

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos
metabólitos secundários majoritários das folhas de
Eremanthus glomerulatus Less (Asteraceae)**

Juliano Geraldo Amaral

Ribeirão Preto
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos
metabólitos secundários majoritários das folhas de
Eremanthus glomerulatus Less (Asteraceae)**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientado: Juliano Geraldo Amaral

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine
Lopes

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amaral, Juliano Geraldo

Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae). Ribeirão Preto, 2008.

147p. :il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Norberto Peporine Lopes

1. *Eremanthus glomerulatus*. 2. Asteracea. 3. Variações sazonal. 4. Técnicas hifenadas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliano Geraldo Amaral

Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por me conceder o maior dom do mundo, a vida.

Ao Sr. José Expedito do Amaral e a Sra. Maria da Graças Pereira Amaral meus pais, meus heróis e exemplos da minha vida. Vocês sempre estarão no meu coração não importa o local que eu esteja. Amo vocês eternamente.

A Tânia de Fátima Amaral, minha estimada irmã, pelo apoio, confiança, proteção, cobranças, exemplos e amor.

A José Expedito do Amaral Junior, meu amigo, companheiro, meu irmão, pelos exemplos, apoio e companheirismo.

A Cristhiane Teixeira Tolentino, por entender as minhas ausências, por aceitar as dificuldades, a distância, pela compreensão, por fazer dos meus ideais os seus e pelo amor que nunca me faltou. Agradeço por você ser assim e por estar sempre disposta a me apoiar e ajudar em todos os momentos. Amo você, *nada nem ninguém*.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pela orientação deste trabalho, pela simplicidade, apoio e sobretudo pela confiança, tolerância e oportunidade. Serei sempre grato ao senhor.

Ao Prof. Msc. Mateus Freire Leite do IMMES e laboratório de bioquímica da FCFPR/USP, pelo apoio incondicional, pela ajuda e sobretudo pela amizade sincera e verdadeira, não tenho palavras para te agradecer.

Ao Dr. Leonardo Gobbo Neto, pelo auxílio desde o primeiro dia deste trabalho até o último.

Ao professor do laboratório de química orgânica Dr João Luis Callegari Lopes pelos ensinamentos e contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Dr Luis Fernando Lopes Guimarães do laboratório de química Analítica da FCFRP/USP pelas correções e sugestões neste trabalho.

Ao meu amigo José Carlos Tomaz do laboratório de química orgânica da FCFRP/USP, por fazer dos dias mais difíceis os mais engraçados e por toda ajuda que sempre me concedeu. Obrigado amigo você é de ouro.

A todos os meus amigos de bancada, alunos de pós e IC do laboratório de química orgânica da FCFRP/USP, Michel, Andréia, Néri, Estela, Dayana, Daniel (Cabeça), Leandro (Ganso), Carlos, Fernanda, Patrícia, Luis Elídio (Mazza), Denise e Ana Ligia, pelas discussões, ensinamentos, pelos inúmeros auxílios e por fazerem o dia a dia do laboratório sempre alegre e divertido. Agradeço muito a todos vocês, pois sem vocês seria impossível a conclusão deste trabalho, obrigado meus amigos.

A todos os técnicos e secretária do laboratório de química orgânica da FCFRP/USP, que sem dúvida nenhuma foram fundamentais para conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado a todos vocês.

Ao Dr. Humberto Takeshi Sakamoto, pela coleta das amostras que originaram meu trabalho.

A Dra. Solange Leite de Moraes, pela, amizade, ensinamentos, auxílios e correções neste trabalho. Muito obrigado Sol.

Ao Prof. Msc. Marcelo Reis da Costa da UNIFENAS, pelos ensinamentos, pela confiança, apoio e por tudo que já fez e faz por mim.

A Prof. Dr Denise Pimenta da Silva Leitão do Laboratório de Bioquímica da FCFRP/USP, pela amizade, ensinamentos e auxílio neste trabalho

A Profa. Julieta Maria M. N. M Santos da Unifenas, por ter concedido a minha primeira oportunidade com professor.

A todos os meu coordenadores, pela confiança e por sempre terem acreditado no meu trabalho, o meu muito obrigado a todos vocês.

A Laura, Ana Cristina, Alcides e dona Nadir do laboratório de bioquímica da FCFRP/USP, pelo companheirismo e todo auxilio na execução deste trabalho.

Ao Msc João Paulo Barreto de Sousa do laboratório de farmacognosia da FCFRP/USP e a sua esposa, pela amizade, companheirismo e acolhida seis estrelas em sua residência.

A Lincoln Roberto Tolentino e Dirce Teixeira Tolentino, pelo auxilio, amizade e, sobretudo pela confiança que sempre me depositaram, pois esta fez com que a distância e saudade sempre fossem amenizadas. Obrigado, vocês são maravilhosos.

A Rafael Marcio Santos Sousa e Silvia Emanuelle Teixeira Tolentino Sousa, pelo companheirismo, ajudas incondicionais e pela amizade sincera e verdadeira que sempre tiveram comigo.

A todos os meus tios e tias, primos e primas que sempre acreditaram em mim e de uma forma ou de outra sempre me ajudaram. Que Deus os iluminem sempre.

A todos os meus amigos, que não listarei, para não correr o risco de cometer a injustiça de esquecer algum, pois graças da Deus vocês são muitos e, sobretudo verdadeiros. Vocês foram fundamentais, muito obrigado a todos.

A CAPES, ao CNPQ e a FAPESP pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

AMARAL, J. G. **Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae)**. 2008. 147f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O trabalho buscou investigar as variações sazonais de metabólitos secundários em *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae). Embora não ser utilizada para fins medicinais esta espécie contém substâncias biologicamente ativas. Para este estudo, foram selecionados dez indivíduos de uma mesma população localizada na região do município de Ibiraci – MG, que durante um período de aproximadamente dois anos (06/2000 a 04/2002) tiveram um de seus ramos coletados mensalmente. Visando a análise das folhas destes ramos uma metodologia para extração e análise de seus metabólitos secundários majoritários por CLAE-UV foi desenvolvida e utilizada para determinação de suas variações sazonais. A identificação destes metabólitos se deu principalmente pelas técnicas hífenadas CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM. Os metabólitos que não puderam ser identificados por estas ferramentas foram isolados do extrato etanólico foliar desta espécie e identificados por RMN de ^1H e ^{13}C e EM. Durante este estudo foi verificado que o envelhecimento das folhas resulta em uma significativa redução no conteúdo de todos os seus metabólitos secundários. Também foi possível identificar nove metabólitos secundários pertencentes às classes dos ácidos cafeoilquínicos, derivados fenólicos e flavonóides, dos quais foram isolados três, sendo dois ainda não relatados na literatura. Quanto à variação sazonal pode-se verificar que os indivíduos apresentam perfis metabólicos bem semelhantes com diferenças quantitativas mas praticamente não apresentando variações qualitativas entre os indivíduos. Pode-se observar também que há um metabolismo bem diversificado no qual nem sempre todos os indivíduos apresentam aumento de produção de um mesmo metabólito em determinada estação do ano. Apesar das variáveis é possível definir o outono e a primavera como as estações que durante o estudo apresentaram os melhores índices de produção de praticamente todos os metabólitos analisados. Por fim pode-se concluir que as variações sazonais em *E. glomerulatus* são significativas e que são determinantes para definir a época de futuras coletas para posteriores estudos químicos ou farmacológicos.

Palavra chave: *Eremanthus glomerulatus*, variações sazonais, técnicas hífenadas, Asteraceae.

ABSTRACT

AMARAL, J. G. **Study of the seasonal and intrapopulation variations of the secondary metabolites from the leaves of *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae)**. 2008. 147p. (Master's Degree Dissertation). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

This study was performed to investigate the seasonal intrapopulation variations of the secondary metabolites in *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae). Although this species is not used for medicinal purposes, it contains biologically active substances. For this study, ten individuals from the same population located in the region of Ibirici city, Minas Gerais state, had one of their branches collected monthly for about two years (from 06/2000 to 04/2002). Aiming the analysis of the leaves from the branches, a methodology on UV-HPLC was developed and used for the extraction and analysis of major secondary metabolites to determine the seasonal variations. The identification of the metabolites has occurred mainly by the HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS hyphenated techniques. The metabolites that could not be identified by these methods were isolated from ethanolic extract of leaves of these species and identified by NMR ^1H and ^{13}C and MS. During this study it was noticed that the aging of the leaves results in a significant reduction on the rate of all the secondary metabolites. It was also possible to identify nine secondary metabolites belonging to caffeoylquinic acids, phenolical derivatives and flavonoids, from which, three compounds were isolated, however two compounds wasn't described in the literature. Relating to the seasonal variation, it was possible to verify that the individuals present similar metabolic profiles with quantitative differences but practically without qualitative difference. It was also possible to observe that there is a diversified metabolism in which not all individuals present an increase in the production of the same metabolite on a specific season. Despite these variations, it is possible to define autumn and spring as the seasons that presented the best rates of production on practically all the analyzed metabolites. Finally, it is possible to conclude that the seasonal variation of *E. glomerulatus* is significant and decisive to define the right time for future collection for further chemical and pharmacological studies.

Key words: *Eremanthus glomerulatus*, seasonal variation, hyphenated techniques, Asteraceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa do zoneamento agroclimático de Minas Gerais.....	25
Figura 2	Mapa da região do sudoeste de Minas Gerais.....	26
Figura 3	Principais fatores que podem influenciar na produção de metabólitos secundários em plantas.....	36
Figura 4	Organograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>E. glomerulatus</i>	49
Figura 5	Perfil cromatográfico registrado em 270nm do indivíduo E 16-IV.....	54
Figura 6	Cromatogramas (270 nm) exemplificando a variação quantitativa entre o metabolismo secundário de folhas novas e velhas provenientes de um mesmo ramo do indivíduo E 16-IV.....	57
Figura 7	Gráfico comparativo de produção de metabólitos secundários majoritários entre os indivíduos da população E, referentes à coleta 22.....	58
Figura 8	Estrutura molecular do 4-fenol-1-O-(5"-O-Cafeoil)- β -apiofuranosil-(1" \rightarrow 6')-O- β -D-glucopiranosídeo.....	68
Figura 9	Proposta do mecanismo de fragmentação da substância BuOH 2.4	72
Figura 10	Estrutura molecular do 4-fenol-1- O- β -glucopiranosídeo (6' \rightarrow 1")O- β -apiofuranosil.....	73
Figura 11	Estrutura molecular do 5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1' \rightarrow 6)-O- β -glicopiranosídeo.....	76
Figura 12	Proposta do mecanismo de fragmentação da substância Prep-1.....	78
Figura 13	Perfil cromatográfico em 270nm obtido para as 2 primeiras extrações.....	81

Figura 14	Gráfico da variação dos constituintes majoritários das folhas de <i>E. glomerulatus</i> em função do tempo após o preparo das amostras.....	83
Figura 15	Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância relativa ao pico 1.....	87
Figura 16	Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância ácido 5-O- <i>E</i> -cafeoilquínico – Pico 2.....	89
Figura 17	Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância 4 fenol-1-O-(5"-O-cafeoil)- β -D-apiofuranosil-(1" \rightarrow 6')-O- β -D-glucopiranosídeo – pico 3.....	91
Figura 18	Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico – pico 4.....	93
Figura 19	Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância quercetina 3'-O-metil-3-O- β -D-glucopiranosídeo – pico 5.....	95
Figura 20	Gráfico demonstrado as variações sazonais ocorridas no individuo I	97
Figura 21	Gráfico demonstrado as variações sazonais ocorridas no individuo IV.....	99
Figura 22	Gráfico demonstrado as variações sazonais ocorridas no individuo X.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Metabólitos secundários isolados de <i>Eremanthus glomerulatus</i> e seus extratos de origem.....	31
Tabela 2	Referências relativo às substâncias isoladas.....	31
Tabela 3	Estrutura dos metabólitos secundários isolados da espécie <i>Eremanthus glomerulatus</i>	32
Tabela 4	Dados referentes as amostras coletadas. Código de coleta, data e estação de coleta dos ramos de <i>E.glomerulatus</i> (população E).....	44
Tabela 5	Dados sobre o perimetro e altura do tronco principal da população E.....	44
Tabela 6	Gradiente de eluição utilizado para as análises por CLAE-DAD, CLAE DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM.....	46
Tabela 7	Reunião das frações provenientes da fração BuOH 2, novas denominações e rendimento.....	51
Tabela 8	Reunião das frações provenientes da fração BuOH 1, novas denominações e rendimento.....	52
Tabela 9	Gradiente de eluição preparativo utilizado para fracionamento do extrato BuOH por CLAE-UV.....	53
Tabela 10	Gradiente de eluição utilizado para as análises sazonal por CLAE-UV.....	54
Tabela 11	Identificação dos picos cromatográficos do extrato polar das folhas de <i>E. glomerulatus</i> e dados de UV e espectrometria de massas obtidos por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM.....	67
Tabela 12	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância BuOH 2.4.....	71

Tabela 13	Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância BuOH 1.6 comparados com a literatura.....	75
Tabela 14	Estruturas moleculares das substâncias identificadas.....	79
Tabela 15	Porcentagem de extração dos principais metabólitos majoritários obtidos na primeira das quatro extrações consecutivas do indivíduo E 22-VII de <i>E. glomerulatus</i> em relação a somatória das extrações.....	81
Tabela 16	Coeficientes de variação (C.V.) encontrados para as amostras analisadas em triplicata demonstrando a repetibilidade do método...	85

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

abr.	Abril
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ago.	Agosto
BDT	Bases de Dados Tropicais
BuOH	Butanol
BuOH 1.6	4-fenol-1- O- β -D-glucopiranosídeo (6'→1'')O- β -D-apiofuranosil
BuOH 2.4	4-fenol-1-O-(5''-O-cafeoil)- β -D-apiofuranosil-(1''→6') - O- β -D-glucopiranosídeo.
C.V.	Coeficiente de variação
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCFC	Cromatografia em camada fina comparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCL ₃	Clorofórmio deuterado
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE – UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos

CLAE-DAD-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e massas
CLAE-DAD-EM-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e massas/massas
CLAE-DAD-ESI-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores/analísadores de arranjo de fotodiodos, acoplada a espectrometria massas/massas <i>tandem</i> com ionização por <i>electrospray</i> .
CL-EM	Cromatografia líquida com detector/analísador de massas e ionização por <i>electrospray</i>
CL-EM/EM	Cromatografia líquida com detector/analísador de massas/massas e ionização por <i>electrospray</i>
<i>d</i>	Dubleto
D ₂ O	Água deuterada
DCM	Diclorometano
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dl</i>	Dubleto largo
dez.	Dezembro
DMSO-d ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
EM/EM	Espectrometria de massas/espectrometria de massas
ESI	<i>Electrospray</i>
ESI-MS	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
EtOH	Etanol

eV.	Elétron-volt
F.M.	Fase móvel
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
fev.	Fevereiro
GEOMINAS	Geoprocessamento em Minas Gerais
HAc	Ácido acético
Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
HPLC	<i>High Performace Liquid Cromatography</i>
Hz	Hertz
IES-EM/EM	Espectrometria de massas/massas por <i>electrospray</i>
Inv.	Inverno
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
jan.	Janeiro
jul.	Julho
jun	Junho
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MHz	Megahertz
mai.	Maio
mar.	Março
MeOH	Metanol
nov.	Novembro

<i>multipl.</i>	Multiplicidade
out.	Outubro
ppm	Partes por milhão
Pico 1	5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1'→6)-O- β -glicopiranosídeo
Pico 2	5-O-E-cafeoilquínico
Pico 3	4-fenol-1-O-(5"-O-cafeoil)- β -D-apiofuranosil-(1"→6') - O- β -D-glucopiranosídeo.
Pico 4	4,5-di-O-cafeoilquínico
Pico 5	Quercetina 3'-O- metil-3-O- β -D- glucopiranosídeo
Pico 6	3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)- β -glicosilquercetina
Pico 7	3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)- β -glicosilkaempferol
Pico 8	3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)- β -glicosilsoramnetina
Prep – 1	5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1'→6)-O- β -glicopiranosídeo
Pri.	Primavera
QqTOF	Analisadores tipo quadrupolo e tempo de voo em seqüência
R.f.	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
s	Singleto
set.	Setembro
s/	Singleto largo
T.R.	Tempo de retenção
TMS	Tetrametilsilano
USP	Universidade de São Paulo

UV/Vis	Detector de ultravioleta e visível
UV-DAD	Detector de ultravioleta por arranjo de fotodiodo
UV-Visível	Detector de ultravioleta e visível
Ver.	Verão
α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico
$[M - H]^-$	Molécula desprotonada
$[M + H]^+$	Molécula protonada
$[M + Na]^+$	Molécula cationizada
\approx	Valor aproximado

*Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados.
O que elas amam são pássaros em vôo. Existem para
dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o vôo,
isso elas não podem fazer, porque o vôo já nasce
dentro dos pássaros. O vôo não pode ser ensinado. Só
pode ser encorajado.*

Rubens Alves

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	vii
Epígrafe	xii
1 – INTRODUÇÃO	21
1.1. O habitat (cerrado)	21
1.2 Os biomas e local de coleta em Minas Gerais	25
1.3 A Família Asteraceae	26
1.4. O gênero <i>Eremanthus</i>	28
1.5. A espécie em estudo <i>Eremanthus glomerulatus</i>	29
1.6. Variações sazonais de metabolitos secundário de espécies vegetais.	34
1.7. Espectrometria de Massas	36
2 – OBJETIVOS	39
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Solventes utilizados e especificação da aparelhagem	40
3.1.1 Solventes utilizados.....	40
3.1.2 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	40
3.1.3 Cromatografia em Camada Fina Comparativa (CCFC).....	41
3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)	41
3.1.5 Colunas Cromatográficas	41
3.1.6 Evaporadores Rotativos e Liofilizador	41
3.1.7 Espectroscopia de Infravermelho	42
3.1.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
3.1.9. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	43
3.2 Coleta, demarcação e armazenamento de <i>Eremanthus glomerulatus</i>	43
3.3 Extração e análise das amostras por CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-EM/EM.....	44
3.3.1 Extração da amostra	45
3.3.2 Análise por CLAE-DAD	45
3.3.3 Análise por CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM	46
3.3.4 Identificação dos picos cromatográficos.....	47
3.4. Estudo fitoquímico das folhas de <i>Eremanthus glomerulatus</i>	47
3.4.1 Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>E. glomerulatus</i>	48
3.4.1.1 Fracionamento do extrato BuOH.....	50
3.4.1.2 Fracionamento do extrato BuOH por CLAE-UV	52
3.5 Estudo das variações sazonais das folhas de <i>Eremanthus glomerulatus</i>	53
3.5.1 Desenvolvimento de método analítico.....	53
3.5.2 Preparo e extração da amostra	55
3.5.3 Análise da estabilidade da amostra.....	56

3.5.4 Análise sazonal dos indivíduos	57
3.5.4.1 Escolha dos indivíduos.....	57
3.5.4.2 Análise das amostras	58
3.5.4.3 Avaliação da repetibilidade do método analítico	59
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 Identificação dos compostos majoritários da folhas de <i>E. glomerulatus</i>	60
4.1.1. Identificação dos picos cromatográficos por CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM	60
4.1.1.1. Ácido 5-O- <i>E</i> -cafeoilquínico – Pico 2.....	60
4.1.1.2. Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico – Pico 4.....	62
4.1.1.3. Quercetina 3'-O- metil-3-O-β-D- glucopiranosídeo – Pico 5.....	63
4.1.1.4. 3-O-(6"-O- <i>E-p</i> -cumaroil)-β-glicosilkaempferol – Pico 7	64
4.1.1.5. 3-O-(6"-O- <i>E-p</i> -cumaroil)-β-glicosilsoramnetina – Pico 8	64
4.1.1.6. 3-O-(6"-O- <i>E-p</i> -cumaroil)-β-glicosilquercetina – Pico 6	65
4.1.2. Identificação e elucidação estrutural dos picos cromatográficos por RMN e EM.....	68
4.1.2.1 Identificação da fração BUOH 2.4	68
4.1.2.1.1 Proposta de fragmentação da substância BUOH 2.4	71
4.1.2.2 Identificação da fração BUOH 1.6	73
4.1.2.3 Elucidação estrutural da fração Prep – 1 – PICO 1	76
4.1.3 Estruturas moleculares das substâncias identificadas	78
4.2. Estudo das variações sazonais das folhas de <i>Eremanthus glomerulatus</i>	80
4.2.1. Preparo da Amostra	80
4.2.2. Método Analítico.....	82
4.2.3. Estabilidade da Amostra.....	82
4.2.4. Análise da variação na concentração dos metabólitos secundários	83
4.2.5. Variação sazonal na concentração dos metabólitos secundários majoritários de média e alta polaridade das folhas de <i>E. glomerulatus</i>	85
4.2.5.1. Variação sazonal do pico 1	85
4.2.5.2. Variação sazonal do pico 2	88
4.2.5.3. Variação sazonal do pico 3	90
4.2.5.4. Variação sazonal do pico 4	92
4.2.5.5. Variação sazonal do pico 5	94
4.2.5.6. Análise da variação sazonal no indivíduo I.....	96
4.2.5.7. Análise da variação sazonal no indivíduo IV	98
4.2.5.8. Análise da variação sazonal no indivíduo X	100
4.3 Considerações finais	102
5 – CONCLUSÕES	104
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
APÊNDICES	114

1 – INTRODUÇÃO

1 – Introdução

1.1. O habitat (cerrado)

O termo “cerrado” designa uma vegetação de aspecto e flora própria, classificado dentro dos padrões de vegetação do mundo como savana (EITEN 1994). Muito rico floristicamente, sendo inclusive considerado como a flora mais diversificada entre as savanas mundiais (KLINK 1996), possui destaque com relação à biodiversidade devido à sua grande extensão, heterogeneidade vegetal e por conter trechos das três maiores bacias hidrográficas da América do Sul (ALHO e MARTINS 1995; KLINK 1996). O cerrado brasileiro cobre cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central, representando aproximadamente 23% da superfície de terra do país (o mesmo tamanho que a Europa Ocidental). Em termos de área é excedida somente pela floresta amazônica com aproximadamente 3,5 milhões de km² (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). Este bioma contribui ainda com cerca de 5% da diversidade da fauna e flora mundiais (KLINK *et al.* 1995) e com cerca de 1/3 da biota brasileira (ALHO e MARTINS 1995). A mais recente compilação de sua flora contabilizou 6429 espécies vasculares (MENDONÇA *et al.* 1998), número superior ao de grande parte de outras floras no mundo (KLINK 1996). Dessas 6429 espécies, 6060 são angiospermas, o que representa 65% das 9300 estimadas por Gentry e colaboradores (1997) para o cerrado, caatinga, lianos, chaco e pantanal (MENDONÇA *et al.* 1998).

Outro destaque do cerrado é a notável variação na sua composição, apresentando formas florestais, savânicas e campestres (RIBEIRO e WALTER 1998). Segundo Eiten (1994), a forma savânica mais comum no Brasil Central é o “arvoredo de escrube-e-árvores”, chamada de cerrado *sensu stricto* (s.s.),

caracterizada por apresentar o estrato arbóreo e arbustivo bem definidos e cobertura arbórea variando de 10 a 60%. O cerrado pode variar quanto à densidade, podendo este ser mais ralo ou mais denso. Uma forma florestal mais densa e mais alta, com árvores normalmente de 7m de altura, algumas podendo atingir 15-18m, formando assim um dossel praticamente fechado, é conhecida como cerradão. Dentre as formas florestais encontram-se ainda as matas de galeria, tipo de vegetação com predominância de espécies arbóreas, ocorrendo ao longo dos cursos fluviais de pequeno porte no Brasil Central. Já as formas campestres que apresentam coberturas arbóreas menores que o cerrado s.s. e arbustos mais esparsos são definidas como campo cerrado e campo sujo. A forma campestre mais extrema, na qual predomina uma vegetação herbácea de 0,5 a 2 m, crescimento contínuo, com raros arbustos e ausência completa de árvores, é conhecida como campo limpo (VIADANA 2005; ANDRADE; FELFILI; VIOLATTI 2002).

Apesar da sua importância, existe uma carência de informações fisiológicas, ecológicas, florísticas e fitossociológicas, acerca do bioma cerrado. Em muitos locais não foram ainda realizadas coletas de material botânico (FELFILI *et al.* 1993). Estes fatos, aliados à pequena área deste ecossistema teoricamente protegida em unidades de conservação legalizadas, as quais, em geral, são mal localizadas ou apresentam tamanho insuficiente para proteger sua biodiversidade (DIAS 1994), dão uma idéia dos riscos da perda de informações sobre a florística da região. A carência de áreas de conservação no cerrado pode ser ainda mais evidenciada quando se compara o esforço governamental em conservar os ecossistemas Amazônicos, os quais têm 12% da sua área protegida em unidades de conservação, contra menos de 2% no cerrado (KLINK 1996).

A forma de intervenção humana mais significativa no cerrado tem sido a grande expansão das pastagens plantadas de lavouras comerciais (soja, milho, arroz, café, feijão e mandioca). Estimou-se que em 1995 um total de 38,6% da área do cerrado estariam sendo voltadas para agropecuária, lavouras, pastagens plantadas e terras produtivas não utilizadas (KLINK 1996). A partir da interpretação das imagens de satélite do sensor MODIS (*Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer*) do ano de 2002, concluiu-se que 55% do cerrado já foi desmatado ou transformado pela ação humana (MACHADO et al., 2004), o que equivale a uma área de 880.000km², ou seja quase três vezes a área desmatada na Amazônia brasileira. As taxas anuais de desmatamento também são mais elevadas no Cerrado: entre os anos de 1970 e 1975, o desmatamento médio no Cerrado foi de 40.000 km² por ano – 1,8 vezes a taxa de desmatamento da Amazônia durante o período 1978–1988 (Klink & Moreira, 2002). As taxas atuais de desmatamento variam entre 22.000 e 30.000km² por ano (MACHADO et al., 2004), portanto, realmente superiores às da Amazônia.

Os solos do cerrado são, em sua maioria, distróficos, ou seja, solos ácidos, de baixa fertilidade, com baixa concentração de matéria orgânica e nutrientes como cálcio, magnésio, fósforo e potássio e com alta concentração de ferro e alumínio (BASE DE DADOS TROPICAIS - BDT). O clima do cerrado é do tipo tropical estacional, com duas estações climáticas, uma chuvosa e outra seca, bem definidas, onde a estação das chuvas compreende o período entre outubro a março. A temperatura média varia entre 22°C, mais ao sul, e 27°C, mais ao norte (BASE DE DADOS TROPICAIS - BDT). Durante a estação seca, que ocorre no inverno, pode ficar de dois a seis meses sem chover, dependendo do ano e da região. Nesse período, a grama e a vegetação rasteira secam progressivamente, podendo ocorrer

grandes queimadas, principalmente no final da estação. A vegetação sofre com as queimadas, mas rebrota rapidamente (PROENÇA *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas, em função do uso não disciplinado, esta formação vegetal típica do país passou por processos degenerativos (expansão da agricultura e agropecuária, desmatamentos e queimadas) que conduziram a sua destruição em grande escala, restando na atualidade menos de 5% de sua área original (VIADANA 2005).

No trabalho recente desenvolvido por Myers *et al.* (2000), foi estimado que o cerrado brasileiro aparece como possuidor de aproximadamente 10.000 espécies vegetais, sendo que 4400 destas são endêmicas, o que representa aproximadamente 1,5% do total de espécies endêmicas do planeta. Além disso, por estar sofrendo grandes perdas de habitat, os mesmos autores o incluíram entre os *hotspots* da biodiversidade. Para ser considerado um *hotspot*, uma área deve conter ao menos 0,5% das 300.000 espécies de plantas existentes como endêmicas. Além deste requisito, a área deve ter perdido mais de 70% de sua vegetação primária, sendo esta o habitat onde usualmente estão a maioria das espécies, especialmente as endêmicas. A grande diversidade da flora do cerrado é explicada, em parte, pelo longo período de evolução em um ambiente com as mais variadas condições adversas (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

Esta flora representa um importante recurso genético e é muito mais que uma simples fonte de carvão vegetal ou áreas a serem aproveitadas para a agricultura e pastagem, freqüentemente estimuladas por interesses econômicos (CASTRO *et al.* 1999; RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). Fica claro portanto, que a proteção do cerrado, a conservação de sua diversidade genética e o estudo de sua

flora, tanto para a preservação como para a possível descoberta de novas substâncias bioativas, é uma questão de considerável importância.

1.2 Os biomas e local de coleta em Minas Gerais

Minas Gerais, na maior parte de seu território, é revestido pela tipologia vegetal denominada cerrado, seguido de mata atlântica e caatinga, como é demonstrado na Figura 1. Dentre estas vegetações, os campos rupestres destacam-se devido à natureza peculiar de suas partes componentes. Eles ocorrem a partir de uma altitude de 900 m acima do nível do mar e estão em grande parte associados à Cadeia do Espinhaço no Estado de Minas Gerais (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

As famílias de plantas mais comuns desse bioma são as melastomastáceas, ericacauláceas, velozíáceas, asteraceae e orquidáceas. Do ponto de vista da biodiversidade, os campos rupestres são muito importantes, pois concentram alto grau de espécies endêmicas (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

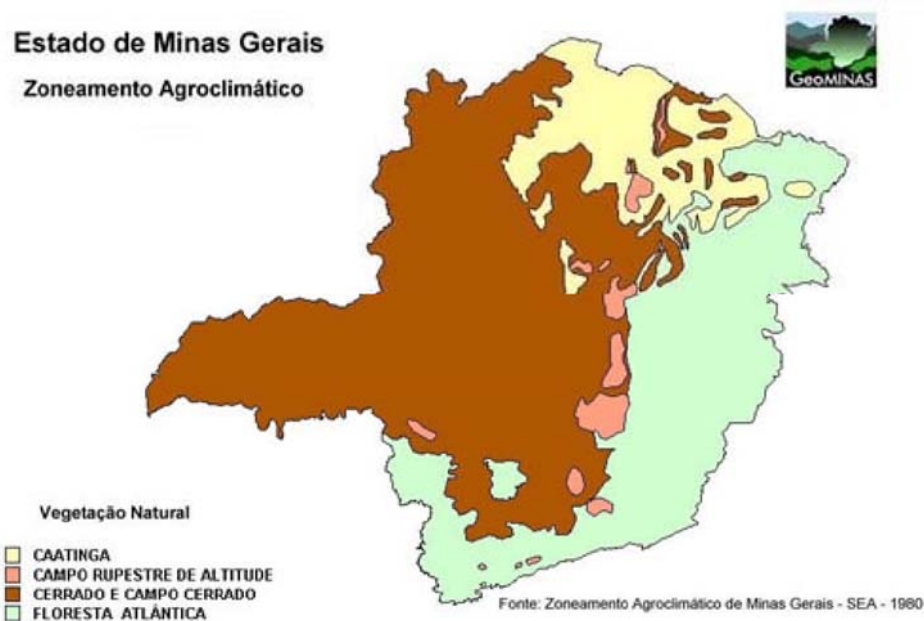


Figura 1. Mapa do zoneamento agroclimático de Minas Gerais. (Disponível em <www.geominas.mg.gov.br>).

Na figura 2 pode-se observar a localização do município de Ibiraci região sudoeste do estado de Minas, a área aonde foram realizadas as coletas de *Eremanthus glomeratus*.



Figura 2. Região do sudoeste de Minas Gerais, a área marcada indica o local de coleta, Ibiraci – MG. (Disponível em www.der.mg.gov.br).

1.3 A Família Asteraceae

Asteraceae (anteriormente denominada de Compositae) é uma das maiores famílias dentre as Angiospermae que, segundo Barroso (1991), constitui o maior grupo e mais diversificado no Reino Vegetal atual, caracterizado por grande plasticidade e poder de adaptações às mais diversas condições ambientais. Esta família compreende 1535 gêneros e cerca de 23000 espécies, divididos em 3

subfamílias e 17 tribos (BREMER 1996). Esta é bem representada em regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Tais plantas podem se desenvolver em localidades ao nível do mar ou, atingir os picos de altas montanhas (BARROSO 1991). Há elementos continentais e extracontinentais que atestam uma ocupação relativamente antiga dos vários continentes, confinados a centros de ocorrência muito distantes uns dos outros, como África, Austrália, América do Sul, México etc. (BARROSO 1991).

As suas subfamílias são Asteroideae, Barnadesioidae e Cichorioideae, sendo que esta última compreende seis tribos: Cardueae e Lactuceae, no hemisfério norte; Mutisieae e Vernonieae, largamente pantropicais e duas pequenas tribos na África. Dentre as 17 tribos de Asteraceae, podemos destacar a Vernonieae, pantropical, concentrada no Brasil, mas ocorrendo também em toda América, África, Ásia e Austrália. Esta tribo compreende 98 gêneros e cerca de 1.300 espécies, divididas em 6 subtribos (BREMER 1996). Na grande maioria estão representadas por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e, só raramente, por espécies arbóreas. O sistema radicular pode ser constituído por uma raiz fusiforme, alongada, ou por um feixe de longas raízes fibrosas. As raízes secundárias podem ter gemas adventícias, pelas quais as plantas são capazes de se multiplicarem vegetativamente (BARROSO 1991).

A família Asteraceae, representando cerca de 10% da flora mundial (BREMER 1996) vem sendo intensamente estudada nos últimos 25 anos não somente quanto à sua morfologia, anatomia, ontogenia, e ecologia, mas também quanto à sua fitoquímica, citogenética e estrutura molecular (BREMER 1996, HIND e BEENTJE 1996). Levantamentos demonstram a grande importância relativa das Asteraceae na composição da vegetação de diferentes localidades, reforçando o

fato de ser uma das mais ricas no Brasil, e também uma das mais importantes no bioma dos cerrados, incluindo os campos rupestres (MENDONÇA *et al.* 1998).

1.4. O gênero *Eremanthus*

O gênero *Eremanthus* pertencente a tribo Vernonieae, compreende 18 espécies nos domínios dos cerrados brasileiros, principalmente em Minas Gerais, Goiás e Bahia (MACLEISH 1987). Historicamente, o gênero vem sendo incluído em uma mistura de muitos gêneros (*Vanillosmopsis*, *Paralycnophora*, *Chresta*) que aparecem atualmente como adjacentes ou semelhantes. Compreende árvores e arbustos, restritos ao cerrado árido do Planalto Central do Brasil, sendo, portanto um gênero endêmico (MACLEISH, 1987).

Em Minas Gerais, as espécies de *Eremanthus* são chamadas de "candeias", devido a sua capacidade de queimar facilmente. Tais espécies estão submetidas a constante pressão exploratória, sendo seus caules freqüentemente utilizados como mourões na construção de cercas (MACLEISH 1987). Estas plantas são também utilizadas para a obtenção de óleo essencial. Dentre os constituintes fixos destacam-se as lactonas sesquiterpênicas, geralmente isoladas de suas partes aéreas, que possuem propriedades citotóxica, antitumoral, antimicrobiana e anti-inflamatório (BOHLMANN *et al.* 1980; PICMAN 1986; SACILOTTO; SARTORI; VICHNEWSKI, 2001).

No território de Minas Gerais, o gênero se encontra distribuído pelo sul, sudoeste, Triângulo Mineiro e região central (MACLEISH 1987), sendo que a área de predominância no estado é a Serra do Cipó, onde as espécies *E. elaeagnus*, *E. glomerulatus* e *E. incanus* são freqüentemente encontradas, formando grandes populações que podem dominar ambientes de cerrado e de campo rupestre. Apesar

de sua ampla ocorrência, estas espécies encontram-se na Lista das Espécies Presumivelmente Ameaçadas de Extinção da Flora de Minas Gerais, (ROMERO e NAKAJIMA 1999).

1.5. A espécie em estudo, *Eremanthus glomerulatus*

E. glomerulatus é descrita como sendo uma árvore que se estende de delgada a robusta, de 2 a 10 metros de altura e poucos ramos, com cor marrom-avermelhada, florescendo e frutificando entre março e outubro. Esta espécie pode ser encontrada nos Estados de Minas Gerais, Goiás e regiões adjacentes à Bahia e São Paulo, a uma altitude de 700 a 1500 metros, sendo comumente observada em grandes colônias. Muitas destas espécies predominam em cerrados e campos rupestres.

Algumas atividades biológicas de *E. glomerulatus* já foram analisadas, entre elas: moluscocida das partes aéreas (DE SOUZA *et al.* 1984; BARROS *et al.* 1985) em especial ao tratamento da esquistossomose e tripanocida do extrato etanólico (CHIARI *et al.* 1996).

Dentre as classes de substâncias que foram isoladas da espécie *Eremanthus glomerulatus*, pode-se destacar os sesquiterpenos, principalmente as lactonas sesquiterpênicas (BARROS *et al.* 1985; BOHLMANN *et al.* 1981; BOHLMANN *et al.* 1982). Como citado anteriormente, algumas destas lactonas sesquiterpênicas apresentam relevantes atividades biológicas, como a ação moluscocida (VICHNEWSKI *et al.*, 1972) e genotóxica (DIAS *et al.*, 1995). Além disso, entre as diversas lactonas sesquiterpênicas isoladas das diferentes espécies de *Eremanthus*, várias delas apresentam atividade tripanocida, antimicrobiana e antifúngica. Os flavonóides são uma outra classe de substância também comumente isolada no

gênero *Eremanthus*, sendo que na espécie em estudo eles também já foram relatadas sua ocorrência (BARROS *et al.* 1985; BOHLMANN *et. al* 1980). Dentre as diversas atividades atribuídas a esta classe se destacam antiviral, antioxidante, antiinflamatória e antitumoral (SIMÕES *et al.* 2004). A literatura também descreve o isolamento de poliacetilenos (BOHLMANN *et al.* 1980), triterterpenos (BOHLMANN *et al.* 1982; BOHLMANN *et al.* 1981) e esteróides (BOHLMANN *et al.* 1982).

As tabelas 1 e 3 demonstram os metabólitos secundários já isolados da espécie *Eremanthus glomerulatus* e a tabela 2 suas referências.

Tabela 1- Metabólitos secundários isolados de *Eremanthus glomerulatus* e seus extratos de origem.

