20B. Espectro de ¹H-NMR da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 21. Espectro de ¹³C-NMR da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 22. Espectro de HMBC da fração 157-4 (500 MHz, DMSO-d₆).

Posição	¹³ C-NMR*	¹ H-NMR*
2	156,3	
3	133,5	
4	177,4	
5	161,2	
6	98,7	6,19 (1H, d,
		J = 2 Hz)
7	164,3	
8	98,5	6,40 (1H, d,
		J = 2Hz)
9	156,3	
10	103,9	
1'	121,1	
2'	115,2	7,53 (1H, d,
		J = 2,5 Hz)
3'	144,8	
4'	148,5	
5'	116,2	6,81 (1H, d,
		J = 8,5 Hz)
6'	121,9	7,66 (1H, dd,
		J = 8,5, J =
		2,5 Hz)
Açúcar		
1"	101,8	5,36 (1H, d,
		J = 7,5 Hz)
2"	71,2	
3"	73,2	
4''	67,9	
5"	75,8	
0		

Tabela 5. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 157-4.

O espectro de massas da substância 157-5, obtido por ESI-IT-MS apresentou pico intenso referente ao íon de m/z 447 [M - H]⁻ (Figura 23). Fragmentação em segunda-ordem por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447 resultou na perda de 146 Da formando um íon produto Y_0^- de m/z 301 [M - 146 - H]⁻ atribuído à quercetina devido à perda de uma deoxihexose (146 Da). Considerando esse padrão de fragmentação, o composto foi caracterizado com quercetina-*O*-deoxihexose.



Figura 23. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447, em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O experimento de ¹H-NMR (Figura 24A-C) da amostra 157-5 apresentou sinais em δ 6,19 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,38 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-8) e δ 6,86 (1H, d, J = 8,5; H-5') além dos sinais em δ 7,25 (1H, dd, J = 2,0, J = 8 Hz; H-6') e δ 7,29 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-2') o que confirma a presença da quercetina. O hidrogênio anomérico em δ 5,25 (1H, d, J = 1,0 Hz) e o sinal em δ 0,82 (3H, d, J = 6 Hz) sugerem a presença de uma unidade de β -D-rhamnopiranosídeo (HARBORNE, 1994). O espectro de ¹³C-NMR (Figura 25) apresentou 15 sinais relativos à aglicona além de 6 sinais referentes à unidade de açúcar. O sinal em δ 17,49 atribuído ao C6'' do açúcar é diagnóstico e confirma a presença da rhamnose. A tabela 6 apresenta os deslocamentos observados no espectro de ¹H-NMR e ¹³C-NMR.

O espectro de HMBC (Figura 26) mostra a correlação do H anomérico em δ 5,25 com o C3 do anel em δ 134,1, confirmado a posição da ligação do açúcar na estrutura do flavonoide. Portanto este composto foi caracterizado como quercetina-3-O- β -Drhamnopiranosideo.



Figura 24A. Espectro ¹H-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 24B. Espectro ¹H-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 24C. Espectro ¹H-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 25. Espectro de ¹³C-NMR da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d₆).



Figura 26. Espectro de HMBC da fração 157-5 (500 MHz, DMSO-d₆).

Posição	¹³ C-NMR*	¹ H-NMR*
2	156,4	
3	134,2	
4	177,7	
5	161,3	
6	98,7	6,19 (1H, d,
		J = 2,0 Hz)
7	164,4	
8	93,6	6,38 (1H, d,
		J = 2,0 Hz)
9	157,2	
10	103,9	
1'	121,1	
2'	115,4	7,29 (1H, d,
		J = 2,0 Hz)
3'	145,2	
4'	148,4	
5'	115,6	6,86 (1H, d,
		J = 8,5)
6'	120,7	7,25 (1H,
		dd, $J = 2,0, J$
		= 8 Hz)
Açúcar		,
1"	101,8	5,25 (1H, d,
		J = 1,0 Hz)
2"	70,4	3,97 (m)
3''	70,6	3,51 (dd, J =
		3,5 e J = 9
		Hz)
4''	71,2	3,15 (m)
5''	70,0	3,22 (m)
6"	17,5	0,82 (d, $J =$
		6 Hz)

Tabela 6. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 157-5.

*500 MHz, DMSO-d₆.

Fração 165

A fração 165 contendo 70 mg deu origem à fração 165-5 com 16 mg após separação por HPLC-RI. O espectro de massas de primeira-ordem apresentou sinais de íons com m/z 463 [M – H]⁻. A fragmentação de segunda-ordem deste íon precursor levou ao íon produto Y_0^- de m/z 317 [M – 146 - H]⁻ (Figura 27), sugerindo a perda de uma

unidade de deoxihexose (146 Da) *O*-substituida na aglicona do flavonoide. O íon produto ^{1,2}A⁻ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado, assim o íon produto Y_0^- foi atribuído à miricetina. A presença do íon produto fragmento $[Y_0 - 2H - COOH]^-$, indica a posição da ligação do açúcar na aglicona, já que é diagnóstico de flavonóis 3-*O*-monoglicosídeos (ABLAJAN et al., 2006). Considerando este padrão de fragmentação, a substância isolada foi identificada como miricetina-3-*O*-deoxihexosídeo.



Figura 27. Espectro de massas em segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 463 $[M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O experimento de ¹H-NMR da amostra 165-5 apresentou sinais em δ 6,18 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,35 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-8) e δ 6,87 (2H, s, H-2' e H-6') o que confirma a unidade de miricetina. O hidrogênio anomérico em δ 5,18 (1H, d, J = 1,5 Hz) e o sinal em δ 0,83 (3H, d, J = 6 Hz) sugerem a presença de uma unidade de rhamnose (HARBORNE, 1994). O espectro de ¹³C-NMR apresentou 15 sinais relativos à aglicona além de 6 sinais referentes à unidade de açúcar. O sinal em δ 17,51 atribuído ao C6'' do açúcar é diagnóstico e confirma a presença da rhamnose. Baseado na comparação dos dados obtidos com a literatura (AGRAWAL, 1989) a substância foi caracterizada como sendo miricetina-3-O-β-D-rhamnopiranosídeo.

Frações 170 e 179

Uma série de amostras puras mostrou um padrão de fragmentação similar por MS. A obtenção de espectros por ESI-IT-MS de primeira-ordem das frações 170-10 (13 mg), 179-4 (5 mg) e 179-5 (8 mg) apresentaram sinal intenso em m/z 433 [M – H]⁻. Fragmentação de segunda-ordem deste íon precursor levou ao íon produto Y_0^- de m/z 301 [M – 132 - H]⁻ (Figura 28), sugerindo a perda de uma unidade de pentose (132 Da) *O*substituida na aglicona do flavonoide. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de unidades de quercetina *O*-pentosídeos.



Figura 28. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z = 433 [M – H]⁻, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Os experimentos de ¹H-NMR das amostras 170-10, 179-4 e 179-5 apresentaram deslocamentos químicos típicos de quercetina (Tabela 6). A diferenciação do açúcar dessas substâncias em α -L-arabinofuranosídeo, β -D-xilopiranosídeo e β -D-xilofuranosídeo foi possível pela comparação dos valores de constantes de acoplamentos (*J*) entre H1 e H2. Os valores próximos a 1,5 Hz indicam a configuração α , enquanto que valores próximos a 7-9 indicam a configuração β (HARBORNE, 1994). O hidrogênio anomérico em δ 5,18 (1H, d, *J* = 3,5 Hz) da fração 170-10 indica a presença de quercetina-

3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo. O hidrogênio anomérico em δ 5,32 (1H, d, *J* = 7,3 Hz) da fração 179-4 indica a presença de quercetina-3-*O*- β -D-xilopiranosídeo e em δ 5,27 (1H, d, *J* = 1,5 Hz) da fração 179-5 indica a presença de quercetina-3-*O*- β -D-xilofuranosídeo (LU E FOO, 1997; HARBORNE, 1994; ANDERSEN e MARKHAM, 2006). Os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de ¹³C-NMR na região de açúcar foram similares aos obtidos na literatura (LU E FOO, 1997; AGRAWAL, 1989; ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Fração 190

A fração 190 contendo 65 mg, após separação por HPLC-RI, deu origem à fração 190-2 contendo 12 mg e a fração 190-3 com 4 mg.

Análise por ESI-IT-MS da fração 190-2, evidenciou a presença do íon precursor de $m/z = 479 [M - H]^{-}$ no espectro em primeira-ordem (Figura 29). Fragmentação em segunda-ordem desse íon gerou o íon produto Y_0^{-} de m/z 317 $[M - 162 - H]^{-}$ resultante de clivagem homolítica sugerindo a perda de uma unidade de hexose (162 Da) *O*-substituída na aglicona do flavonoide. O íon produto $[Y_0 - H - COOH]^{-}$ detectado é diagnóstico de flavonóis 3-*O*-monoglicosilados (ABLAJAN et al., 2006) e o íon produto ${}^{1,2}A^{-}$ é produto da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado. De acordo com esse padrão de fragmentação, o composto foi identificado como miricetina-3-*O*-hexosídeo.



Figura 29. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z = 479 $[M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O experimento de ¹H-NMR (Figura 30) da amostra 190-2 apresentou sinais em δ 6,19 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,37 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-8) e δ 7,20 (2H, s, H-2' e H-6') o que confirma a unidade de miricetina. O hidrogênio anomérico em δ 5,33 (1H, d, J = 7,7 Hz) sugere a presença de uma unidade β-D-galactopiranosídeo (HARBORNE, 1994). Na região de 3,1-3,7 observam-se os sinais de açúcar sobrepostos ao sinal de H₂O prejudicando a atribuição completa dos H. O espectro de ¹³C-NMR (Figura 31) apresentou 15 sinais relativos à aglicona, além de 6 sinais referentes à unidade de açúcar. A tabela 7 apresenta os deslocamentos observados no espectro de ¹H-NMR e ¹³C-NMR. Baseado na comparação dos dados obtidos com a literatura (AGRAWAL, 1989) a substância foi caracterizada como sendo miricetina-3-*O*-β-D-galactopiranosídeo.



Figura 30. Espectro de ¹H-NMR da fração 190-2 (300 MHz, DMSO-d₆).



Figura 31. Espectro de ¹³C-NMR da fração 190-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

Posição	¹³ C-NMR*	¹ H-NMR*		
2	156,2			
3	133,8			
4	177,4			
5	161,2			
6	98,7	6,19 (1H, d,		
		J = 2,0 Hz)		
7	164.1			
8	93,4	6,37 (1H, d,		
		J = 2,0 Hz)		
9	156,2			
10	103,9			
1'	119,9			
2'	108,6	7,20 (2H, s)		
3'	145,4			
4'	136,7			
5'	145,4			
6'	108,6	7,20 (2H, s)		
Açúcar				
1"	102,1			
2"	71,2			
3''	73,3			
4''	68,0			
5''	75,9			
6''	60,1			
*300 MHz, DMSO-d ₆				

Tabela 7. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 190-2.

300 MHZ, DMSO-d₆.

Fração 190-3

Análise por ESI-IT-MS da fração 190-3, evidenciou a presença do íon precursor de m/z 449 $[M - H]^{-}$ no espectro em primeira-ordem. Fragmentação em segunda-ordem desse íon (Figura 32) gerou o íon produto Y_0^- de m/z 317 $[M - 132 - H]^-$ resultante de clivagem homolítica sugerindo a perda de uma unidade de pentose (132 Da) O-substituída na aglicona do flavonoide. De acordo com esse padrão de fragmentação, o composto foi identificado como miricetina-3-O-pentosídeo.



Figura 32. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z = 449 $[M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O experimento de ¹H-NMR (Figura 33) da amostra 190-3 apresentou sinais em δ 6,19 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,38 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-8) e δ 7,07 (2H, s, H-2' e H-6') o que confirma a unidade de miricetina. O hidrogênio anomérico em δ 5,53 (1H, d, J = 1,5Hz) e os deslocamentos de ¹³C sugerem a presença de uma unidade *O*-αarabinofuranosídeo (HARBORNE, 1994). O espectro de ¹³C-NMR (Figura 34) apresentou 15 sinais relativos à aglicona além dos 6 sinais referentes a unidade de açúcar. A tabela 8 apresenta os deslocamentos observados no espectro de ¹H-NMR e ¹³C-NMR. Baseado na comparação dos dados obtidos com a literatura (AGRAWAL, 1989) a substância foi caracterizada como sendo miricetina-3-*O*-α-arabinofuranosideo.



Figura 33. Espectro de ¹H-NMR da fração 190-3 (300 MHz, DMSO-d₆).



Figura 34. Espectro de ¹³C-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

Posição	¹³ C-NMR*	¹ H-NMR*
2	156,4	
3	133,3	
4	177,8	
5	161,2	
6	98,6	6,19 (1H, d,
		J = 2,0 Hz)
7	164,3	
8	93,5	6,38 (1H, d,
		J = 2,0 Hz)
9	157,3	
10	103,9	
1'	119,9	
2'	108,1	7,07 (2H, s)
3'	145,7	
4'	136,6	
5'	145,7	
6'	108,1	7,07 (2H, s)
Açúcar		
1"	107,6	5,53 (1H, d,
		J = 1,5 Hz)
2"	82,0	
3''	76,8	
4''	85,4	
5"	60,4	

Tabela 8. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 190-3.

*300 MHz, DMSO-d₆.

Fração 223

A fração 223 contendo 26 mg foi obtida após separação por GPC e por análises em TLC observou-se que havia uma mistura de flavonoides. Através do experimento de NMR foi possível identificar uma das substâncias. O experimento de ¹H-NMR da amostra 223 apresentou sinais em δ 6,18 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,37 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-8) e δ 7,15 (2H, s, H-2' e H-6') o que confirma a unidade de miricetina. O espectro de ¹³C-NMR apresentou 15 sinais relativos à aglicona além de 5 sinais referentes a unidade de açúcar. A tabela 9 apresenta os deslocamentos observados no espectro de ¹H-NMR e ¹³C-NMR.

Baseado na comparação dos dados obtidos com a literatura (AGRAWAL, 1989) a substância foi caracterizada como sendo miricetina-3-O- α -arabinopiranosídeo.

Posição	¹³ C-NMR*	¹ H-NMR*
2	156,3	
3	133,9	
4	177,5	
5	161,2	
6	98,7	6,18 (1H, d,
		J = 2.0 Hz)
7	164,3	
8	93,4	6,37 (1H, d,
		J = 2.0 Hz)
9	156,4	, ,
10	103,9	
1'	119,8	
2'	108,5	7,15 (2H, s)
3'	145,6	
4'	136,8	
5'	145,6	
6'	108,5	7,15 (2H, s)
Acúcar	,	· · · · ·
1"	101,7	$5,18 \ (J = 5)$
	,	Hz)
2"	70,7	3,77 (m)
3"	71,8	3,51 (dd)
4"	66,2	3,65 (m)
5''	64,4	3,24 (m)

Tabela 9. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 223.

*500 MHz, DMSO-d₆.

Fração 237

A fração 237 contendo 140 mg foi analisada por HPLC-RI semipreparativo dando origem a uma subfração com um composto puro. A fração 237-2 com 16 mg foi analisada por ESI-IT-MS, gerando um espectro de primeira-ordem com íon precursor de m/z 615 $[M - H]^-$ (Figura 35). A fragmentação desse íon por ESI-IT-MS/MS levou ao íon produto Y_1^- de m/z 463 $[M - 152 - H]^-$ referente à perda de uma unidade de galoil. A fragmentação do íon produto de m/z 463 não foi possível, porém baseado nos compostos caracterizados

anteriormente, duas possibilidades foram propostas para a identificação das unidades constituintes desse íon produto. Uma possibilidade seria a presença de uma unidade de deoxihexose ligada a uma miricetina, outra possibilidade seria uma unidade de hexose ligada à quercetina.



Figura 35. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z = 615 $[M - H]^{-}$, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O experimento de ¹H-NMR (Figura 36. A-B) da amostra 237-2 apresentou sinais em δ 6,18 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,39 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-8) e δ 6,82 (1H, d, J = 8; H-5') além dos sinais em δ 7,52 (1H, dd, J = 2,0, J = 8 Hz; H-6') e δ 7,63 (1H, d, J = 2,0Hz; H-2') o que confirma a presença da quercetina. Na região de 3,4-3,6 ppm observam-se os sinais de açúcar sobrepostos ao sinal de H₂O prejudicando a atribuição completa dos H. A tabela 10 apresenta os deslocamentos observados no espectro de ¹H-NMR e ¹³C-NMR (Figura 37). Comparação dos dados obtidos com a literatura possibilitou a identificação deste composto como sendo quercetina-3-O-(6''galoil)- β -galactopiranosídeo (Figura 38).



Figura 36A. Espectro de ¹H-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO-d₆).



Figura 36B. Espectro de ¹H-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO-d₆).



Figura 37. Espectro de ¹³C-NMR da fração 237-2 (300 MHz, DMSO-d₆).

tos quinneos de	12	<u>uu huçuo 257 2.</u>	
Posição	¹³ C-NMR*	'H-NMR*	
2	156,3		
3	133,5		
4	177,4		
5	161,2		
6	98,8	6,18 (1H, d,	
		J = 2.0 Hz)	
7	164,2	. ,	
8	93.6	6.39 (1H, d,	
	,	J = 2.0 Hz	
9	156.4	- ,- ,	
10	103.8		
1'	121.0		
2'	115.2	763 (1H d	
2	110,2	I = 20 Hz	
3'	144 8	<i>J</i> = 2,0 112)	
ع 4'	148.5		
	116.0	6.82 (1H d	
5	110,0	(J-8)	
6'	121.9	J = 0 7 52 (1H	
0	121,7	7,52 (11), dd $I = 20$ I	
		(u, J = 2, 0, J) - 8 Hz)	
Acúcar		$= 0 \Pi L$	
	102 1		
1) ,,	102,1		
2 2''	71,1		
J 1''	12,0		
4	07,8		
5	72,4		
0	62,1		
Galoil	110.1		
1	119,1	(0)	
2	108,6	6,8 (s)	
3	145,5		
4'''	138,5		
5'''	145,5		
6'''	108,6	6,8 (s)	
*300 MHz, DMSO-d ₆			

Tabela 10. Deslocamentos químicos de ¹³C-NMR e ¹H-NMR da fração 237-2.


m/z 615

Figura 38. Estrutura proposta para quercetina-(6"-O-galoil)-β-galactopiranosídeo.

Fração 274

A fração 274 obtida por separação por GPC apresentou uma mistura de compostos distintos com grande diferença na polaridade quando analisada por TLC. Devido a essa diferença de comportamento frente à sílica, uma metodologia empregando o uso da técnica de extração em fase sólida com cartuchos contendo sílica C_{18} (SPE C_{18}) foi desenvolvida para o isolamento desses compostos. Os cartuchos foram pré-condicionados passando sequencialmente 15 mL de MeOH e 10 mL de H₂O. Em seguida a amostra (respeitando o limite de carga de 1 mg para cada 10 mg de fase estacionária) previamente solubilizada em um pequeno volume de solução (~ 1 mL MeOH/H₂O 1:1 v/v) foi aplicada nos cartuchos. Soluções contendo MeOH 100%, MeOH/H₂O (2:8 v/v) e H₂O 100% foram utilizadas como eluente e aplicadas (10 mL) nos cartuchos. Cada eluato foi coletado como uma fração separada e monitorado por TLC em vários sistemas eluentes, sendo empregado nesta análise comparativa, quercetina como substância de referência. No total, uma alíquota de 150 mg foi aplicada múltiplas vezes no cartucho originando três frações: 274-M, 274 –MW e 274-W3.

Fração 274-M

A análise comparativa por TLC da fração 274-M (15 mg), eluída na solução MeOH 100%, evidenciou apenas uma mancha com R_f e coloração similar à quercetina, utilizada como substância de referência. O espectro em primeira-ordem obtido por ESI-IT-MS da fração 274-M (Figura 39), evidenciou a presença do íon precursor de m/z 301, o qual sugere a presença de uma quercetina.