Substância	Extrato de Origem	*Ref.	**Estrutura Química (Figura 3)
Ereglomerulido	Planta inteira	1	1
	Partes aéreas	3	
Custonolido	Raiz	4	2
3 β -hidróxi-2,3-diidroereglomerulido	Partes aéreas	3	3
2,3- <i>trans</i> -ereglomerulido	Partes aéreas	3	4
8 α -angeloióxi-10 α -hidróxi-10,14-diidroestafiatina	Partes aéreas	3	5
8 α -hidróxi-15-desoxigoiazensolido	Partes aéreas	4	6
Licnofolido	Partes aéreas	4	7
5'-hidróxitigliolóxi-desoxigoiazensolido	Partes aéreas	4	8
2',3'8 α -epoxiangeloióxi-15-desoxigoiazensolido	Partes aéreas	4	9
8 α -[2'-(1')-hidroxietillacrilóxi]-15-desoxigoiazensolido	Partes aéreas	4	10
Eremantolido C	Planta inteira	3	11
16 α -[1'(E)-1,2-epoxipropil]-eremantolido	Partes aéreas	4	12
16 α -[1'(Z)-1,2-epoxipropil]-eremantolido	Partes aéreas	4	13
4 α ,5-diidro-16 α -[1'(E)-metilpropil-1,2-enil]-eremantolido	Planta inteira	1	14
16 α -[1'(E)-metilpropil-1,2-enil]-15-hidroxieremantolido	Planta inteira	1	15
	Partes aéreas	4	
15-hidroxieremantolido C	Planta inteira	1	16
Trideca-3,5,7,9-tetraino-1,11-dieno	Partes aéreas	2	17
Germacrano D	Partes aéreas	2, 3, 4	18
Biciclogermacrano	Partes aéreas	2, 3, 4	19
A-humuleno	Partes aéreas	2, 3, 4	20
Lupeol	Partes aéreas	2, 3	21
Acetato de lupeila	Partes aéreas	2,3,4	22
	Raiz	4	
Lupenona	Partes aéreas	3,4	23
Acetato Δ -12 isômeros (acetato de Lupeol)	Raiz	4	24
Acetato Δ -13 isômeros (acetato de Lupeol)	Raiz	4	25
Estigmasterol	Raiz	4	26
3,7-O-dimetilkampferol	Partes aéreas	2	27
quercetina 3'-O- metil-3-O- β -D- glucopiranosídeo	Folha	5	28
4-hidroxifenol 1-O- β -(5"-O-cafeoil)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo	Folha	5	29

* Referências codificadas na tabela 2.

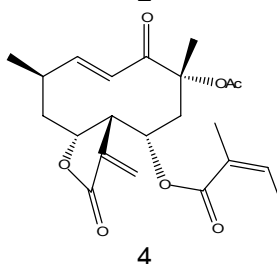
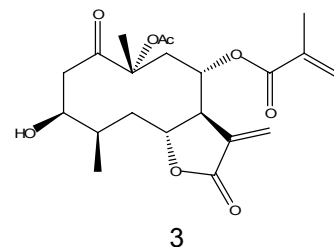
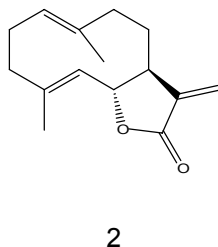
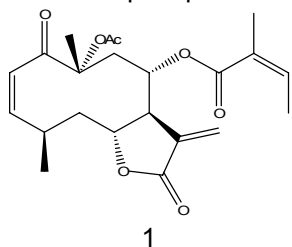
** Estruturas apresentadas na tabela 3.

Tabela 2 – Referências relativo às substâncias isoladas

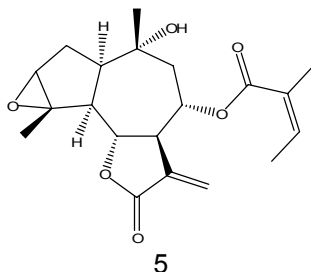
Referência	Código
(BARROS <i>et al.</i> 1985)	1
(BOHLMANN <i>et al.</i> 1980)	2
(BOHLMANN <i>et al.</i> 1981)	3
(BOHLMANN <i>et al.</i> 1982)	4
(SAKAMOTO 2004)	5

Tabela 3 – Estrutura dos metabólitos secundários isolados da espécie *Eremanthus glomerulatus*.

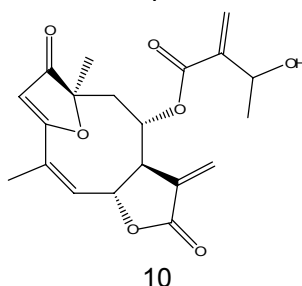
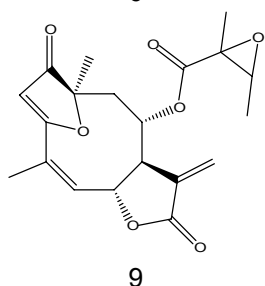
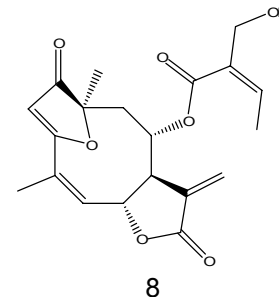
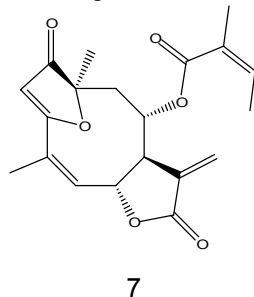
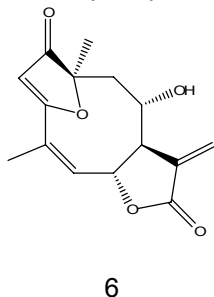
Lactonas Sesquiterpênicas do tipo germacranolido.



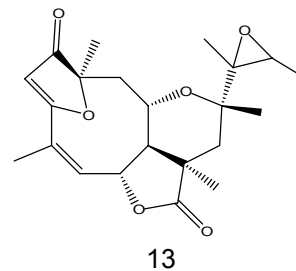
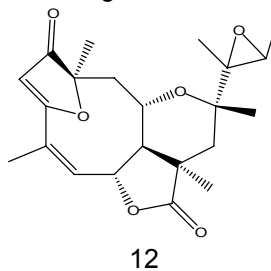
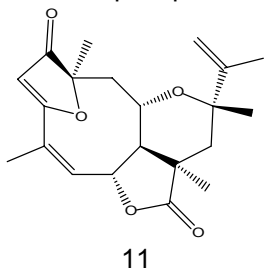
Lactona Sesquiterpênicas do tipo guaianolido



Lactonas Sesquiterpênicas do tipo furanoheliangolido derivada do goiazensolido



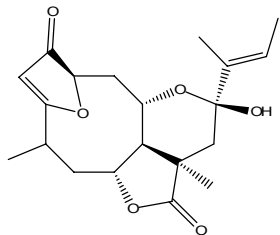
Lactonas Sesquiterpênicas do tipo furanoheliangolido derivada do eremantolido



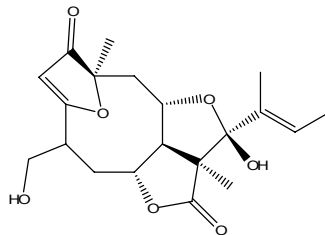
Continua.

Conclusão

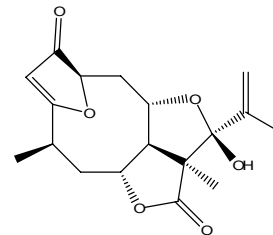
Lactonas Sesquiterpênicas do tipo furanoheliangolido derivada do eremantolido



14

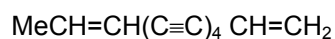


15



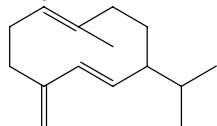
16

Poliacetilenos

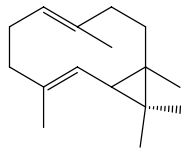


17

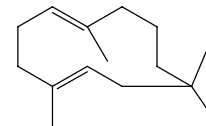
Sesquiterpenos



18

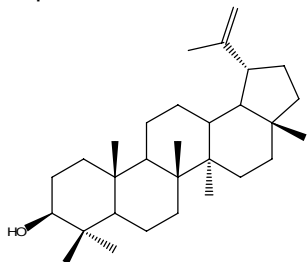


19

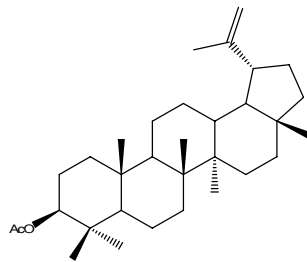


20

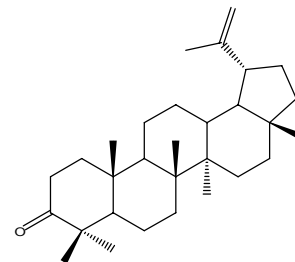
Triterpenos



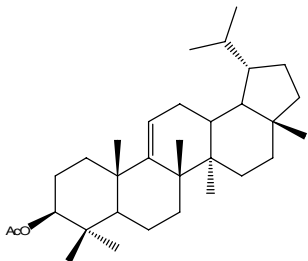
21



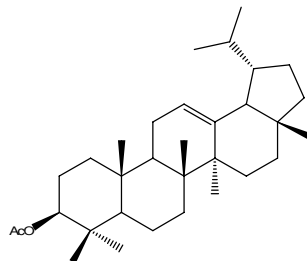
22



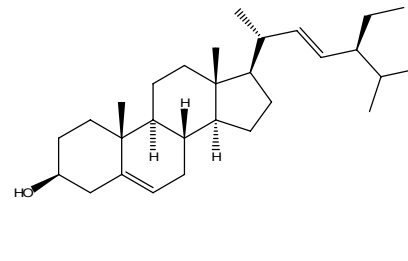
23



24

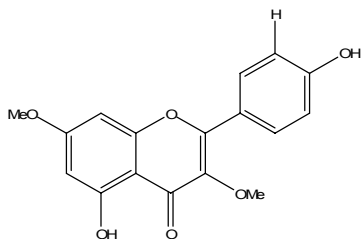


25

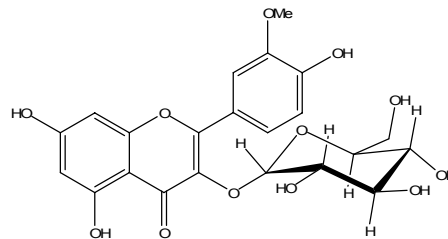


26

Flavonóides

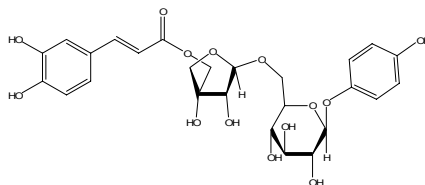


27



28

Derivado Fenólico



29

1.6. Variações sazonais de metabólitos secundário de espécies vegetais.

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e circadianas; intraplanta, interplantas e interespecies) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão gênica, assim como o próprio genótipo, podem sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolucionários (DARROW e BOWERS, 1997; EVANS, 1996; BOWERS e STAMP, 1993; LINDROTH *et al.*, 1987).

Vários fatores podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários. Deve ser enfatizado, porém, que estudos sobre a influência destes fatores na produção de metabólitos secundários têm-se limitado a um restrito grupo de espécies, predominantemente de regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes e podem ter sofrido fortes pressões seletivas por humanos, visando certas características desejadas. Seu comportamento, portanto, pode não ser representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; GERSHENZON, 1984).

A estação em que a droga é coletada é um dos fatores de considerável importância, visto que a quantidade e, às vezes, a natureza dos constituintes ativos, não são constantes durante o ano (EVANS, 1996). São relatadas variações sazonais no conteúdo de óleos essenciais (ANGELOPOULOU *et al.*, 2002; PALÁ-PAÚL *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 1997), lactonas sesquiterpênicas (ZIDORN e STUPPNER, 2001; SCHMIDT *et al.*, 1998), ácidos fenólicos (ZIDORN e STUPPNER, 2001), flavonóides (WILT e MILLER, 1992; MENKOVIC *et al.*, 2000; LOBSTEIN *et al.*, 1991; CLARK e CLARK, 1990; JALAL *et al.*, 1982), cumarinas (WILT e MILLER, 1992), saponinas (NDAMBA *et al.*, 1994) e glicosídeos cianogênicos (WATERMAN e MOLE, 1989).

O ruibarbo (*Rhamnus purshiana*), por exemplo, não contém derivados de antraquinonas no inverno; o conteúdo de C-glicosídeos, O-glicosídeos e antraquinonas nos brotos e folhas flutuam marcadamente durante o ano (EVANS, 1996); as concentrações de glicosil-flavonóis e de biflavonas em *Ginkgo biloba* apresentam variações sazonais (LOBSTEIN *et al.*, 1991); e as concentrações de hypericina e pseudohypericina em *Hypericum perforatum* aumentam de cerca de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão (SOUTHWELL e BOURKE, 2001).

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários foram revisados por (GOBBO-NETO e LOPES; 2007), apresentando como principais fatores a influência por sazonalidade e ritmo circadiano (Figura 3).

Em estudo recentemente Sakamoto e colaboradores (2005), analisaram a espécie *E. seidelii* verificando que, embora a mesma não possuía variações sazonais significativas, esta apresenta perfil quantitativo diferenciado quando comparado aos outros indivíduos analisados, apontando para a existência de três quimiotipos quantitativos desta espécie. Tal fato reforça a necessidade que o estudo seja continuado a fim de avaliar os tipos de variações possíveis em um maior número de espécies.

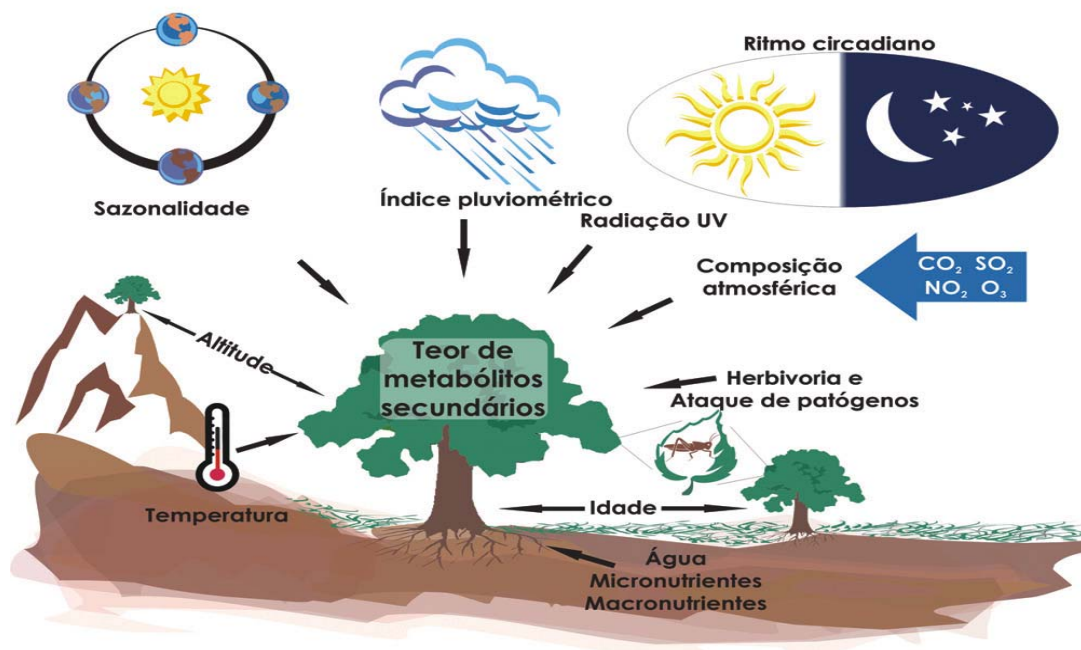


Figura 3. Principais fatores que podem influenciar na produção de metabólitos secundários em plantas (ilustração de C. A. Carollo; extraída de GOBBO-NETO e LOPES, 2007)

1.7. Espectrometria de Massas

A maior dificuldade no estudo da variação de metabólitos secundários provenientes de espécies vegetais está no isolamento e identificação de seus constituintes, observando que o processo necessário para tal é demorado, trabalhoso e de alto custo, haja vista a grande quantidade de solventes, reagentes, materiais e equipamentos necessários. Porém, grandes avanços estão sendo obtidos nesse campo, com o interfaceamento de sistemas cromatográficos de alta performance (CLAE) a detectores espectrométricos capazes de fornecer dados suficientes para a identificação de substâncias presentes em misturas complexas, sem a necessidade de isolamento. A maioria desses sistemas, também denominados hifenados, utiliza cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um detector UV/VIS com arranjo de diodos e um espectrômetro de massas, sendo a ionização da amostra realizada por “electrospray” (ESI). Dessa forma, é possível

obter alguma informação sobre a classe das substâncias presentes na amostra, bem como de sua massa molecular (CREMIN e ZENG, 2002).

A disponibilidade de espectrômetros de massas acoplados e com ionização por *electrospray* (FERNANDÉZ-METZLER *et al.*, 1998) proporciona ao pesquisador uma ferramenta extremamente poderosa para análise de amostras biológicas (GELPI, 1995). A cromatografia líquida (CL) acoplada com espectrometria de massas (EM) diminui os estágios de preparação da amostra (FITZGERALD *et al.*, 1999 *apud* OLIVEIRA; WATSON, 2000) e permite analisar rapidamente o perfil metabólico de drogas ou substâncias naturais, podendo auxiliar no desenvolvimento de fármacos. Os problemas iniciais que envolviam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a EM, duas técnicas aparentemente incompatíveis, foram amplamente superados pelo desenvolvimento de interfaces de ionização à pressão atmosférica. Este avanço estabeleceu a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) e posteriormente a cromatografia líquida acoplada a espectrômetros de massas seqüenciais (CL-EM/EM) como métodos de rotina para o estudo de metabolismo de drogas (OLIVEIRA; WATSON, 2000). As diferentes técnicas de IES-EM/EM permitem também analisar moléculas polares sem a necessidade de derivatização (OLIVEIRA; WATSON, 2000), além de gerar informações estruturais através dos fragmentos gerados a partir de íons-precusores, fundamentais para a identificação *on line* ou mapeamento de substâncias conhecidas (WARIDEL *et al.*, 2001).

Recentemente Bradshaw e colaboradores divulgaram a criação de um método simplificado para estudo de “desrepliação” utilizando EM e RMN para 126.000 estruturas de produtos naturais (BRADSHAW *et al.*, 2001). O termo desrepliação pode ser definido como a identificação de substâncias ou classes de

substâncias não inéditas que já foram descritas como ativas para a mesma ação observada no extrato (STREGE *et al.*, 1999). No Brasil espécies do gênero *Lychnophora*, popularmente conhecidas como arnica-da-serra, são comumente empregadas como antiinflamatório e analgésico tópico (LOPES, 2001). Os estudos fitoquímicos relatam principalmente a ocorrência de lactonas sesquiterpênicas do tipo furanoheliangolido, os quais apresentam atividade antiinflamatória *in vitro* (RÜNGLER *et al.*, 1999). O fracionamento biomonitorado de um extrato ativo levou ao isolamento de dois derivados cafeoilquínicos com atividade *in vivo* (SANTOS, 2002). Um estudo inicial de desreplicação com 10 espécies ativas do gênero revelou que algumas espécies possuíam lactonas em grandes quantidades, enquanto que em outras espécies não era observada sua ocorrência. Por outro lado, todos os extratos ativos apresentavam os derivados cafeoilquínicos (SANTOS 2006). Todas essas vantagens classificam o sistema CLAE-EM/EM como uma importante ferramenta para os estudos de metabolismo de fármacos e de matrizes biológicas, como exemplo, extratos vegetais, base desta pesquisa.

2 – OBJETIVOS

2 – Objetivos

O trabalho consistiu em estudar as variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários de baixa e média polaridade das folhas de uma população de *Eremanthus glomerulatus* Less. Para tanto foram realizados os seguintes estudos:

- Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE para verificar a existência ou ausência de variações sazonais e intrapopulacional.
- Identificação por meio de CLAE-DAD e CLAE-DAD-ESI-EM/EM de metabólitos secundários majoritário de baixa e média polaridade das folhas de *E. glomerulatus* Less.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3 – Materiais e Métodos

3.1 Solventes utilizados e especificação da aparelhagem.

3.1.1 Solventes utilizados.

Para análise por cromatografia em camada fina, delgada comparativa e preparativa foram utilizados MeOH, AcOEt, grau técnico (Mallinkrodt), purificados no laboratório de destilação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (FCFRP-USP), BuOH, grau analítico (Reagem) e água (H₂O) destilada.

Nas análises por cromatografia em coluna utilizou-se MeOH, grau técnico (Mallinkrodt) e água destilada.

No preparo de extratos, fracionamento e solubilização de amostras foi utilizado etanol EtoA, DCM, AcOEt, MeOH, Hex, grau técnico (Mallinkrodt), BuOH grau analítico (Reagem) e água destilada.

Como solvente para preparação das amostras e análise por cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados ACN, HAc, MeOH, Hex grau HPLC (todos da marca J.T. Baker), além de H₂O deionizada (18mΩ; Milli-Q, Millipore), todos filtrados e posteriormente degaseificados com auxílio de bomba de vácuo e banho de ultra-som.

Para solubilização das amostras analisadas pela técnica de ressonância magnética nuclear RMN utilizou-se água deuterada (D₂O), da marca Aldrich.

Detalhes sobre cada um dos métodos estão apresentados a seguir.

3.1.2 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

Foram utilizadas placas de vidro (20 x 20 e 20 x 10 cm) recobertas com uma fina camada (0,25 mm) de sílica gel GF₂₅₄ (Merck). As placas foram ativadas em estufa por 30 minutos a 110⁰C. As amostras então dissolvidas foram aplicadas com

tubo capilar e, após eluição, as placas foram reveladas sucessivamente por exposição à luz ultravioleta (revelador físico) em 254 e 366 nm (lâmpada Mineralight, modelo UVGL-25) e nebulização com H₂SO₄ concentrado ou solução de Ce(SO₄)₄ (1g em 100ml de H₂SO₄ 2N). A seguir as placas foram secas em chapa aquecedora à temperatura de 110⁰C por 2 minutos.

3.1.3 Cromatografia em Camada Fina Comparativa (CCFC).

Foi utilizada folha de sílica gel 60 F₂₅₄ (Riedel-de-Haen), para cromatografia em camada fina com 0,2 mm de espessura e diâmetro de 20 x 20 cm, sendo que ao término da eluição, utilizou-se revelador físico e vapor de iodo para revelação.

3.1.4 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).

Para (CCDP) foram utilizadas placas de vidro (20 x 20 cm) recobertas com uma camada de 1 mm de espessura de sílica gel PF₂₅₄ (Merck). As placas foram ativadas e reveladas por exposição à luz ultravioleta (revelador físico) em 254 e 366 nm.

3.1.5 Coluna Cromatográfica

Para cromatografia por exclusão com Sephadex LH-20, foi utilizada coluna de vidro com 20 mm de diâmetro por 40 mm de altura, empregando como fase estacionária (F.E.) Sephadex LH-20 (Sigma, filtração em gel) 25 cm. Como F.M. utilizou-se uma mistura isocrática de MeOH:H₂O.

3.1.6 Evaporadores Rotativos e Liofilizador.

Para o processo de secagem de extratos e de amostras foram utilizados aparelhos de rota-evaporação Tecnal, modelo Te-120, Buchi, modelo r-124 e liofilizador Virtis, modelo 10-146MR-BA.

3.1.7 Espectroscopia na região do Infravermelho.

Para obtenção dos espectros de infravermelho (IV) foi utilizado aparelho Nicolet modelo Protégé 460 Mogn-ir-technology. As amostras foram analisadas na forma de filme utilizando como solvente clorofórmio.

3.1.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

O desenvolvimento do método e as análises de variações metabólicas foram realizados em um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-6A, equipado com detector de UV-Visível modelo SPD-6AV e com injetores manual (Rheodine 6171) e automático (SIL-10Advp), controlados pelo software CLASS-VP 6.12 (CLAE-UV).

A identificação e/ou confirmação dos picos cromatográficos foi feita em um sistema CLAE acoplado a um detector de UV-DAD e a um espectrômetro de massas (sistema CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM). Assim foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-20A, acoplado a um detector UV-DAD (CBM20A, Shimadzu) e a um espectrômetro de massas UltrOTOF (Bruker Daltonics) com ionização por *electrospray* (ESI) e analisador do tipo QqTOF (analisadores tipo quadrupolo e tempo de voo em seqüência).

Em ambos sistemas foi utilizada uma mesma coluna Sigma-Aldrich analítica (Spherisorb ODS-2, 5 µm, 4,6 mm de diâmetro por 250 mm de altura), acoplada a uma pré-coluna de 1 cm, de material equivalente.

Para a purificação de substâncias foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu modelo LC-6A, com *loop* de 2 ml e coluna preparativa Shimpack ODS 5 µm (20 mm de diâmetro por 250 mm de altura).

3.1.9. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Utilizaram-se os seguintes aparelhos de RMN: Bruker modelos DPX-300, DRX-400 e DRX-500 operando respectivamente em 300 MHz, 400 MHz e 500 MHz para ^1H e 75 MHz, 100 MHz e 125 MHz para ^{13}C .

3.2 Coleta, demarcação e armazenamento de *Eremanthus glomerulatus*.

Foi identificado e demarcado pelo grupo de pesquisa em produtos naturais do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP-USP, uma população de *E. glomerulatus* (população E) composta por 10 indivíduos, situada no município de Ibiraci – MG, na estrada de acesso a São Roque – MG, a partir da rodovia de Franca-Ibiraci, à beira de um abismo (W 47^o. 08'. 229" ; S 20^o. 32'. 046" – 1094 m de altitude). No local da coleta parte do substrato é rochoso e parte já apresenta um solo em desenvolvimento com tonalidade avermelhada. A vegetação ao redor desta população é composta, predominantemente, de pequenas árvores e solo coberto de gramínea. Cada indivíduo foi escolhido aleatoriamente e rotulado com um código composto pelo número da população seguindo por um número de I a X, sendo estes devidamente marcados com placa de alumínio.

De cada indivíduo marcado, monitorado pelo período de aproximadamente dois anos (06/2000 a 04/2002), foi coletado mensalmente em torno das 12:00 horas (± 30 min), um ramo que foi acondicionado em saco de papel, devidamente marcado com o código do indivíduo e código de coleta. Estas amostras foram posteriormente levadas ao laboratório onde os materiais coletados foram secos em estufas de ar circulante a 45^oC por 48h e estocados em *freezer* até o momento do processamento para análise. A tabela 4 demonstra a correlação entre código de coleta, data de

coleta e estação correspondente. A tabela 5 apresenta os dados sobre altura e perímetro dos troncos (principal) dos indivíduos marcados da população E.

Tabela – 4. Dados referentes as amostras coletadas. Código de coleta, data e estação de coleta dos ramos de *E.glomerulatus* (população E).

Código de Coleta	Mês	Ano	Estação
6	junho	2000	Outono
7	julho	2000	Inverno
8	agosto	2000	Inverno
9	setembro	2000	Inverno
10	outubro	2000	Primavera
11	novembro	2000	Primavera
12	dezembro	2000	Primavera
13	janeiro	2001	Verão
14	fevereiro	2001	Verão
15	março	2001	Verão
16	abril	2001	Outono
17	maio	2001	Outono
18	junho	2001	Outono
19	julho	2001	Inverno
20	agosto	2001	Inverno
21	setembro	2001	Inverno
22	outubro	2001	Primavera
23	novembro	2001	Primavera
24	dezembro	2001	Primavera
25	janeiro	2002	Verão
26	fevereiro	2002	Verão
27	março	2002	Verão
28	abril	2002	outono

Tabela – 5. Dados sobre o perímetro e altura do tronco principal da população E.

Dado	Ind. I	Ind. II	Ind. IV	Ind. V	Ind. VI	Ind. VII	Ind. VIII	Ind. IX	Ind. X	Média
Alt. m	3,13	4,66	3,78	3,20	3,15	4,60	3,40	4,30	2,00	3,58
P. cm	23,00	21,00	23,00	10,00	12,00	28,00	18,00	30,00	23,00	20,89

P. perímetro do tronco principal com casca; Alt. Altura; Ind. Indivíduo.

3.3 Preparo e análise das amostras por CLAE-DAD-EM, CLAE-DAD-EM/EM.

Todos os procedimentos e testes para desenvolvimento das metodologias de extração e análise foram realizados no sistema CLAE-DAD, utilizando como amostra as folhas provenientes do indivíduo IV, coleta 16, da população E (código E 16-IV).

3.3.1 Preparo da amostra.

Para o preparo das amostras foram pesadas 5 g de folhas de *E. glomerulatus*, estas foram submetidas a processo de secagem por uma hora em estufa com temperatura não excedendo 40°C. Após a secagem o material foi triturado em gral com auxílio de um pistilo até que todas as folhas fossem transformadas em um pó fino e homogêneo. A seguir, transferiu-se 30mg da amostra para um frasco de vidro, acrescentou-se 3 mL de MeOH:H₂O 9:1 e o material foi submetido a extração em banho de ultrassom por 10 minutos. Alíquotas de 500 µL deste extrato foram retiradas com auxílio de micropipeta (Gilson) e acondicionadas em frascos do tipo eppendorf (1,5mL). As amostras foram particionadas com o mesmo volume de Hex. Para esse procedimento utilizou-se agitador de tubos tipo vortex por alguns segundos, centrifugou-se a 4000rpm por 10minutos, retirou a fração polar com auxílio de uma seringa e filtrou-se em filtro de acetato de celulose 0,45µm (Millipore).

3.3.2 Análise por CLAE-DAD.

A fim de separar e identificar os metabólitos secundários majoritários da espécie em estudo foi adaptada a metodologia cromatográfica já desenvolvida e validada por Sakamoto (2004). Esta metodologia consiste na injeção de 20 µL da amostra, via injetor manual, na coluna cromatográfica, utilizando fluxo de 1,0 mL por minuto e com fase móvel composta de H₂O com 2 % de HAc (bomba de fluxo A) e ACN com com 2 % de HAc (bomba de fluxo B), seguindo gradiente descrito na tabela 6.

Tabela – 6 Gradiente de eluição utilizados para as análises por CLAE-DAD, CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM.

Tempo	ACN (%)
0,01	10
5	25
10	25
15	40
20	40
25	50
35	55
40	10
50	10

3.3.3 Análise por CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM

As análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM (CLAE acoplada a DAD e a espectrometria de massas operando no modo EM/EM, isto é, gerando espectros de íons produtos a partir da fragmentação de íons precursores selecionados induzida em célula de colisão) foram realizadas utilizando-se as mesmas condições cromatográficas das análises realizadas por CLAE-DAD. As amostras a serem analisadas também foram preparadas do mesmo modo, porém as extrações foram realizadas partindo-se de uma alíquota de 50 mg de folhas pulverizadas e mesmo volume de solvente extrator (3 mL).

O eluente da coluna foi direcionado por um divisor de fluxo em uma proporção de 3:1, sendo o fluxo maior direcionado ao DAD e o restante ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas na região de UV-Visível gerados pelo DAD foram registrado na faixa de 200 a 700nm sendo monitorados a 270nm. Os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre 50 e 850 m/z e os parâmetros do espectrômetro de massas listados a seguir foram mantidos os mesmos em todas as análises: 1000 *scans* por segundo; intervalo entre espectros: 2 segundos; fluxo do gás de secagem: 5,0 L/min; temperatura do gás de secagem: 180⁰C; pressão do gás de nebulização (nitrogênio): 4 bar.

Após as análises de CLAE-DAD-EM, os tempos de retenção e m/z obtidos para cada sinal dos cromatogramas gerados foram utilizados para determinar os parâmetros para a posterior análise por CLAE-DAD-EM/EM. Ou seja, para a obtenção de espectros de íons produtos (EM/EM) a partir dos íons precursores desejados foi informado ao software do espectrômetro de massas o m/z de cada íon precursor que deveria ser fragmentado na célula de colisão e seu respectivo tempo de retenção. A dissociação induzida por colisão (fragmentação) foi realizada utilizando-se N_2 como gás de colisão e, a energia de colisão variou entre 8 e 25eV.

3.3.4 Identificação dos picos cromatográficos.

Os picos cromatográficos foram identificados comparando os dados já existentes na literatura com os espectros no UV, massa exata obtida para íons precursores (molécula protonada $[M + H]^+$ e/ou molécula desprotonada $[M - H]^-$ e/ou molécula cationizada $[M + Na]^+$) em alta resolução. Também foram utilizados os espectros de íons produto gerados por dissociação induzida por colisão em modo EM/EM, provenientes da análise da amostra E 16-IV. Tais dados foram gerados a partir de análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, tanto no modo de ionização positiva quanto negativa.

Os picos em que os dados gerados não apresentam relatos suficientes na literatura para sua identificação, foram isolados e identificação pela técnica de RMN.

3.4. Estudo fitoquímico das folhas de *Eremanthus glomerulatus*.

Para este estudo foi utilizado extrato bruto etanólico preparado previamente pela separação de 850,0 g de folhas de *E. glomerulatus*, proveniente de ramos coletados em Ibiraci (MG), mesmo local de coleta das amostras para o estudo das

variações sazonais, estas foram secas em temperatura não excedendo 40 °C, moídas e submetidas a extrações exaustivas por maceração com etanol e, em seguida, com diclorometano. Após a evaporação dos solventes sob pressão reduzida, em evaporadores rotativos, foram obtidos 150,0 g de extrato etanólico e 85,0 g de extrato diclorometânico.

3.4.1 Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *E.glomerulus*.

Parte do extrato etanólico (30 g) foi suspenso com 500 mL de Hex, homogeneizado em banho de ultrassom e filtrado em papel de filtro. Após a evaporação do solvente sobre pressão reduzida, em evaporador rotativo, o filtrado, extrato hexânico, foi armazenado em *freezer*, para ser posteriormente analisado. O precipitado foi resuspenso em 500 mL de MeOH:H₂O (7:3 v/v) e particionado com DCM (3 X 250 mL). A fase diclorometânica foi concentrada sob pressão reduzida, (em evaporador rotativo), originando o extrato DCM. Adicionou-se 400mL de água à fase MeOH:H₂O e particionou-se com AcOEt (3 X 250 mL). A fase referente ao AcOEt foi concentrada sob pressão reduzida originando o extrato AcOEt. À fase aquosa, foi adicionada 300 mL de água e procedeu-se a partição com BuOH (3 X 100 mL). Acrescentou-se 300 mL de água a fase BuOH e esta foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, originando o extrato BuOH. A fase aquosa foi armazenada em geladeira para posterior liofilização e análises. Os extratos DCM, AcOEt e BuOH foram analisados por IV para verificação de grupos funcionais.

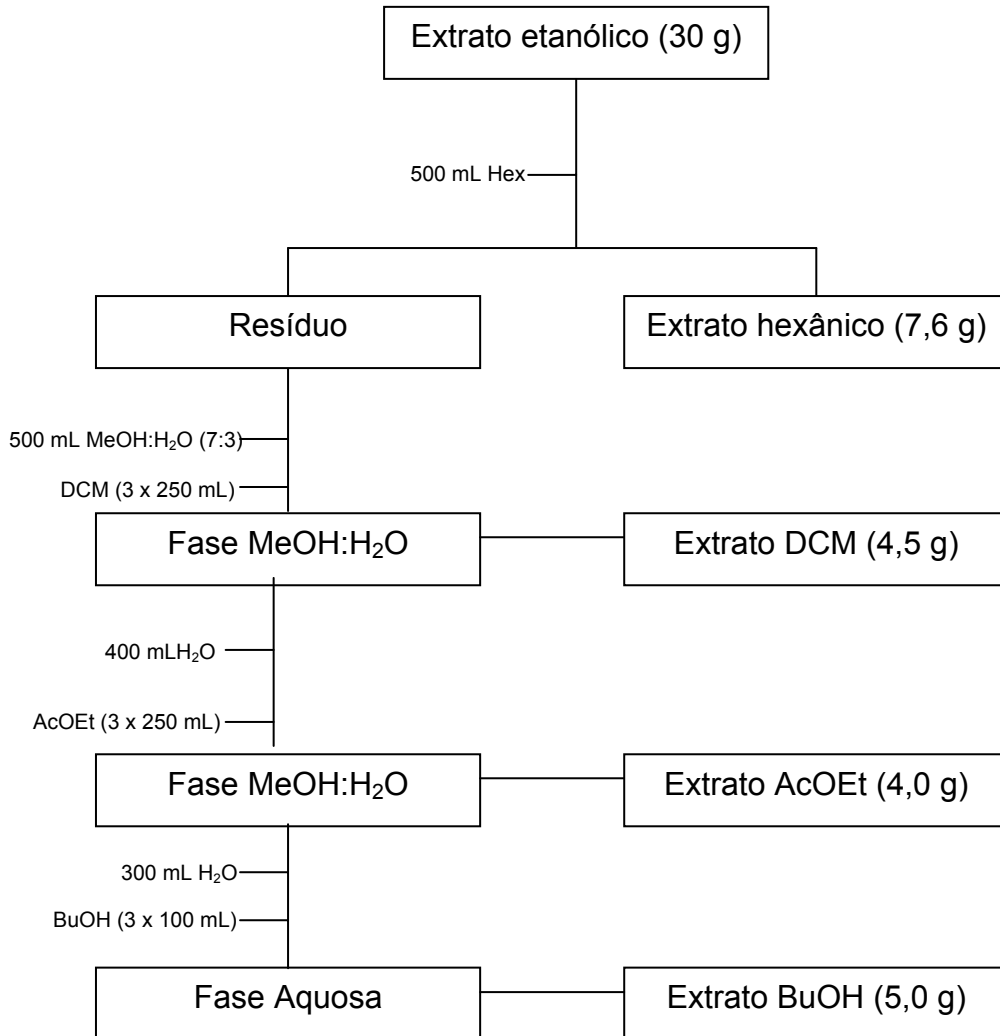


Figura 4. Organograma do fracionamento do extrato etanólico das folhas de *E. glomerulatus*.

3.4.1.1 Fracionamento do extrato BuOH

A fim de isolar os constituintes majoritários do extrato em análise, foram realizadas análises em placas de CCDC, sendo testados três eluentes diferentes, AcOEt : DCM (7 : 3), BuOH : HAc : H₂O (60 : 15 : 25) e AcOEt : MeOH : H₂O (80 : 12 : 8). As placas foram reveladas com luz UV e H₂SO₄. O eluente composto por AcOEt : MeOH : H₂O (80 : 12 : 8), apresentou a melhor resolução, podendo observar na placa a presença de duas manchas com fatores de retenção diferentes (R.f).

Para separar estes constituintes, uma amostra do extrato em análise (250 mg) foi suspensa em MeOH e aplicada em 10 placas de CCDC, utilizando-se o mesmo eluente anterior. Ao término da eluição, as placas foram reveladas com luz UV, delineadas as regiões de adsorção e raspadas com auxílio de espátula. O material adsorvido a sílica foi extraído com MeOH em banho de ultrason e filtrado a vácuo em funil com placa sinterizada. Após estes procedimentos as frações foram concentradas sob fluxo de ar comprimido, sendo nomeadas de frações BuOH 1 e BuOH 2, de acordo com a ordem crescente de R.f. Para aumento do rendimento destas frações tal procedimento foi realizado 4 vezes, obtendo-se um rendimento de aproximadamente 70 mg para fração BuOH 1 e 300 mg para fração BuOH 2. A seguir as frações ambas foram aplicadas em CCDC fase normal e eluídas em BAL (BuOH:AcOEt:H₂O 80:12:8) e foi observado que ambas ainda não se encontravam isoladas, sendo necessário utilizar um novo processo de purificação.