Figura 39. Espectro de massa de primeira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS da fração 274-M, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O experimento de ¹H-NMR da amostra 274-M apresentou sinais em δ 6,08 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-6), δ 6,28 (1H, d, J = 1,5 Hz; H-8) e δ 6,78 (1H, d, J = 8,5; H-5') além dos sinais em δ 7,52 (1H, dd, J = 2,0, J = 8,5 Hz; H-6') e δ 7,63 (1H, d, J = 2,0 Hz; H-2') o que confirma a presença da quercetina.

Fração 274-MW

Análise da fração 274-MW, eluída na solução MeOH/H₂O (2:8 v/v), evidenciou um sinal intenso do íon precursor de m/z 585 [M – H]⁻ no espectro em primeira-ordem. Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor gerou o íon produto Y_1^- de m/z 433 [M – 152 – H]⁻, evidenciando a perda de uma unidade galoil, e outro íon produto Y_0^- de m/z 301 [M – 152 – 132 – H]⁻ evidenciando a perda uma pentose *O*-substituída na aglicona do flavonoide. Fragmentação de terceira-ordem do íon produto Y_0^- de m/z 301 gerou íons produtos fragmentos de m/z 179 (^{1,2}A⁻) e de m/z 151 (^{1,3}A⁻), típicos da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com o anel-A dihidroxilado, sugerindo o flavonoide quercetina como aglicona. Baseado nesse padrão de fragmentação esse composto foi identificado como quercetina-*O*-(*O*-galoil)-pentosideo. A figura 40 apresenta os espectros obtidos.



Figura 40. Espectro de massas da fração 274-MW: A – espectro em primeira-ordem da fração 274-MW. B – Espectro em segunda-ordem (MS/MS) do íon precursor de m/z 585. C – Espectro em terceira-ordem (MS/MS³) do íon produto de m/z 301. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fração 274-W

O espectro de primeira ordem da fração 274-MW (3 mg), eluída na solução H₂O 100%, evidenciou a presença do íon precursor de m/z 631 [M – H]⁻. Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor gerou um íon produtos Y_1^- de m/z 479 [M – 152 – H], atribuído à perda de uma unidade galoíla, e o íon produto Y_0^- de m/z 317 [M – 152 – 162 – H] referente à perda de uma hexose *O*-substituída na aglicona do flavonoide. Fragmentação em terceira-ordem do íon produto de m/z 317 gerou íons com valores de m/z abaixo da aglicona (m/z < 317) como m/z 179 (^{1.2}A) e m/z 151 (^{1.3}A⁻) que juntos são típicos da fragmentação RDA de flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado. A posição exata da ligação do grupo galoil na hexose baseado somente nos espectros de massas obtidos não pode ser definida, mas eles aparecem predominantemente na posição 6⁻ da hexose; no entanto outras posições não podem ser excluídas. Somente quando no espectro de massas o fragmento ^{0.4}X⁻ é presente, se pode confirmar a posição 6⁻ (BYLKA et al., 2002). Nos experimentos realizados esse fragmento não esteve presente, portanto, considerando esse padrão de fragmentação, esse composto foi identificado como miricetina-*O*-(*O*-galoil)-hexosídeo. A figura 41 apresenta os espectros obtidos.



Figura 41. Espectro de massas da fração 274-W: A – espectro em primeira-ordem da fração 274-W. B – Espectro em segunda-ordem (MS/MS) do íon precursor de m/z 631. C – Espectro de terceira-ordem (MS/MS³) do íon produto de m/z 317. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fração 325

A fração 325 contendo 18 mg foi obtida após separação por GPC. A análise por TLC evidenciou a presença de uma única mancha, indicando que a fração continha uma substância majoritária isolada. O experimento de ¹H-NMR da amostra 325 apresentou sinais em δ 6,17 (1H, d, *J* = 2,0 Hz; H-6), δ 6,36 (1H, d, *J* = 2,0 Hz; H-8) e δ 7,22 (2H, s, H-2' e H-6') o que confirma a unidade de miricetina.

Análise por HPLC-PAD dos flavonoides heterosídeos isolados

Informações sobre estruturas de flavonoides também podem ser obtidas pelo comportamento cromatográfico do composto. Na fase reversa, geralmente colunas C_{18} , os compostos mais polares eluem primeiramente, podendo assim ser correlacionada à polaridade dos compostos e o tempo de retenção na corrida cromatográfica. Portanto, o tempo de retenção é inversamente correlacionado com o aumento da glicosilacão, enquanto que o aumento do número de unidades acila, metila e prenila causam efeito contrário; no entanto a posição da ligação destes substituintes pode afetar consideravelmente o tempo de retenção. Quando possuem um padrão de substituição equivalente, flavanonas precedem flavonóis, os quais precedem flavonas. Para compostos isoméricos que diferem na estrutura glicosídica, rutinosídeos eluem à frente de neoesperidosídeos, galactosídeos à frente de glucosídeos (ROBARDS E ANTOLOVICH 1997), glucosídeos à frente de arabinosideos e arabinosideos à frente de rhamnosídeos (HARBORNE E BOARDLEY, 1984).

A fim de se explorar a relação entre estrutura e tempo de retenção, os compostos isolados foram analisados por HPLC-PDA (Figura 42 e 43) empregando o uso de coluna C_{18} com 250 x 4.6 mm d.i., com partículas com tamanho médio de 5 µm.



Figura 42. Cromatogramas e espectros de UV obtidos por HPLC-PAD de flavonoides heterosídeos e acetilados derivados de quercetina. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Isocrático: 40% de **A** em **B** por 40 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 254$ nm, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.



Figura 43. Cromatogramas e espectros de UV obtidos por HPLC-PAD de flavonoides heterosídeos e acetilados derivados de miricetina. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Isocrático: 40% de **A** em **B** por 40 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL min⁻¹, $\lambda = 254$ nm, Volume de injeção: 20µL. Forno de coluna: 40°C.

A análise dos cromatogramas obtidos mostra que flavonoides-O-(O- galoil)-hexose tiveram o t_r bem menor quando comparados com os outros compostos em que esse grupo era ausente. No entanto, a substituição da unidade de hexose por pentose nesses compostos aumentou consideravelmente o t_r. Também se observa que as configurações xilopiranosídeos eluíram à frente de xilofuranosídeos e estes à frente de arabinopiranosídeos e arabinofuranosídeos. Com maior t_r se observa os flavonoides com unidades de rhamnoses e agliconas. Portanto a ordem de eluição para os flavonoides derivados de quercetina e miricetina isoméricos com diferentes unidades de açúcar obedeceu à seguinte ordem: O-(O-galoil)-hexoses, O-xilopiranosídeos, O- xilofuranosídeos, O-arabinopiranosídeos, O-arabinofuranosídeos e por último Orhamnopiranosídeos.

Avaliação quantitativa do extrato EtOH 70% de M. bella

Durante a etapa de quantificação foi empregado o método de calibração externa. As amostras foram analisadas por HPLC-PAD para a construção da curva analítica utilizando padrões comerciais de ácido gálico e quercetina.

Cada amostra foi preparada e injetada em triplicata e a resposta de absorção obtida em 280 nm para os compostos derivados de ácidos fenólicos e 360 nm para os derivados de flavonoides. Ao final, as áreas médias sob os picos cromatográficos das amostras foram calculadas e os valores obtidos interpolados em função da concentração usando regressão linear. Os dados foram apresentados como média ± desvio das injeções (Figura 44).



Figura 44. Curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa a partir de injeções em triplicata para a quantificação de compostos derivados de ácidos fenólicos utilizando ácido gálico (A) e flavonoides utilizando quercetina (B).

A partir das curvas analíticas foram obtidos os coeficientes linear (a) e angular (b), os coeficientes de correlação (r²) e os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), todos apresentados na tabela 11.

Padrão	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Coeficiente de correlação $(r^2)^*$	Faixa linear (µg.mL ⁻¹)	LOD (µg.mL ⁻¹)	LOQ (µg.mL ⁻¹)
Ácido gálico	-2,2237	75639	0,9992	1-500	2.27	6,8
Quercetina	-3,31288	87488 0	0,9996	1-500	1,57	4,75
*P > 0.0001						

Tabela 11. Dados de regressão linear para os padrões empregada na elaboração das curvas analíticas.

P < 0.0001.

O limite de detecção (LOD) foi determinado como o sinal equivalente a 3,3 vezes o valor entre a razão do coeficiente linear (a) pelo coeficiente angular (b) (3,3 x a/b)obtidos pela equação da reta da curva analítica de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi dado como 10 vezes o valor desta razão (10 x a/b) (RIBANI et al., 2004).

A análise de linearidade mostrou os seguintes valores: ac. gálico $r^2 = 0.9992$ (regressão linear: y = -2,2237 + 75639*x) e quercetina $r^2 = 0,9996$ (regressão linear: v = -3,31288 + 87488*x). LOD para o ác. gálico foi de 2.27 µg.mL⁻¹ e LOQ de 6.8 µg.mL⁻¹. Para quercetina LOD foi de 1.57 μ g.mL⁻¹ e LOQ de 4.75 μ g.mL⁻¹(Tabela 11).

Aplicação do método analítico

A determinação da concentração de ácidos fenólicos e flavonoides presentes no extrato foliar foi realizada no extrato EtOH 70%. Desta forma, tentou-se chegar a resultados mais representativos com relação à real composição dos metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcoólico.

Uma solução estoque contendo 100 µg.mL⁻¹ de cada padrão foi preparada e solubilizada em MeOH/H₂O (7:3, v/v). As soluções padrão cobrindo intervalos lineares com dez níveis de concentração (1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 300 e 500 μ g/mL⁻¹) foram feitas a partir de diluições das soluções estoque e o volume final ajustados para 1 mL. Todas as amostras foram mantidas em freezer a -18°C.

Três amostras de extrato EtOH 70% de M. bella contendo 10 mg, foram acuradamente preparadas e solubilizadas em 1 mL de solução MeOH:H₂O (7:3, v/v) e em seguida filtradas em membrana de PTFE 0,45 µm para um vial e analisadas em triplicata por HPLC-PAD.

A Figura 45 ilustra as separações cromatográficas dos compostos presentes no EtOH 70% obtidas para a investigação quantitativa do extrato.