A fim de purificar a fração BUOH 2, a mesma foi solubilizada em (MeOH:H₂O 8:2), aplicada ao topo de uma coluna Sephadex e eluída com (MeOH:H₂O 8:2), sendo coletado 44 frações. As frações foram aplicadas em placas de CCDC e eluídas em BAL. Após revelação com luz UV e H₂SO₄, foram reunidas, renomeadas,

secas em ar comprimido e tiveram suas massas e identificações determinadas conforme é demonstrado na tabela 7.

Todas novas frações foram enviadas para análises por RMN – ^1H e ^{13}C em D_2O a com a finalidade de comprovar suas purezas e iniciar os processos de identificação.

Tabela – 7 Reunião das frações provenientes da fração BuOH 2, novas denominações e rendimento.

Frações Reunidas	Nova Denominação	Massa obtida
1 – 10	SBuOH-2.1	17mg
11 – 12	SBuOH-2.2	9,2mg
13 – 21	SBuOH-2.3	73,1mg
22 – 29	SBuOH-2.4	171,1mg
30 – 32	SBuOH-2.5	4,4mg
33 – 36	SBuOH-2.6	4,2mg
37 – 44	SBuOH-2.7	3,7mg

Para purificação da fração BUOH 1, a mesma foi solubilizada em (MeOH:H₂O 3:2), aplicada ao topo de uma coluna Sephadex e eluída com (MeOH:H₂O 3:2), coletando-se 30 frações. Para reunião destas frações utilizou-se placas de CCDC fase normal eluídas em BAL. Após revelação com luz UV e H₂SO₄, foram reunidas, renomeadas, secas em ar comprimido e tiveram suas massas determinadas conforme é demonstrado na tabela 8.

Tabela – 8 Reunião das frações provenientes da fração BuOH 1, novas denominações e rendimento.

Frações Reunidas	Nova Denominação	Massa obtida
1 – 4	SBuOH-1.1	5,4mg
5 – 18	SBuOH-1.2	17,4mg
19 – 20	SBuOH-1.3	3,1mg
21 – 23	SBuOH-1.4	2,8mg
24	SBuOH-1.5	1,5mg
25 – 30	SBuOH-1.6	6,3mg
31 – 34	SBuOH-1.7	4,8mg
35 – 37	SBuOH-1.8	3,0mg

Estas frações, conforme procedimento realizado para análise de pureza e início do processo de identificação das frações originadas da fração BuOH 2, também foram enviadas para análise por RMN – ^1H e ^{13}C em D_2O .

3.4.1.2. Fracionamento do extrato BuOH por CLAE-UV.

Devido o fato de que nem todas as substâncias de interesse terem sido obtidas pelo método fitoquímico clássico, houve a necessidade de fracionar o extrato BuOH pelo sistema CLAE-UV. A fração BuOH foi analisada conforme método estabelecido no item 3.5.1 sem a presença de HAc na fase móvel. Após a definição do tempo de retenção das substâncias de interesse, efetuou-se o fracionamento utilizando-se uma coluna preparativa ODS Shimpack 20 x 250 mm, com detector operando em $\lambda = 270$ nm e fluxo de 9,0 mL/min de ACN:MeOH (80:20), em condições de gradiente preparativo conforme estabelecido na tabela 9. A amostra foi preparada na concentração de 60 mg/mL, sendo aplicada 1 mL por análise via injetor manual com *loop* de 2 mL. Nesta análise coletou-se oito frações (após cinco injeções da amostra), que foram secas por pressão reduzida seguida de liofilização e

novamente injetadas no sistema CLAE-UV (conforme método estabelecido no item 3.5.1). Após análise dos cromatogramas gerados, a fração 1 (PREP – 1), foi estabelecida como substância de interesse e analisada por EM.

Tabela – 9 Gradiente de eluição preparativo utilizado para fracionamento do extrato BuOH por CLAE-UV.

Tempo	Bomba de fluxo B (%)
0,01	10
50	19
60	10
65	10

3.5 Estudo das variações sazonais das folhas de *Eremanthus glomerulatus*.

Todos os procedimentos realizados para desenvolvimento de método analítico, extração e análise de estabilidade foram realizados no sistema CLAE-UV, utilizando como amostra as folhas provenientes do indivíduo E 16-IV.

3.5.1 Desenvolvimento de método analítico.

Ao se testar o método analítico utilizado no sistema CLAE-DAD, no sistema CLAE-UV, verificou-se a baixa resolução entre os picos majoritários sendo necessário o ajuste do método. Para esse objetivo foram testadas várias F.M sendo que a mais adequada foi aquela em que injetou-se 20 µL da amostra via injetor manual, na coluna cromatográfica, utilizando fluxo de 1,0 mL por minuto, λ 270 nm e com fase móvel composta de H₂O com 2 % de HAc (bomba de fluxo A) e ACN:MeOH:HAc 78 : 20 : 2 (bomba de fluxo B), seguindo gradiente descrito na tabela 10.

Tabela – 10 Gradiente de eluição utilizados para as análises sazonal por CLAE-UV

Tempo	Bomba de fluxo B (%)
0,01	10
25	19
35	19
50	25
60	30
70	35
75	100
80	100
85	10
90	10

Essa metodologia foi capaz de separar com parâmetros aceitáveis de resolução oito picos cromatográficos, sendo estes definidos de acordo com a ordem crescente de tempo de retenção (T.R.), conforme é ilustrado na figura 5. Porém para certificar a correta identificação dos picos gerados, foi realizado uma nova análise no sistema CLAE-DAD-EM no modo positivo e negativo, utilizando estas novas condições, a fim de comparar os espectros de UV e massa exata obtida para íons precursores em alta resolução com os dados gerados no item 3.3.3.

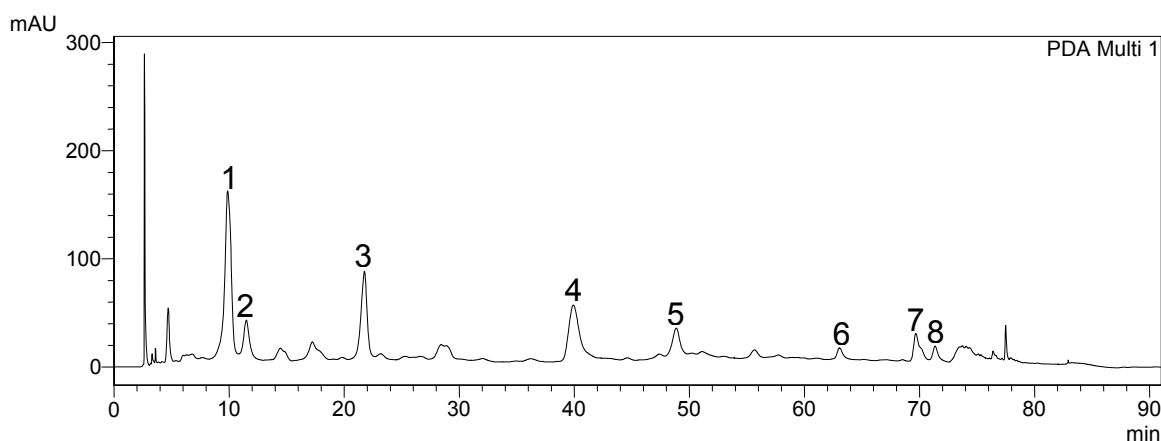


Figura 5. Perfil cromatográfico registrado em 270nm do individuo E 16-IV.

3.5.2 Preparo e extração da amostra.

Pra verificar a existência ou ausência de variações de concentração dos compostos majoritários a serem analisados em folhas de idades diferentes, retirou-se do *freezer* a amostra do individuo E 22-VII, secando-a por uma hora em estufa com temperatura não excedendo 40°C, As folhas novas foram separadas das velhas e trituradas separadamente, em moinho analítico até que toda folha fosse transformada em um pó fino e homogêneo. A seguir 30mg de cada amostra foi transferida para um frasco de vidro, acrescentando-se 3 mL de MeOH:H₂O 9:1, contendo o padrão interno cumarina na concentração de 20 µg/mL. O solvente extrator foi preparado a partir da diluição, com MeOH/H₂O 9:1, de uma solução estoque de cumarina a 1,0 mg/mL em MeOH/H₂O 9:1, a qual foi mantida em *freezer*.

As amostras então foram extraídas em banho de ultrassom por 10 minutos. Alíquotas de 600 µL destes extratos foram retiradas com auxílio de micropipeta (Gilson) e acondicionadas em frascos do tipo eppendorf (1,5 mL). Particionou-se com o mesmo volume de Hex, utilizando um agitador de tubos tipo vortex por alguns segundos e centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Após esse processo retirou-se a fração polar com auxílio de uma seringa e esta foi filtrada em filtro de 0,45 µm (Millipore) diretamente para frascos de auto-injetor do sistema de CLAE-UV, os quais foram tampados com septo faceado com teflon.

As amostras foram injetas na coluna do sistema CLAE-UV, conforme condições estabelecidas no item 3.5.1. Após análise foi verificado que há variação de concentração dos compostos majoritários entre as folhas novas e velhas. Com base nessa informação optou-se em amostrar o ramo no todo para que variações como esta não influenciem no resultado final deste estudo. A figura

6 demonstra os cromatogramas das folhas novas e velhas de um mesmo ramo do indivíduo E 22-VII.

Para avaliar a capacidade de extração de metabólitos secundários de baixa e média polaridade, amostras do mesmo indivíduo utilizado para desenvolver a metodologia, foram submetidas a quatro extrações consecutivas. Entre cada extração o material era filtrado e analisado por CLAE-UV e as áreas dos picos das substâncias majoritárias foram utilizadas para determinar a contribuição de cada extração individual em relação ao total (somatória das 4 extrações).

3.5.3 Análise da estabilidade da amostra.

Para determinação da estabilidade dos constituintes das amostras, foram comparados os dados obtidos da amostra analisada por CLAE-UV imediatamente após o preparo e após 24, 48, 72 e 120 horas. A média da variação da área relativa observada para cada pico foi utilizada para a construção de um gráfico de porcentagem de variação em função do tempo.

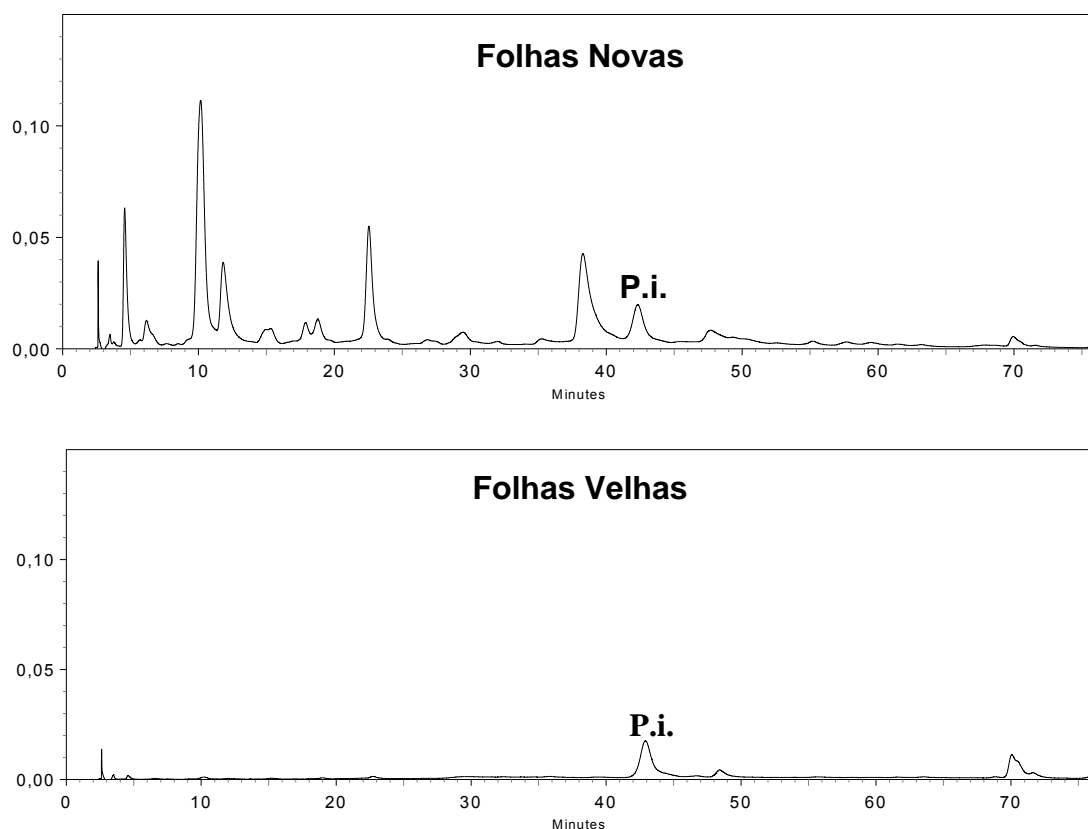


Figura 6. Cromatogramas (270 nm) exemplificando a variação quantitativa entre o metabolismo secundário de folhas novas e velhas provenientes de um mesmo ramo do indivíduo E 16-IV. (P.i. padrão interno).

3.5.4 Análise sazonal dos indivíduos.

3.5.4.1 Escolha dos indivíduos.

Para escolha dos indivíduos a serem analisados utilizou-se aleatoriamente a coleta 22. As maiores diferenças no perfil cromatográfico foram observadas nos indivíduos I, IV e X, sendo que com o agrupamento das substâncias por classe (derivados fenólicos, ácidos cafeoilquínicos e flavonóides) foi possível observar que o indivíduo I possui como tendência produzir em maior quantidade os derivados fenólicos, o indivíduo IV possui uma baixa produção para todas as classes e o indivíduo X produz todos as classes em uma proporção relativamente igual. Devido ao fato destes indivíduos serem os que apresentam maior diferenciação dentro da população, os mesmos foram selecionados para o estudo de variação sazonal. Tais dados podem ser observados na figura 7.

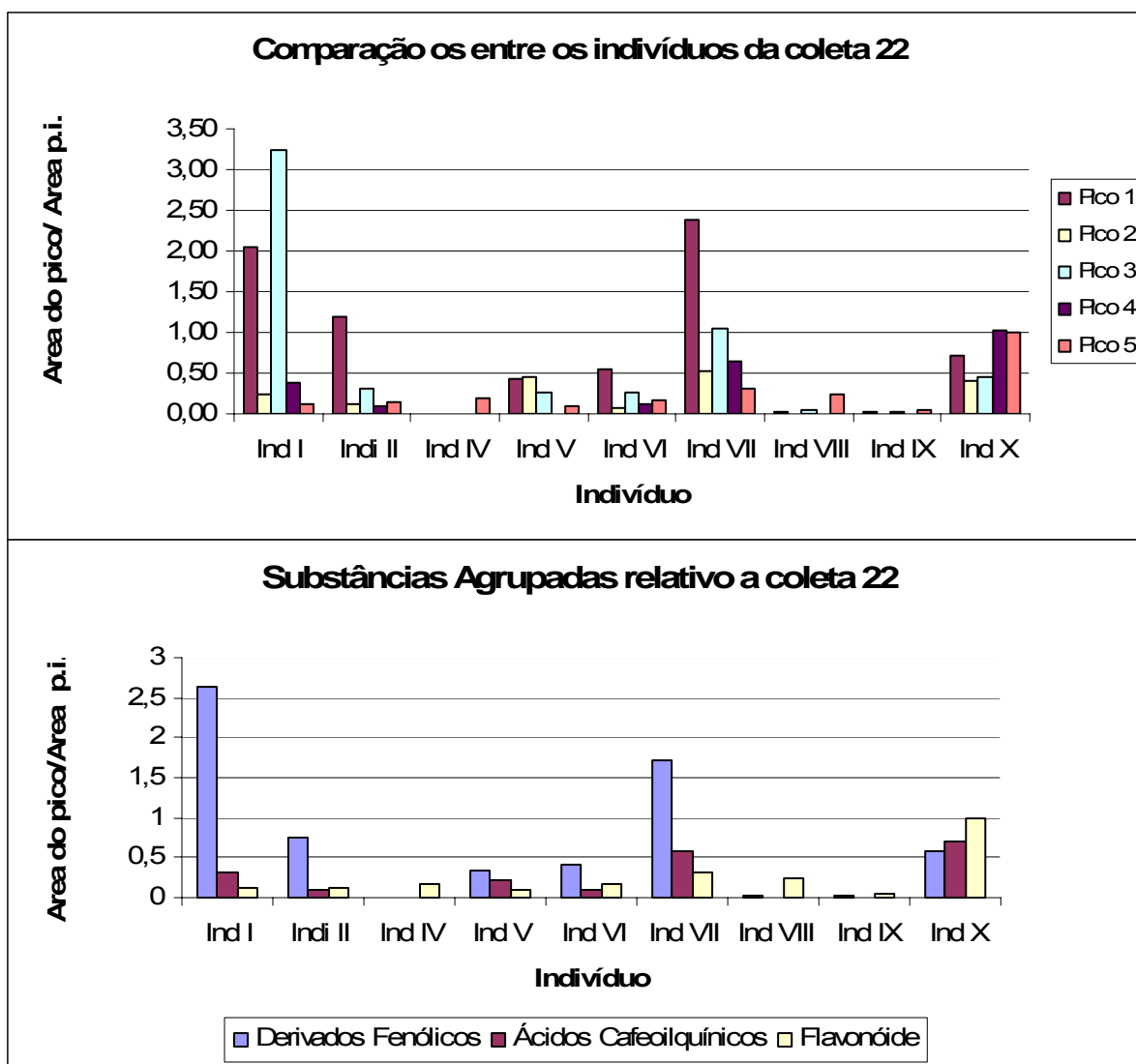


Figura 7. Gráfico comparativo de produção de metabólitos secundários majoritários entre os indivíduos da população E, referente à coleta 22.

3.5.4.2 Análise das amostras.

Após definição dos indivíduos a serem analisados, uma amostra de cada uma das 23 coletas, referente a cada um dos indivíduos selecionados (indivíduo I, IV e X), foi analisada pelo método CLAE-UV, utilizando a metodologia de extração já descrita no item 3.5.2. Ao término de todas as análises os cromatogramas gerados foram analisados e verificou-se que dos 8 picos majoritários seria possível a análise de variações sazonal do picos 1, 2, 3, 4 e 5. Os demais picos ou apresentam baixas concentrações ou sofrem alterações em suas áreas ao longo do estudo devido a

existência de variações qualitativas das amostras, tal fato impede suas corretas identificações e quantificações. Para que este tipo de variação não influencie no resultado final, decidiu-se não analisá-los quanto a variações sazonal.

Desta forma, para análise de sazonalidade na concentração de metabólitos, foi construída uma planilha com as áreas relativas obtidas para cada metabólito de cada indivíduo. Com estes dados, foram construídos gráficos de variação mensal das áreas relativas dos metabólitos majoritários agrupados por classe (pico 1, 2, 3, 4 e 5) esboçando a variação de cada metabólito de cada indivíduo em relação a sua média de produção durante todo o estudo.

3.5.4.3 Avaliação da repetibilidade do método analítico.

Para certificar a repetibilidade do método desenvolvido e garantir a ausência de possíveis erros instrumentais ou analíticos, amostras dos indivíduos I, IV e X referente às coletas 8, 11, 17, 23 e 28 foram analisadas em triplicatas e calculado seus desvios padrão e coeficiente de variação, tomando como variação aceitável desvios de ($\pm 5\%$). Estas amostras foram selecionadas por apresentarem em algum momento do estudo, variações na concentração de seus metabólitos em relação as suas médias muito discrepantes, em um ou mais dos indivíduos, selecionados para esta parte do estudo.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 – Resultados e Discussão

4.1 Identificação dos compostos majoritários da folhas de *E. glomerulatus*.

O processo de identificação dos compostos majoritários das folhas de *E. glomerulatus* ocorreu em duas etapas. Primeiramente foi realizado um estudo de desreplicação utilizando os dados gerados pelas análises nos sistemas CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM. Algumas substâncias não puderam ser identificadas e optou-se pela tentativa de seus isolamentos e determinação estruturais por RMN e EM.

4.1.1. Identificação dos picos cromatográficos por CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD EM/EM.

Para identificação destes picos cromatográficos (figura 5 item 3.5.1 e figura 1 do apêndice) foi utilizado os dados gerados a partir de análises por CLAE-DAD/EM e CLAE-DAD-EM/EM, tanto no modo de ionização positivo quanto negativo.

4.1.1.1. Ácido 5-O-*E*-cafeoilquínico – Pico 2.

O termo ácido cafeoilquínico é usado para designar uma família de ésteres formados pela esterificação de um derivado do ácido *trans*-cinâmico com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH),3,4,5-tetra-hidroxíciclohexanóico); este último com hidroxilas na posição axial nos carbonos 1 e 3 e hidroxilas equatoriais nos carbonos 4 e 5. Isto gera séries de isômeros de posição ou seja, subgrupos de substâncias com um mesmo número de ácidos *trans*-cinâmicos esterificados em posições diferentes no ácido quínico (CLIFFORD, 1999, 2000; CLIFFORD *et al.* 2003, 2006; MARIA & MOREIRA 2004; MOLGARD; RAVN, 1988).

O pico cromatográfico 2 apresentou nos espectros de massas o íon m/z 353 como pico base em modo de ionização negativa e íon m/z 355 no modo positivo e espectro de UV característico de ácidos cafeoilquínicos (UV max: \approx 299 e 325 nm). O espectro de íons produto obtidos para o íon precursor m/z 353 (modo negativo) e m/z 355 (modo positivo) apresentaram os íons produtos m/z 191 e m/z 163 respectivamente. Comparando estes resultados com os dados das chaves de identificação de ácidos cafeoilquínicos (ACQ) por CLAE-EM/EM publicados por Clifford et al. (2003, 2005, 2006) foi possível a identificação da substância em análise. Segundo estes autores o íon precursor m/z 353 como pico base no espectro de massas em modo de ionização negativa é um dado indicativo de ácido quínico esterificado com uma única unidade de ácido caféico, sendo estes apresentados em uma série de isômeros de posição. A confirmação desta identificação se dá através da análise dos íons produtos que para o ácido 5-O-*E*-cafeoilquínico apresentam m/z 191 como pico base e m/z 179.5 com intensidade relativa menor que 5%.

Tais informações comparadas aos dados gerados para o pico 2 (Tabela 11 e Figura 3 do Apêndices), puderam levar a confirmação deste como sendo ácido 5-O-*E*-cafeoilquínico. Além disso, o pico 3 também teve seu tempo de retenção comparado com um padrão de mesma identidade. As massas moleculares obtidas para as moléculas protonadas e desprotonadas também estão de acordo com as massas calculadas para um ácido cafeoilquínico ($C_{16}H_{17}O_9$): $[M-H]^-$ 353,09 e $[M+H]^+$ 355,09.

4.1.1.2. Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico – Pico 4.

O ácido di-cafeoilquínico é constituído por duas unidades de ácido caféico esterificados em um ácido quínico gerando uma série de seis isômeros de posição (CLIFFORD, 1999, 2000; CLIFFORD *et al.* 2003, 2006; 2007). Os espectros de íons produto (EM/EM) no modo de ionização positiva não foram muito informativos para diferenciação destes isômeros, sendo assim a identificação foi baseada principalmente nos espectros de íons produtos gerados no modo de ionização negativa, bem como nos dados de massas obtidas para os íons precursores $[M - H]^-$ espectros de UV.

O pico 4 (Tabela 11 e Figura 5 do Apêndice) apresentou espectro de UV idêntico aos ácidos cafeoilquínicos, conforme já citado no item 4.1.1.1, e picos base no espectro de massas no modo de ionização positivo de m/z 517 e m/z 499, que representa um ácido di-cafeoilquínico desidratado $[M - H_2O]^+$. No modo de ionização negativa apresentou um íon de m/z 515, o que condiz com um ácido di-cafeoilquínico. Porém sua perfeita identidade só pode ser obtida através da análise dos dados gerados pelos espectros de íons produtos obtidos na fragmentação do íon precursor m/z 515 em modo negativo.

É característico dos ácidos di-cafeoilquínicos com uma unidade de ácido caféico esterificada na posição 4, a geração do fragmento m/z 173, referente a unidade de ácido quínico desidratada. Para estes isômeros é necessário uma eliminação de H_2O a partir de uma das hidroxilas vizinhas antes da eliminação da unidade de ácido caféico (CLIFFORD, 1999, 2000; CLIFFORD *et al.* 2003, 2006;). Comparando os resultados dos íons produtos gerados pelo pico 4 com as chaves de identificação de ácidos cafeoilquínicos (ACQ) por CLAE-EM/EM publicados por

Clifford *et al.* (2003, 2005, 2006) pode-se identificar este pico como sendo o ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico.

Além disso, as massas moleculares obtidas para as moléculas protonadas e desprotonadas também estão de acordo com as massas calculadas para o ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico ($C_{25}H_{24}O_{12}$): requerem $[M-H]^-$ 515,13 e $[M+H]^+$ 517,12, podendo assim atribuir o pico 4 a substância ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico .

4.1.1.3. Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo – Pico 5

Os espectros de massas relativos ao pico 5 (Tabela 11), são compatíveis com a fórmula molecular ($C_{22}H_{22}O_{12}$), que está de acordo com o flavonóide Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-Glucopiranosídeo, substância esta já isolada anteriormente na espécie em estudo prévio realizado por Sakamoto (2004).

A identificação desta substância deu-se inicialmente pela comparação do tempo de retenção e espectro de UV com padrão disponível no laboratório.

O sinal desta substância no cromatograma detectado por espectrometria de massas no modo de ionização positiva mostrou-se pouco intenso, o que indica uma capacidade de ionização relativamente inferior neste modo. Por outro lado no modo de ionização negativa um espectro de íons produto foi adquirido com sucesso (Figura 6 do Apêndice), sendo que os resultados obtidos estão de acordo com as fragmentações descrita na literatura (ROCHFORT *et. al.* 2006; ROMANI *et. al.* 2006; ABLAJAN *et al* 2005; KAMMERER *et. al.* 2004; PAREJO *et. al.* 2004; RÖSCH *et. al.* 2004; SALCES *et. al* 2004) e as massas obtidas (Tabela 11) são compatíveis com massa molecular calculada para a substância Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo ($C_{22}H_{22}O_{12}$): $[M-H]^-$ 477,11 e $[M+H]^+$ 479,10, confirmando assim a atribuição desta substância ao pico 5.

4.1.1.4. 3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)- β -glicosilkaempferol – Pico 7

A massa molecular obtida para este pico (Tabela 11) é compatível com a fórmula molecular do tilirosídeo: (C₃₀H₂₆O₁₃). A presença de m/z 309 no espectro de íons produtos no modo de ionização positiva (Figura 8 do Apêndice) confirma a presença de uma unidade cumaroilglicose. Como uma unidade cumaroilglicose possui a mesma massa molecular nominal (ou seja, 309 u.m.a.) de uma unidade rutinose (glicose + ramnose) e ambas são de ocorrência relativamente comum em flavonóides, a obtenção de um espectro de íons produto com massas moleculares acuradas foi necessária para a diferenciação entre estas duas possibilidades. Assim a massa molecular acurada obtida para o íon (m/z 309,0991; Tabela 11) confirmou a fórmula molecular de uma unidade cumaroilglicose: C₁₅H₁₇O₇, com erro de \pm 5,4 ppm, ao passo que uma unidade rutinose tem uma fórmula molecular C₁₂H₂₁O₉ e massa molecular exata de 309,1186. Similarmente, a massa acurada obtida para o íon produto m/z 147,0441 (Tabela 11) confirmou a presença de uma unidade cumaroil (C₉H₇O₂) com erro de \pm 3,4 ppm, enquanto uma unidade ramnose (C₆H₁₁O₄) tem uma massa exata calculada de 147,0675. O pico base m/z 287 no espectro de íons produto no modo de ionização positiva (FIGURA 8, Tabela 11) corresponde a aglicona Kaempferol protonada.

4.1.1.5. 3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)- β -glicosiloramnetina – Pico 8

O pico 8 produziu no espectro de massas, em ambos os modos de ionização, picos base 30 u.m.a maior que os obtidos para o tilirosídeo (Item 4.1.1.4) . As massas moleculares obtidas para este pico (Tabela 11) indicam a fórmula molecular C₃₁H₂₈O₁₄, indicando que a molécula trata-se do tilirosídeo com uma hidroxila e uma metila como substituintes adicionais. A presença de uma unidade cumaroilglicose é

novamente confirmada pela fragmentação no modo de ionização positiva (Figura 9 Apêndice) e pelas massas moleculares acuradas obtidas para os íons produto m/z 309,0978 e 147,0462 com erros de $\pm 1,2$ ppm e $\pm 10,2$ ppm, (Figura 9 Apêndice). A confirmação deste grupo leva a conclusão de que a hidroxila e a metila adicionais em relação ao tilirosídeo estão na aglicona, o que é confirmado pelo íon produto m/z 317, isto é: assim como o íon m/z 287 corresponde à aglicona protonada no espectro do tilirosídeo, o íon m/z 317 no espectro desta substância confirma a massa molecular da aglicona como 316 u.m.a. A análise conjunta destes dados comparado com os resultados já obtidos por Gobbo (2007) para a mesma substância pode confirmar o pico 8 como 3-O-(6''-O-*E-p*-cumaroil)- β -glicosilisoramnetina, a qual também já foi isolada por em espécie da mesma tribo (GRAEL et al., 2005).

4.1.1.6. 3-O-(6''-O-*E-p*-cumaroil)- β -glicosilquercetina – Pico 6

O pico 6 produziu no espectro de massas, em ambos os modos de ionização, pico base 16 u.m.a maior que o obtido para o pico 7 (Item 4.1.1.4.) As massas moleculares obtidas para este pico (Tabela 11) indicam a fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{14}$, sugerindo que a molécula também trata-se do tilirosídeo com duas hidroxilas como substituintes adicionais. Porém, a presença da unidade cumaroilglicose não pode ser confirmada diretamente, pois não houve fragmentação no modo positivo e no modo negativo não apresentou o íon produto relativo a esta unidade. Entretanto, com a análise dos fragmentos gerados no modo negativo (Figura 7 do Apêndice) pode-se observar que a massa acurada relativa a diferença entre o pico base e a primeira fragmentação (m/z 609,1400 – m/z 463,0997) é de m/z 146,0403, podendo assim confirmar a presença de uma unidade cumaroil

desprotonada $C_9H_7O_2$. Tal fato pode também ser confirmado pela massa acurada relativa a diferença entre pico base e o segundo fragmento (m/z 609,1400 – m/z 301,0425) que é de 308,0975, que corresponde a uma unidade cumaroilglicose desprotonada $C_{15}H_{16}O_7$. Todos estes dados também foram comparados com os da literatura (VVEDENSKAYA et. al. 2004) e desta forma pode-se confirmar a identidade do pico como sendo 3-O-(6"-O-*E-p*-cumaroil)- β -glicosilquercetina.

Tabela 11. Identificação dos picos cromatográficos do extrato polar das folhas de *E. glomerulatus* e dados de UV e espectrometria de massas obtidos por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM.

*Pico	t.r. (min)	Substâncias	Ionização positiva Íons precursores	Ionização positiva EM/EM (<i>m/z</i>)	Ionização negativa Íons precursores	Ionização negativa EM/EM (<i>m/z</i>)	UV Max nm
1	9,9	5'-O-cafeoil-β-apiofuranosil-(1'→6)- O-β-glicopiranosídeo	[M - H ₂ O] ⁺ 457,12	—	[M - H] ⁻ 473,13	413,12; 383,11; 353,10; 311,08; 251,06; 179,04	296, 324
2	11,5	Ácido 5-O-E-cafeoilquínico	[M + H] ⁺ 355,09	163,04	[M - H] ⁻ 353,09	191,06	299, 326
3	21,8	4-fenol-1-O-(5''-O-cafeoil)-β- apiofuranosil-(1''→6'')-O-β- glucopiranosídeo.	[M + Na] ⁺ 589,14	—	[M - H] ⁻ 565,1596	455,1299; 353,0953; 179,0403; 161,0282	295, 326
4	39,9	Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico	[M + H] ⁺ 517,12	—	[M - H] ⁻ 515,13	353,10; 191,06; 179,04; 173,05	296, 324
5	55,7	Quercetina 3'-O- metil-3-O-β-D- glucopiranosídeo	[M + H] ⁺ 479,10	317,07	[M - H] ⁻ 477,11	391,17; 314,05; 285,05; 271,02; 257,06; 243,03	300, 330
6	63,0	3-O-(6''-O-E- <i>p</i> -cumaroil)-β- glicosilquercetina	[M + H] ⁺ 611,12	—	[M - H] ⁻ 609,13	463,0997; 301, 0425; 179,0118	315
7	69,7	3-O-(6''-O-E- <i>p</i> -cumaroil)-β- glicosilkaempferol	[M + H] ⁺ 595,13	309,0991; 291,0910 287,0594; 147,0441	[M - H] ⁻ 593,14	447,1029; 285,0476	313
8	71,0	3-O-(6''-O-E- <i>p</i> -cumaroil)-β- glicosilsoramnetina	[M + H] ⁺ 625,14	317,0702; 309,0978; 291,0906; 165,0119; 147,0462	[M - H] ⁻ 623,15		311

*Os números dos picos são referente a figura 5 item 3.5.1.

4.1.2. Identificação e elucidação estrutural dos picos cromatográficos por RMN e EM.

4.1.2.1 Identificação da fração BUOH 2.4.

A substância BuOH 2.4, isolada da fase butanólica do extrato etanólico das folhas de *E. glomerulatus* (conforme procedimento descrito no item 3.4.1.1), apresentou-se na forma de um sólido marrom amorfo solúvel apenas em água. A análise desta substância por métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C), métodos espectrométricos (ESI-MS) e comparação de dados com referências bibliográficas (SAKAMOTO 2004), permitiu-nos identificá-la como sendo um derivado fenólico glicosilado e esterificado, denominado de 4-fenol-1-O-(5''-O-Cafeoil)- β -apiofuranosil-(1'' \rightarrow 6')-O- β -glucopiranosídeo.

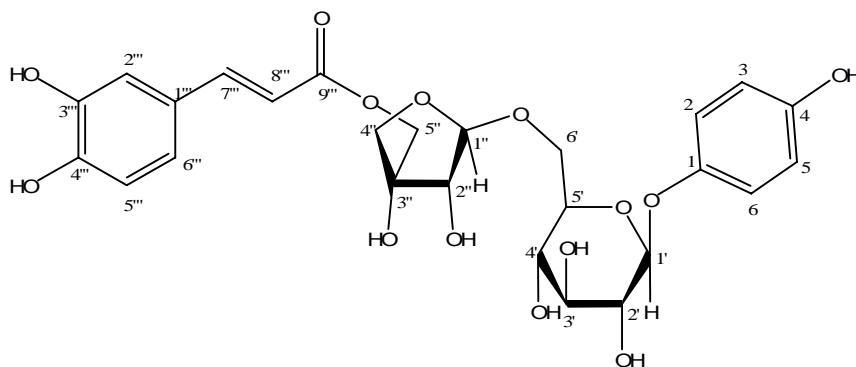


Figura 8. 4-fenol-1-O-(5''-O-Cafeoil)- β -apiofuranosil-(1'' \rightarrow 6')-O- β -glucopiranosídeo

Os dados de RMN- ^1H e de ^{13}C de BuOH 2.4 estão disponíveis nas Figuras 10 a 15 do apêndice e reunidos na tabela 12.

A análise destes dados revelou a presença de sinais na região de hidrogênios aromáticos ($\approx \delta$ 6,62 – 6,87 ppm) e na região dos hidrogênios de açúcares ($\approx \delta$ 3,36 - 4,18 ppm). Também puderam ser observados dois dubletos em δ 7,29 e δ 6,04

ppm, referentes aos hidrogênios olefínicos H-7'' e H-8'', respectivamente. Estes hidrogênios estão acoplados entre si com constante de acoplamento de 15,7 Hz, o que define a relação trans entre estes hidrogênios.

O sinal de H-6'' (δ 6,7 ppm) apresentou-se como um dubleto largo com J típico de acoplamento *orto* de 8,2 Hz, sendo que este hidrogênio acopla com H-5'' (δ 6,8 ppm, $J = 8,2$ Hz). Enquanto que o singlete largo em δ 6,87 ppm foi atribuído ao H-2''.

O deslocamento químico destes hidrogênios juntamente com os olefínicos bem como as multiplicidades destes sinais são indicativos da presença de um grupamento cafeoil, sendo que tais atribuições puderam ser confirmadas ao realizar a comparação com os dados obtidos por Sakamoto (2004) para a mesma substância (Tabela 12).

A presença de dois dubletos com integração para dois hidrogênios em δ 6,63 ppm e δ 6,83 ppm, referentes a H-5/H-3 e H-6/H-2, com $J_{orto} = 8,7$ Hz, sugere a presença de um anel aromático *para*-substituído.

A presença de um dubleto em δ 4,68 ppm ($J = 7,3$ Hz) foi atribuído a H-1', sendo que os sinais dos hidrogênios deste anel H-2', H-4' e H-5' apresentaram-se sobrepostos em δ 3,47 – 3,36 ppm e com integração para três hidrogênios. Os sinais dos hidrogênios H-3' e H-6'b apresentaram-se sobrepostos em δ 3,60 – 3,54 ppm e o hidrogênio H-6'a como dubleto largo (δ 3,94 ppm e $J = 11,05$ Hz).

Portanto, todos esses sinais de hidrogênios deste açúcar, juntamente com os dados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C e a comparação com a referência permitiu-nos confirmar que esta unidade trata-se da glicose (tabela 12).

Os dubletos presentes em δ 4,10 e 4,17 ppm com $J = 11,4$ Hz ambos integrando para um, foram atribuídos aos hidrogênios H-4''a e b, respectivamente.

Para o H-1" foi atribuído o deslocamento em δ 5,00 ppm, o qual apresentou-se como um singlete largo, sendo este característico de hidrogênio anomérico do açúcar apiofuranose. O H-2" apresentou-se como singlete largo δ 3,93 ppm.

Para o H-5"b atribui-se o δ 3,81 ppm ($d, J = 10,7$ Hz) e para o H-5"a atribui-se δ 3,95 ppm ($d, J = 10,7$ Hz). A partir das comparações com a referência (Tabela 12), foi possível atribuir os referidos sinais a uma unidade de açúcar de cinco membros, denominada apiose.

Após as atribuições dos sinais relativos aos hidrogênios, foi analisado o espectro de RMN ^{13}C e comparado com os valores da referência (Tabela 12) chegando a conclusão que a apiose está ligada a unidade de glicose através do C-1" e a unidade cafeoil através de C-5".

A fim de confirmar a fórmula molecular proposta $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$, a massa calculada 566,1635 u.m.a. e o pico referente à substância no cromatograma, foi obtido o espectro de ESI-MS em alta resolução nos modos positivo e negativo (Figura 32 do apêndice), no qual foram observados os íons $[\text{M} - \text{H}]^-$ em $m/z = 565,1563$ com erro de 0,0 ppm (modo negativo) e $[\text{M} + \text{Na}]^+$ em $m/z 589,1530$ com erro de ± 0.5 ppm (modo positivo). Sendo tais dados compatíveis com a fórmula estrutural proposta (Figura 8) e certificando que esta substância corresponde ao pico 3 (Figura 4 do Apêndice), do cromatograma da folhas de *E. glomerulatus*.