Figura 45. Separação cromatográfica empregada na etapa quantitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *M. bella*. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente: 5-45% de **A** em **B** em 160 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m), HPLC (Jasco[®]), fluxo 1,0 mL.min⁻¹, Volume de injeção: 20 μ L. Forno de coluna: 40°C.

Com o auxílio do detector PAD, cada pico cromatográfico encontrado teve seu espectro de UV analisado para escolha da curva de calibração empregada na quantificação com base na similaridade espectral. Os picos que exibiram espectros com máximos na região do UV entre 210-220 nm e entre 260-280 nm, típicos de ácidos fenólicos (STICHER, 2008) foram quantificados utilizando a curva construída com ácido gálico em 280 nm. Os compostos com máximos na região do UV em 240-290 nm e entre 300-390 nm típicos de flavonoides (MERKEN e BEECHER, 2000), foram quantificados utilizando a curva da quercetina.

. Após a análise de similaridade espectral, os picos relacionados para a quantificação tiveram suas áreas integradas e calculadas com auxílio do software Jasco[®] *ChromPass*.

A Tabela 12 indica a concentração individual dos picos cromatográficos estabelecida a partir das curvas analíticas obtidas com os padrões ácido gálico e quercetina.

Picos Rt	Compostos	Concentração ±	Curva ^b
(min)		DP ^a (µg.mL ⁻¹)	
4,34	acido gálico	$12,13 \pm 2,35$	AG
27,84	n.d. ^c	$7,19\pm0,87$	AG
43,05	n.d. ^c	$8,07\pm0,71$	AG
50,52	n.d. ^c	$8{,}40\pm0{,}57$	AG
67,95	miricetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo	$9{,}92\pm0{,}91$	Q
75,383	quercetina-O-(6"-O-galoil) galactopiranosídeo	$5,\!46\pm0,\!65$	Q
84,108	quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo	$21,82 \pm 2,05$	Q
87,252	quercetina-hexosídeo	$11,09 \pm 1,05$	Q
90,822	quercetina-3-O β-D-xilopiranosídeo	$7{,}01\pm0{,}78$	Q
92,873	quercetina-3-O-β-D-xilofuranosídeo	$14,06 \pm 1,33$	Q
97,749	quercetina-3-O-α-L-arabinofuranosídeo	$29,99 \pm 3,37$	Q
102,105	quercetina-O-β-D-rhamnopiranosídeo	$15,81 \pm 1,49$	Q
119,768	Quercetina	$9{,}83 \pm 1{,}47$	Q
Estimativ	a de		
Ácidos feno	plicos	35,80	
Estimativa	de		
Flavonoid	les	129,02	

Tabela 12. Concentração dos derivados de ácido gálico e flavonoides no extrato EtOH 70% das folhas de *M. bella*.

^aDP = desvio padrão para n = 3.

^bCurva analítica empregada na quantificação com base na similaridade espectral. AG = 280 nm; Q = 360 nm.

^c n.d.: não determinado.

Os resultados da análise quantitativa do extrato EtOH 70% apresentados na Tabela 12, mostram que os flavonoides parecem estar presentes em maior concentração (129,02 μ g.mL⁻¹) quando comparados com os ácido fenólicos (35,80 μ g.mL⁻¹).

Nota-se que os flavonoides heterosídeos derivados da quercetina foram os compostos majoritários. O composto quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo com 29,99 μ g.mL⁻¹ foi o composto encontrado em maior concentração, seguido dos compostos quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo com 21,82 μ g.mL⁻¹, quercetina-*O*- β -D-rhamnopiranosídeo com 15,81 μ g.mL⁻¹ e quercetina-3-O- β -D-xilofuranosídeo com 14,06 μ g.mL⁻¹.

Esta abordagem mostrou que os flavonoides heterosídeos derivados de quercetina foram majoritários, porém análises sazonais em áreas fitogeográficas distintas seriam necessárias para uma avaliação mais adequada sobre a real concentração desses compostos em *Myrcia bella*. Um estudo avaliando de variabilidade química de *Lychnophora salicifolia* Mart. revelou que não houve variações qualitativas e quantitativas em espécies da mesma região, porém análises estatísticas revelam uma grande variabilidade entre as amostras de diferentes regiões. Isto indica que o padrão de concentração dos compostos analisados depende da distribuição geográfica do espécime (GOUVEA et al, 2012).

Validação dos dados

A repetitividade baseada na injeção em triplicata de três concentrações conhecidas (50, 100, 200 μ g.mL⁻¹) foi analisada por HPLC-PAD e o desvio padrão relativo (RSD %) foi calculado para cada padrão (Tabela 13). Valores de RSD % variaram de 0.32 – 2.40% *intra-day* e 0.52 – 2.32% *inter-day* para ac. gálico e 0.39 – 3,0% *intra-day* e 0.47-1,47% *inter-day* para quercetina.

An	nalítos	Concentração	Precisão			
		(µg.mL ⁻¹)	Intra-day $(\pm SD)$	RSD %	Inter-day (± SD)	RSD %
Ác	. gálico	50	$41,66 \pm 1,0$	2,40	35,93 ± 0,85	2,36
(n=	=3)	100	$77,\!53\pm0,\!25$	0,32	74,16 ± 0,49	0,66
		200	$143,2 \pm 0,95$	0,66	$142,13 \pm 0,75$	0,52
Qu	iercetina	50	$45,23 \pm 0,30$	0,66	$42,63 \pm 0,63$	1,47
(n=	=3)	100	$85,2 \pm 2,6$	3,0	86,43 ± 0,81	0,93
		200	163,36 ± 0,64	0,39	169,73 ± 0,8	0,47

Tabela 13. Dados de precisão obtido dos analítos, expressos como RSD (%).

Análise por FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ do extrato EtOH 70%

Além dos experimentos que levaram ao isolamento e identificação de compostos, também foi realizada uma análise da composição química do extrato EtOH 70% empregando a técnica de ESI-IT-MS com inserção direta da amostra.

O principal objetivo desta análise foi avaliar a capacidade da técnica ESI-IT-MS para produzir informações espectrais sobre a constituição química da amostra analisada de forma rápida e direta, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento e/ou de separações cromatográficas.

Apesar de os padrões de fragmentação por espectrometria de massas poderem variar dependendo do equipamento usado, vários autores demonstram que a principal via de fragmentação dos flavonoides é aparentemente independente dos modos atuais de ionização (ESI, APCI ou MALDI) ou dos tipos de analisadores utilizados (triTOF, IT ou QTOF). Porém, diferenças significativas na abundância relativa dos sinais dos íons fragmentos podem ser observadas quando instrumentos diferentes são utilizados (WOLFENDER et al., 2000; WARIDEL et al., 2001; DE RIJKE et al., 2003; MARCH et al., 2007).

Fragmentos de íons gerados por espectrometria de massas de flavonoides são geralmente designados de acordo com um sistema nomenclatura elaborado por Mabry, Markham, and Thomas (1970), modificado por Ma et al. (1997) para agliconas e para os glicosilados um sistema criado por Domon e Costello (1988).

Para agliconas livres, os símbolos ^{*ij*} A_0 e ^{*ij*} B_0 são utilizados para se referir a fragmentos contendo anel-A e -B intactos respectivamente, enquanto que os símbolos *i* e *j* indicam quebras das ligações do anel-C. Fragmentos do açúcar, com cargas retidas na porção do carboidrato, são indicadas como A_i , B_i e C_i , onde *i* representa o número de ligações quebradas, contadas a partir da unidade glicosídica terminal. Íons contendo a aglicona são indicados como X_j , Y_j , Z_j , onde *j* representa o número de clivagens de ligação interglicosídica, contando a partir da aglicona.

Uma análise de caráter exploratório foi realizada no modo positivo e negativo, e quando comparados os resultados, o modo negativo foi capaz de obter resultados mais informativos para a obtenção da composição química. Desta forma, somente os resultados em modo negativo serão apresentados e discutidos. Assim, o modo negativo foi escolhido considerando o conhecimento prévio da composição flavonoídica dessa espécie e que esta classe de compostos secundários ionizam facilmente pela desprotonação das hidroxilas fenólicas, sendo as moléculas desprotonadas dos flavonoides transferidas facilmente para a fase gasosa como íons negativos.

Diante destas observações e conhecendo, em parte, a composição química do material estudado, nesta etapa do estudo, foi realizada a caracterização dos metabólitos secundários presentes no extrato EtOH 70% por ESI-IT-MS/MS no modo de inserção direta da amostra.Uma alíquota de 100 ug do EtOH 70% foi dissolvida com 1 mL de MeOH:H₂O (1:1 v/v) e em seguida filtrada em membrana de PTFE com poro de 0,45 μ m. A solução foi introduzida diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa de vidro impulsionada por um sistema de bombeamento em fluxo de 15 μ L min⁻¹.

A figura 46 mostra o espectro de massas com os íons precursores das moléculas desprotonadas ([M-H]⁻) do extrato EtOH 70% de *M. bella*.



Figura 46. Espectro de massas de primeira-ordem obtido por FIA-ESI-IT-MS do extrato EtOH 70% analisado em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação dos principais íons precursores em múltiplos estágios evidenciou a presença de diversos metabólitos, conforme discutido a seguir. A nomenclatura de Murraye colaboradores (2006) e Ma e colaboradores (1997) foram adotadas na discussão dos espectros.

O íon precursor de m/z 197 $[M - H]^-$ presente no espectro de primeira-ordem (Figura 46) confirma a presença do composto identificado como galato de etila. As agliconas quercetina e miricetina de m/z 301 $[M - H]^-$ e m/z 317 $[M - H]^-$ apresentaram sinais de alta intensidade no espectro de primeira-ordem.

O íon precursor de m/z 169 foi atribuído ao ácido gálico. Fragmentação em segunda-ordem desse íon precursor (Figura 47) levou a formação do íon produto de m/z 125 [M – 44 – H]⁻, após a perda de 44 Da (COO⁻), confirmando a presença do composto ácido gálico previamente isolado e caracterizado por experimentos de NMR (CHUA et al., 2011).