O relato de substâncias fenólicas diglicosiladas no gênero *Eremanthus* é pouco comum, possivelmente em função do pequeno número de estudos envolvendo extratos polares. Além disso, o isolamento desta classe de substâncias a partir de espécies de Asteraceae também é, em geral, pouco comum.

Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância BuOH 2.4.

C	BuOH 2.4 δ (ppm) ¹	(Sakamoto 2004) δ (ppm) ²	H	BuOH 2.4 δ (ppm) <i>multipl.</i> J(Hz) ³	(Sakamoto 2004) δ (ppm) <i>multipl.</i> J(Hz) ⁴
1	C	152,8	151,7	--	--
2	CH	120,9	118,8	2	6,83 <i>d</i> (8,7)
3	CH	117,7	116,4	3	6,63 <i>d</i> (8,7)
4	C	153,7	153,6	--	--
5	CH	117,7	116,4	5	6,63 <i>d</i> (8,7)
6	CH	120,9	118,8	6	6,83 <i>d</i> (8,7)
1'	CH	80,4	103,7	1'	4,68 <i>d</i> (7,3)
2'	CH	72,3	74,4	2'	3,47 – 3,36 <i>m</i>
3'	CH	78,1	78	3'	3,60 – 3,54 <i>m</i>
4'	CH	69,8	71,1	4'	3,47 – 3,36 <i>m</i>
5'	CH	75,9	76,5	5'	3,47 – 3,36 <i>m</i>
6'	CH2	68,1	68,5	6'a	3,94 <i>dl</i> (11,05)
				6'b	3,60 – 3,54 <i>m</i>
1"	CH	103,9	110,2	1"	5,00 <i>sl</i>
2"	CH	77,3	77,8	2"	3,93 <i>sl</i>
3"	C	79,4	78,2	--	--
4"	CH2	79,4	78,2	4"a	4,10 <i>d</i> (11,4)
				4"b	4,17 <i>d</i> (11,4)
5"	CH2	75,4	74,5	5"a	3,95 <i>d</i> (10,7)
				5"b	3,81 <i>d</i> (10,7)
1'''	C	129,3	126,9	--	--
2'''	CH	116,3	115,2	2'''	6,87 <i>sl</i>
3'''	C	146,7	146,4	--	--
4'''	C	149,6	149,44	--	--
5'''	CH	118,5	116,7	5'''	6,8 <i>d</i> (8,2)
6'''	CH	125,3	122,5	6'''	6,7 <i>d</i> (8,2)
7'''	CH	148,8	146,6	7'''	7,29 <i>d</i> (15,7)
8'''	CH	111,2	114,7	8'''	6,04 <i>d</i> (15,7)
9'''	C	171,3	167,6	--	--

¹(75 MHz D₂O); ²(100 MHz CD₃COCD₃ + gotas DMSO-d₆); ³(500 MHz D₂O); ⁴(100 MHz CD₃COCD₃ + gotas DMSO-d₆).

4.1.2.1.1 Proposta de fragmentação da substância BUOH 2.4.

Com a análise dos dados gerados pelo espectro dos íons produtos (Figura 4 do apêndice), obtidos pela fragmentação do íon precursor $[\text{M} - \text{H}]^-$ 565,1701 m/z , pode-se observar que os íons gerados em m/z 455,1299 e m/z 353,0953 referem-se a fragmentação da glicose, já proposto por March et. al. (2006 e 2004). Esse mecanismo é similar a eliminação neutra de água (1,2) conforme apresentado na figura 9 (mecanismos A e B). Por outro lado o íon m/z 179,0403 é referente a fragmentação da apiose, ocorrendo provavelmente via assistência 1,2 do par eletrônico do oxigênio levando a eliminação neutra de um epóxido (mecanismo C figura 9).

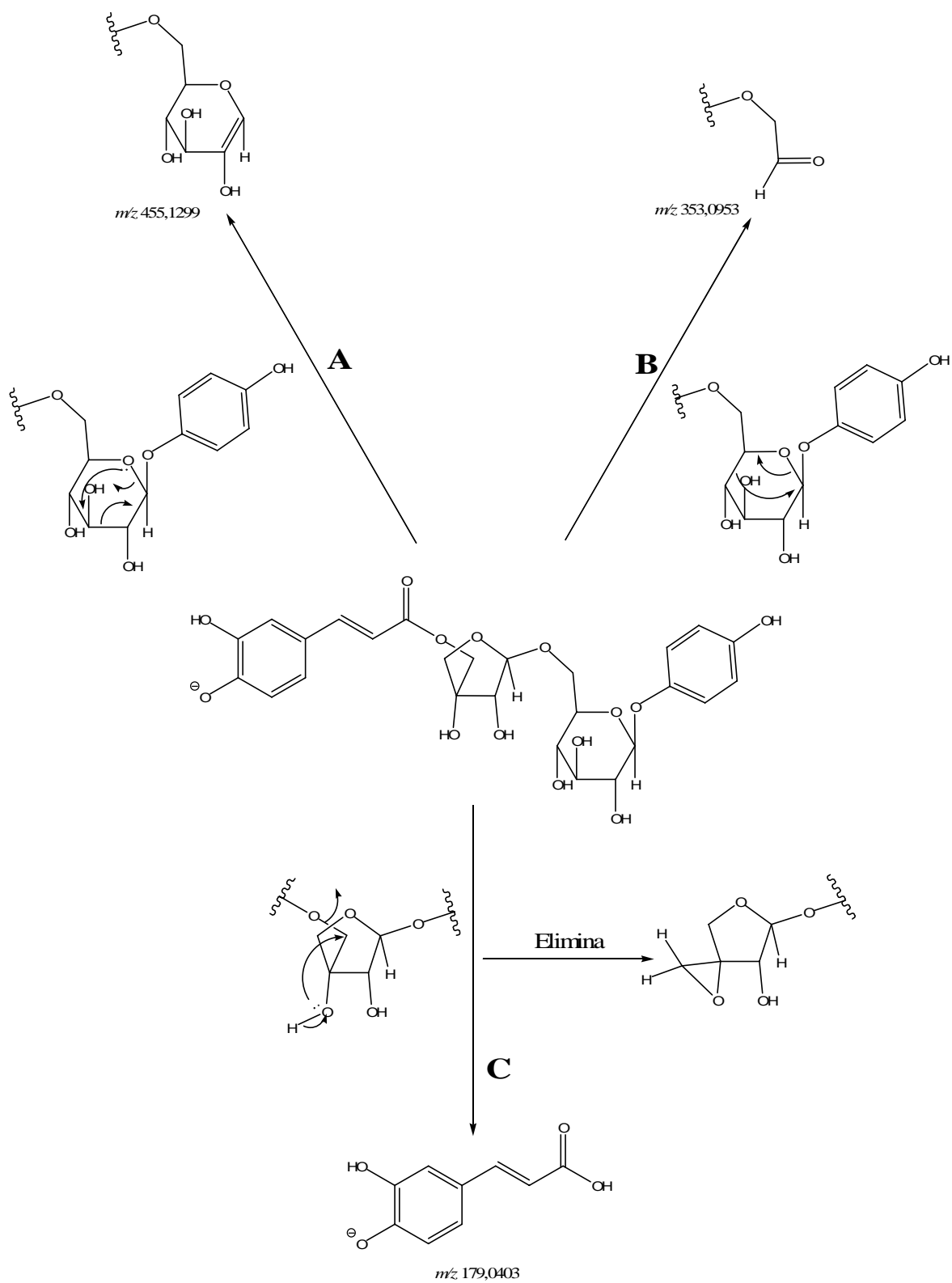


Figura 9. Proposta do mecanismo de fragmentação da substância BuOH 2.4.

4.1.2.2 Identificação da fração BUOH 1.6.

Conforme procedimento também descrito no item 3.4.1.1, da fase butanólica do extrato etanólico das folhas de *E. glomerulatus*, isolou-se a substância denominada de BuOH 1.4. Esta apresentou-se na forma de um sólido marrom amorfo solúvel apenas em água. A análise desta substância por métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e ^{13}C), métodos espectrométricos (ESI-MS) e comparação de dados com referências bibliográficas (ZHONG et al 1998, GOBBO 2002), permitiu identificá-la como sendo um derivado fenólico glicosilado, denominado de 4-fenol-1-O- β -glucopiranosídeo (6' \rightarrow 1'')O- β -apiofuranosil.

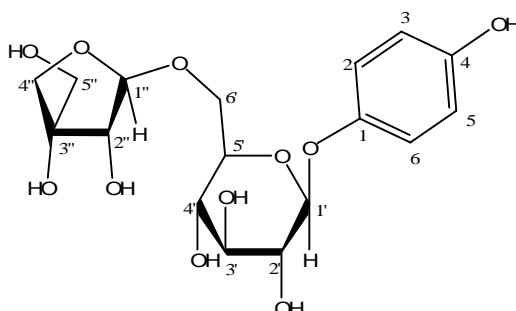


Figura 10. 4-fenol-1-O- β -glucopiranosídeo (6' \rightarrow 1'')O- β -apiofuranosil

Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de BuOH 1.6 estão disponíveis nas figuras de 16 a 23 do apêndice e reunidos na tabela 13.

Analisando estes dados pode-se verificar a presença de dois dubletos em δ 6,81 ppm e δ 6,99 ppm, com $J_{orto} = 8,7$ Hz, ambos com integração para dois hidrogênios, sugerindo assim a presença de um anel aromático *para*-substituído.

No espectro de RMN de ^1H também é possível observar a presença de dois dubletos em δ 4,91 ppm e δ 5,02 ppm, com $J = 8,0$ Hz e 2,8 Hz, respectivamente, sendo o primeiro atribuído ao hidrogênio anomérico da glicose e o segundo da apiose.

A glicose esta ligada a aglicona através de uma ligação β , pode-se confirmar este fato com base na constante de acoplamento do hidrogênio anomérico deste açúcar, δ 4,91 ppm, com $J = 8,0$ Hz, típico para o acoplamento *trans*-diaxial entre os hidrogênios H-1' e H-2' da glicose. Caso esta ligação se apresente como α , esta constante seria característica de acoplamento *cis*-equatorial-axial ($J \approx 3,0$ Hz). Esta mesma linha foi utilizada para determinação da ligação, também em β para a molécula de apiose no carbono C-6' da glicose, no qual o acoplamento do carbono anomérico da apiose tem uma constante de acoplamento $J = 2,8$ Hz, típico de um acoplamento *trans*-di-pseudoequatorial. (GOBBO 2002)

A apiose também é confirmada devido a presença, no espectro de RMN ^1H , de um dubleto com deslocamento característico, por volta δ 5,02 ppm, e com constante de acoplamento de $J = 2,8$ Hz, relativo ao hidrogênio anomérico deste açúcar. Outros dados que podem confirmar a presença deste açúcar são os dois dubletos em δ 3,79 ppm e 3,92 ppm acoplado com $J = 10,0$ Hz, relativos aos H-4" a e b, e o singlete com integração para dois hidrogênios, em δ 3,56 ppm relativo aos hidrogênios H-5" a e b, nas posições não oxigenadas da apiose.

Com a análise dos espectros dos experimentos de HMBC realizados (figuras 26 a 31 do apêndice) foi possível observar as correlações entre os hidrogênios C-6' da glicose (δ 119,3 ppm) com o H-1" (δ 5,02 ppm) da apiose e o C-1 (δ 151,0 ppm) do anel fenólico com o H-1' (δ 4,91 ppm) da glicose, determinando assim a posição dos açucares como glucopiranosídeo (6' \rightarrow 1")O- β -apiofuranosil.

As demais atribuições de ^1H e ^{13}C as seqüências das ligações foram confirmadas através da comparação dos dados com os da literatura e dos espectros de correlação heteronuclear (HMQC e HMBC figuras de 22 a 31 do apêndice) da substância.

Para confirmação da fórmula molecular proposta $C_{17}H_{24}O_{11}$, e o tempo de retenção referente a esta substância no cromatograma, obteve-se um espectro de ESI-MS em alta resolução, nos modos positivo e negativo (Figura 33 do Apêndice). Nesse espectro foram observados os íons $[M - H]^-$ em $m/z = 403,1244$ com erro de $\pm 0,9$ ppm (modo negativo) e $[M + Na]^+$ em $m/z 427,1218$ com erro de $\pm 0,4$ ppm (modo positivo). Os valores obtidos são compatíveis com a fórmula estrutural proposta (Figura 10), mas embora isolada e identificada esta substância não representa nenhum dos picos majoritários e portando não selecionada previamente para o estudo de variação de metabólitos secundários (Item 3.5.1; Figura 5).

Tabela 13. Dados de RMN de 1H e ^{13}C obtidos para a substância BuOH 1.6 comparados com a literatura.

C		BuOH 1.6 δ (ppm) ¹	(Zhong et. al 1998) δ (ppm) ²	H	BuOH 1.6 δ (ppm) <i>multipl.</i> J (Hz) ³	(Zhong et. al 1998) δ (ppm) <i>multipl.</i> J (Hz) ⁴
1	C	151,0	152,5	--	--	--
2	CH	119,3	119,5	2	6,99 <i>d</i> (8,7)	6,96 <i>d</i> (9,0)
3	CH	116,9	116,7	3	6,81 <i>d</i> (8,7)	6,70 <i>d</i> (9,0)
4	C	152,0	153,9	--	--	--
5	CH	116,9	116,7	5	6,81 <i>d</i> (8,7)	6,70 <i>d</i> (9,0)
6	CH	119,3	119,5	6	6,99 <i>d</i> (8,7)	6,96 <i>d</i> (9,0)
1'	CH	102,1	103,8	1'	4,91 <i>d</i> (8,0)	4,68 <i>d</i> (8,0)
2'	CH	73,6	75,0	2'	3,49 <i>dd</i> (9,3; 8,0)	NC
3'	CH	77,3	78,1	3'	3,53 <i>dd</i> (9,3; 9,2)	NC
4'	CH	70,4	71,7	4'	3,43 <i>dl</i> (9,2)	NC
5'	CH	75,6	76,9	5'	3,65 – 3,62 <i>m</i>	NC
6'	CH ₂	68,3	68,8	6'a	3,69 <i>dd</i> (11,0; 6,4)	3,61 <i>dd</i> (11,0; 6,0)
				6'b	3,98 <i>dl</i> (11,0)	4,01 <i>dd</i> (11,0; 2,0)
1''	CH	109,7	111,1	1''	5,02 <i>d</i> (2,8)	4,98 <i>d</i> (2,0)
2''	CH	76,3	78,0	2''	3,91 <i>sl</i>	3,91 <i>d</i> (2,0)
3''	C	79,9	80,6	--	--	--
4''	CH ₂	74,2	75,0	4''a	3,79 <i>d</i> (10,0)	3,75 <i>d</i> (10,0)
				4''b	3,92 <i>d</i> (10,0)	3,96 <i>d</i> (10,0)
5''	CH ₂	64,4	65,7	5''a	3,56 <i>s</i>	3,58 <i>s</i>
				5''b	3,56 <i>s</i>	3,58 <i>s</i>

¹(125 MHz D₂O); ²(100 MHz CD₃OD); ³(500 MHz D₂O); ⁴(400 MHz CD₃OD); (NC não citado pelo autor)

4.1.2.3 Elucidação estrutural da fração Prep – 1 – PICO 1

A substância Prep – 1, isolada da fase butanólica do extrato etanólico das folhas de *E. glomerulatus* (conforme procedimento descrito no item 3.4.1.2), apresentou-se na forma de um sólido marrom amorfo solúvel apenas em água. A análise desta substância por métodos espectrométricos (ESI-MS e ESI-MS/MS), permitiu-nos atribuí-la como sendo o 5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1'→6)-O- β -glicopiranosídeo.

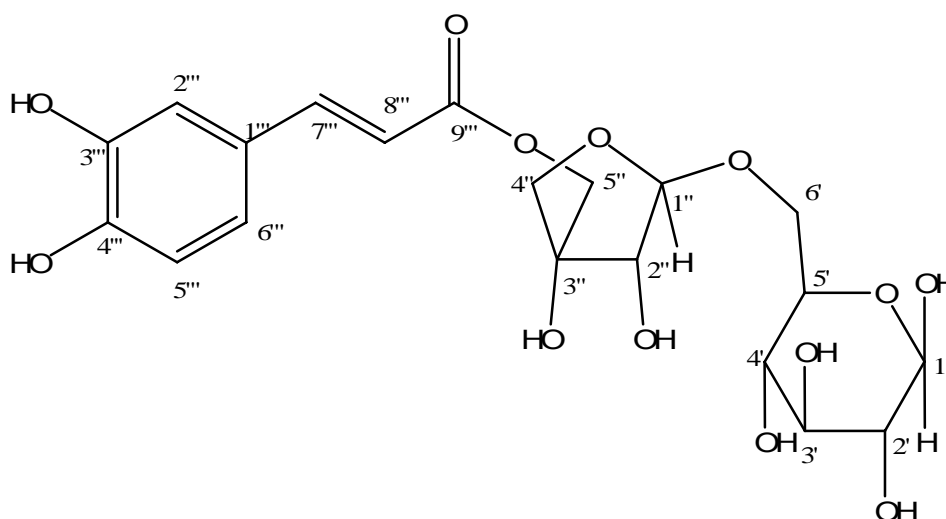


Figura 11. 5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1'→6)-O- β -glicopiranosídeo

A Prep – 1 apresentou nos espectros de massas (tabela 11 e figura 2 do apêndice) o íon $[M - H]^-$ 473,13 m/z como pico base em modo de ionização negativa e $[M - H_2O]^+$ 457,12 m/z no modo de ionização positivo. Tais valores em ambos modos de ionização apresentaram 92 u.m.a menor que os obtidos para substância BuOH 2.4 (item 4.1.2.1 e 4.1.2.2), sugerindo que trata-se desta substância porém sem o grupamento fenol. Tais atribuições foram reforçadas com a comparação dos espectros de íons produtos gerados no modo negativo no qual para ambas as

substâncias apresentam o íon m/z 353, relativo a quebra da glicose dando origem a um aldeído e o íon 179 relativo a quebra da apiose (figura 12).

A fim de justificar a estrutura sugerida e elaborar uma proposta de fragmentação, obteve-se espectros de massas em alta resolução (figura 34 do apêndice) para Prep – 1 em modo de ionização negativo. Observamos nesse espectro o íon $[M - H]^-$ 473,1301 m/z como pico base, que sugere a fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_{13}$ com erro $\pm 0,0$ ppm e no modo de ionização positivo obtendo o íon $[M + Na]^+$ 497,1270 m/z , que sugere a fórmula molecular $C_{20}H_{26}NaO_{13}$ com erro de $\pm 0,2$ ppm.

Com a análise dos dados gerados pelo espectro dos íons produtos, obtidos pela fragmentação do íon precursor $[M - H]^-$ 473,1301 m/z em modo ionização negativo, pode-se observar que os íons gerados m/z 413,113, m/z 383,0975, m/z 353,0882 e m/z 311,0773 referem-se a fragmentação da glicose, já proposto por March *et. al.* (2006, 2004). Este mecanismo ocorre novamente por contratura e abertura do anel, mecanismo A e por um mecanismo similar a eliminação neutra de água, mecanismos B, C e D (figura 12). Já os íons m/z 251,0555 e m/z 179,0427 são referentes a fragmentação da apiose sendo estes formados também pela contratura e abertura do anel, mecanismos E e assim como para substância BuOH 1.6, o mecanismo F ocorre provavelmente via assistência 1,2 do par eletrônico do oxigênio levando a eliminação neutra de um epóxido (figura 12).

Após a análise conjunta de todos estes dados foi possível propor a referida substância como sendo o 5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1' \rightarrow 6)-O- β -glicopiranosídeo e elaborar seu mecanismo de fragmentação (figura 11 e 12).

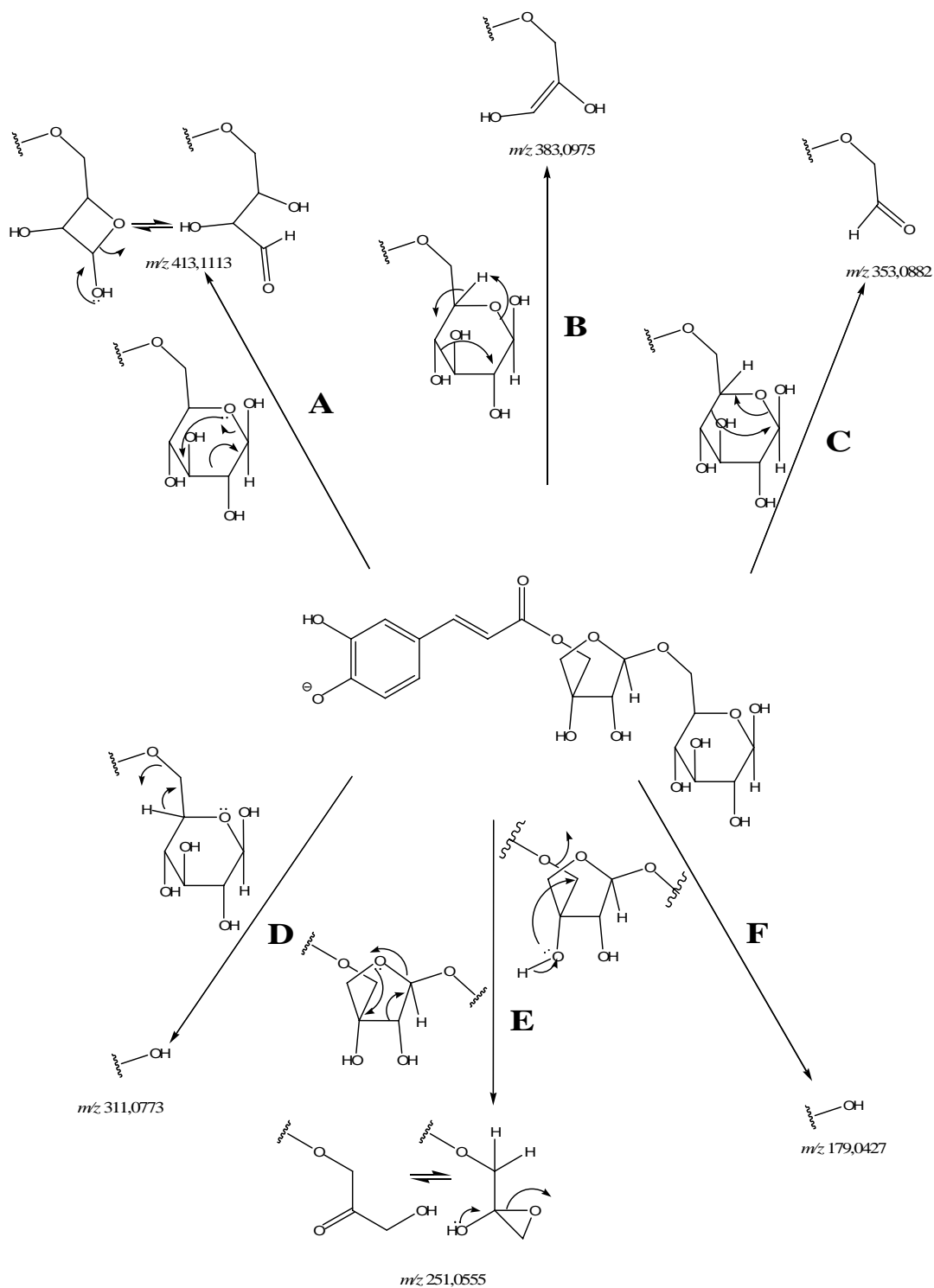


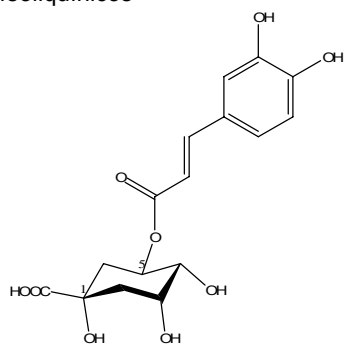
Figura 12. Proposta do mecanismo de fragmentação da substância Prep-1.

4.1.3 Estruturas moleculares das substâncias identificadas.

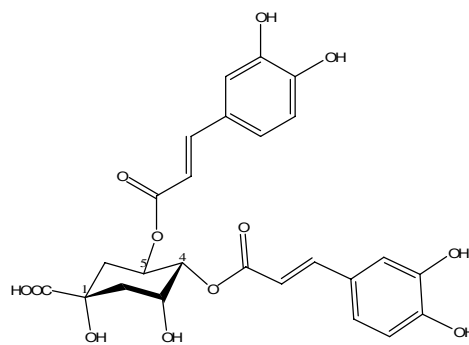
Todas a substâncias isoladas neste estudo estão exibidas na tabela 12 com sua referida identificação e estrutura molecular.

Tabela 14 Estruturas moleculares das substâncias identificadas

Ácidos Cafeoilquínicos

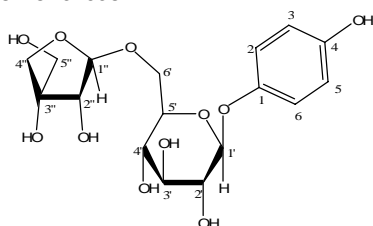


Ácido 5-O-E-cafeoilquínico

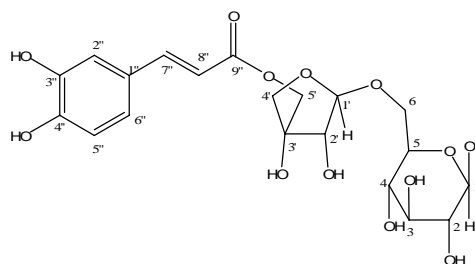


Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico

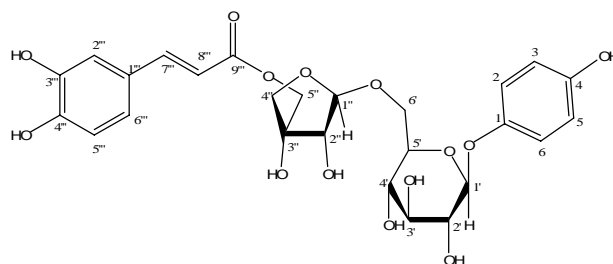
Derivados Fenólicos



4-fenol-1-O-β-D-glucopiranosídeo-(6'→1'')O-β-D-apiofuranosil

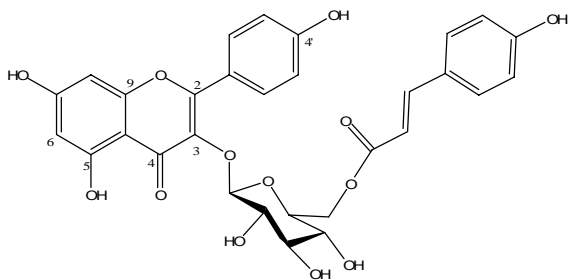


5'-O-cafeoil-β-apiofuranosil-(1'→6')O-β-D-glicopiranosídeo

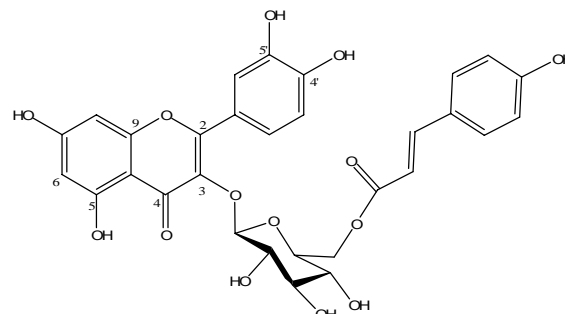


4-fenol-1-O-(5'-O-cafeoil)-β-D-apiofuranosil-(1''→6'')O-β-D-glicopiranosídeo.

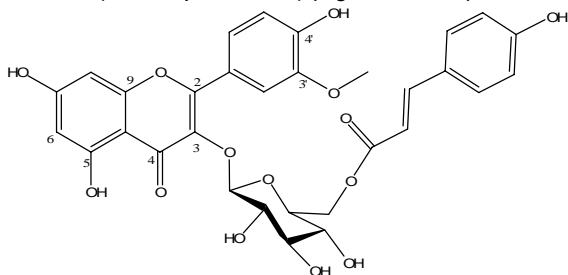
Flavonóides



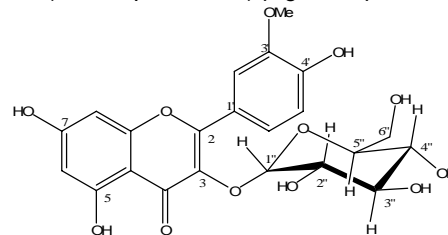
3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)-β-glicosilkaempferol



3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)-β-glicosilquercetina



3-O-(6''-O-E-p-cumaroil)-β-glicosiloramnetina



Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glicopiranosídeo

4.2. Estudo das variações sazonais das folhas de *Eremanthus glomerulatus*.

4.2.1. Preparo da Amostra

O método de extração foi desenvolvido, conforme item 3.5.2, a fim de obter uma elevada taxa de extração de metabólitos secundários de média a alta polaridade, visando uma metodologia capaz de ser empregada em todo o estudo. O solvente extrator definido foi MeOH/H₂O 9:1, tendo em vista que é desejável um método com uma única etapa de extração. Esta escolha foi ratificada com base nas proporções relativas entre os picos detectados nos cromatogramas obtidos após quatro extrações consecutivas do mesmo material.

Após o processo de preparação da amostra (extração e posterior limpeza do extrato por partição líquido/líquido com hexano), o método desenvolvido revelou uma percentagem de extração em torno de 90%, na primeira extração, para todos os metabólitos analisados, não havendo diferenças marcantes entre a percentagem de metabólitos polares e apolares extraídos conforme pode ser visto na tabela 15. A percentagem de extração obtida e, principalmente, a semelhança dos valores entre todos os metabólitos foram considerados satisfatórios para os propósitos deste estudo. Considerando que este processo de extração facilitou o sistema de limpeza da amostra e extraiu em proporções muito semelhantes todos os metabólitos de interesse no estudo de variação sazonal optou-se pelo seu emprego no estudo de variação

Para exemplificar, a figura 13 demonstra o perfil cromatográfico em 270 nm das duas primeiras extrações das quatro extrações consecutivas realizadas com o indivíduo E 22-VII.

Tabela 15 Porcentagem de extração dos principais metabólitos majoritários obtidos na primeira das quatro extrações consecutivas do indivíduo E 22-VII de *E. glomerulatus* em relação a somatória das extrações.

Pico	% Relativa a 1ª Extração
1	95%
2	92%
3	87%
4	93%
5	94%
6	91%

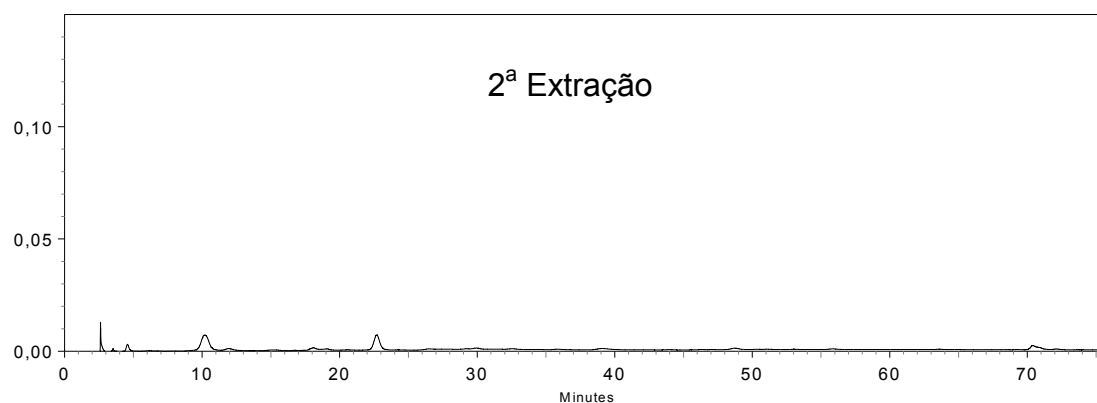
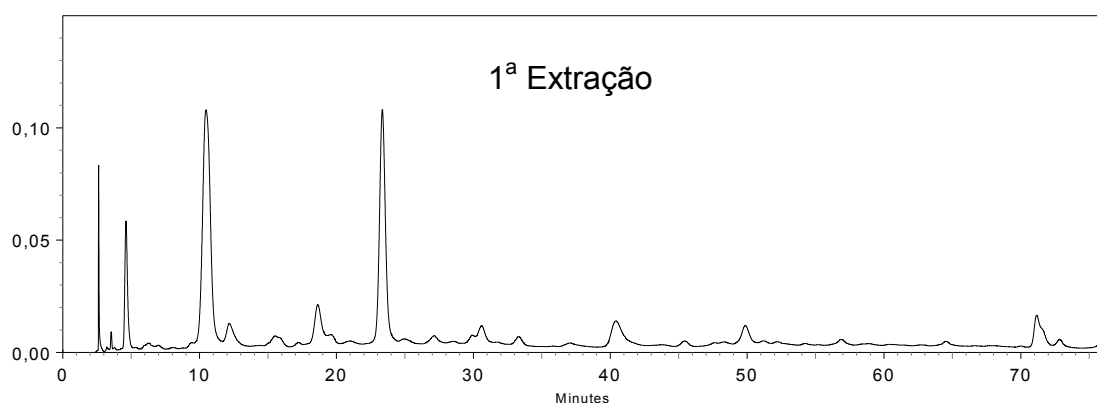


Figura 13 Perfil cromatográfico em 270nm obtido para as 2 primeiras extrações consecutivas das folhas pulverizadas do indivíduo E 22-VII, de acordo com a metodologia desenvolvida.

4.2.2. Método Analítico

Após desenvolvimento do método analítico (conforme descrito no item 3.5.1), testou-se a cumarina como padrão interno (p.i.). A adição de padrão interno se faz necessária para correção de erros inerentes as etapas de preparo/extração da amostra, além de permitir correção nos tempos de retenção dos analitos.

A cumarina foi escolhida como padrão interno por apresentar uma boa estabilidade, simetria do seu pico no cromatograma, disponibilidade e tempo de retenção no cromatogra em uma região livre de picos e linha de base baixa e linear.

A concentração do p.i. foi estabelecida em 20 µg/mL com base em sua absorção no comprimento de onda utilizado (270 nm) e sua intensidade relativo as substâncias majoritárias a serem analisadas.

4.2.3. Estabilidade da Amostra

Em relação à estabilidade das substâncias majoritárias das amostras, após o preparo da mesma (tempo 0) e após os tempos de 24, 48, 96 e 120 horas só foram observados variações significativas (superiores a $\pm 5\%$) nas amostras analisadas após o tempo de 48 horas. Para melhor esboçar este fato foi construído um gráfico (Figura 14) que demonstra o percentual de variação de cada constituinte. Para construção do gráfico a área relativa a cada substância foi dividida pela área do padrão interno e depois calculada a variação em relação ao tempo 0.

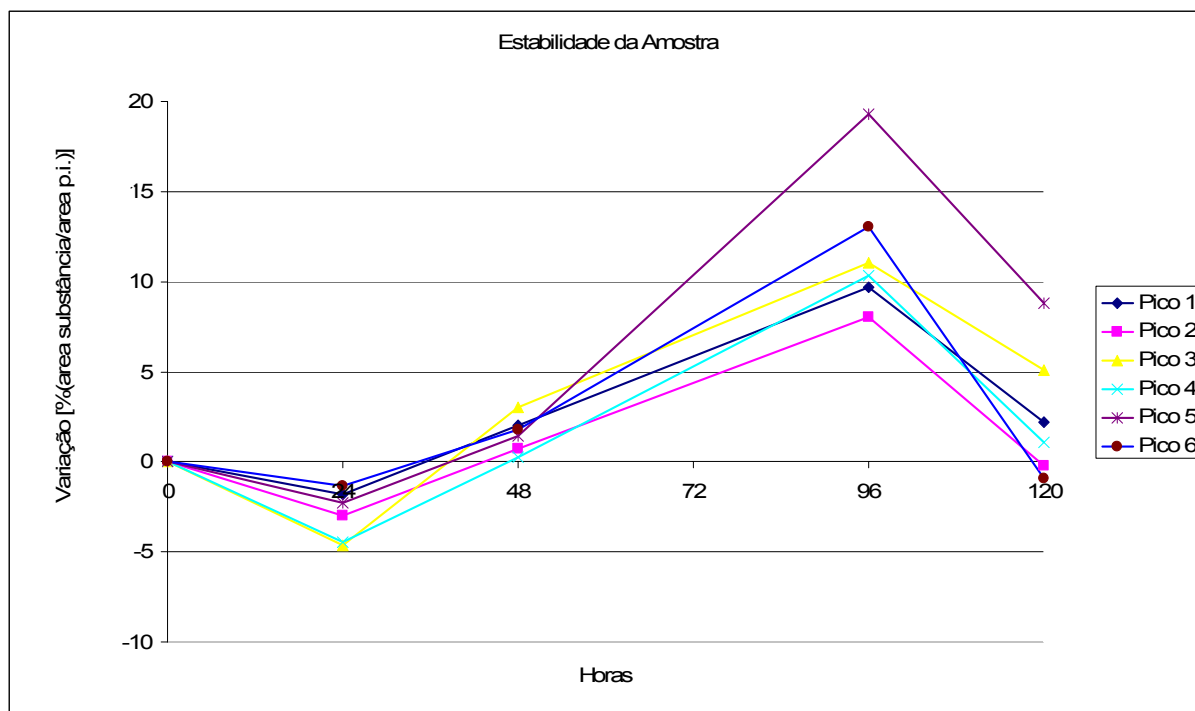


Figura 14. Gráfico da variação dos constituintes majoritários das folhas de *E. glomerulatus* em função do tempo após o preparo das amostras. A identificação dos picos consta na tabela 11.

4.2.4. Análise da variação na concentração dos metabólitos secundários

O maior desafio de uma análise quantitativa de metabólitos secundários originados, esta baseada na dificuldade de obter padrões destas substâncias, haja visto que na maioria das vezes estes só podem ser obtidos através de estudos fitoquímicos da espécie em estudo.

Como o intuito deste estudo não é quantificar e sim, verificar a existência ou ausência de variações sazonais nos constituintes majoritários das folhas de *E. glomerulatus*, e visto que não é possível a construção de uma curva analítica para todos os picos majoritários, já que a maioria deles não foram isolados e sim identificados por um estudo de desreplicação, a alternativa encontrada para verificar a ocorrência de variações sazonais foi analisar a variação das áreas obtidas para cada substância majoritária em relação a sua média de produção durante o estudo.

Para realização desta análise as áreas relativas de cada substância foram divididas pela área do p.i.. A seguir calculou-se a média das áreas produzidas para cada substância de cada individuo e por fim, calculou-se a variação de produção em relação a média obtida durante o estudo.

Entretanto para certificar a repetibilidade do método, as amostras que apresentaram em algum momento do estudo variação de produção de metabólitos secundários muito discrepantes, em relação à média, foram analisadas em triplicatas. As áreas obtidas foram divididas pela área do p.i. e foi calculado seus coeficientes de variação, tomando como variação aceitável desvios de $\pm 5\%$. Tal procedimento foi realizado a fim de garantir ausência de possíveis erros instrumentais ou analíticos durante a análise. A tabela 16 demonstra os coeficientes de variação encontrados para cada amostra analisada, sendo que todos estão dentro do limite aceitável. Esta análise confirma a repetibilidade do método, garantindo assim a fidelidade dos dados obtidos para o estudo da variação sazonal.

Tabela 16 Coeficientes de variação (C.V.) encontrados para as amostras analisadas em triplicata demonstrando a repetibilidade do método.

Pico	Coleta	8	11	17	23	28
	Indivíduo	C.V. %	C.V. %	C.V. %	C.V. %	C.V. %
1	I	2,5	4,2	0,6	4,7	0,4
	IV	5,0	2,9	2,2	4,4	4,2
	X	4,9	1,5	4,5	3,8	0,3
2	I	1,4	0,3	1,2	1,8	1,0
	IV	4,7	0,8	2,5	4,0	1,7
	X	1,5	0,5	2,3	0,6	0,4
3	I	2,5	1,5	1,2	1,6	0,9
	IV	4,3	4,2	4,3	2,7	4,7
	X	2,8	0,6	0,9	1,0	0,5
4	I	2,1	0,9	1,7	1,9	0,7
	IV	3,3	3,4	3,1	0,4	0,9
	X	1,7	1,3	3,1	0,3	0,6
5	I	2,7	1,6	1,9	1,7	1,6
	IV	2,4	1,1	1,3	1,5	5,0
	X	1,3	0,9	0,8	0,3	0,4
6	I	3,9	4,1	4,4	4,4	8,7
	IV	3,3	4,2	1,3	4,7	1,7
	X	0,9	2,2	4,9	2,5	0,4

A identificação dos picos consta na tabela 11.

4.2.5. Variação sazonal na concentração dos metabólitos secundários majoritários de média e alta polaridade das folhas de *E. glomerulatus*.

4.2.5.1. Variação sazonal do pico 1

Para o pico 1 (figura 15) no final do primeiro outono do estudo, observa-se um decréscimo de produção para todos os indivíduos. No primeiro inverno, apesar dos indivíduos não apresentarem resultados semelhantes, no geral, há uma diminuição de produção deste metabólito em relação a sua média de produção. Já na primeira primavera, apesar de haver uma produção atípica para o indivíduo X, todas as outras espécimens apresentaram uma diminuição de produção. O indivíduo X apresentou

no segundo mês de coleta uma elevação de produção superior a 400 %, em relação a sua média de produção, existindo semelhança no final da estação.

No primeiro verão do estudo, o perfil de produção é semelhante, apresentando um decréscimo de produção para todos os indivíduos. No segundo outono é observada uma semelhança entre os indivíduos, em que predomina o aumento na produção nos dois primeiros meses da estação e decréscimo no último, sendo esta característica observada também nesta estação no ano anterior. No segundo inverno assim como no ano anterior pode-se observar também diminuição na produção. Já na segunda primavera é observado um decréscimo no primeiro mês seguido de acréscimo ou manutenção da média de produção nos meses seguintes. Tais características não possuem grande semelhança como a mesma estação do ano anterior.

No segundo verão, o predomínio é pela diminuição de produção nos indivíduos I e X e aumento no indivíduo IV. Comparando com verão anterior pode-se observar semelhança apenas no indivíduo I. Para o início do terceiro outono do estudo o predomínio é por diminuição da produção.

Apesar da semelhança de produção entre os indivíduos ser próxima, não é possível definir a estação em que mais se produz este metabólito, pois não é estável a produção desta substância, nem mesmo durante uma mesma estação.

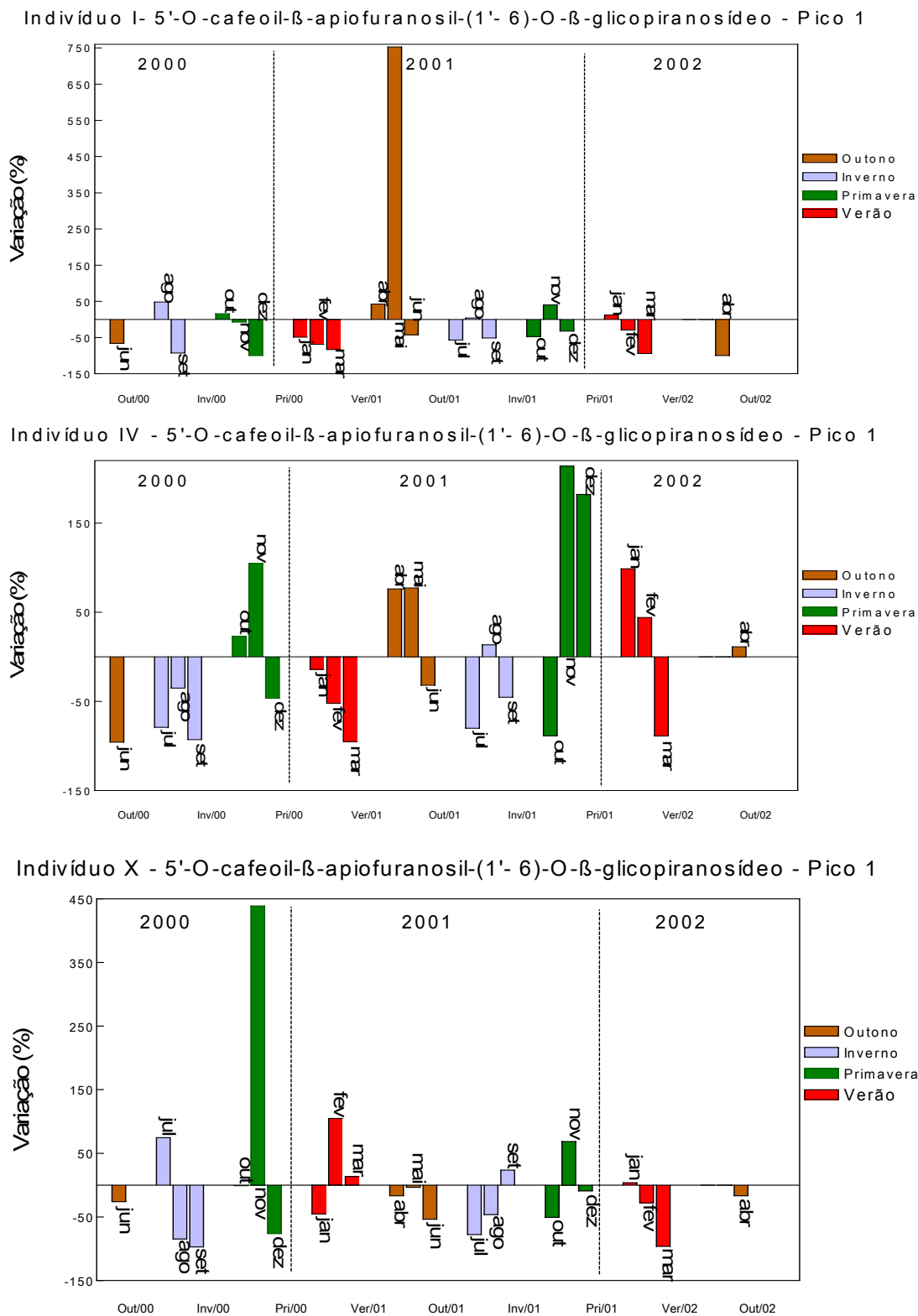


Figura 15. Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância 5'-O-cafeoil-β-apiofuranosil-(1'→6)-O-β-glicopiranosídeo relativa ao pico 1.

4.2.5.2. Variação sazonal do pico 2

Para o pico 2 (figura 16), no primeiro ano de estudo houve uma tendência de queda de produção no final do outono. Apenas o indivíduo X, apresenta-se atípico com elevação de produção. No inverno o predomínio é por diminuição de produção, tendo apenas o indivíduo IV com elevação no mês de agosto. Na primavera não há uma estabilidade nos três indivíduos, exceto no final da estação, em que o predomínio é por decréscimo de produção.

Seguindo o estudo, no segundo ano predomina a diminuição de produção no verão, aumento no outono com exceção no final da estação em que ocorre decréscimo. Sendo tal característica observada também nesta estação no ano anterior. Já no inverno, o predomínio é por diminuição de produção, assim como ocorrido para esta estação no ano anterior. Na primavera, a tendência é de diminuição com pequenas elevações de produção no mês de novembro, exceto para o indivíduo IV, que apresenta elevada produção.

No último ano do estudo a produção deste metabólito no verão se mostra diferente do ano anterior, pois apresenta elevação de produção nos dois primeiros meses, mas há semelhança no final da estação em que há queda de produção. Já no outono deste ano, assim como no ano anterior é marcado pela elevação de produção.

Apesar da semelhança de produção ente os indivíduos ser próxima, novamente não é possível definir a estação em que mais se produz este metabólito, pois não é estável a produção desta substância durante as estações.

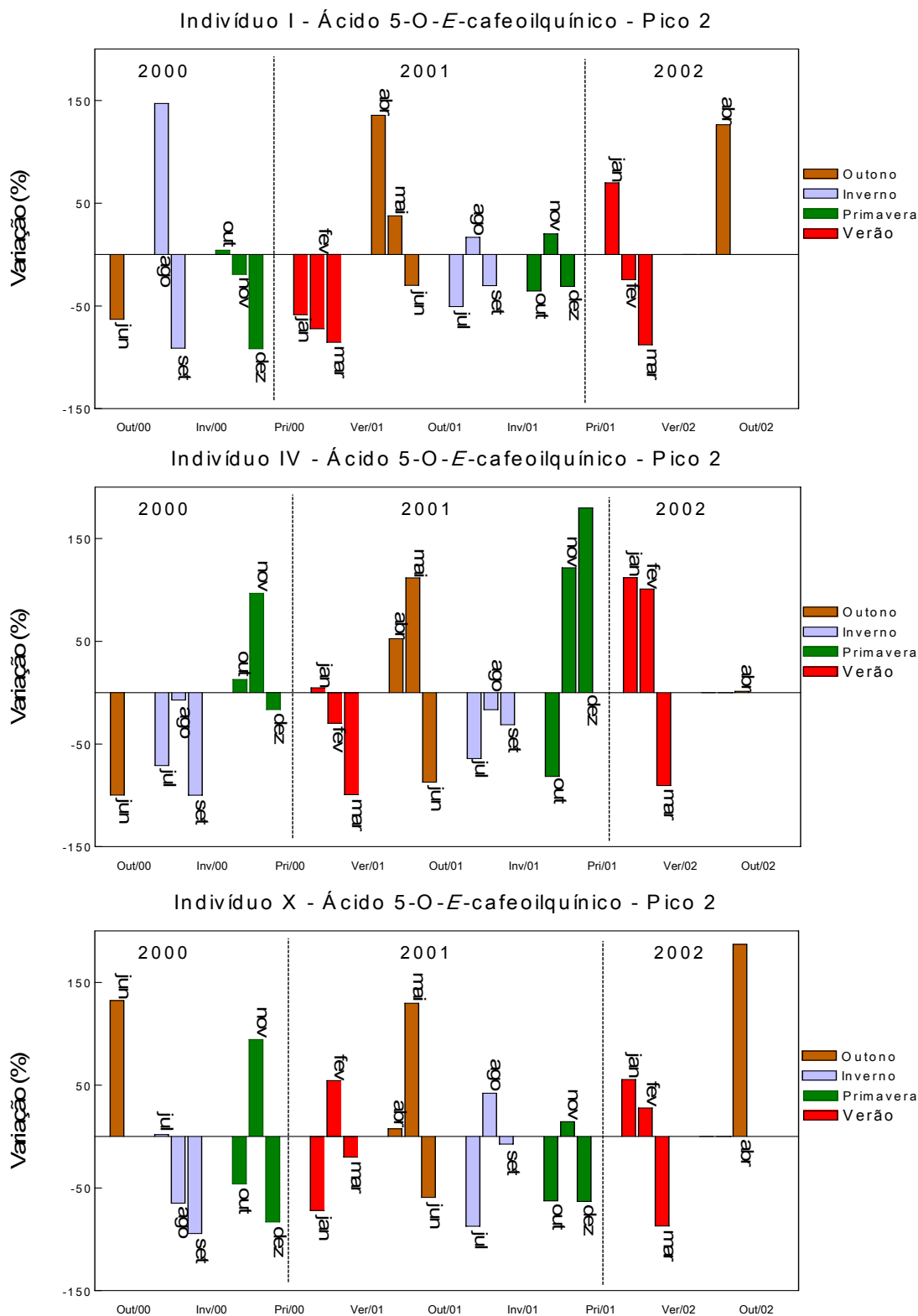


Figura 16. Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância ácido 5-O-*E*-cafeoilquínico – pico 2.

4.2.5.3. Variação sazonal do pico 3

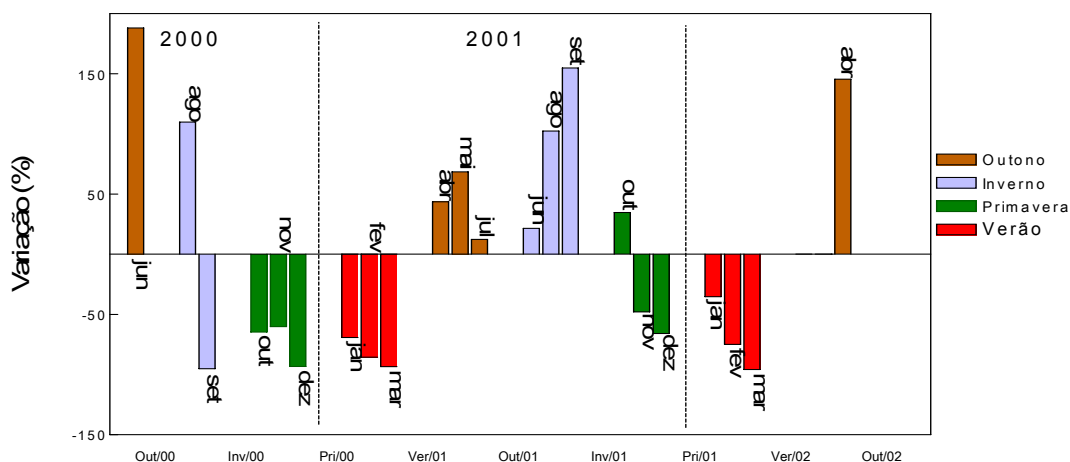
O pico 3, (figura 17) no primeiro ano do estudo apresenta elevação de produção no outono, sendo esta elevação é mantida no início do inverno, mas com uma queda de produção para os meses seguintes desta estação. Esta queda também é observada durante toda a primavera.

No segundo ano, a produção deste metabólito no verão continua em baixa, tendo sua elevação apenas com a chegada do outono, fato este também observado no ano anterior deste estudo. Já no inverno há um perfil discrepante de produção entre os indivíduos, havendo estabilidade apenas no mês de agosto, em que todos os indivíduos têm tendência a elevar a produção. Tal fato não é tão observado no ano anterior, em que neste mês os indivíduos apresentaram em maior grau a manutenção média dos níveis de produção deste metabólito. Na primavera o perfil é totalmente semelhante ao do ano anterior, em que o predomínio em todos os indivíduos é a queda de produção.

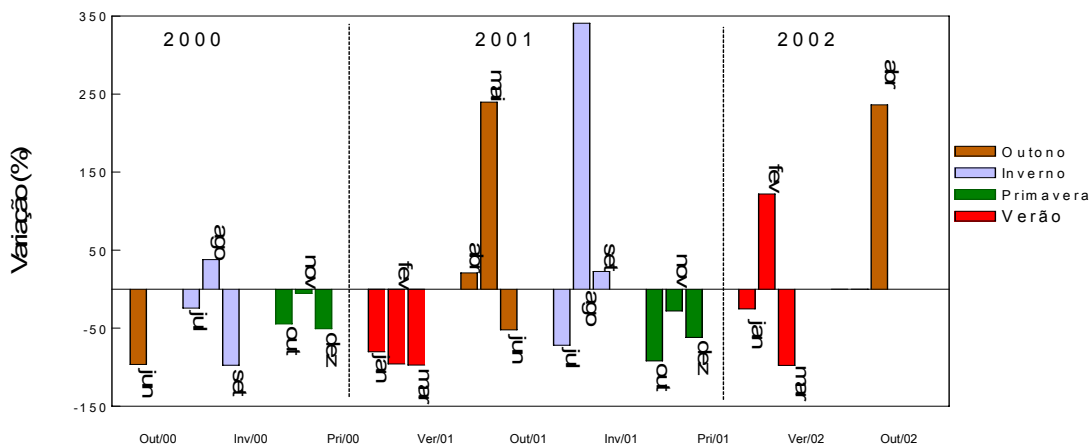
O terceiro ano é marcado novamente pelo de decréscimo de produção no verão e elevação de produção no outono.

O perfil de produção deste metabólito é bastante semelhante entre as estações sendo o outono a estação de destaque de produção, na qual é possível observar elevada produção em todos os anos do estudo.

Indivíduo I - 4-fenol-1-O-(5"-O-cafeoil)-β-apiofuranosil-(1"-6') - O-β-glucopiranosídeo Pico 3



Indivíduo IV - 4-fenol-1-O-(5"-O-cafeoil)-β-apiofuranosil-(1"-6') - O-β-glucopiranosídeo Pico 3



Indivíduo X - 4-fenol-1-O-(5"-O-cafeoil)-β-apiofuranosil-(1"-6') - O-β-glucopiranosídeo Pico 3

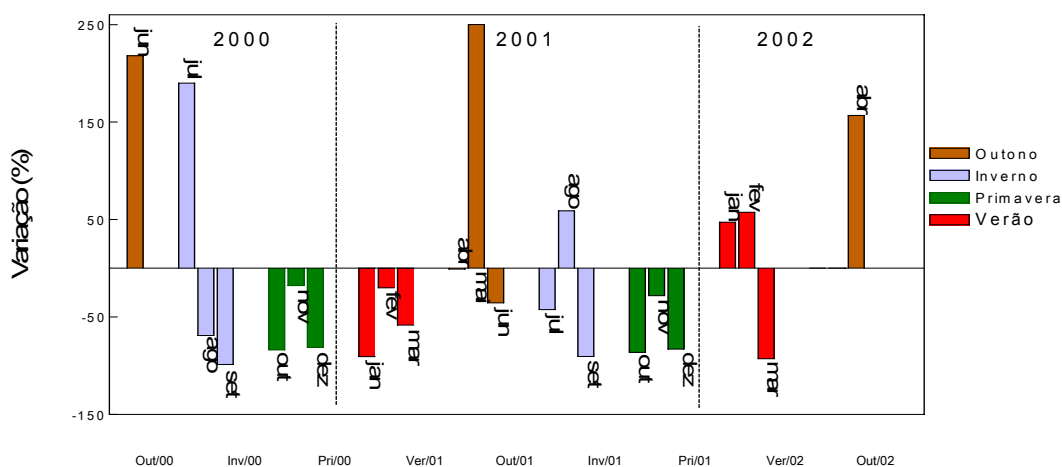


Figura 17. Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância 4 fenol-1-O-(5"-O-cafeoil)-β-apiofuranosil-(1"→6')-O-β-glucopiranosídeo – pico 3.

4.2.5.4. Variação sazonal do pico 4

No primeiro ano do estudo (figura 18), há predomínio no outono, de elevação na produção deste metabólito, mostrando-se contrário a esta característica apenas o indivíduo IV, que apresentou diminuição de produção. No inverno deste mesmo ano o predomínio é por diminuição de produção e na primavera aumento nos dois primeiros meses da estação e diminuição no terceiro.

Para o segundo ano, há praticamente baixa de produção durante todo verão, e no outono há uma pequena elevação nos dois primeiros meses seguindo de decréscimo no terceiro. Fato este que não é observado no ano anterior. No inverno o predomínio é pela queda de produção, característica esta observada também no ano anterior. Esta queda é mantida no primeiro mês da primavera, mas com elevação de produção no mês de novembro seguido de quedas no mês seguinte, exceto para o indivíduo IV que apresenta aumento de produção.

No terceiro ano de estudo, no verão observa-se uma concordância entre todos os indivíduos, em que no verão os meses de janeiro e fevereiro são marcados pela elevação de produção e no mês de março um decréscimo. Já no outono, assim como no ano anterior, o predominante é a elevação de produção.

Apesar da semelhança de produção ente os indivíduos ser próxima, os destaques de produção deste metabólito acontece principalmente na primavera e no outono.

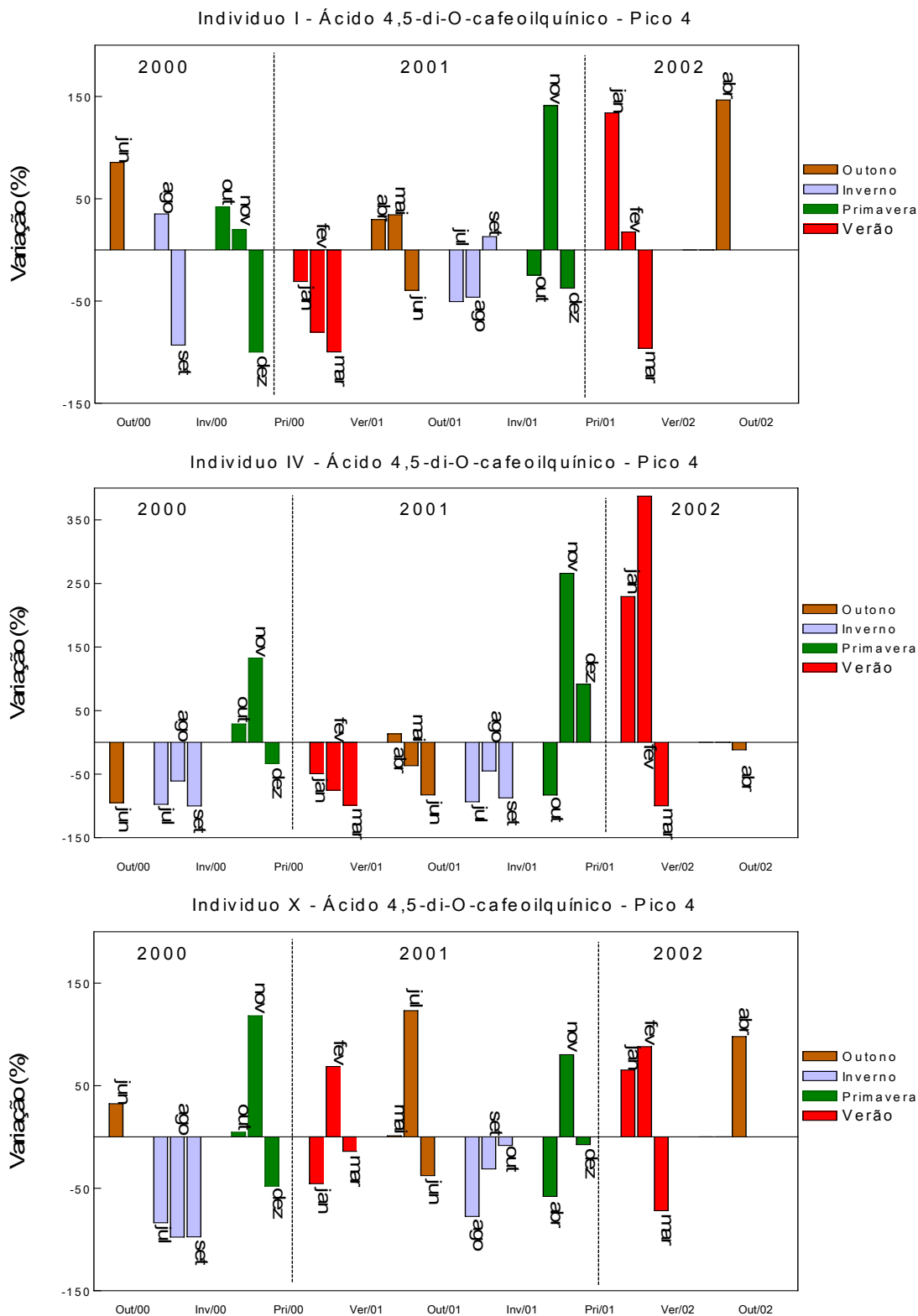


Figura 18. Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico. – pico 4.

4.2.5.5. Variação sazonal do pico 5

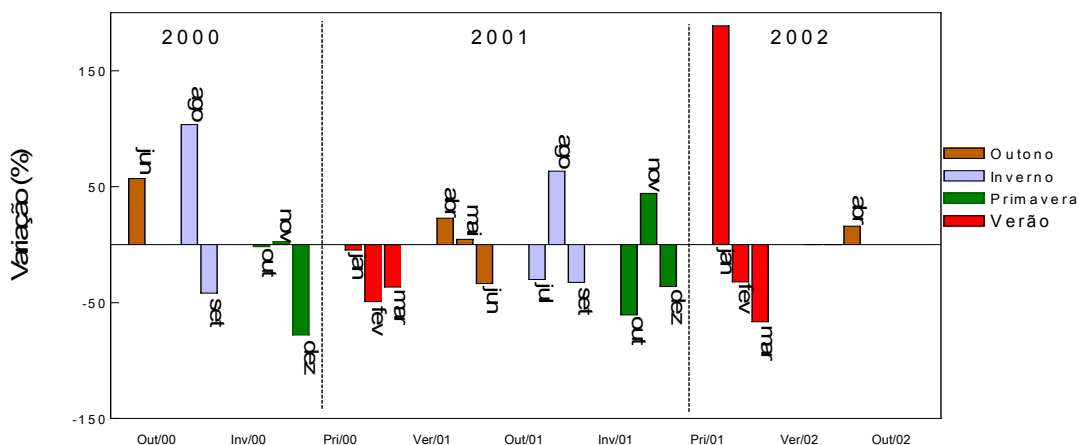
Para o metabólito Quercetina 3'-O- metil-3-O- β -D-glucopiranosídeo no final do outono, do primeiro ano de estudo, há aumento de produção, exceto no indivíduo IV que apresenta decréscimo de produção (figura 19). No inverno a predominância é por elevação da produção no início da estação e queda no final. Já na primavera o predomínio é por queda, tendo um pico de produção apenas em novembro no indivíduo X.

No segundo ano, o verão também apresenta predomínio de queda de produção, sendo seguido pelo outono que apresenta tendência a pequenas elevações no início da estação, sendo que em maio a produção aumentou significativamente nos indivíduos IV e X, mas no mês seguinte há predomínio de queda de produção novamente. Já no inverno o perfil é semelhante a todos os indivíduos, apresentando queda de produção no início e final da estação, além disso há um aumento de produção em relação a média no mês de agosto. E estas características são iguais ao do ano anterior só para o final da estação. Na primavera o predomínio é por queda de produção, característica esta também observada nos resultados do ano anterior deste estudo.

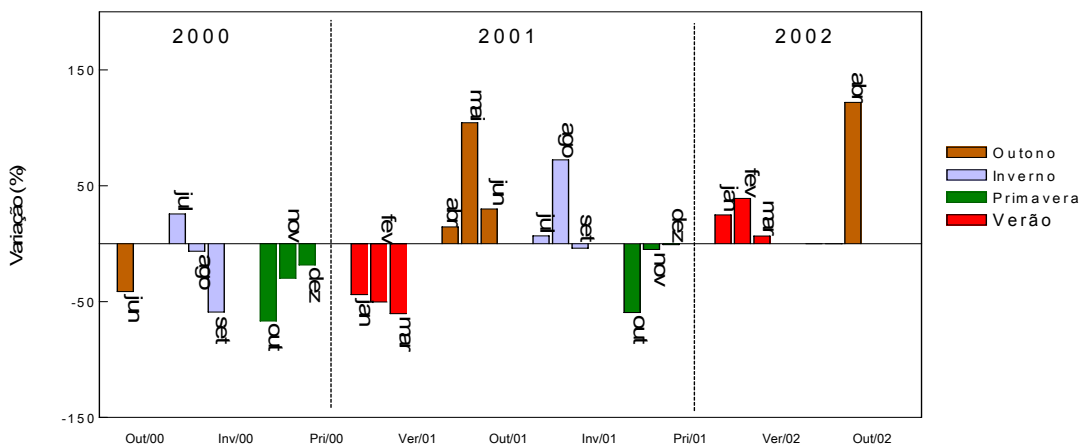
Para o terceiro ano do estudo, no verão é observado elevação da taxa de produção deste metabólito nos indivíduos I e IV e no indivíduo X diminuição. Já no primeiro mês do outono deste ano é observado elevação de produção para todos os indivíduos.

Apesar deste metabólito apresentar taxas de produção bastante variáveis durante o estudo, tornando difícil a definição da melhor época de coleta, pode-se considerar o outono como a estação em que mais houve produção deste metabólito.

Indivíduo I - Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo - Pico 5



Indivíduo IV - Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo - Pico 5



Indivíduo X - Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo - Pico 5

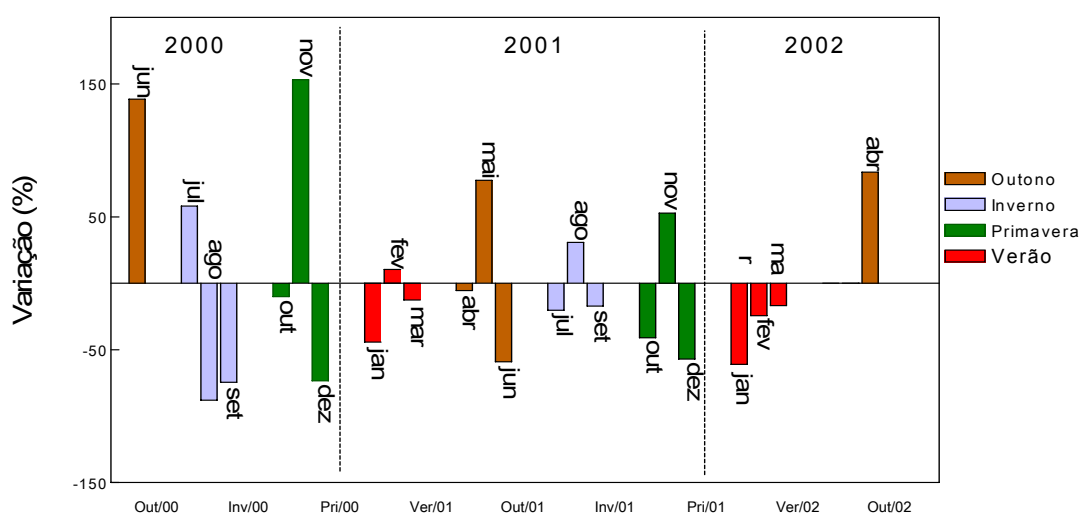


Figura 19. Gráfico das variações sazonais ocorridas nos indivíduos I, IV e X para a substância Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo – pico 5.

4.2.5.6. Análise da variação sazonal no indivíduo I

Analisando as variações de todos os metabólitos, ocorridas no indivíduo I durante o estudo (figura 20), é possível observar que no ano de 2000 houve uma tendência por parte deste indivíduo a produzir mais os metabólitos relativos aos picos 3, 4 e 5 no final do primeiro outono do estudo. Variações semelhantes no primeiro inverno para todos os metabólitos, com aumento no mês de agosto e queda em setembro, também foram observadas. Já na primeira primavera houve aumento de produção apenas para o metabólito relativo ao pico 4.

Em 2001, o primeiro verão provocou queda de produção em todas as substâncias, havendo uma recuperação da produção, também para todas nos dois primeiros meses do segundo outono, seguido de queda no terceiro mês. Já no segundo inverno deste ano o único metabólito que apresentou aumento de produção significativo em todos os meses da estação é o relativo ao pico 3. Na segunda primavera observa-se um perfil de aumento de produção praticamente em todas as substâncias no mês de novembro.

No segundo verão do ano de 2002 só é observado aumento de produção no mês de janeiro para os metabólitos relativos ao pico 2, 4 e 5, sendo que nos outros meses da estação praticamente todos os metabólitos tem sua produção reduzida. Já no início do terceiro outono deste ano só o pico 1 não apresentou elevação de produção, fato este que não é observado no ano anterior, ano este em que todos metabólitos aumentaram sua produção nesta estação.

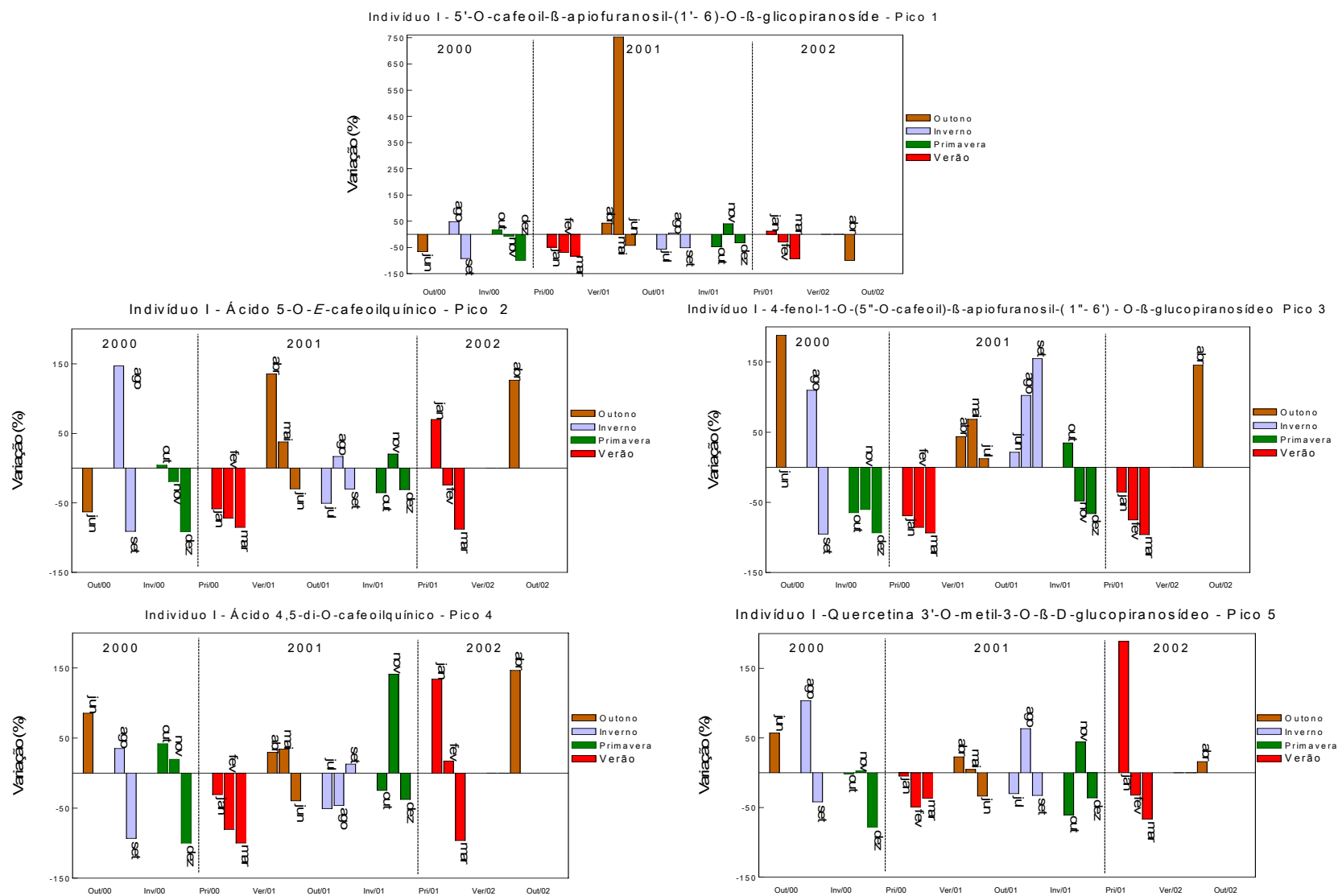


Figura 20 – Gráfico demonstrado as variações sazonais ocorridas no indivíduo I.

4.2.5.7. Análise da variação sazonal no indivíduo IV.

Na análise dos metabólitos produzidos pelo indivíduo IV (figura 21), é possível verificar que no ano de 2000 ocorreu queda de produção para todos os metabólitos no final do primeiro outono do estudo. No primeiro inverno do estudo houve aumento de produção apenas para pico 3 no mês de agosto e para o pico 5 no mês de julho. Na primeira primavera o predomínio é por aumento de produção nos dois primeiros meses da estação para os picos 1, 2 e 4.

No ano de 2001 o primeiro verão do estudo provoca queda de produção em todos os metabólitos e no segundo outono o predomínio é por aumento de produção praticamente em todos indivíduos. Este comportamento não é observado apenas para substância relativa ao pico 4. No segundo inverno, com exceção dos picos 3 e 5 que apresentam aumentos de produção, todos os outros metabólitos tiveram sua produção reduzidas. No primeiro mês da segunda primavera deste mesmo ano, praticamente todos os metabólitos apresentam produção diminuída, mantendo-se desta forma durante toda a estação apenas os metabólitos relativos aos picos 3 e 5.

Em 2002 as produções dos metabólitos no segundo verão do estudo se diferem do primeiro, pois todos os indivíduos apresentam aumento de produção em pelo menos um mês desta estação. E no terceiro outono há manutenção da média de produção para os picos 1, 2 e 4 e aumento para os picos 3 e 5.

4.2.5.8. Análise da variação sazonal no indivíduo X.

Analisando as variações ocorridas entre todos os metabólitos do indivíduo X (figura 22), pode-se verificar que no final do primeiro outono do estudo (ano 2000) apenas o metabólito relativo ao pico 1 apresentou diminuição do nível de produção. No primeiro inverno os picos 1, 2, 3 e 5 apresentam perfis semelhantes, ou seja, aumento de produção no mês de julho e diminuição nos meses seguintes. O pico 4 apresenta decréscimo de produção em todos os meses desta estação. Já na primeira primavera é observado aumento de produção em pelo menos um mês da estação para os picos 1, 2, 4 e 5, destacando-se o metabólito relativo ao pico 1 que teve produção superior a 400 % relativo a média de produção para este metabólito.

No ano de 2001 há apenas aumento de produção no primeiro verão do estudo para os picos 1, 2, 4 e 5, no mês de fevereiro. No segundo outono há uma queda de produção para todos os metabólitos no final da estação sendo registrados aumento de produção apenas para os picos 2, 3, 4 e 5 no mês de maio. Já no segundo inverno o predomínio é por queda de produção em todos os indivíduos sendo observado somente pequenas elevações de produção nos meses de agosto para os picos 2, 3 e 5. Na segunda primavera a tendência é por queda de produção para todos os metabólitos sendo observado aumento de produção somente no mês de novembro para os picos 1, 2, 4 e 5.

No ano de 2002 o segundo verão do estudo apresenta perfis de produção muito variados, sendo observados aumento de produção apenas no metabólitos relativos aos picos 1, 2 e 4. Por fim, no início do terceiro outono deste estudo ocorreu um aumento na produção dos metabólitos relativos aos picos 2, 3, 4 e 5.