Figura 47. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 169, em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

O íon precursor de m/z 191 $[M - H]^-$ foi atribuído ao ácido quínico. Fragmentação em segunda-ordem desse íon (Figura 48) levou aos íons produto de m/z 172, m/z 127 e m/z 85. Esse padrão de fragmentação confirma a presença do ácido quínico.



Figura 48. Espectro de massas de terceira-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 191, em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 433 [M - H]⁻ resultou no espectro na Figura 49. O íon produto Y_0^- de m/z 301 [M - 132 - H]⁻, foi atribuído a quercetina e sugere a perda de 132 Da, indicando a perda de uma unidade de pentose. Esse padrão de fragmentação foi atribuído a quercetina-*O*-pentosídeo, e confirma a presença das quercetinas com diferentes configurações de pentoses previamente isoladas e identificadas por NMR.



Figura 49. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 433, em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação MS/MS do íon precursor de m/z 447 [M – H]⁻, levou à formação do íon produto Y_0^- de m/z 301 [M – 146 – H]⁻, sugerindo a perda de uma deoxihexose (146 Da). O íon produto Y_0^- foi atribuído a quercetina. Além desses íons fragmentos, outros íons diagnósticos foram detectados. O íon fragmento ${}^{0.2}X^-$ proveniente da perda de 104 Da da clivagem interna da ligação do açúcar, é característico de deoxihexoses (LI e CLAEYS, 1994). Outro fragmento detectado, $[Y_0 - H - CO]^-$, é típico de flavonóis 3-*O*monoglicosídeos (ABLAJAN et al., 2006). A presença desses íons fragmentos juntos possibilitaram a identificação e confirmação da presença do composto quercetina-3-*O*-β-D-rhamnopiranosídeo (Figura 50).



Figura 50. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 447, em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 449 $[M - H]^-$ (Figura 51) levou à formação do íon produto Y_0^- de m/z 316 $[M - 132 - 2H]^-$ devido à perda de uma pentose, além da perda de 126 Da, gerando o fragmento ${}^{0,2}X^- - 2H_2O$ de m/z 323, característico da clivagem interna das ligações de pentoses. Posteriormente, o fragmento Y_0^- sofreu uma clivagem do tipo RDA no anel-B, gerando o íon produto ${}^{1,2}A^-$ de m/z 179, além de outros íons produtos com valores abaixo da aglicona como $[Y_0 - H - COOH]^-$ de m/z 271 e Z_0^- de m/z 303, os quais confirmam a presença da miricetina-3-O- α -arabinopiranosídeo e miricetina-3-O- α -arabinofuranosídeo.



Figura 51. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 449, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 479 [M – H]⁻ (Figrua 52) produziu os íons produto Y_0^- de m/z 316 [M – 162 – 2H]⁻, devido a perda de 162 Da, o que sugere a presença de uma hexose *O*-substituída na aglicona do flavonoide. O íon produto [Y_0^- – H–COOH]⁻ de m/z 271 gerado é característico de compostos 3-*O*-monoglicosilados (ABLAJAN et al., 2006). Esse padrão de fragmentação confirma a presença do composto miricetina-3-*O*-β-D-galactorpiranosídeo.



Figura 52. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 479, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 463 $[M - H]^-$ (Figura 53) gerou o íon produto Y_0^- de m/z 316 $[M - 146 - 2H]^-$ devido à perda de uma deoxihexose, além dos fragmentos ^{0,2}X⁻ de m/z 359 $[M - 104 - H]^-$ e ^{0,1}X⁻ de m/z 331 $[M - 132 - H]^-$ gerados a partir da clivagem interna das ligações glicosídicas, os quais confirmam a presença de uma deoxihexose (LI E CLAEYS, 1994). Outros fragmentos como Y_0^- , Z_0^- de m/z 301 $[M - 162 - H]^-$, $[Y_0 - H - COOH]^-$ de m/z 271, ^{1,2}A⁻ de m/z 179 e ^{1,3}B⁻ de m/z 137 confirmam a presença do composto miricetina-3-O-β-D-rhamnopiranosídeo. A figura 54 esquematiza a proposta de fragmentação observada no espectro de MS.



Figura 53. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MSⁿ do íon precursor de m/z 463, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.



Figura 54. Proposta de fragmentação baseado na nomenclatura de Ma et al. (1997) e Domon e Costello (1988) para miricetina-3-O- β -D-rhamnopiranosídeo detectada por ESI-IT-MS/MSⁿ no extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*.

Fragmentação em terceira-ordem do íon precursor de m/z 585 $[M - H]^-$ (Figura 55) produziu os íons produtos Y₁⁻ de m/z 433 [M - 152 - H]- devido à perda de 152 Da, o íon produto Y₀⁻ de m/z 301 [M - 132 - 152 - H]- devido à perda de 132 Da. O íon fragmento $^{1,2}A^-$ de m/z 179 gerado pela fragmentação RDA do anel-B confirma a presença da quercetina como aglicona. Esse padrão de fragmentação confirma a presença do composto previamente isolado e identificado como quercetina-O-(O-galoil)-pentosídeo.



Figura 55. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 585, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação do íon precursor de m/z 601 $[M - H]^{-}$ produziu o íon produto Y_0^{-} de m/z 449 $[M - 152 - H]^{-}$ devido à perda de 152 Da referente a uma unidade galoil (Figura 56). A fragmentação em segunda-ordem deste íon produto de m/z 449 não foi possível. No entanto, considerando o perfil químico obtido nesse estudo podemos inferir que este íon se trata da miricetina-(*O*-galoil)-pentosídeo, já que outros flavonoides heterosídeos esterificados com uma unidade galoil foram caracterizados.



Figura 56. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 601, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação em segunda-ordem do íon precursor de m/z 615 $[M - H]^-$ (Figura 57) gerou fragmentos de m/z 463 [M - 152 - H]- devido à perda de 152 Da atribuído uma unidade galoíla e de m/z 317 [M - 152 - 146 - H]- devido à perda de 146 Da, confirmando a presença do composto miricetina-O-(O-galoil)-deoxihexosídeo. Outro íon produto de m/z 301 confirma a presença do composto quercetina-3-O-($6^{\prime\prime}$ -O-galoil)- β - galactopiranosídeo. Ambos flavonoides possuem a mesma massa molecular, porém os fragmentos de m/z 317 e m/z 301 confirmam a presença das agliconas miricetina e quercetina respectivamente. A presença desses dois fragmentos no espectro de massas possibilitou a detecção e diferenciação destes dois compostos caracterizados previamente.



Figura 57. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 615, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Fragmentação do íon precursor de m/z 631 $[M - H]^-$ (Figura 58) produziu o íon produto Y_1^- de m/z 479 $[M - 152 - H]^-$ após a perda de 152 Da devido à perda de uma unidade galoil. O íon precursor Y_1^- após fragmentação gerou o íon produto Y_0^- de m/z 316 $[M - 152 - 162 - 2H]^-$ devido à perda de 162 Da atribuído a uma hexose. Esse padrão de fragmentação confirma a presença do composto miricetina-O-(O-galoil)-hexosídeo.



Figura 58. Espectro de massas de segunda-ordem obtido por ESI-IT-MS/MS do íon precursor de m/z 631, obtido em modo negativo. Para condições espectrométricas veja: Material e Métodos.

Ao final da fragmentação em múltiplos estágios dos íons precursores no espectro de primeira-ordem, os experimentos de ESI-IT-MS/MSⁿ forneceram informações importantes para a caracterização de compostos sem a necessidade de etapas de purificação e/ou isolamento de substâncias que despendem de muito tempo. Essa técnica se mostrou rápida e eficiente na avaliação química dos compostos presentes no extrato EtOH 70%.

A tabela 14 apresenta os fragmentos gerados característicos de flavonóis *O*heterosídeos observados nos espectros obtidos por ESI-IT-MS/MSⁿ que deram subsídio para a identificação dos compostos presentes no extrato EtOH 70%.

Tabela 14. Perda de massas características de flavonóis *O*-heterosídeos observadas nos espectros obtidos por ESI-IT-MS/MSⁿ do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*.

Fragmentos	Açúcares			Fragmentos	Aglio	cona
	Hexoses	Deoxihesoses	Pentoses		Quercetina	Miricetina
$^{0,1}X^{-}$		134 ^b		$^{1,2}\mathbf{B}^{-}$		137 °
$^{0,2}X^{-}$		104 ^b		^{1,3} A ⁻	151 ^c	151 ^c
$^{0,2}X^{-} - 2H_2O$			126 ^b	$^{1,2}A^{-}$	179 [°]	179 ^c
Y_{i}	162 ^a	146 ^b	132 ^b		301 ^c	317 ^c
$Z_{ m i}$						301 ^c

^aRef. Ferreres et al., 2007.

^bRef. Li e Claeys, 1994.

^cRef. Ma et al., 1997.

Análise por HPLC-ESI-IT-MS do extrato EtOH 70%

Flavonoides estão geralmente presentes como misturas complexas em extratos vegetais, o que dificulta o isolamento em grandes quantidades dos compostos suficiente para análises espectrométricas. Uma forma de detecção e identificação de compostos em misturas empregada atualmente com êxito é o uso de técnicas hifenizadas como HPLC-MS. Essa técnica raramente é utilizada para a caracterização completa de moléculas, porém ela pode ser muito útil fornecendo o valor de m/z dos diferentes constituintes. Adicionalmente, o HPLC-MS pode ser utilizado na derreplicação de compostos previamente identificados, podendo nos dar informações sobre os constituintes de uma

mistura rapidamente (CONSTANT E BEECHER, 1995). Estudos comparando a eficiência de diferentes técnicas de ionização para flavonoides mostram que a ionização por *eletronspray* (ESI) no modo negativo é mais sensível, juntamente com um sistema de eluição acidificado (RAUHA et al., 2001). A acidificação da fase móvel provoca um melhora na separação dos compostos e mudança nos tempos de retenção dos compostos em colunas C₁₈. Ácidos voláteis como ác. fórmico, ác. acético e trifluoracético são compatíveis com o sistema HPLC-MS. Esses ácidos causam diversos efeitos em diferentes concentrações na sensibilidade e detecção dos compostos, além de aumento na eficiência do sistema ESI, mas ao mesmo tempo reduz fortemente o tempo de retenção (RAUHA et al.,2001; APFEL et al., 1995). Portanto, um equilíbrio considerando tempo de retenção e sensibilidade deve ser ajustado com modificações na concentração do ácido na fase móvel. No modo negativo, uma concentração de 0,1% de ácido fórmico parece ser preferível, e este o modo mais sensível e adequado para inferir a relação m/z de flavonoides separados, especialmente em casos onde estes compostos estão presentes em baixas concentrações (DE RIJKE et al., 2003; SWASTSITANG et al., 2000; CUYCKENS e CLAYES., 2002, BECCHI e FRAISE, 1989; MAURI et al., 1999; FABRE et al., 2001)

Nem sempre os sinais de m/z mais intensos são os íons precursores (adultos) no modo negativo ($[M - H]^{-}$) e positivo ($[M + H]^{+}$), pois adultos com moléculas dos solventes e/ou ácidos (52 54), além de complexos moleculares ($[M - H - M]^{-}$ (64) podem ser gerados. Diminuição da voltagem do cone pode gerar redução de formação desses complexos e dos adultos. (BARNES et al., 1994; SWATSITANG et al., 2000).