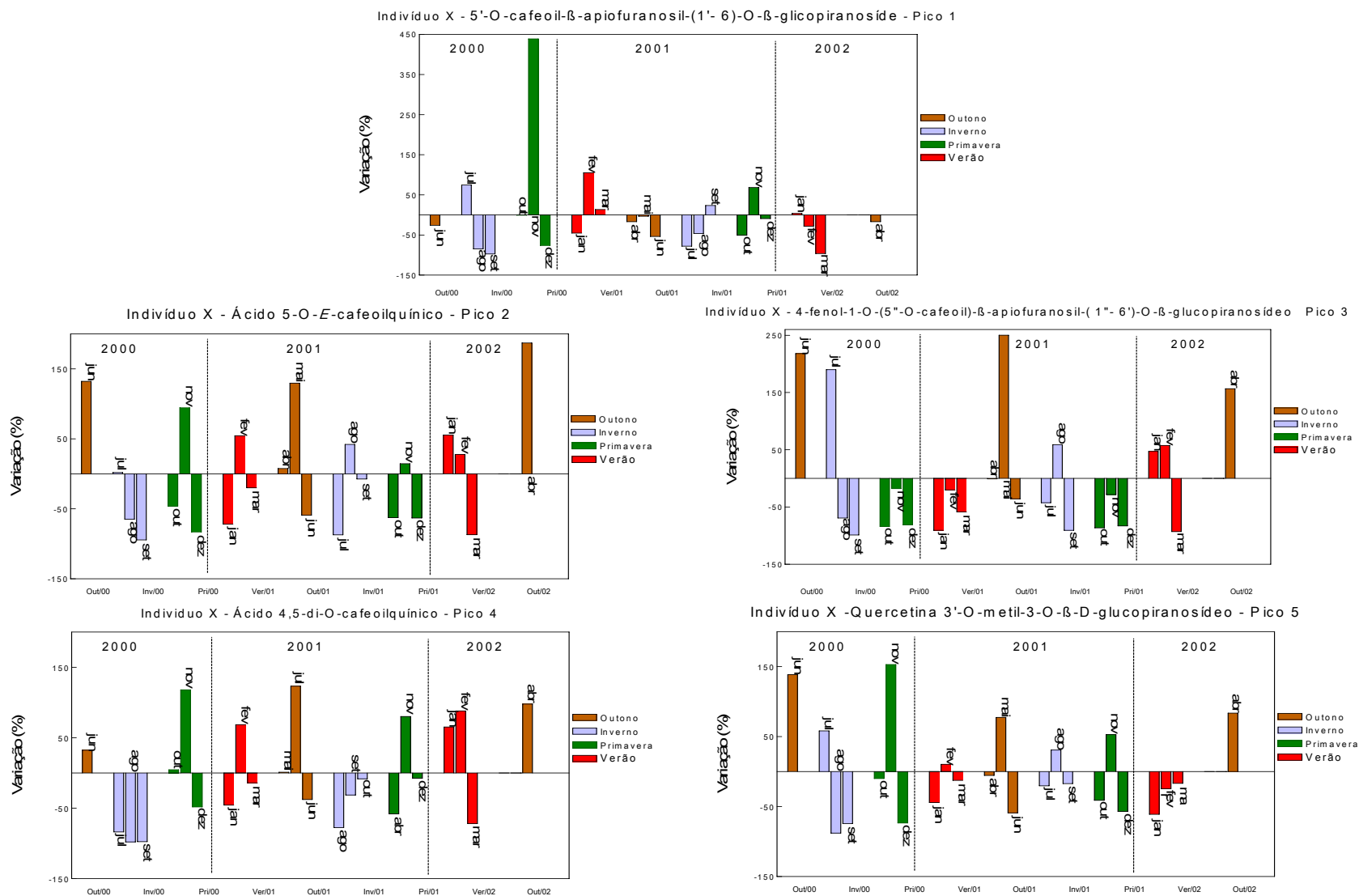


Figura 22. Gráfico demonstrado as variações sazonais ocorridas no indivíduo X.

4.3 Considerações Finais

O método desenvolvido para extração e análise por CLAE-UV dos metabólitos secundários majoritários de baixa e média polaridade das folhas de *Eremanthus glomerulatus*, demonstrou-se capaz de separar oito substâncias com parâmetros aceitáveis de resolução, que de acordo com o tempo de retenção foram identificadas como, 5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1'→6)-O- β -glicopiranosídeo, ácido 5-O-*E*-cafeoilquínico, 4-fenol-1-O-(5''-O-cafeoil)- β -apiofuranosil-(1''→6')-O- β -glucopiranosídeo, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, Quercetina 3'-O-metil-3-O- β -D-glucopiranosídeo, 3-O-(6''-O-*E-p*-cumaroil)- β -glicosilquercetina, 3-O-(6''-O-*E-p*-cumaroil)- β -glicosilkaempferol e 3-O-(6''-O-*E-p*-cumaroil)- β -glicosilisoramnetina.

A substâncias 5'-O-cafeoil- β -apiofuranosil-(1'→6)-O- β -glicopiranosídeo e 4-fenol-1-O-(5''-O-cafeoil)- β -apiofuranosil-(1''→6')-O- β -glucopiranosídeo foram isoladas do extrato foliar etanólico em quantidades de 7 mg e 148 mg respectivamente, sendo estas identificadas por RMN de ^1H e ^{13}C ou EM.

Estas substâncias que se caracterizam por serem um derivado fenólico diglicosilado que possuem um grupamento cafeiol são inéditas no gênero e na família Asteraceae, não sendo também descritas na literatura. Trata-se, portanto de substâncias no qual as atividades farmacológicas ainda não foram estudadas e que devido o fato das mesmas terem sido isoladas, este estudo pode no futuro contribuir para definição de suas atividades. Também foi isolado e identificado, embora não sendo majoritário na espécie, a substância 4-fenol-1-O- β -glucopiranosídeo (6'→1'')O- β -apiofuranosil.

As demais substâncias foram identificadas através da utilização das técnicas hífenadas CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, concluindo-se assim que a utilização destas técnicas para identificação de metabólitos secundários diretamente

dos extratos vegetais, sem a necessidade de seu isolamento, foi uma escolha adequada que permitiu rapidez e eficiência na atribuição de picos cromatográficos. Além disso, os espectros de UV e de massas de íons produtos (EM/EM) podem ser utilizados para iniciar uma construção de banco de dados visando facilitar e agilizar o processo de identificação por estas técnicas em estudos futuros.

No estudo de variações sazonais, inicialmente pode-se observar que o envelhecimento das folhas resulta em uma significativa redução no conteúdo de todos os metabólitos secundários presentes na espécie estudada. Verificou-se também que os indivíduos apresentam perfis metabólicos bem semelhantes com diferenças quantitativas, mas praticamente não apresentando variações qualitativas.

Pode-se observar também que há um metabolismo bem diversificado no qual nem sempre todos os indivíduos apresentam aumento de produção de um mesmo metabólito em determinada estação do ano. Apesar das variáveis é possível definir o outono e a primavera como as estações que durante o estudo apresentaram os melhores índices de produção de praticamente todos os metabólitos analisados, mas não é possível determinar o melhor mês, uma vez que existem variações de produção dentro de uma mesma estação.

Por fim pode-se concluir que as variações sazonais em *E. glomeratus* são significativas e que são determinantes para definir a época de futuras coletas para posteriores estudos químicos ou farmacológicos.

5 – CONCLUSÕES

5 – Conclusões

Ao término deste estudo foi possível concluir que:

- Os extratos analisados apresentam preferencialmente substâncias polares pertencente a classe dos derivados fenólicos, ácidos cafeoilquínicos e flavonóides.
- No estudo de variações sazonais, os indivíduos apresentam perfis metabólicos bem semelhantes com diferenças apenas quantitativas. Pode-se observar também que há um metabolismo bem diversificado entre os indivíduos e que apesar das variáveis é possível definir o outono e a primavera como as estações que durante o estudo apresentaram os melhores índices de produção de praticamente todos os metabólitos analisados, mas não é possível determinar o melhor mês, uma vez que existem variações de produção dentro de uma mesma estação.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 – Referências Bibliográficas

Ablajan, K.; Abliz, Z.; Shang, X.; He, J.; Zhang R.; Shi, J.; 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.** 2006; v. 41: 352–360

ALHO, C.J.R., MARTINS, E.S. 1995. **De Grão em Grão, o Cerrado Perde Espaço (Cerrado – Impactos do Processo de Ocupação)**. WWF- Fundo Mundial para a Natureza. Brasília.

Alonso-Salces, R.; M.; Ndjokob, K.; Queiroz, E.; F.; Ioset, J.; R.; Hostettmann, K.; Berrueta, L.; A.; Gallo, B.; Vicente, F.; On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. **Journal of Chromatography A**, 1046, 89–100. 2004.

ANDRADE, A.Z.L; FELFILI, J.M.; VIOLATTI, L. 2002. Fitossociologia De Uma Área De Cerrado Denso Na Recor-lbge, Brasília-Df. **Act.Bot. Bras**, v. 16(2), p. 225-240, 2002.

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochem Syst Ecol**, v.30, p.189-203, 2002.

BARROS, D. A. D. et al. Sesquiterpene lactones in the molluscicidal extract of *Eremanthus glomerulatus*. **Planta Med.** Stuttgart, v. 49, p. 38-39, 1985

BARROSO, G, M.; **Sistemática de Angiosperma no do Brasil**. v. 2 São Paulo e Rio de Janeiro, Livros Tecnicos e científicos Ed. Universidade de São Paulo, 1991, 150 p.

BASE DE DADOS TROPICAIS (BDT). **De grão em grão o cerrado perde espaço** (Cerrado - Impactos do Processo de Ocupação) WWF / PRO-CER Documento para discussão. <<http://www.bdt.fat.org.br/cerrado/dominio/>> Acesso em: 22 de ago. 2005.

BOHLMANN, F. et al. Furanoheliangolides from two *Eremanthus* species and from *Chresta sphaerocephala*. **Phytochemistry**. Oxford, v. 21, n. 7, p. 1669-1673, 1982.

BOHLMANN, F. et al. Sesquiterpene lactones from *Eremanthus* species. **Phytochemistry** Oxford, v. 19, p. 2663-2668, 1980.

BOHLMANN, Ferdinand; GUPTA, Rajinder K.; JAKUPOVIC, Jasmin; ROBINSON, Harold; KING, Robert M. Naturally occurring terpene derivatives. Part 320. Three germacranolides and other constituents from *Eremanthus* species. **Phytochemistry** Oxford, 20(7), 1609-12. 1981.

BOWERS, M.D.; STAMP, N.E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v.74, n.6, p.1778-1791, 1993.

BRADSHAW, J., BUTINA, D., DUNN, A. J., GREEN, R. H., HAJEK, M., JONES, M. M., LINDON, J. C., SIDEBOTTON, P. J. A Rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1541, 2001.

BREMER, K. **Asteraceae cladistics & classification**. Portland, Timber Press, 1996, 160 p.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R.; TAMASHIRO, J. Y.; SHEPHERD, G. J. How rich is the flora of Brazilian Cerrados? **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 86, n. 1, p. 192-203, 1999.

CHIARI, E. et al. In vitro screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytother. Res.** Sussex, v. 10, n. 7, p. 636-638, 1996.

CLARK, L.E.; CLARK, W.D. Seasonal variation in leaf exudate flavonoids of *Isocoma acradenia* (Asteraceae). **Biochem Syst Ecol**, v.18, n.2/3, p.145-148, 1990.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food and Agric.**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food and Agric.**, v. 79, p. 362-372, 1999.

CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **J. Sci. Food and Agric.**, v. 51, p. 2900-2011, 2003.

CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 3821-3832, 2005.

CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MS of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyldimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. **J. Sci. Food and Agric.**, v. 54, p. 1957-1969, 2006.

CLIFFORD, M.N.; Wu, W.; KIRKPATRICK, J.; KUHNERT, N. Profiling the Chlorogenic Acids and Other Caffeic Acid Derivatives of Herbal Chrysanthemum by LC-MSn. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 929-936, 2007.

CREMIN, P.A.; ZENG, L. High-Throughput Analysis of natural products compound libraries by parallel LC-MS Evaporative Light Scattering detection. **Anal. Chem.** V. 74, p. 2492, 2002.

DARROW, K.; BOWERS, M.D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochem Syst Ecol**, v.25, n.1, p.1-11, 1997.

DE MARIA, Carlos Alberto Bastos and MOREIRA, Ricardo Felipe Alves. Analytical methods for chlorogenic acid. **Quím. Nova**, July/Aug., vol.27, no.4, p.586-592, 2004.

DE SOUSA, C. P. et al. Chemoprophylaxis of schistosomiasis: Molluscidal activity of natural products. **An. Acad. Brasil. Cienc.** Rio de Janeiro, v. 56, n. 3, p. 333-338, 1984.

DIAS, B.F. de S. 1994. A conservação da natureza. Pp.607-663. In: M. N. Pinto (Org.). **Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas**. Editora Universidade de Brasília. Brasília.

DIAS, F. L. et al. Genotoxicity of the natural cercaricides "sucupira" oil and eremanthine in mammalian cells "in vitro" and "in vivo". **Environ. Molec. Mutat.** New York, v. 26, n. 4, p. 338-344, 1995.

EITEN, G. 1994. Vegetação do Cerrado. Pp. 17-73. In: M. N. Pinto (Org.). **Cerrado: Caracterização, Ocupação e Perspectivas**. Editora Universidade de Brasília. Brasília.

EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. WB Saunders Company, London, 14 ed., 612p., 1996.

FELFILI, J. M.; SILVA Jr., M.C.; Rezende, A.V.; Machado, J.W.B.; Walter, B.M.T.; SILVA, P.E.N. & HAY, J.D. 1993. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado *sensu stricto* na Chapada Pratinha, DF-Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 6(2): 27-46.

FERNANDÉZ-METZLER, C.L.; OWENS, K.G.; BAILLIE, T.A.; KING, R.C. Rapid liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based screening procedures for studies on the biotransformation of drug candidates. **Drug Metab. Disp.**, v.27, n.1, p.32-40, 1999.

GELPI, E. Biomedical and biochemical applications of liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, n.703, p.59-80, 1995.

GENTRY, A.H.; HERRERA-MAC Bryde, O.; HUBER, O.; NELSON, B.W. & VILLAMIL, C.B. 1997. Regional overview: South America. Pp. 269-307. In: V.H. Heywood, S.D. Davis (Coord.). **Centres of Plant Diversity**. WWF/IUCN. Cambridge.

GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Adv Phytochem**, v.18, p. 273-320, 1984

GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteracea) e determinação de suas variações populacionais e temporais**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002.

GOBBO-NETO, L. **Estudo fitoquímico do extrato polar das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. e avaliação de sua atividade antiinflamatória**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 128p., 2002.

GOBBO-NETO, Leonardo and LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, Abr 2007, vol.30, no.2, p.374-381.

GRAEL, C.F.F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L.C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and tripanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. **Fitoterapia**, v. 76, p. 73-82, 2005.

HIND, D. J. N. & BEENTJE, H. J. Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference. Royal Botanic Gardens, **Kew Bulletin**, v. 1, p. 621-626, 1996.

JALAL, M.A.F.; READ, D.J.; HASLAM, E. Phenolic composition and its seasonal variation in *Calluna vulgaris*. **Phytochemistry**, v.21, n.6, p.1397-1401, 1982.

KAMMERER, D.; CLAUS, A.; CARLE, REINHOLD.; SCHIEBER ANDREAS.; Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.** 2004, v.52, 4360-4367

Klink, C.A. 1996. Relação entre o desenvolvimento agrícola e a biodiversidade. Pp. 25-27. In: R.C. Pereira, L. C. B. Nasser (Eds.). **Anais VIII Simpósio sobre o Cerrado, 1st International Symposium on Tropical Savanas - Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e fibras nos Cerrados**. Embrapa CPAC. Brasília

KLINK, C.A.; MACEDO, R.F.& MUELLER, C.C. 1995. **De Grão em Grão, o Cerrado Perde Espaço (Cerrado - Impactos do Processo de Ocupação)**. WWF Fundo Mundial para a Natureza. Brasília.

LINDROTH, R.L.; HSIA, M.T.S.; SCRIBER, J.M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochem Syst Ecol**, v.15, n.6, p.681-686, 1987.

LOBSTEIN, A.; JAKO, L.R.; BERRURIER, M.H.; ANTON, R. Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. **Planta Med**, v.57, p.430-433, 1991.

LOPES, N.P.L. **A essência da arnica**. Fapesp Pesquisa, n. 64, maio, p.42-44, 2001

LOPES; N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.689-693, 1997.

MACLEISH, N. F. F.; Revision of *Eremanthus* (Compositae: Vernoniae). **Ann. Missouri Bot. Gard.** Washington v. 74, p. 265-290, 1987.

MACHADO, R.B., M.B. RAMOS NETO, P.G.P. PEREIRA, E.F. CALDAS, D.A. GONÇALVES, N.S. SANTOS, K. TABOR E M. STEININGER. 2004. **Estimativas de**

perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Brasília, DF.

MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA, M.C., REZENDE, A.R., FILGUEIRAS, T.S. & NOGUEIRA, P.E. **Flora vascular do Cerrado. In Cerrado: ambiente e flora.** (S.M. Sano & S.P. Almeida, eds.). EMBRAPA - CPAC, Planaltina, DF, p.289-556, 1998.

MENKOVIC, N.; SAVIKIN-FODULOVIC, K., SAVIN, K. Chemical composition and seasonal variations in the amount of secondary compounds in *Gentiana lutea* leaves and flowers. *Planta Med.*, v.66, p. 178-180, 2000.

MARCH, R.E.; MILAO, X. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry*, 231(2-3), 157-167, (2004).

MARCH, R.E.; LEWARS, E.G.; STADEY, C.J.; MIAO, X.; ZHAO, X.; METCALFE, C.D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 248(1-2), 61-85, 2006

MITTERMEYER, R.A.; MYERS, N.; MITTERMEIER, C.G. 1999. **Hotspots Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions.** CEMEX Conservation International.

MOLGARD, P.RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. *Phytochemistry*, v. 27, p. 2411-2421, 1988.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858, 2000.

NDAMBA, J.; LEMMICH, E.; MØLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochemistry*, v.35, n.1, p.95-99, 1994.

NOGUEIRA, R., PEREIRA, E., KASUYA, O., L., MEGUMI, M., C. Mycorrhizal fungi associated to orchids growing in "campos rupestres" in "Quadrilátero Ferrífero" region, Minas Gerais State, Brazil. *Acta Bot. Bras.*, Juy/Sept. 2005, vol.19, no.3, p.417-424.

OLIVEIRA, E.J.; WATSON, D.G. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. **Biomed. Chromat.**, n.14, p.351-372, 2000.

PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M.J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ-PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, Fco. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochem Syst Ecol**, v.29, p.663-672, 2001.

PAREJO, I.; JAUREGUI, O.; FERRAN, S.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; CODINA C.; Separation and Characterization of Phenolic Compounds in Fennel (*Foeniculum vulgare*) Using Liquid Chromatography-Negative Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 2004, 52, 3679-3687.

PICMAN, Anna K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology** (1986), 14(3), 255-81. CODEN: BSECBU ISSN:0305-1978. CAN 105:17708 AN 1986:417708 CAPLUS Pp. 25-27. In: R.C. Pereira, L. C. B. Nasser (Eds.). **Anais VIII Simpósio sobre o Cerrado, 1st International Symposium on Tropical Savanas - Biodiversidade e Produção Sustentável de Alimentos e fibras nos Cerrados**. Embrapa CPAC. Brasília.

PROENÇA, C.; OLIVEIRA, R.S.; SILVA, AP. **Flores e frutos do cerrado**. 226p., 2000.

RATTER, J. A., RIBEIRO, J. F., BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany.**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RATTER, J. E.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Ann. Bot. London**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RIBEIRO, J. F. & WALTER, B.M.T. 1998. Fitofisionomias do bioma cerrado. Pp.89-166. In: S. M. Sano, S. P. Almeida (Eds.). **Cerrado: Ambiente e Flora**. Embrapa CPAC. Planaltina.

ROCHFORT, S. J.; IMSIC, M.; JONES R.; TRENERRY, V. C.; TOMKINS, B.; Characterization of Flavonol Conjugates in Immature Leaves of Pak Choi [*Brassica rapa* L. Ssp. *chinensis* L. (Hanelt.)] by HPLC-DAD and LC-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.** 2006, 54, 4855-4860.

ROMANI, A.; VIGNOLINI, P.; ISOLANI, L.; IERI, F. ; HEIMLER, D.; HPLC-DAD/MS Characterization of Flavonoids and Hydroxycinnamic Derivatives in Turnip Tops (*Brassica rapa* L. Subsp. *sylvestris* L.). **J. Agric. Food Chem.** 2006, 54, 1342-1346.

ROMERO, ROSANA and NAKAJIMA, JIMI NAOKI. Endemic species from Serra da Canastra National Park, Minas Gerais. **Rev. bras. Bot.**, Oct. 1999, vol.22 suppl.2, p.259-265. ISSN 0100-8404.

RÖSCH, D.; KRUMBEIN, A.; MÜGGE, C.; KROH, W. L.; Structural Investigations of Flavonol Glycosides from Sea Buckthorn (*Hippophae2 rhamnoides*) Pomace by NMR Spectroscopy and HPLC-ESI-MSⁿ. **J. Agric. Food Chem.** 2004, 52, 4039-4046.

RÜNGLER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorg. Méd. Chem.**, v. 7, p.2343, 1999.

SAKAMOTO, H. T. **Estudos das variações de metabólitos secundários de populações das espécies *Eremanthus elaeagnus* e *E. glomerulatus* (Vernonieae, Asteraceae)** 2004 Tese de Doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; Ribeirão Preto.

SAKAMOTO, H. T., GOBBO-NETO, L., CAVALHEIRO, A. J., LOPES, N. P., LOPES, J. L. C. Quantitative HPLC Analysis of Sesquiterpene Lactones and Determination of Chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 16, N^o. 6B, 1396-1401, 2005.

SANTOS, M. D. **Lychnophora ericoides Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas.** 2006. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Usp,

SANTOS, M.D. **Isolamento dos constituintes polares e avaliação da atividade antinociceptiva das raízes de *Lychnophora ericoides* Mart.** 2002. 86p. Dissertação (Mestrado) – FCFRP-USP, Ribeirão Preto, SP
SCHMIDT *et al.*, 1998

SACILOTTO, A. C. B. C., SARTORI, F. T., VICHNEWSKI, W. *Eremanthus veadeiroensis* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 30(9), 897-900, 2002.

SIMÕES, C. M. O, SCBENKEL, E. P., GOSMAM, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Rio Grande do Sul, 5 ed., editora UFRGS, 2004.

SOUTHWELL, I.A.; BOURKE, C.A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, v.56, p.437-441, 2001.

STREGE, M. A. High-performance liquid chromatographic-electrospray ionization mass spectrometric analyses for the integration of natural products with modern high-throughput screening. **J. Chromatog. B.**, v. 725, p.67, 1999.

VIADANA, A. G., A classificação fisionômica de Kuechler empregada na definição dos padrões vegetacionais do cerrado. **Estudos Geográficos**, Rio Claro, v. 3(2), p. 103-107, 2005.

VICHNEWSKI, W. & GILBERT, B.; Schistosomicidal sesquiterpene lactone from *Eremanthus elaeagnus*. **Phytochemistry**. Oxford ,v.11, p. 2563-2566, 1972.

VVEDENSKAYA, I. O.; ROSEN R.T.; GUIDO J. E.; RUSSELL D. J.; MILLS K. A; VORSA N.; Characterization of Flavonols in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, 188-195, 2004.

WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K.R.; MAJOR, H.J; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **J. Chromatog. A**, v. 926, p. 29, 2001.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants, cap.4, *In*: BERNAYS, E.A. **Insect-plant interactions**, CRS press, v.1, 164p., 1989.

WILT, F.M.; GEDDES, J.D.; TAMMA, R.V.; MILLER, G.C.; EVERETT, R.L. Interspecific variation of phenolic concentrations in persistent leaves among six taxa from subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). **Biochem Syst Ecol**, v.20, n.1, p.41-52, 1992.

WILT, F.M.; MILLER, G.C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis* : Asteraceae). **Biochem Syst Ecol**, v.20, n.1, p.53-67, 1992.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v.50, p.115-133, 2001.

APÊNDICES

Apêndices

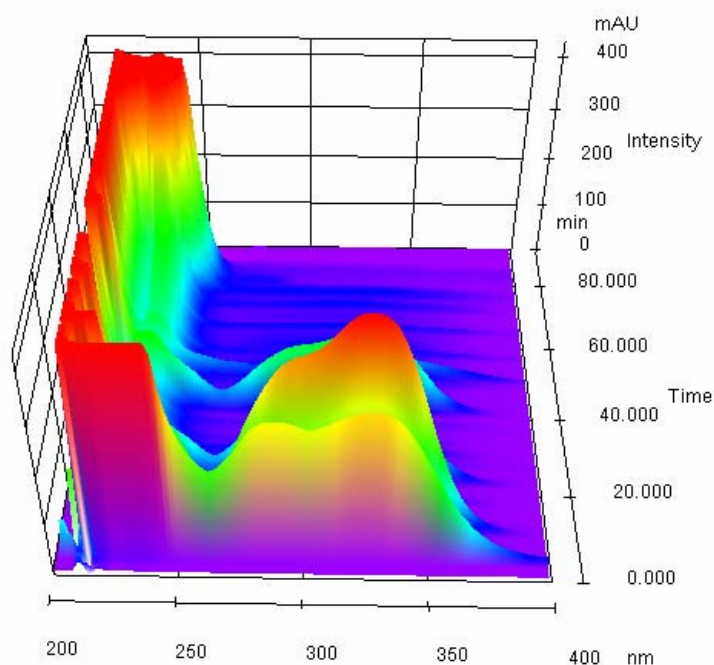
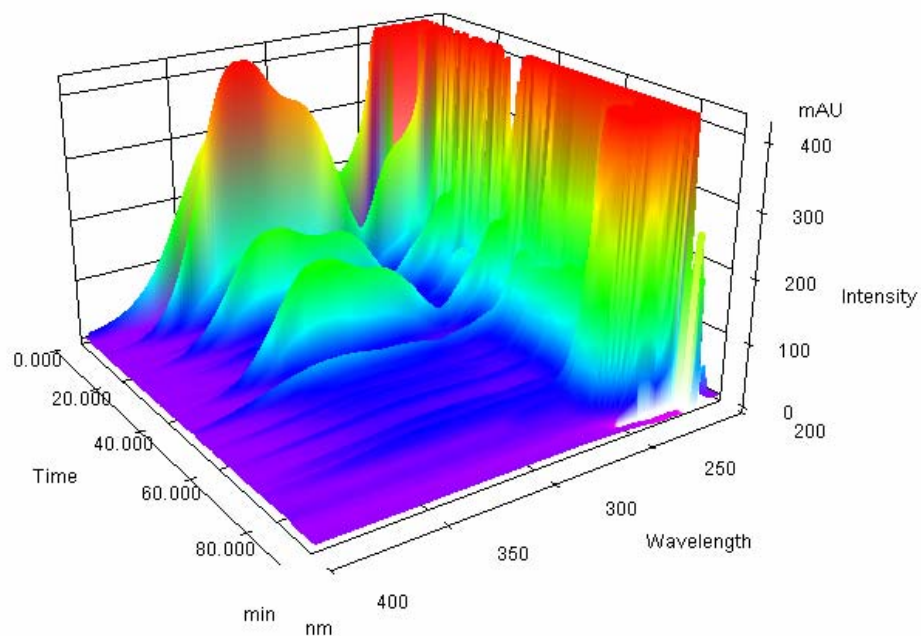


Figura 1. Exemplo de cromatogramas em 3 dimensões (tempo de retenção X comprimento de onda X intensidade da absorção) obtidos para o indivíduo E 16-IV, utilizando o método desenvolvido para o estudo de variação sazonal.

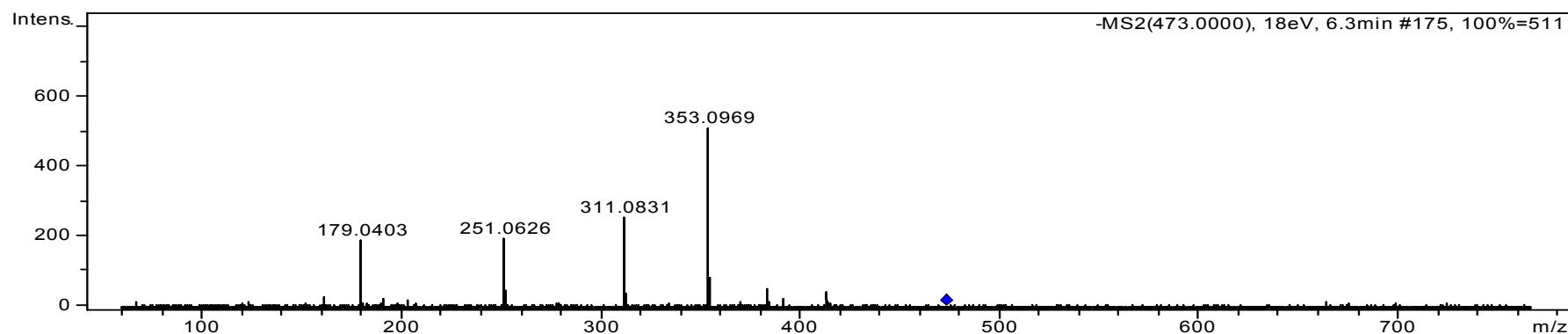
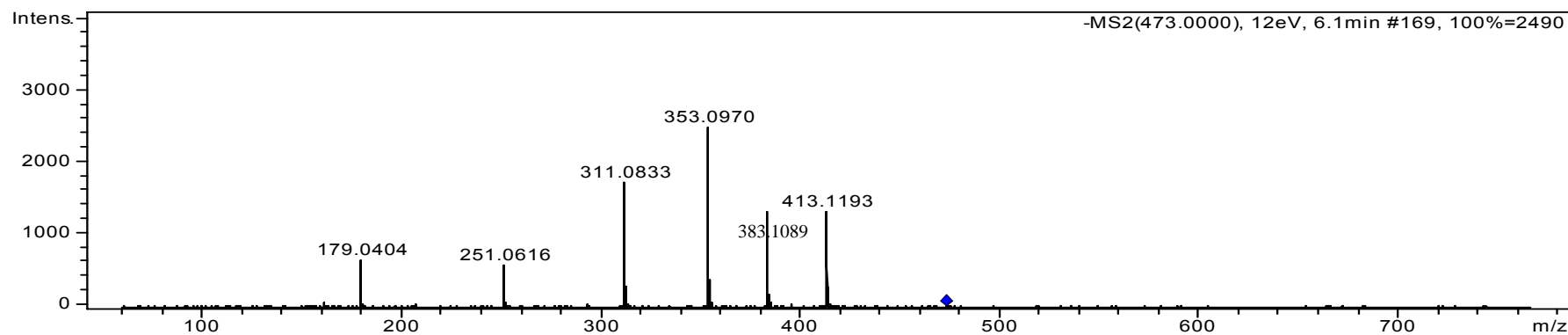
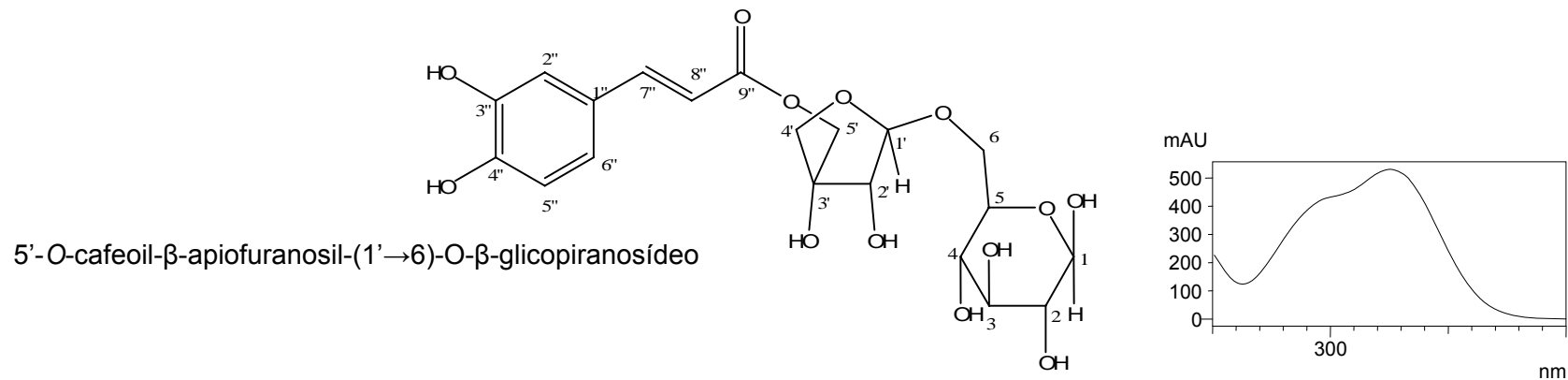


Figura 2. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produtos nos modos de ionização negativo 12 eV (superior) e 18 eV (inferior) obtidos para o pico cromatográfico 2 por CLAE-DAD-EM/EM.

Ácido 5-O-cafeoilquínico – Pico 2

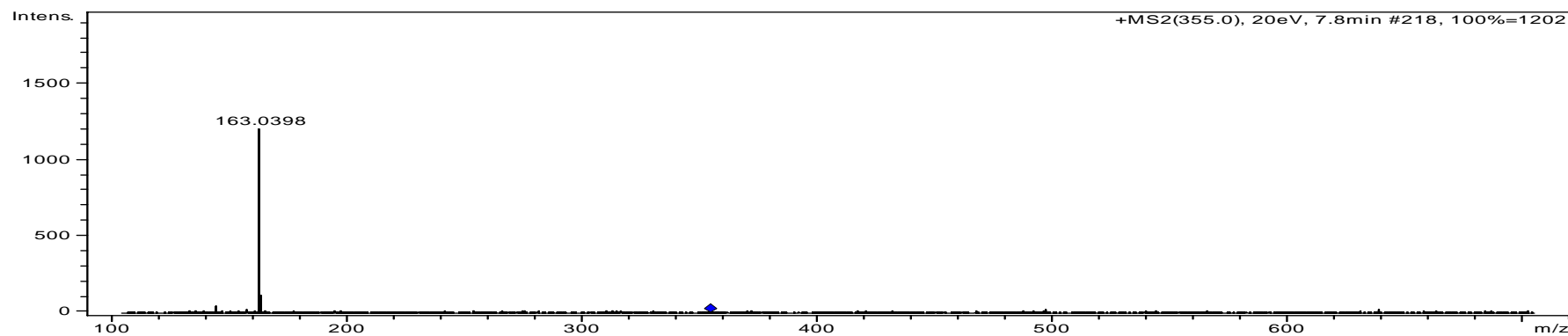
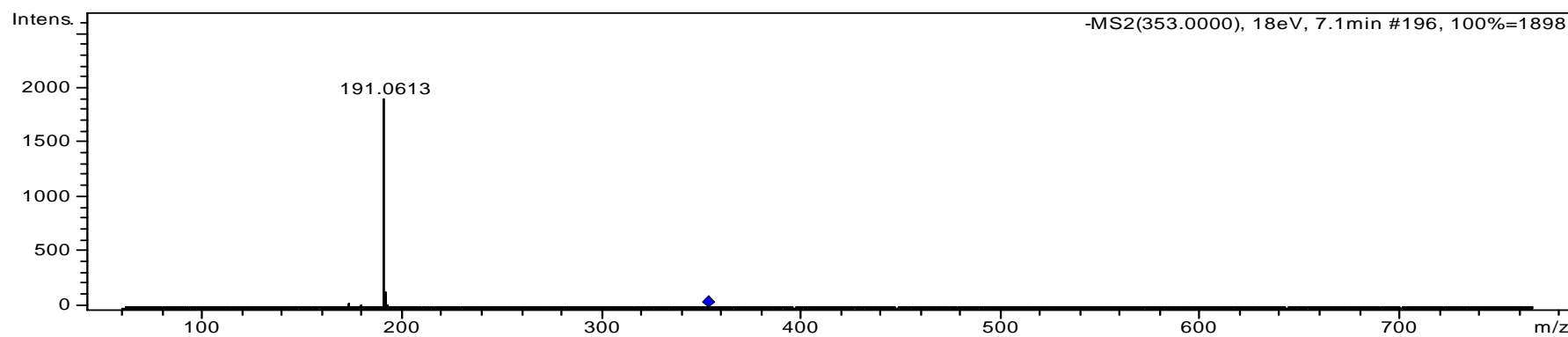
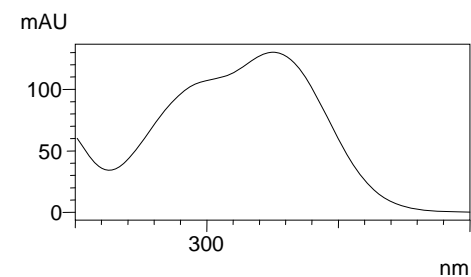
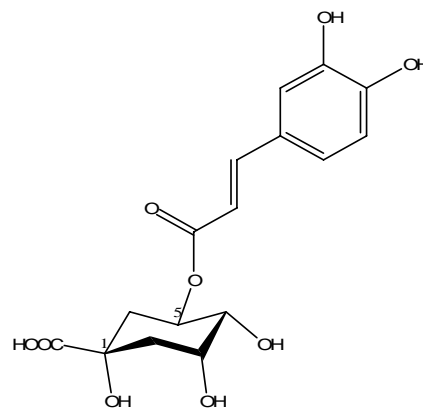


Figura 3. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produtos nos modos de ionização negativo (superior) e positivo (inferior) obtidos para o pico cromatográfico 2 por CLAE-DAD-EM/EM.

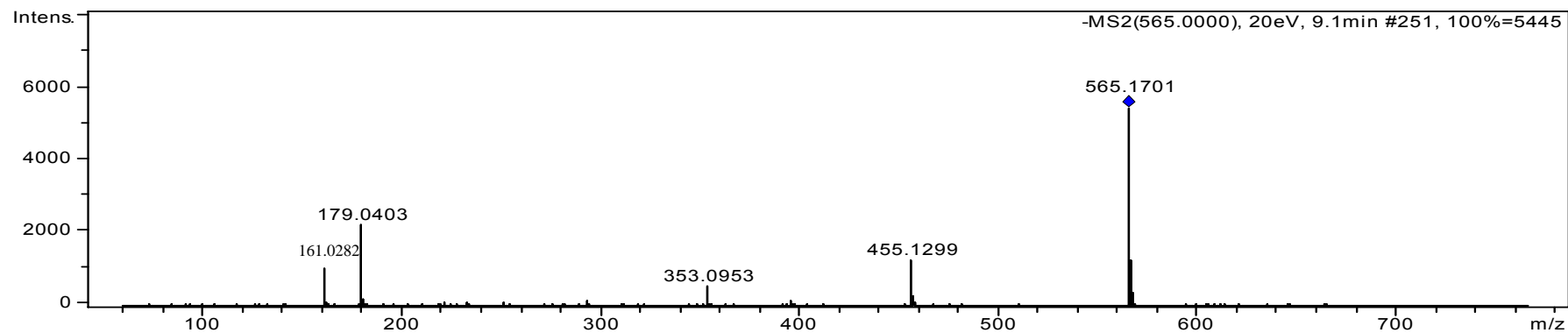
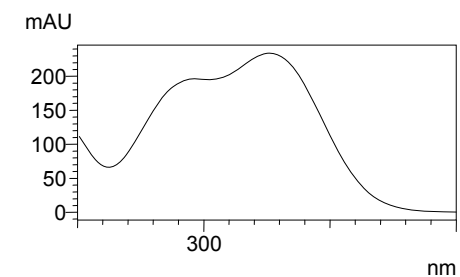
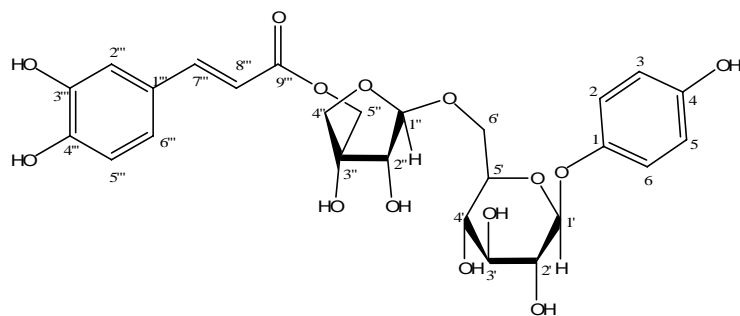
4-fenol-1-O-(5''-O-cafeoil)- β -D-apiofuranosil-(1'' \rightarrow 6')-O- β -D-glucopiranosídeo – Pico 3

Figura 4. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produtos no modo de ionização negativo obtido para o pico cromatográfico 3 por CLAE-DAD-EM/EM.

Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico – Pico 4

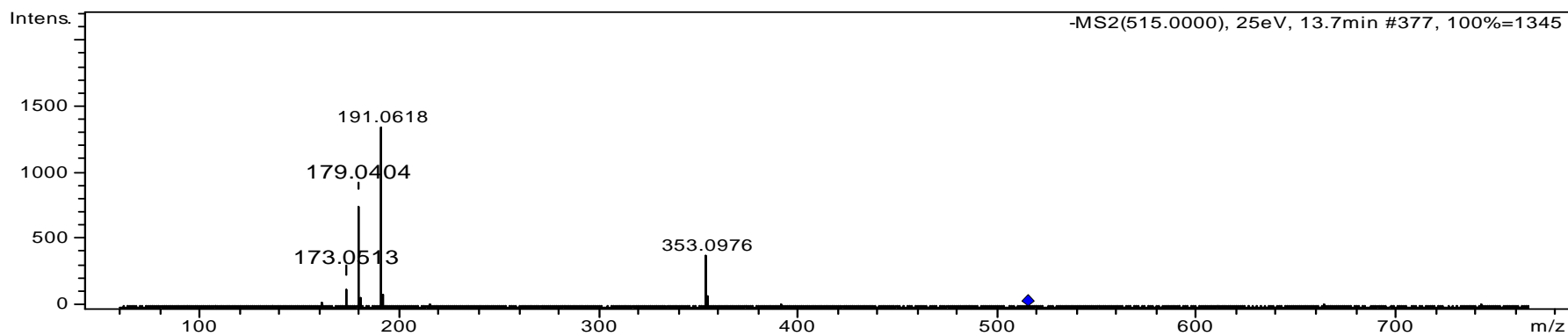
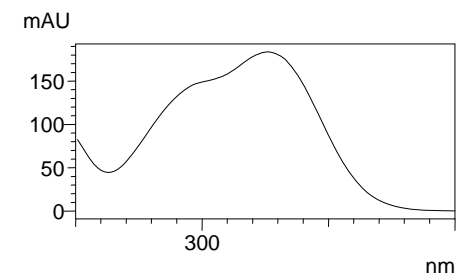
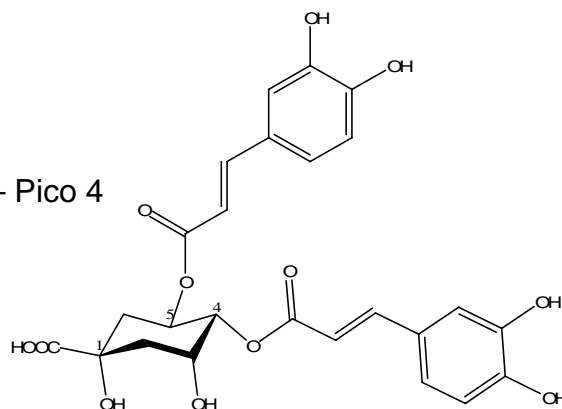


Figura 5. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produtos no modo de ionização negativo obtido para o pico cromatográfico 4 por CLAE-DAD-EM/EM.

Quercetina 3'-O-metil-3-O-β-D-glucopiranosídeo – Pico 5

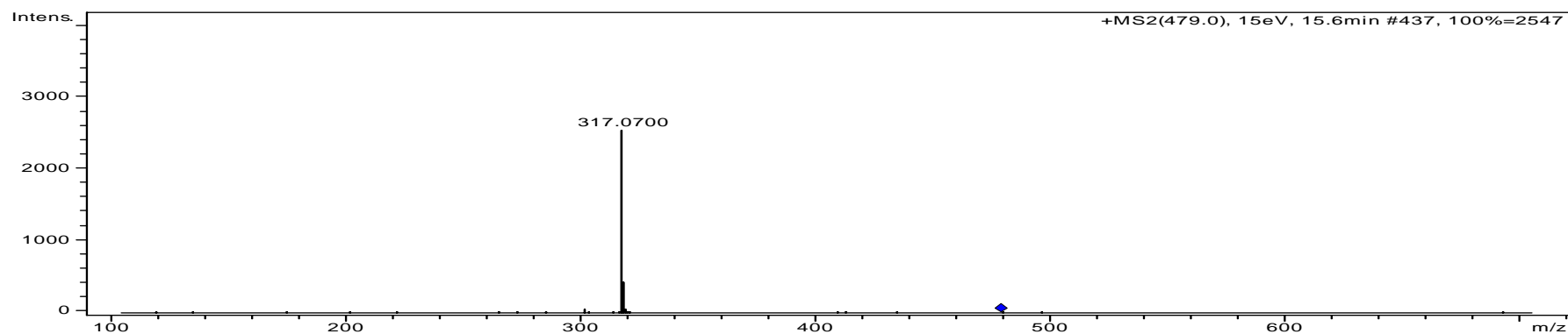
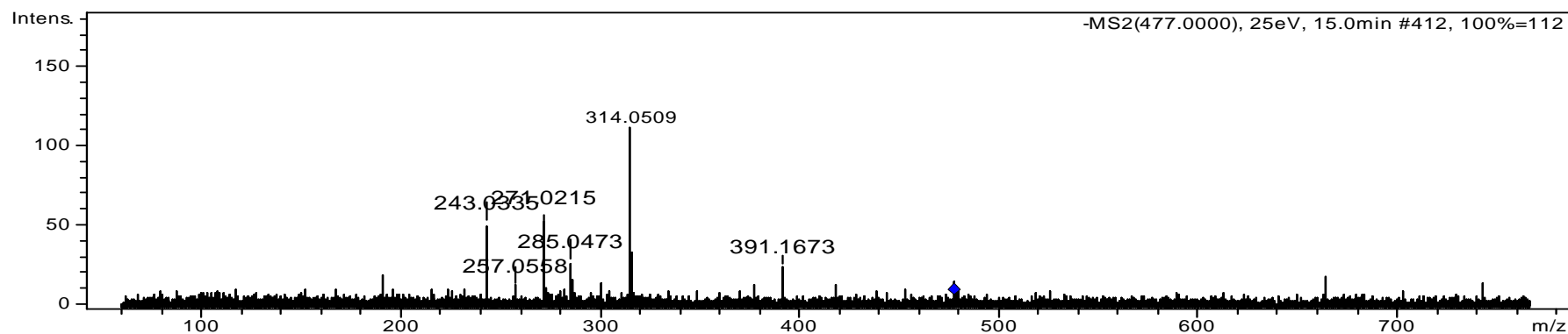
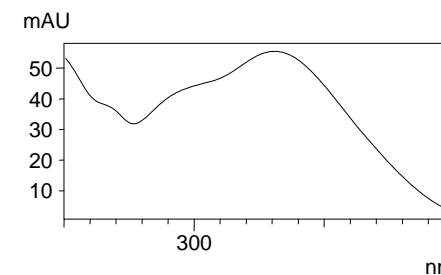
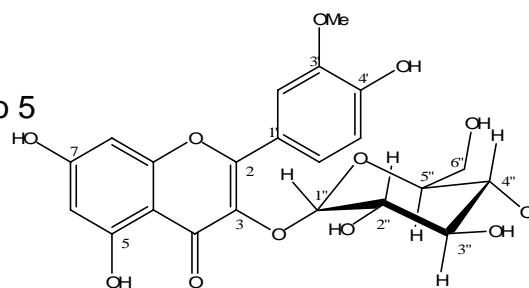


Figura 6. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produtos nos modos de ionização negativo (superior) e positivo (inferior) obtidos para o pico cromatográfico 5 por CLAE-DAD-EM/EM.

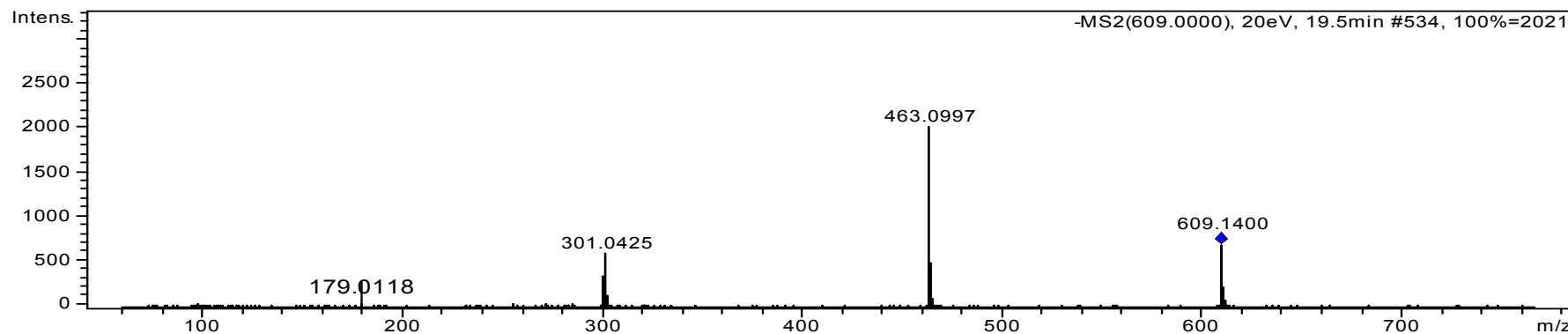
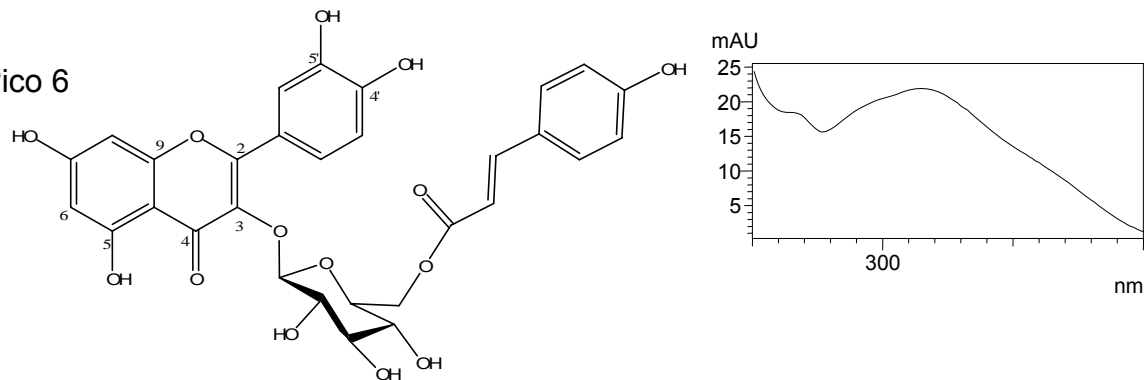
3-O-(6''-O-*E*-*p*-cumaroil)- β -glicosilquercetina – Pico 6

Figura 7. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produtos no modo de ionização negativo obtido para o pico cromatográfico 6 por CLAE-DAD-EM/EM.

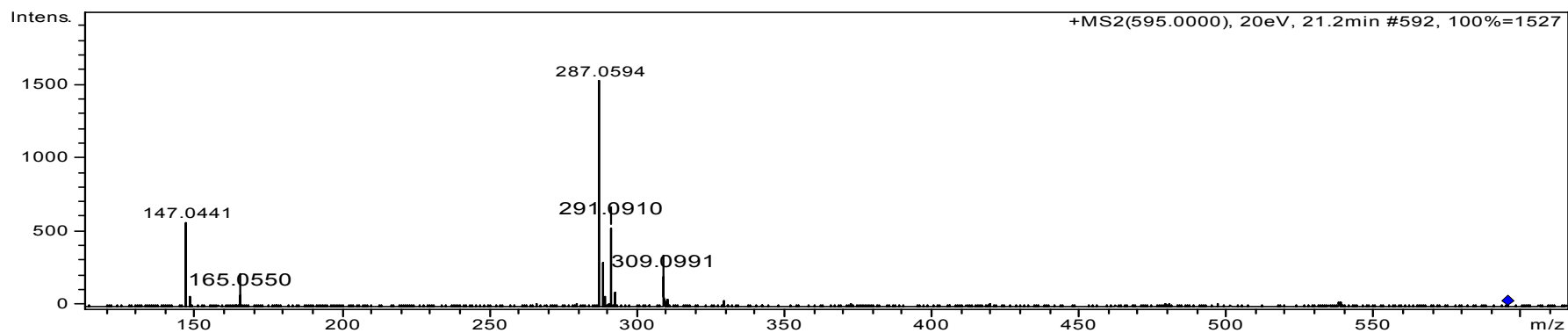
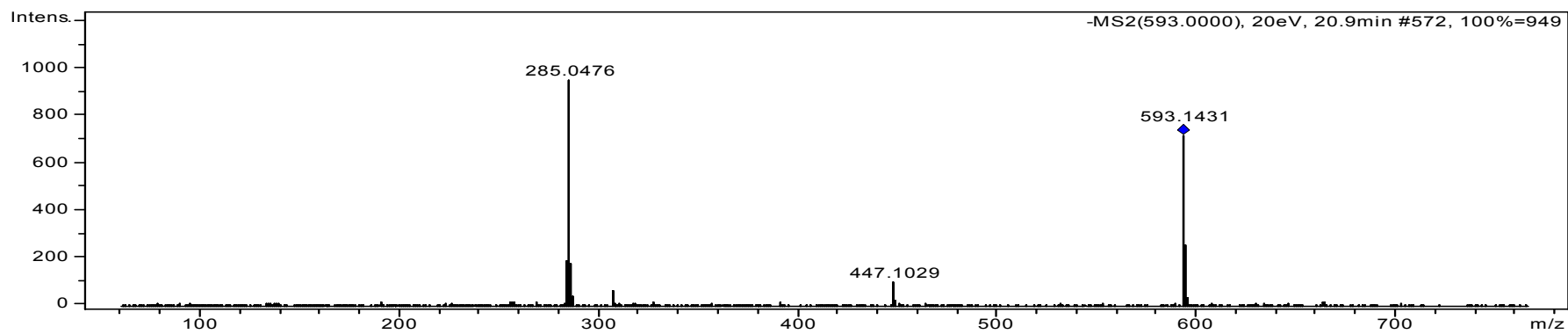
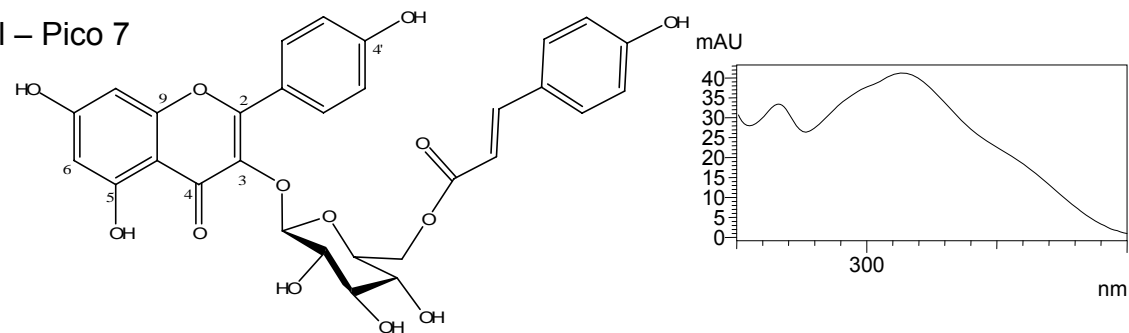
3-O-(6''-O-*E*-*p*-cumaroil)- β -glicosilkaempferol – Pico 7

Figura 8. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produtos nos modos de ionização negativo (superior) e positivo (inferior) obtidos para o pico cromatográfico 7 por CLAE-DAD-EM/EM.

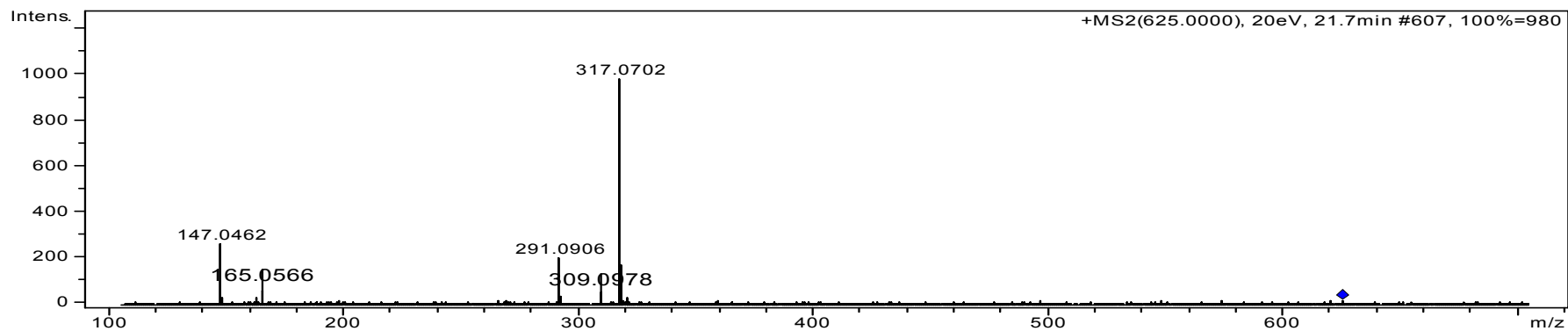
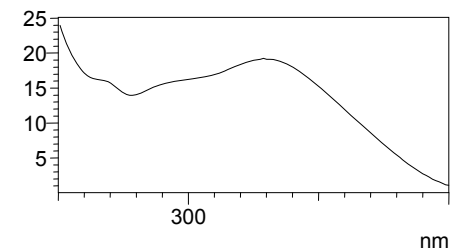
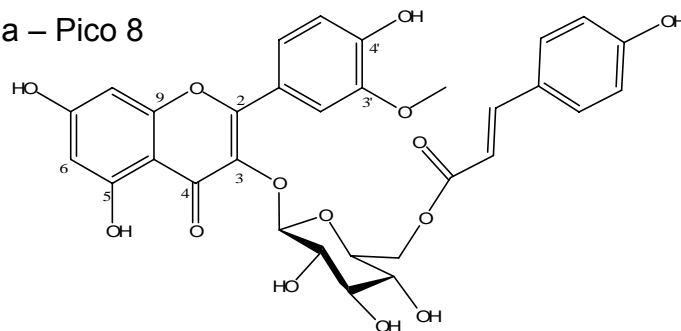
3-O-(6''-O-*E*-*p*-cumaroil)- β -glicosilisoramnetina – Pico 8

Figura 9. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produtos no modo de ionização positivo obtido para o pico cromatográfico 8 por CLAE-DAD-EM/EM.

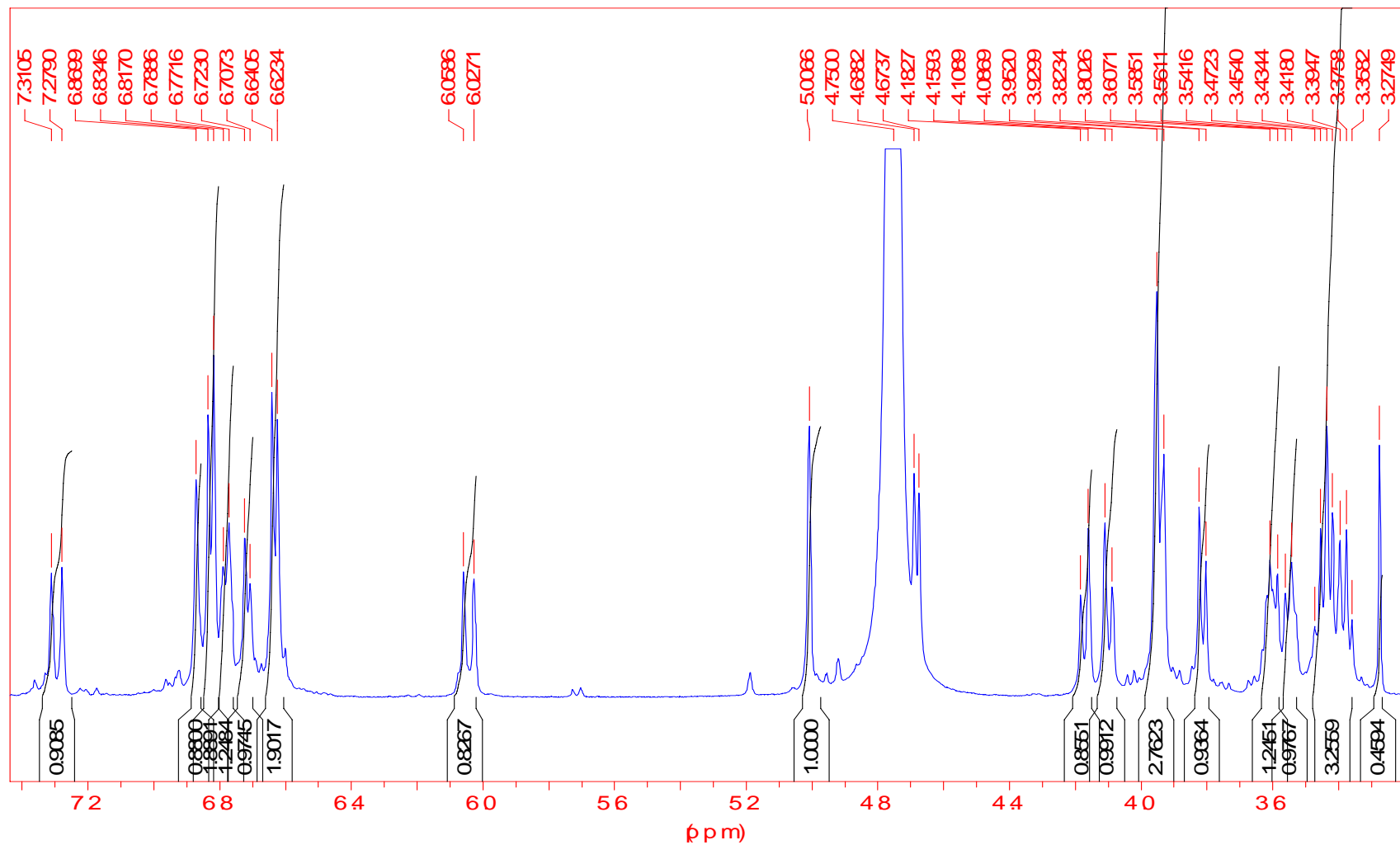


Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 2.4, (D_2O , 500 MHz).

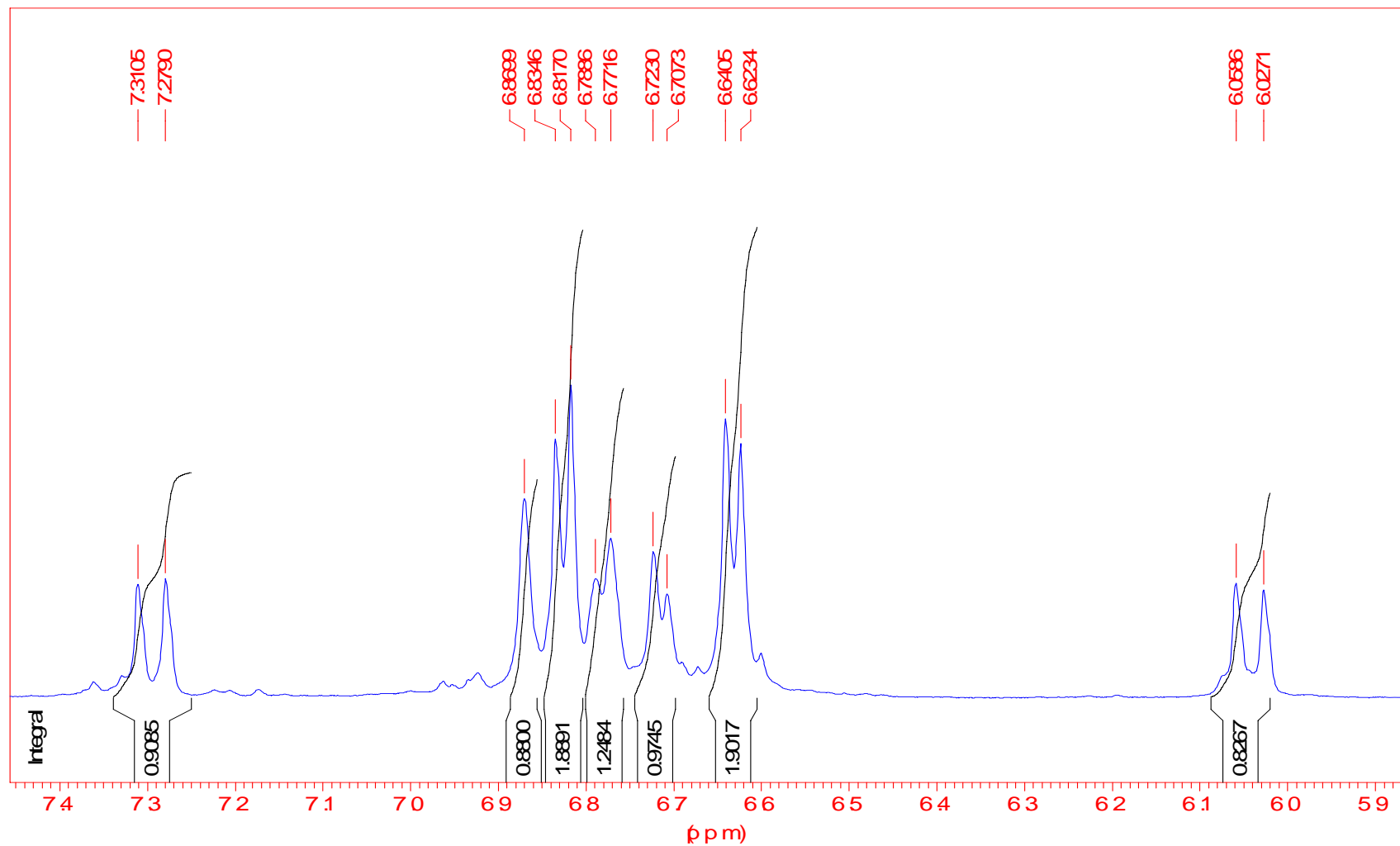


Figura 11 – Expansão (7,4 a 5,9 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 2.4, (D_2O , 500 MHz).

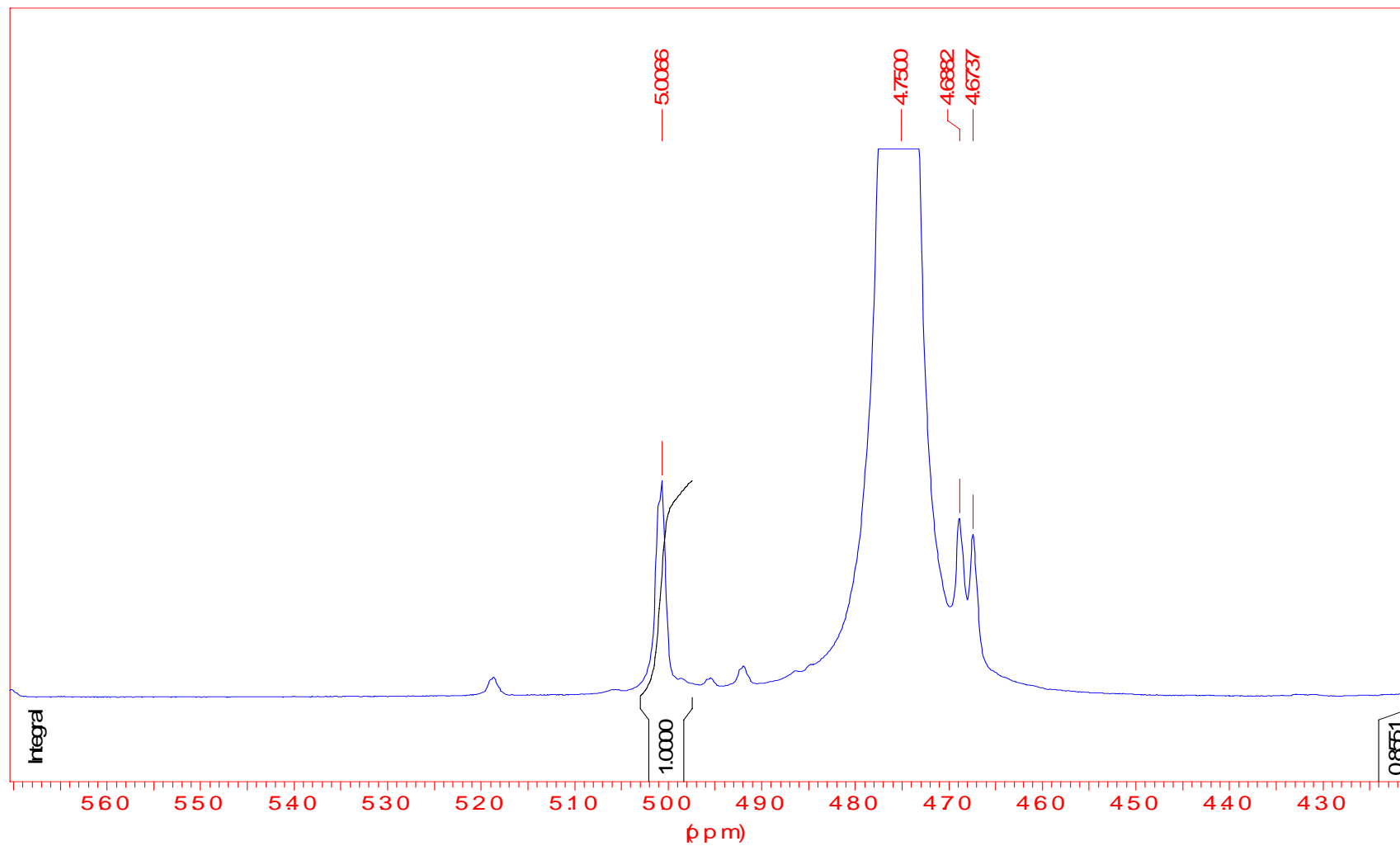


Figura 12 – Expansão (5,60 a 4,30 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 2.4, (D_2O , 500 MHz).

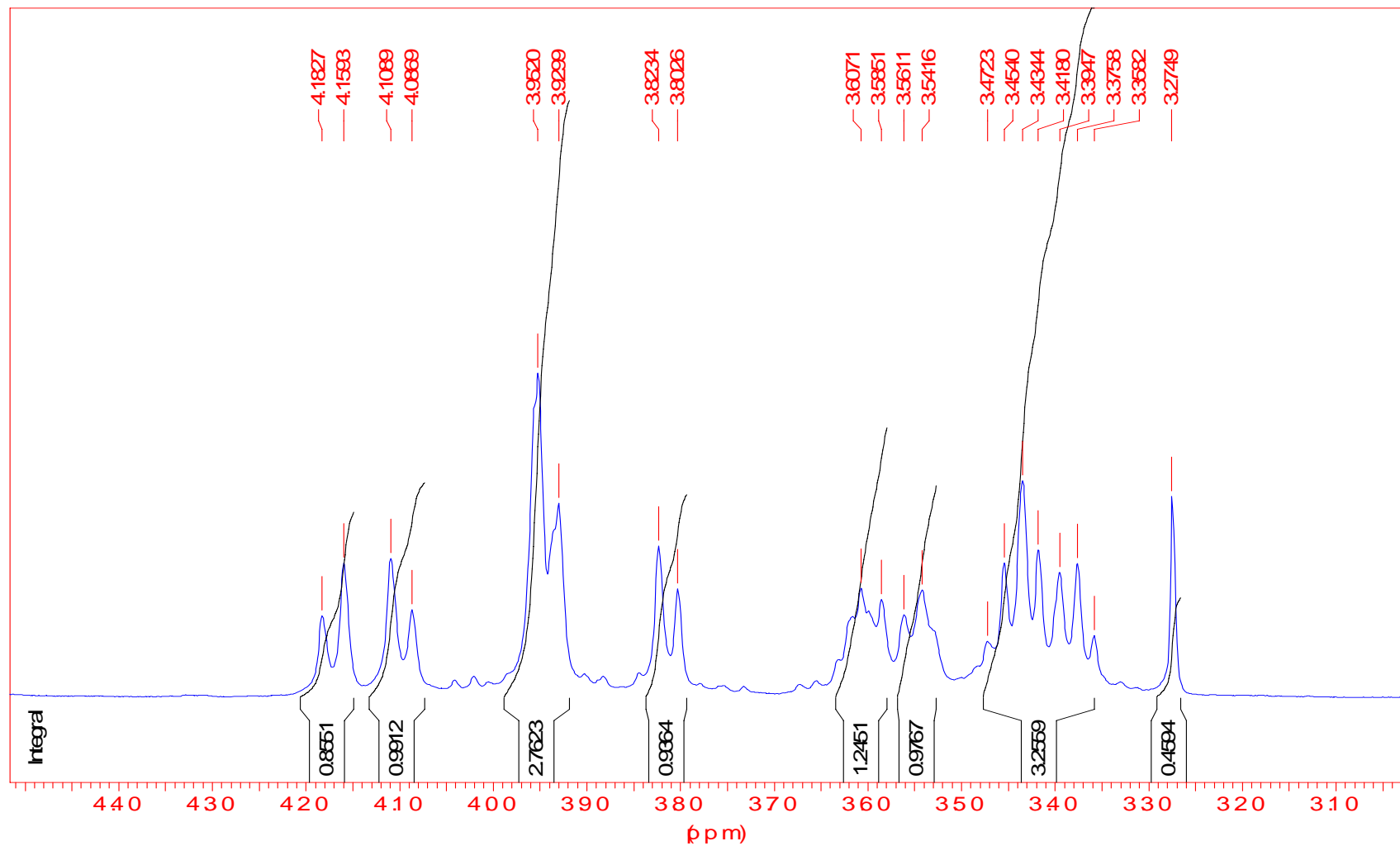


Figura 13 – Expansão (4,40 a 3,10 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 2.4, (D_2O , 500 MHz).

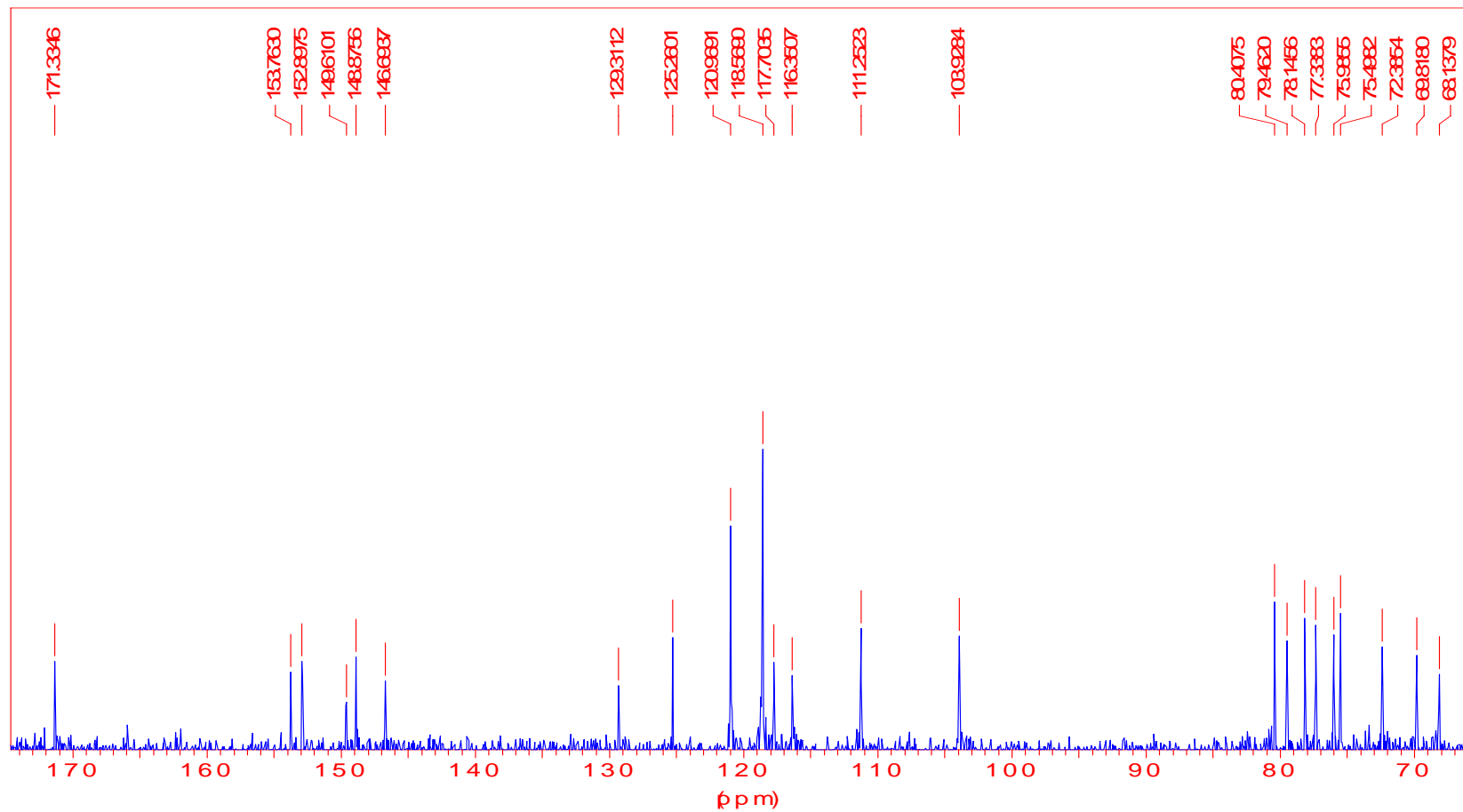


Figura 14 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância BuOH 2.4, (D_2O , 300 MHz).