Diante disso, uma aliquota de 10 mg do extrato EtOH 70% foi solubilizada em MeOH: H_2O (1 : 1 v/v) e submetida a análises por HPLC-ESI-MS no modo negativo. Os dados obtidos são apresentados na figura 59 e na tabela 14.



Figura 59. Cromatograma analítico obtido na análise por HPLC-ESI-MS do extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*. Sistema de eluição: **A** (MeOH + 0,1% Ác. Fórm.) e **B** (H₂O + 0,1% Ác. Fórm.). Gradiente linear: 10-45% de **A** em **B** em 200 min. Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm). Fluxo 0,8 mL min⁻¹, $\lambda = 254$ nm. Volume de injeção: 20µL.

Pico	Rt	UV	HPLC-	ESI-IT-MS/MS ⁿ ions	Tentative assignment
#	(min)	$(\lambda_{máx.})$	ESI-MS		-
1	3.7		179	n.f. ^b	acido cafeico
2	4.1		191	191, 173, 127, 85	acido quínico
3	11.3	212, 278	633	n.f. ^b	n.i. ^a
4	82.3	212, 272	635	n.f. ^b	n.i. ^a
5	92.1		469	n.f. ^b	n.i. ^a
6	106.6	266, 356	631	631, 479, 317, 271, 179, 151	miricetina-O-(O-galoil)-hexosídeo
7	119.5	266, 350	479	479, 316, 271	miricetina-3- O-β-D-galactopiranosídeo
8	123.4	266, 362	449	449, 316, 271, 179	miricetina-3-O-α-arabinopiranosideo
9	127.8	266, 356	615	615, 463, 301, 271	quercetina-O-(O-galoil)-hexosídeo
10	129.8	260, 356	615	615, 463, 301, 271	quercetina-3-O-(6"-O-galoil)-β-galactopiranosídeo
11	132.7	260, 356	449	317, 303, 271, 231, 179	miricetina-3-O-α-arabinofurano
12	133.9	260, 350	463	317, 301, 271, 179, 136	miricetina-3-O-β-D-rhamnopiranosídeo
13	141.4	260, 350	463	301, 273, 179, 151	quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo
14	144.3	254, 362	463	301, 273, 179, 151	quercetina-O-hexosídeo
15	148.5	260, 356	433	301, 261, 191	quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo
16	152.3	254, 356	433	301, 261, 191	quercetina-3-O-β-D-xilofuranosídeo
17	155.9	266, 352	601	601, 449	miricetina-O-(O-galoil)-pentosídeo
18	159.7		467	n.f. ^b	n.i. ^a
19	160.0	266, 356	433	301, 191	quercetina-O-α-L-arabinofuranosídeo
20	164.0	254, 350	447	301, 271, 255, 179	quercetina-3-O-β-D-rhamnopiranosídeo
21	163.8		483	n.f. ^b	n.i. ^a
22	169.2		477	n.f. ^b	n.i. ^a
23	171	266, 356	615	463, 317	miricetina-O-(O-galoil)-deoxihexosídeo
24	176.8	260, 356	585	433, 301, 179, 151	quercetina- O-(O-galoil)-pentosídeo
25	181		631	n.f. ^b	n.i. ^a
26	189.4	254, 374	301	137	Quercetina

Tabela 15. Dados obtidos por HPLC-PAD-MS (espectros no UV e íons detectados) e FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ (íons produtos) e identificação de compostos presentes no extrato EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella*.

^aComposto não identificado.

^bÍon precursor não fragmentado.

Aliada à técnica de FIA-ESI-IT-MS/MS, o experimento por HPLC-ESI-MS possibilitou a detecção de 26 íons e a identificação de 19 compostos simultaneamente. Com excessão dos flavonoides derivados de kaempferol e do composto galato de etila, todos os compostos isolados e caracterizados por FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ e/ou NMR foram detectados e identificados no extrato EtOH 70%.

Por fim, as técnicas empregadas nesse trabalho possibilitaram a identificação de 22 compostos (Figura 60).



Figura 60. Compostos encontrados no EtOH 70% das folhas de *Myrcia bella* (deoxyhex = deoxihexose; hex = hexose; pent = pentose).

6. CONCLUSÕES

O estudo da composição química do EtOH 70% evidenciou a presença de ácidos fenólicos além de uma grande diversidade de flavonoides na forma de agliconas, glicosilados e galoil glicosídeos. Poucos trabalhos focam o estudo de extratos polares de espécies de *Myrcia*, porém, nota-se em *Myrcia bella* e *Myrcia multiflora* DC. a presença marcante de flavonoides heterosídeos e acetilados derivados de miricetina e quercetina (YOSHIKAWA et al. 1998; MATSUDA et al. 2002). Estas duas espécies se diferenciam apenas pela presença de acetofenonas e flavanonas glicosiladas em *M. multiflora*. Esses dados são importantes considerando o potencial uso dessas espécies como fitoterápicos, pois metodologias eficientes que consigam diferenciar rapidamente a composição química de matrizes vegetais são desejáveis para controle de qualidade.

Os estudos por FIA-ESI-IT-MS e HPLC-PAD-ESI-MS se mostraram eficientes e rápidos na detecção e identificação de todos os compostos isolados e caracterizados de *M*. *bella*, sem a necessidade de etapas de purificação, contribuindo significativamente para a busca de novos compostos bioativos. A presença de grande quantidade de flavonoides em mistura no caso do extrato é interessante do ponto de vista farmacológico, mas se torna um desafio para as técnicas analíticas.

A quantificação desses compostos mostra que os flavonoides estão presentes em maior concentração (129,02 μ g.mL⁻¹) no extrato EtOH 70% quando comparados com os ácido fenólicos (35,83 μ g.mL⁻¹), sendo os flavonoides heterosídeos quercetina-3-*O*- β -D-arabinofuranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -D-rhamnopiranosídeo os compostos majoritários.

Os testes com o radical DPPH mostraram que o extrato EtOH 70% possui uma atividade antioxidante alta ($IC_{50} = 8,23 \ \mu g.mL^{-1}$) quando comparado com o padrão positivo quercetina ($EC_{50} = 1,6 \ \mu g.mL^{-1}$), o que pode ser explicada em parte pela presença majoritária de flavonoides. Juntamente com o cálculo do TPC, ficou claro que o a concentração dos compostos fenólicos nas amostras influenciaram a atividade antioxidante. Quanto maior a concentração de ácidos fenólicos, mais eficiente foi a atividade antioxidante.

Além da atividade antioxidante, os testes para avaliar os possíveis efeitos alelopáticos mostraram que o extrato EtOH 70% gerou um estresse alelopático durante o

processo de germinação, interferindo drasticamente nos processos fisiológicos inibindo o crescimento e desenvolvimento de raízes de *Cucumis sativus* e *Hordeum Vulgare*.

Os ácidos fenólicos, mesmo que em menor concentração quando comparados com os flavonoides, também podem atuar como aleloquímicos. Estudos de alelopatia mostram que compostos isolados são ativos em baixas concentrações $(10^{-5} - 10^{-6} \text{ M})$ ou ainda em concentrações extremamente baixas de 10^{-10} M (MACIAS et al. 2001).

Considerando que *Myrcia bella* ocorre em diversos fragmentos de cerrado no estado de São Paulo (CAVASSAN, 2002; LATANSIO-AIDAR, et al., 2010; ISHARA, et. al., 2008), mais estudos avaliando a composição química quali e quantitativamente nos diferentes fragmentos se tornam necessários para o controle de qualidade desse extrato assegurando a atividade biológica.

Diante disso, concluímos que *Myrcia bella* Cambess. é uma fonte rica de compostos fenólicos, principalmente flavonoides heterosídeos, o que atribui a esta espécie um grande potencial medicinal. Assim esperamos que a abordagem proposta neste trabalho possa contribuir para o estudo mais aprofundado desta espécie, propiciando uma estratégia rápida e eficiente para o reconhecimento da composição química de plantas que possam ser utilizadas como fitoterápicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLAJAN, K.; ABLIZ, Z.; SHANG, X.-Y.; HE J.-M.; ZHANG R.-P.; SHI J.-G.; Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.** v.41, p. 352-360, 2006.

AGRAWAL, P. K. 4 Carbon-13 NMR of flavonoids. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.

AMIC, D.; DAVIDOVIC-AMIC, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIC, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croat Chem Acta**, v. 76, p. 55-61, 2003.

ANDERSEN, O. M; MARKHAM, K. R.; Flavonoides: Chemistry, Biochemistry and Applications. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 1197 p.

ANVISA RDC n. 17, 16 abril de 2010. Disponível em http://www.in.gov.br/autenticidade.html, pelo código 00012010041900094. Acesso dia 22 jan 2013.

APFFEL, A. et al. Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containingmobilephases. **Journal of Chromatography A.,** v. 712, n. 1, p. 177-190, 1995.

ARAUJO, A. R. B; TEIXEIRA, M. I. J. G.; RODRIGUES, R.R. Florística e fitossociologia de um trecho de cerrado no município de Franca-SP. **Naturalia**, São Paulo, v. 24, p.153-170, 1999.

ARDREY, R. E. Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction. San Francisco: John Wiley & Sons, 2003. 289 p.
BAIES, H. P. et al. Allelopathy and exotic plants: from genes to invasion. **Science**, v. 301, p. 1377-1380, 2003.

BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2466–2474, 1994.

BASILE, A. et al. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 110-116, 2000.

BATALHA, M.A. The Brazilian cerrado is not a biome. **Biota Neotropica** v. 11 n.1, 2011.

BECCHI, M.; FRAISSE, D. Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of *C*-glycosidic flavonoids. **Biological Mass Spectrometry**, v. 18, n. 2, p. 122-130, 1989.

BENINGER, C. W.; HALL, J. C. Allelopathic activity of luteolin 7-O-β-glucuronide isolated from *Chrysanthemum morifolium* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 2, p. 103-111, 2005.

BERTIN, C. et al. Laboratory assessment of the allelopathic potential of fine leaf fescues (*Festuca rubra* L.). Journal of Chemical Ecology, v. 29, n. 8, p. 1919-1937, 2003.

BERTOLDI, C. et al. Chemical profile of *Festuca arundinacea* extract showing allelochemical activity. **Chemoecology**, v. 22, n. 1, p. 13-21, 2012.

BIGLARI, F.; ALKARKHI, A.F.M.; EASA, A.M. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. Food Chemistry, v. 107, p. 1636–1641, 2008.

BLOCK , G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 17, p. 1–29, 1992.

BOGATEK, R. et al. Allelopathic effects of sunflower extracts on mustard seed germination and seedling growth. **Biologia Plantarum**, v. 50, n. 1, p. 156-158, 2005.

BORS, W. et al., Flavonoids as antioxidants: Determination of radical scavenging efficiencies. **Methods Enzymology**, v.186, p.343-355, 1990.

BOURLIÈRE, F. & HADLEY, M. 1983. Present-day savannas: an overview. In **Ecosystems of the world – tropical savannas** D.W. Goodall (Ed.). Elsevier, Amsterdam, p.1-17.

BOX, E.O. & FUJIAWARA, K. 2005. Vegetation types and their broad-scale distribution. In Vegetation ecology (E. van der Maarel, ed.). Blackwell, Oxford, p.106-128.

BUER, C. S.; IMIN, N.; DJORDJEVIC, M. A. Flavonoids: new roles for old molecules. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 1, p. 98-111, 2010.

BYLKA, W.; FRANSKI, R.; STOBIECKI, M. Differentiation between isomeric acacetin-6-C-(6"-O-malonyl)glucoside and acacetin-8-C-(6"-O-malonyl)glucoside by using lowenergy CID mass spectra. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 37, n. 6, p. 648-650, 2002.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Validation of a liquid chromatography ionspray mass spectrometry method for the analysis of flavanones, flavones and flavonols. **Rapid Communications in Mass Spectrometry,** v. 13, n. 23, p. 2399-2405, 1999.

CARVALHO, M. B.; et al. Vascular Flora of a Cerrado sensu stricto remnant in Pratânia, state of São Paulo, southeastern Brazi. **Journal of species lists and distribution**, v. 6, n. 3, p 350-357, 2010.

CASTRO, A.A.J.F. et al. How rich is the flora of Brazilian cerrados?. Annals of the Missouri Botanical Garden. v. 86, p. 192-224, 1999.

CAVASSAN, O. Florística e fitossociologia da vegetação lenhosa em um hectare de cerrado no Parque Ecológico Municipal de Bauru (SP). 1990. 206 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 1990.

CAVASSAN, O. O cerrado do Estado de São Paulo. In: Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois (A.L. Klein, org.). Editora Unesp, São Paulo, 2002, p. 93-106.

CHUA, L. S. et al. Flavonoids and phenolic acids from Labisia pumila (Kacip Fatimah). **Food Chemistry**, v. 127, p. 1186–1192, 2011.

CONSTANT, H. L.; BEECHER, C. W. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural Product Letters**, v. 6, n. 3, p. 193–196, 1995.

COUTINHO, L. M. Ecological effects of fire in Brazilian Cerrado. In: B. J. Huntley & B.H. Walker (Eds.). Ecology of Tropical Savannas. Berlin: Springer-Verlag. 1982. p. 273-291.

COUTINHO, L.M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 1, n. 1, p. 17-23, 1978.

COUTINHO, L.M. O conceito de bioma. Acta Botânica Brasileira. v. 20, n. 11, p. 11, 2006.

CRUZ-ORTEGA, R.; AYALA-CORDERO, G.; ANAYA, A. L. Allelochemical stress pro duced by aque ous leach ate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 116, p. 20-27, 2002.

CUYCKENS, F. et al. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analysis**, v. 28, n. 10, p. 888-895, 2000.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 24, p. 2341-2348, 2002.

CZARNOTA, M. A.; PAUL, R. N.; DAYAN, F. E.; NIMBAL, C. I.; WESTON, L. A. Mode of action, localization of production, chemical nature and activity of sorgoleone: A potent PSII inhibitor in *Sor ghum* spp. root exudates. **Weed Technology** v. 15, p. 813-825, 2001.

DANIEL, A. N. et al. Antiinflammatory and antinociceptive activities of eugenol essential oil in experimental animal tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 212-217, 2009.

DAKSHINI, K. M. M. Allelopathic potential of the phenolics from the roots of *Pluchea lanceolata*. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 571-576, 1994.

DE MARTINO, L.; MENCHERINI, T.; MANCINI, E.; AQUINO, R. P.; ALMEIDA, L. F. R.; DE FEO, V. In Vitro Phytotoxicity and Antioxidant Activity of Selected Flavonoids **Int. J. Mol. Sci., v.** 13, p. 5406-5419, 2012.

DE RIJKE, E. et al. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triplequadrupole and ion-trap instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 984, n. 1, p. 45-58, 2003. DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. **Glycoconjugate Journal**, v. 5, n. 4, p. 397-409, 1988.

EINHELLIG, F. A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACIAS,F. A. et al. (Eds.). *Allelopathy:* chemistry and mode of action of allelochemicals.London: CRC Press, LLC, 2004. p. 217-238.

FABRE, N. et al. Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion LC–ES ion trap mass spectrometry. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, v. 12, n. 6, p. 707-715, 2001.

FERREIRA, A. C.; NETO, J. C.; DA SILVA, A. C.; KUSTER, R. M.; CARVALHO, D.
P. Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids. Chemical Research in Toxicology, v. 19, n. 3, p. 351-5, 2006.

FREI, B. Cardiovascular disease and nutrient antioxidants: role of low-density lipoprotein oxidation. **Critical Reviews on Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 83–98, 1995.

GEI, K. F. Ten-year retrospective on the antioxidant hypothesis of arteriosclerosis. **Nutr Biochem**, v. 6, p. 206–236, 1995.

GILLMAN, M. W. et al., Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men. Journal of the American Medical Association, v. 273, p. 1113-1117, 1995.

GILMORE, A. R. How fescue *Festuca arundinacea* inhibits growth of sweetgum trees *Liquidambar styraciflua*. **Illinois-Research**, v. 19, n. 3, p. 8-9, 1977.

GOMES, B. Z. et al. Estrutura do cerradão e da transição entre cerradão e floresta aludícola num fragmento da International Paper do Brasil Ltda., em Brotas, SP. **Revista Brasileira Botânica**, v. 27, n. 2, p. 249-262, 2004.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje**, v. 89, n. 15, p. 51-54, 1993.

GOUVEA, R. D. et al. A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart. (Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 28-36, 2012.

GUIMARÃES, A. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., Myrtaceae, on mice. **Rev Bras Farmacogn**., v. 19, p. 883-887, 2009.

HAMBURGER M. O, HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30 p. 3864-3874, 1991.

HARBORNE, J. B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: CODY, V., MIDDLETON, E. Jr., HARBORNE, J. B. (eds). Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure activity relationship. New York, USA: Alan R Liss, Inc; 1986. p.15-24.

HARBORNE, J. B.; BOARDLEY, M. Use of high-performance liquid chromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulphates. Journal of Chromatography A, v. 299, p. 377-385, 1984.

HARBORNE, J. B. *The flavonoids:* advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1994. 676 p.

HARNLY M. J.; LIN, L. Z. A screening method for the identifications of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plants materials. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 55, p. 1084-1096, 2007.

HENRIQUES, A. T. et al. Óleos voláteis de espécies de Myrcia nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

HUGHES, R. J. et al. Atandemmass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 210–211, p. 371-385, 2001. INDERJIT; NILSEN, E.T. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: Progress and problems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 221-238, 2003.

INGRAM, D.; SANDERS, K.; KOLYBABA, M.; LOPEZ, M. Case–control study of phytoestrogens and breast cancer. Lancet, v. 9083, p. 990–994, 1997.

ISHARA, L. K. et al. Composição florística de remanescente de cerrado sensu stricto em Botucatu, SP **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 4, p. 575-586, 2008.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, n.4, p. 508-536, 1997.

LATANSIO-AIDAR, S.R et al. Phytossociology of a dense Cerrado on the footprint of a carbon flux tower, Pé-de-Gigante, Vassununga State Park, SP. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1,p. 195-210, 2010.

LI, Q. M.; CLAEYS, M. Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. **Biological Mass Spectrometry**, v. 23, n. 7, p. 406-416, 1994.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J. M.; Óleos voláteis de espécies de *Myrcia nativas*do Rio Grande do Sul. **Quim Nova,** v. 27, p. 916-919, 2004.

LINSKENS, H. F.; JACKSON, J. F. Modern methods of plant analysis: plant toxin analysis. Berlin: Springer, 1992. p. 4-9.

LU, Y.; FOO L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace, **Food Chemistry**, v. 59, p.187-194, 1997.

MA, Y. L. et al. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, n. 12, p. 1357-1364, 1997.

MABBERLEY, D. J. The Plant-book. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK. 1997.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer Verlag, 1970. 354 p.

MACIAS, F. A. et al. 997. Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 683-687, 1997.

MAFFEI, M. et al. Effect of benzoic acid hydroxy- and methoxy- ring substituents during cucumber (*Cucumis sativus* L.) germination. I.: Isocitrate lyase and catalase activity. **Plant Science**, v. 141, n. 2, p. 139-147, 1999.

MAJORS, R. E. The role of the column in preparative HPLC. The Magazine of Separation Science-LC*GC, v. 7, n. 3, p. 8-16, 2004.

MALLIK A.U., INDERJIT 2002. Problems and prospects in the study of plant allelochemicals: a brief introduction. In: Chemical ecology of plants: Allelopathy in aquatic and terrestrial ecosystems, INDERJIT, MALLIK A. U., BIRKHÄUSER VERLAG (Eds.), Bas er-Boston-Berlin, p. 1-5.

MANTOVANI, W.; MARTINS, F. R. Florística do Cerrado na Reserva Biológica de Moji Guaçu, SP. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.7, n.1, p.33-60, 1993.

MARCH, R. E. et al. High-energy and lowenergy collision-induced dissociation of protonated flavonoids generated by MALDI and by electrospray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 262, n. 1-2, p. 51-66, 2007.

MARCHIORI, J.N.C.; SOBRAL, M., 1997 **Dendrologia das angiospermas - Myrtales**, Santa Maria: Ed. da UFSM.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV, and V. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 50, n. 3, p. 429-431, 2002.

MAURI, P. L. et al. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, n. 10, p. 924-931, 1999.

MCLAUGHLIN, J. C.; SMITH, S. M. Metabolic regulation of glyoxylate cycle enzyme synthesis in detached cucumber cotyledons and protoplasts. **Planta**, v. 195, n. 1, p. 22-28, 1994.

MENDES, A. P. S.; BORGES, R. S.; CHAVES NETO, A M. J.; DE MACEDO, L. G.M.; DA SILVA A. B. F. The basic antioxidant structure for flavonoid derivatives Journal of Molecular Modeling, v. 18, n. 9, p. 4073-4080, 2012

MELO, J. G.; NASCIMENTO, V. T.; AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A. & ALBUQUERQUE, U.P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina.), pata-de-vaca (*Bauhinia* spp.) e ginco (*Ginkgo biloba* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 111-120, 2004.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by highperformance liquid chromatography: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 28, n. 3, p. 577-599, 2000.

MORAIS, S.M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Química Nova,** v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORELAND, D. E.; NOVITSKI, W. P. Interference by flavone and flavonols with cloroplasts mediated electrons transport and phosphorylation. **Phytochemistry**, v. 27, n. 11, p. 3359-3366, 1988.

MOROZ, P. A.; KOMMISSARENKO, N. F. Allelopathic activity of several phenolic compounds. Allelopatii, p. 118-122, 1983.

MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L.; NAITO, Y.;TABET, J. C. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. **Pure and Applied Chemistry**, 2006. Disponível em: http://www.iupac.org/reports/provisional/abstract06/murray_310107.html> Acesso em: 20 dez. 2006.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; SIDARI, M. 2001. The effect of phenols on respiratory enzymes in seed germination respiratory enzyme activities during germination of *Pinus laricio* seeds treated with phenols extracted from different forest soils. **Plant growth regulation**, v. 35, n. 1, p. 31-35, 2001.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-861, 2000.

NASCIMENTO, J. E.; LACERDA, E. U.; NASCIMENTO, V. T.; MELO, J. G.; ALVES, B. S.; SILVA, L. G. M.; RAMOS, M. A.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P. & AMORIM, E. L. C. Produtos a base de plantas medicinais comercializados em Pernambuco – Nordeste do Brasil. Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 24, n. 1, p. 113-122, 2005a.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L. C. & ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinaiscomercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (Pimpinella anisum L.), quebra-pedra (Phyllanthus spp.), espinheira santa (Maytenus ilicifolia Mart.) e camomila (Matricaria recutita L.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2005b.

NESS, A. R.; POWLES, J. W. Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review. **International Journal of Epidemiology**, v. 6, p. 1–13, 1997.

NICOLLIER, G. F.; THOMPSON, A. C. Phytotoxic compounds from *Melilotus alba* (white sweet clover) and isolation and identification of two new flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 760-764, 1982.

OWEN, R. W. et al. Isolations and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. Food and Chemical Toxicology, v. 41, p. 1727-1738, 2003.

PARVEZ, M. M. et al. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 7, p. 631-635, 2004.

PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELEHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotcin diabetic rats. **Diabetes Research,** v. 22, p. 49-57, 1993.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995–2018, 1998.

POLITYCKA, B.; KOZŁOWSKA, M.; MIELCARZ, B. Cell wall peroxidases in cucumber roots induced by phenolic allelochemicals. **Allelopathy Jounal**. v. 13, p. 29–36, 2004.

POLITYCKA, B. Peroxidase activity and lipid peroxidation in roots of cucumber seedlings influenced by derivatives of cinnamic and benzoic acids. Acta Physiologiae Plantarum, v. 18, n. 4, p. 365-370, 1996.

PAULETTI, P.M.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D.H.S.; YOUNG, M.C.M.; TOMAZELA, D.M.; EBERLIN, M.N.; BOLZANI, V.S. New antioxidant C-glucosylxanthone from the stems of *Arrabidaea samydoides*. Journal of Natural **Products, v.** 66, p. 1384-1387, 2003.

PRAKASH, D. et al. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 1, p. 18-28, 2007.

PRISTA, L. N. **Tecnologia farmacêutica.** 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. 3 v.

RAUHA, J. P.; VUORELA, H.; KOSTIAINEN, R. Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and

atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, v. 36, n. 12, p. 1269-1280, 2001.

RATTER, J. A. & DARGIE, T. C. D. An analysis of the floristic composition of 26 cerrado areas in Brazil. **Edinburg Journal of Botany**, v. 49, n. 2, p. 235-250, 1992.

RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F.L. & BRIDGEWATER, S. Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, *v*. 80, p. 223-230, 1997.

REIGOSA, M. J.; SANCHES-MOREIRAS, A. M.; PEDROL, N.; COBA DE LA PENA, T.; PAZOS, E.; BAERSON, S.; DUKE, S. O. Mode of action of BOA: Multifaceted approach, 2004. In: Proceeding of Second Allelopathy Symposium "Allelopathy – from under standing to application" Puławy, Poland: 95.

REYNERTSON, K. A.; WALLACE, A. M.; ADACHI, S.; GIL, R. R.; YANG, H.; BASILE, M. J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I. B.; KENNELLY, E. J. Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). Journal of Natural **Products,** v. 69, *p.* 1228-30, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO J. F. & WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. In: S. M. SANO & S. P. ALMEIDA (Eds.), **Cerrado: ambiente e flora.** EMBRAPA – CPAC, Planaltina, p. 89-166, 1998.

RICE, E.L. Allelopathy. New York: Academics Press, 1984, 422p.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN,

U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. **Analyst**, v. 122, n. 2, p. 11-34, 1997.

ROBARDS, K. trategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables, **Journal of Chromatography** A, v. 1000, p. 657–691, 2003.

ROLIM DE ALMEIDA, L. F. et al. *In vitro* potential allelopathic of *Leonurus sibiricus* leaves. Journal of Plant Interactions, v. 3, n. 1, p. 39-48, 2008.

RUGGIERO, P.G. Levantamento pedológico relacionado às fitofisionomias encontradas na Gleba Pé-de-Gigante, Parque Estadual de Vassununga, Santa Rita do Passa Quatro, *SP*. 2000. 128f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 2000.

RUSSO, E. M. K. et al. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, p. 11, 1990.

SCHIEBER, A. et al. Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. 'Brettacher') by HPLC–PDA and HPLC–APCI–MS/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 87-94, 2002.

SHALABY, A. M. Influence of flavonoid compounds on VA mycorrhiza *Glomus mosseae* and alfalfa plants. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 225-238, 2001.

SHANLEY, P.; L. LUZ. Eastern Amazonian Medicinals: Marketing, Use and Implications of Forest Loss. **BioScience**, v. 53, n. 6, p. 573-584, 2003.

SILVA, L. O. et al. Levantamento florístico e fitossociológico em duas áreas de cerrado *sensu stricto* no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás. Acta Botânica Brasílica, São Paulo, v. 16, n. 1, 2002.

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

SMITH, A. E.; MARTIN, L. D. Allelopathic characteristics of three cool-season grass species in the forage ecosystem. **Agronomy Journal**, v. 86, n. 2, p. 243-246, 1994.

SPRINGER, T. L. Allelopathic effects on germination and seedling growth of clovers by endophyte-free and -infected tall fescue. **Crop Science**, v. 36, p.1639-1642, 1996.

STICHER, O. Natural product isolation. Natural Product Reports, v. 25, p. 517-554, 2008.

SWATSITANG, P. et al. Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus* sinensis. Analytica Chimica Acta, v. 417, n. 2, p. 231–240, 2000.

TAYLOR, L. P.; GROTEWOLD, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 317-323, 2005.

TORRES, A. et al., 1996. In: **Proceedings of the first world congress on Allelopathy: A** science of the future (SAI) University Cadiz Spring Cadiz. pp: 278.

TSANUO, M. K. et al. Isoflavanones from the allelopathic aqueous root exudate of *Desmodium uncinatum*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 265-273, 2003.

VAN ACKER, S. A; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M. N.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine,** v. 20, p. 331-342, 1996.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 361-372, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer, 2003. 384 p.

WARIDEL, P. et al. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, n. 1, p. 29-41, 2001.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. 1994 Analysis of Phenolic Plant Metabolites; Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK.

WOODWARD, S.L. 2008. Introduction to biomes. Greenwood, Westport.

WOLFENDER, J. L. et al. Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides. **Phytochemical Analysis**, v. 3, n. 5, p. 193–214, 1992.

WOLFENDER, J. L. et al. Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analysis** v. 28, n. 10, p. 895–906, 2000.

WORSHAM, A. D. (1987) Germination of wicthweed seeds. In: Musselman L. (ed.) **Parasitic Weeds in Agriculture**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 45-61.

YOSHIKAWA, M. et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 1, p. 113-119, 1998.

YU, J. Q. et al. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 2, p. 129-139.