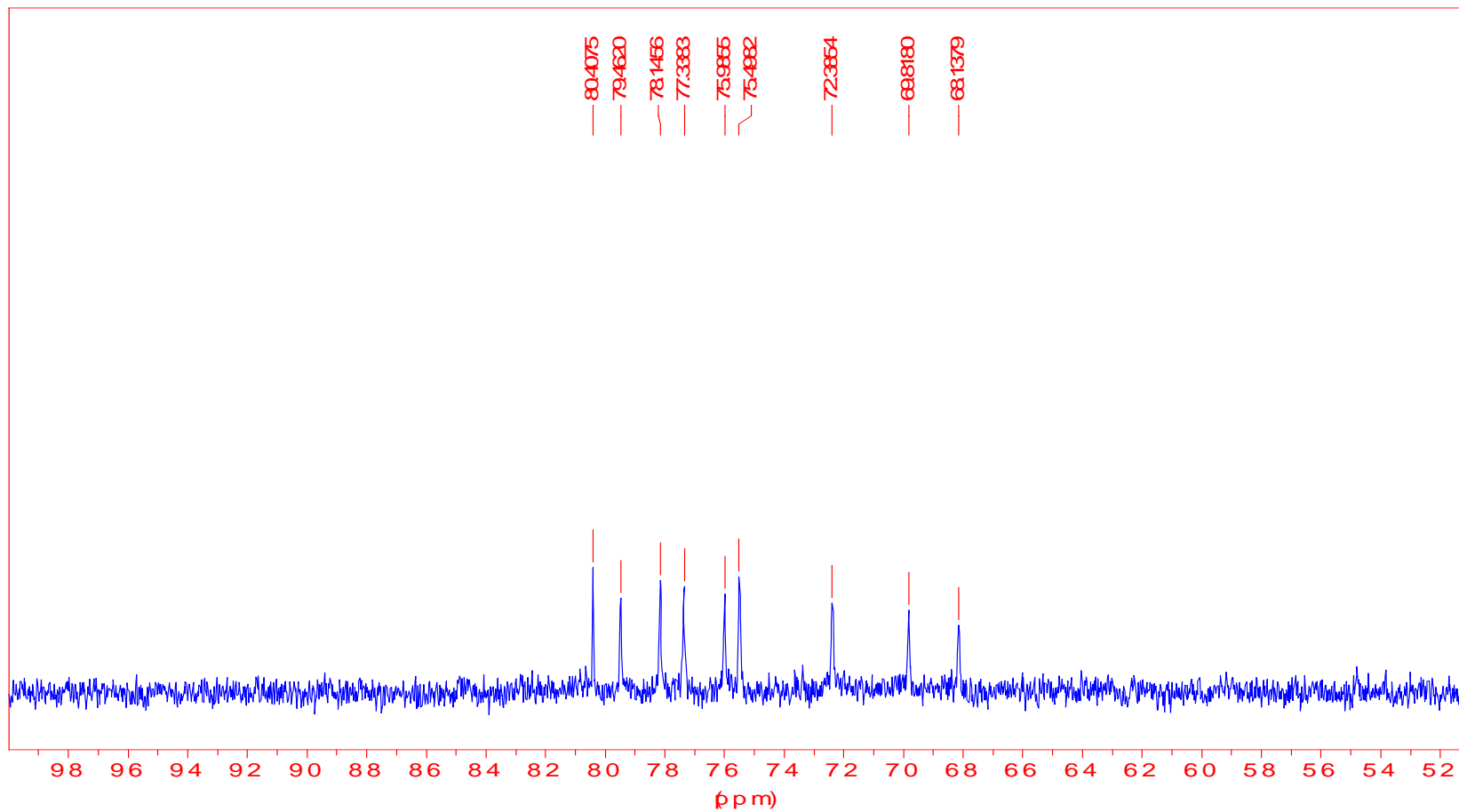


Figura 15 – Expansão (98 a 52 ppm) do espectro de RMN de ^{13}C da substância BuOH 2.4, (D_2O , 300 MHz).

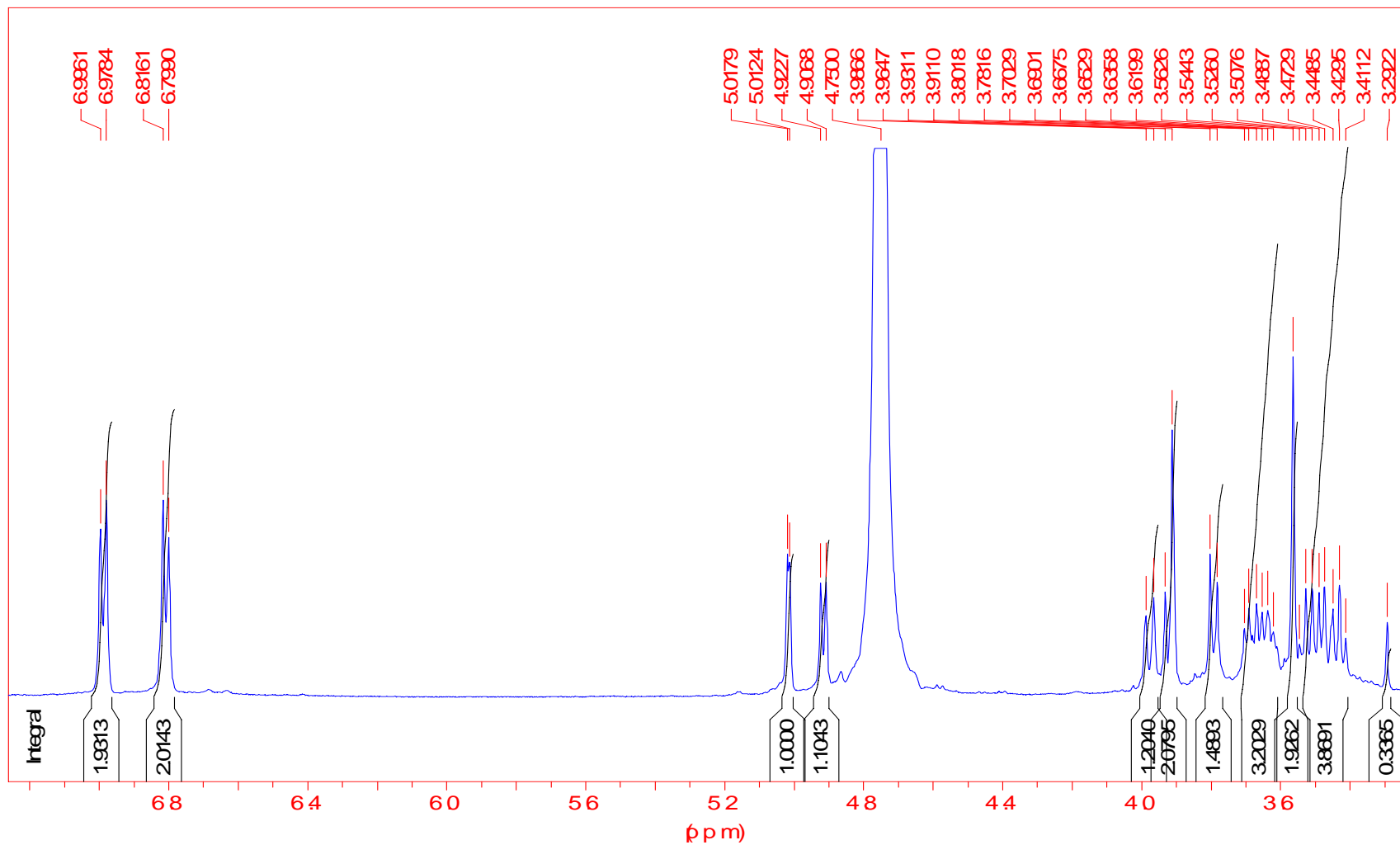


Figura 16 – Espectro de RMN de ¹H da substância BuOH 1.6, (D₂O, 500 MHz).

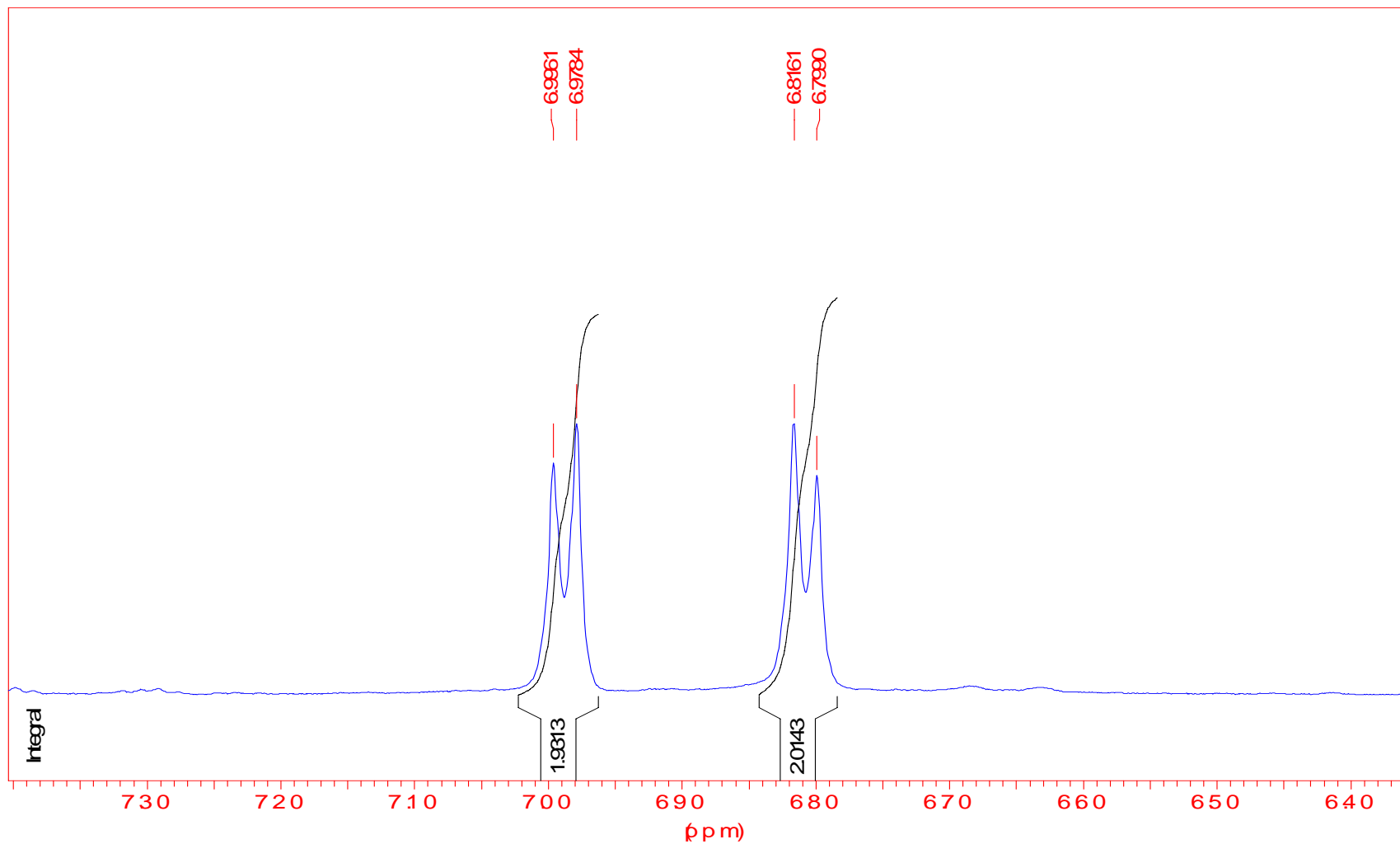


Figura 17 – Expansão (7,30 a 6,40 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 1.6, (D_2O , 500 MHz).

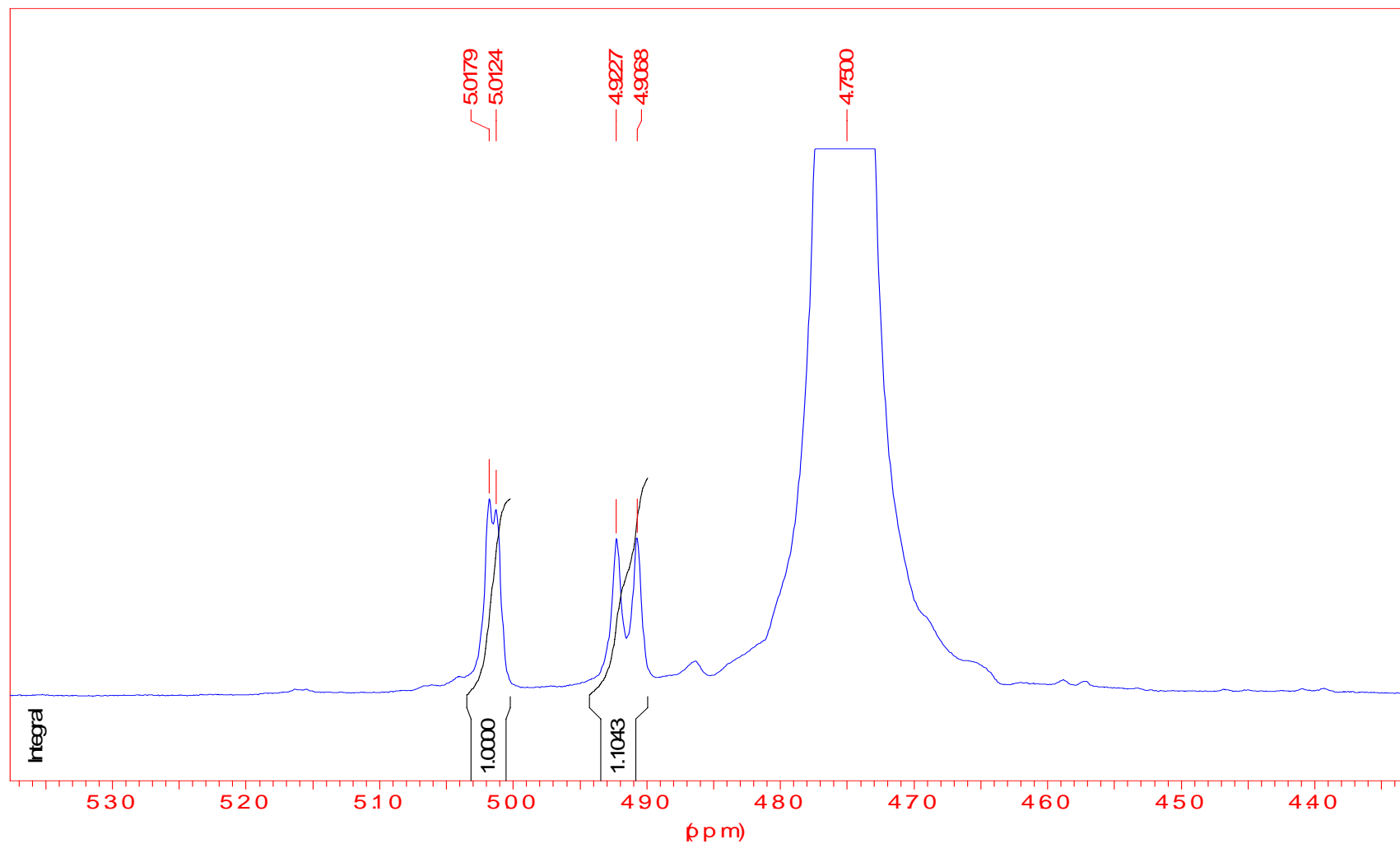


Figura 18 – Expansão (5.30 a 4,40 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 1.6, (D_2O , 500 MHz).

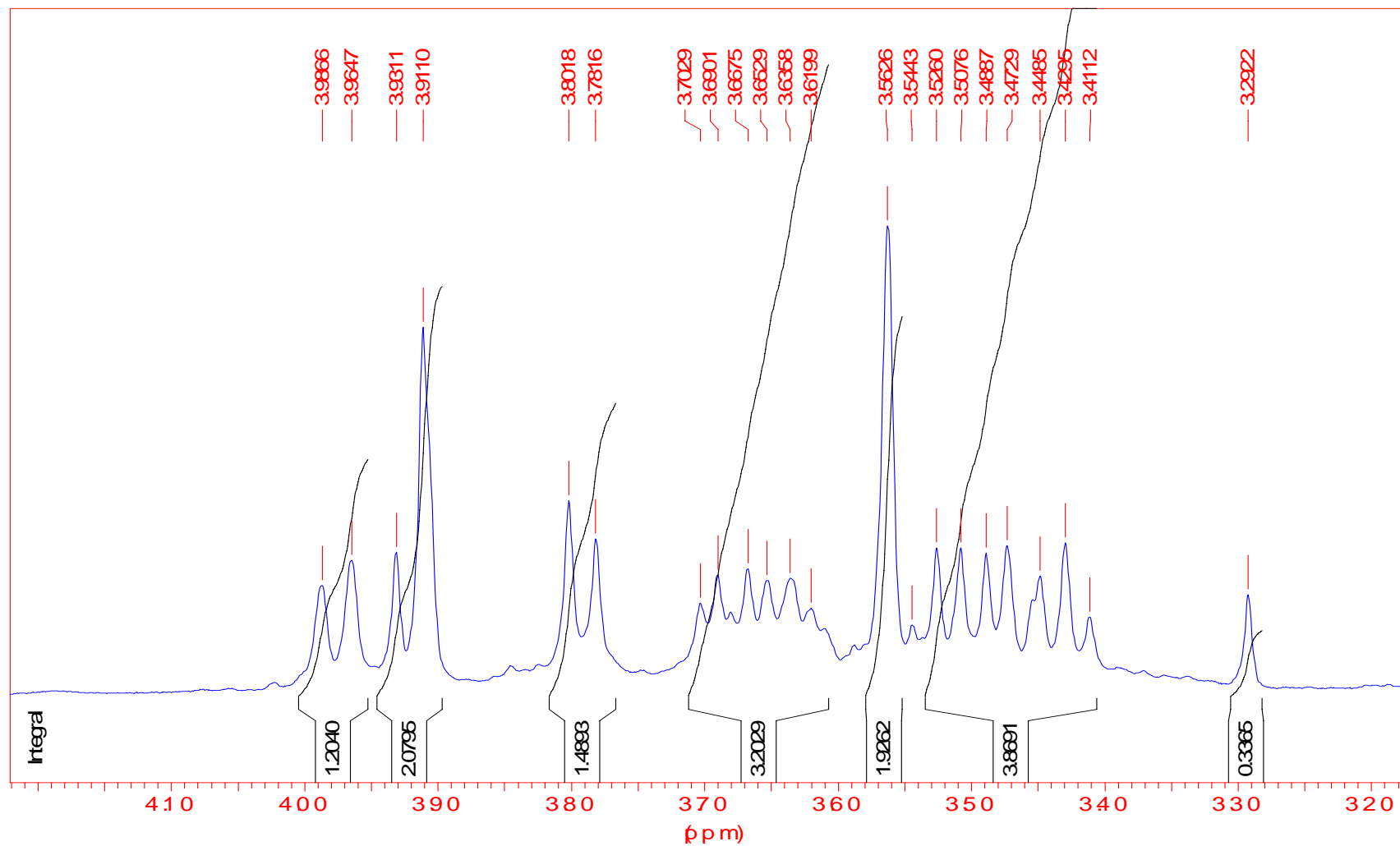


Figura 19 – Expansão (4,10 a 3,20 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 1.6, (D_2O , 500 MHz).

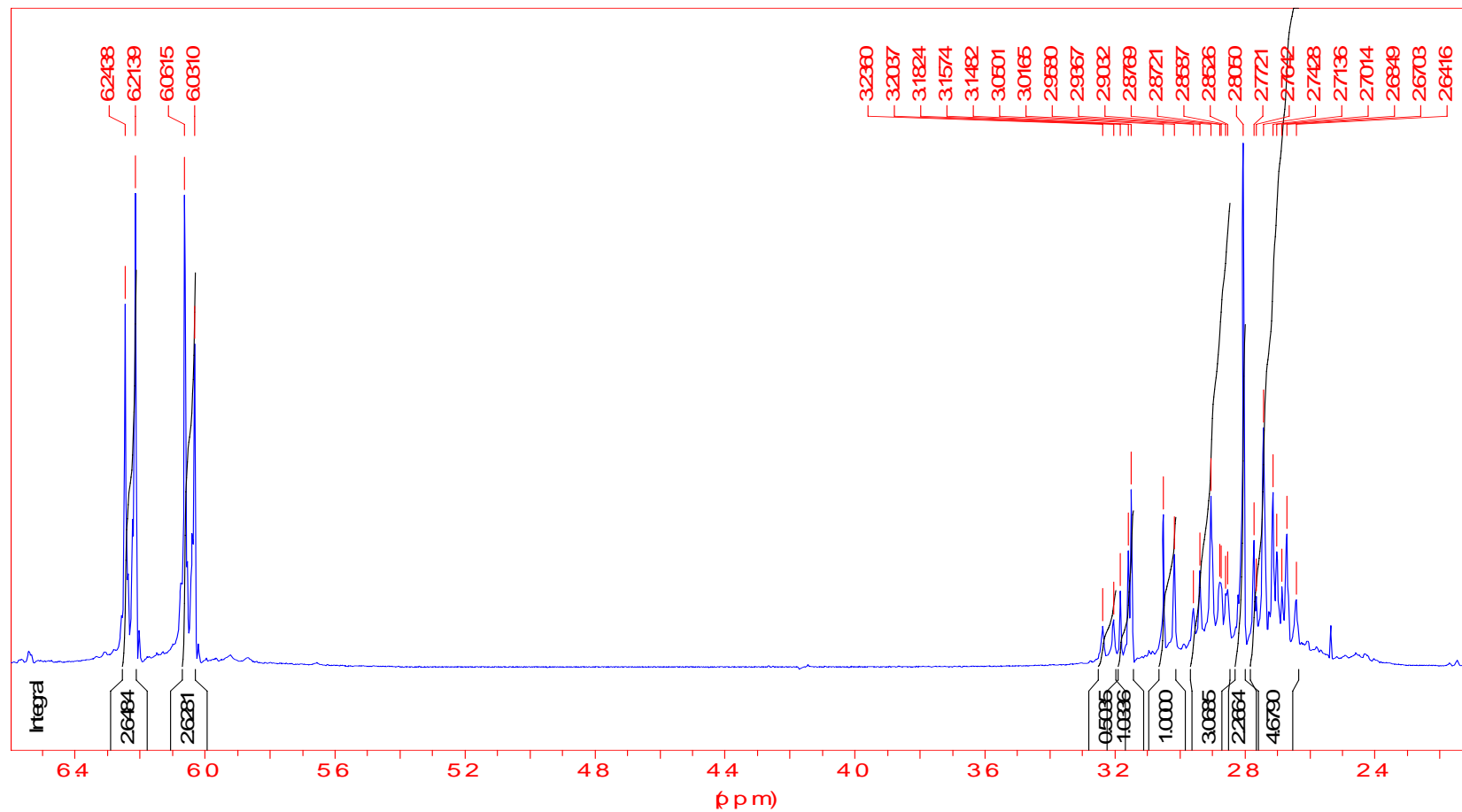


Figura 20 – Espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 1.6 com supressão de água, (D_2O , 300 MHz).

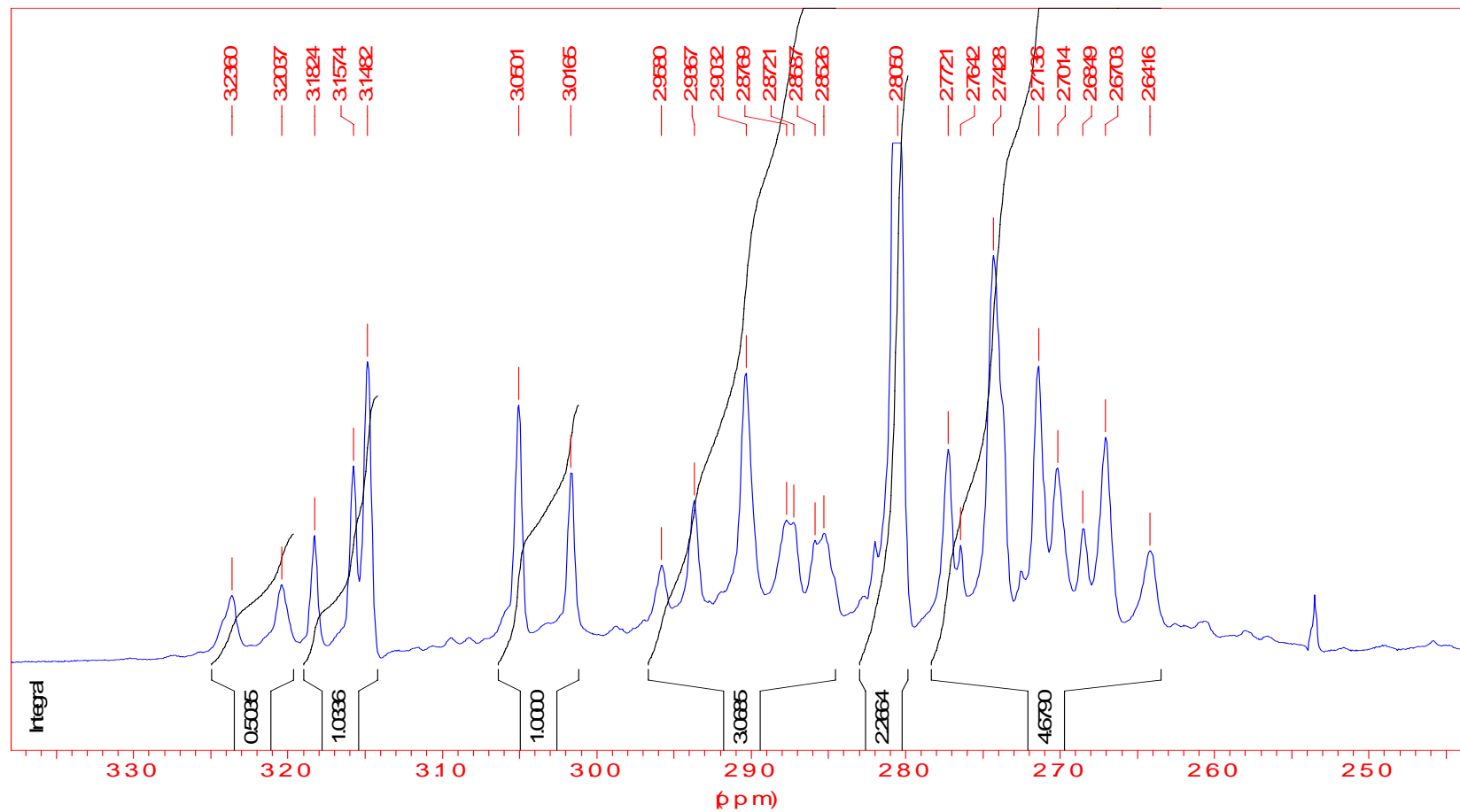


Figura 21 – Expansão (3,30 a 2,50 ppm) do espectro de RMN de ^1H da substância BuOH 1.6 com supressão de água, (D_2O , 300 MHz).

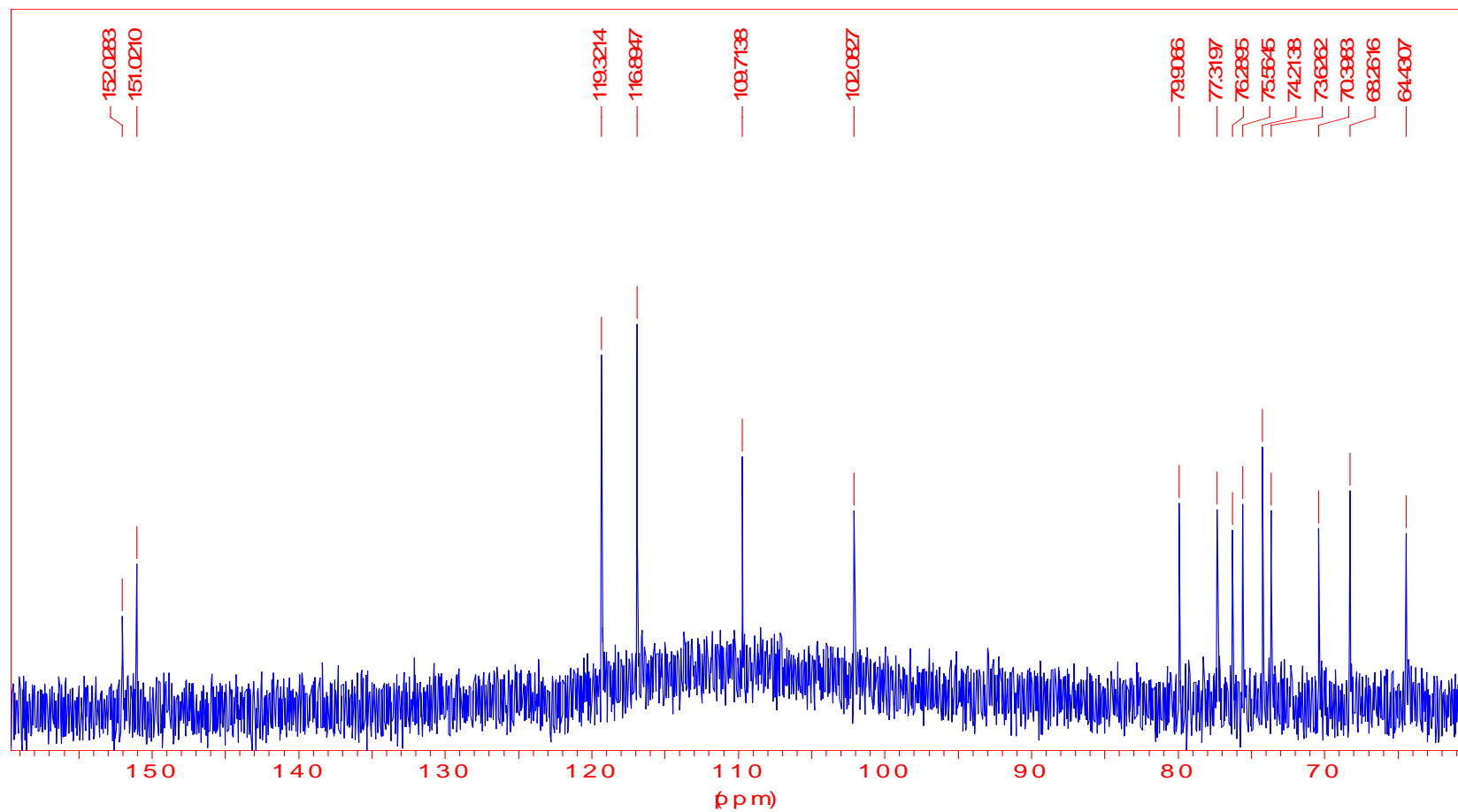


Figura 22 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância BuOH 1.6, realizado em aparelho de 500 MHz, utilizando D_2O como solvente.

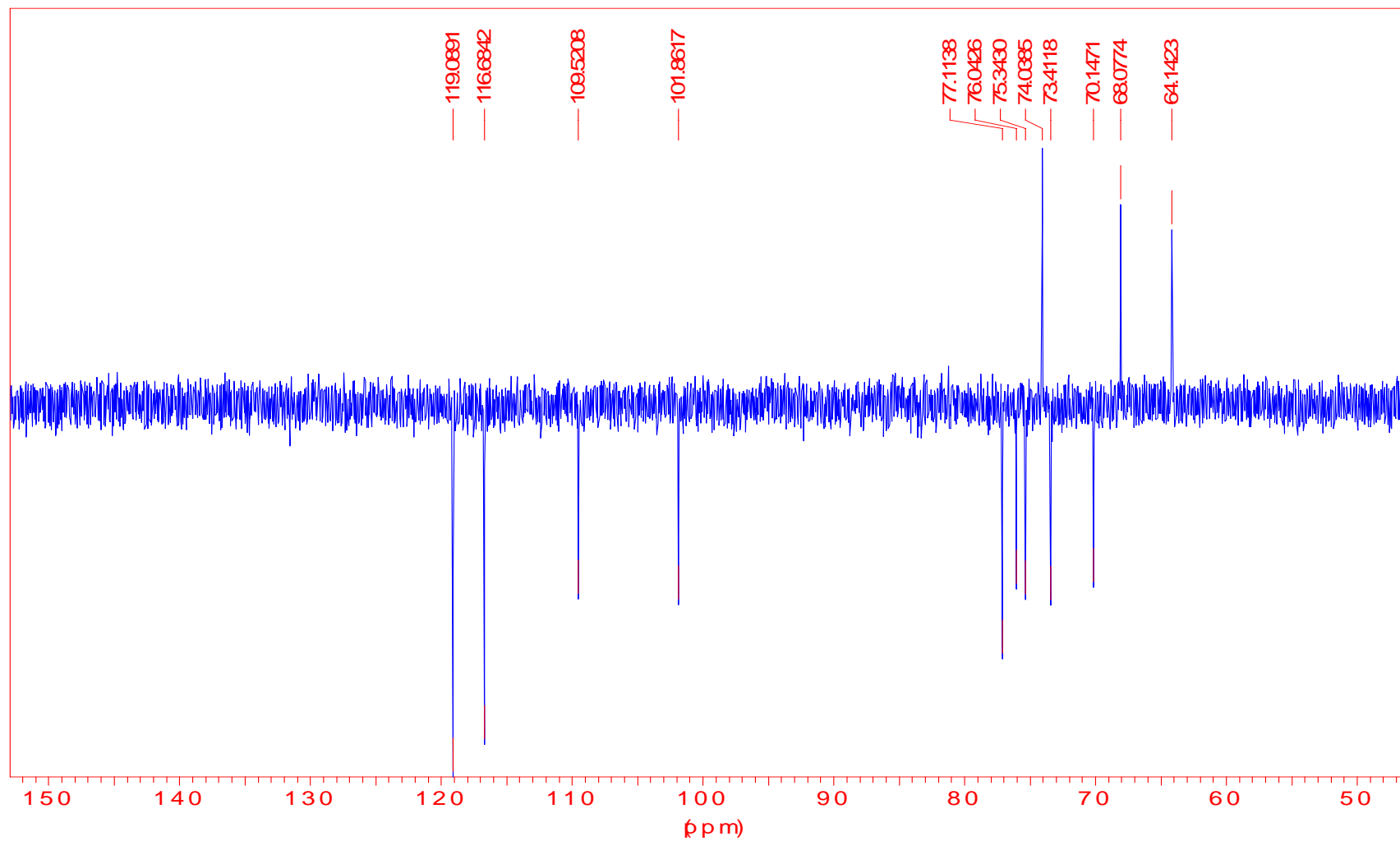


Figura 23 – Espectro de RMN de ^{13}C Dept. 135° da substância BuOH 1.6, realizado em aparelho de 500 MHz, utilizando D_2O como solvente.

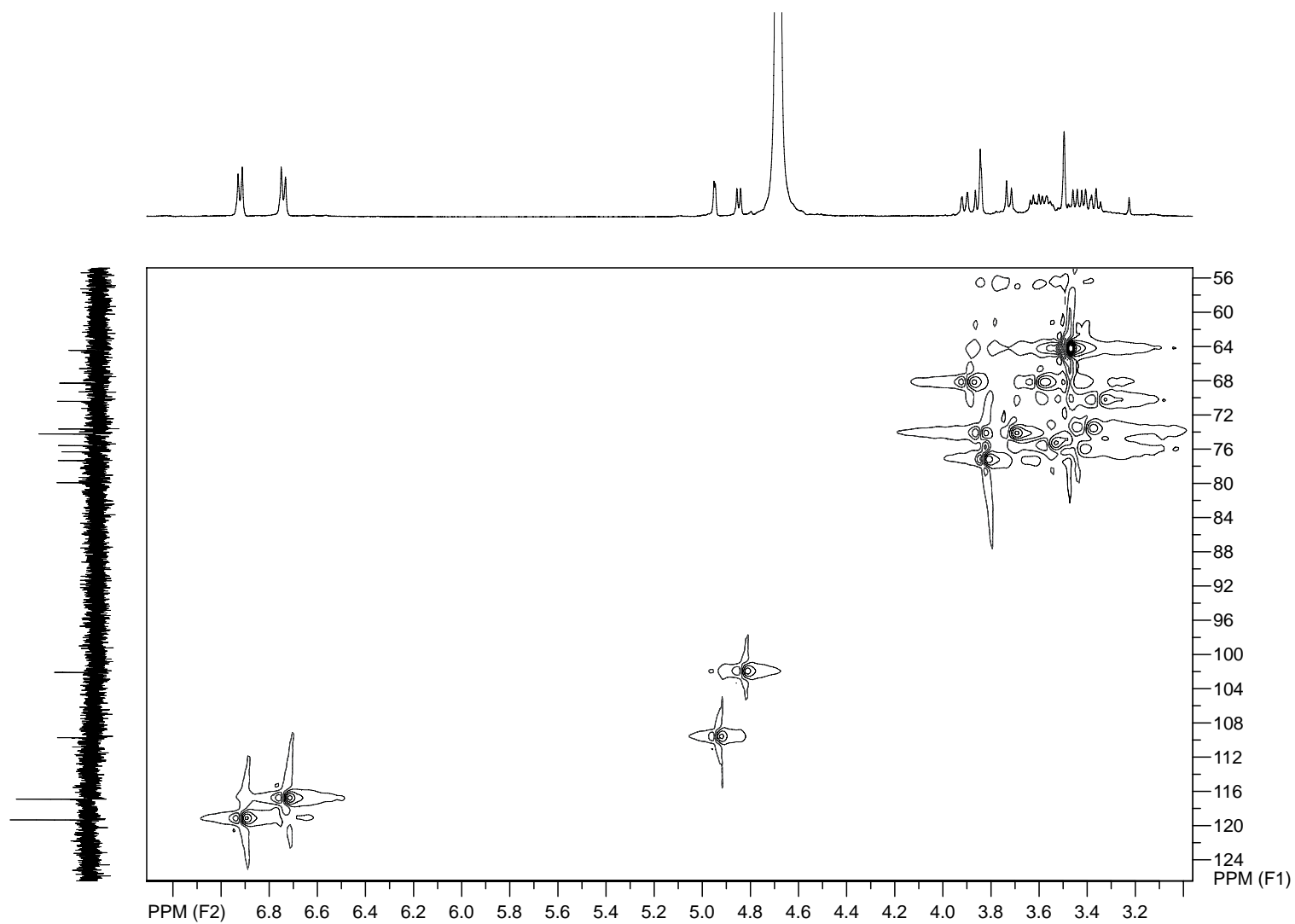


Figura 24 – Experimento de HMQC da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D₂O como solvente.

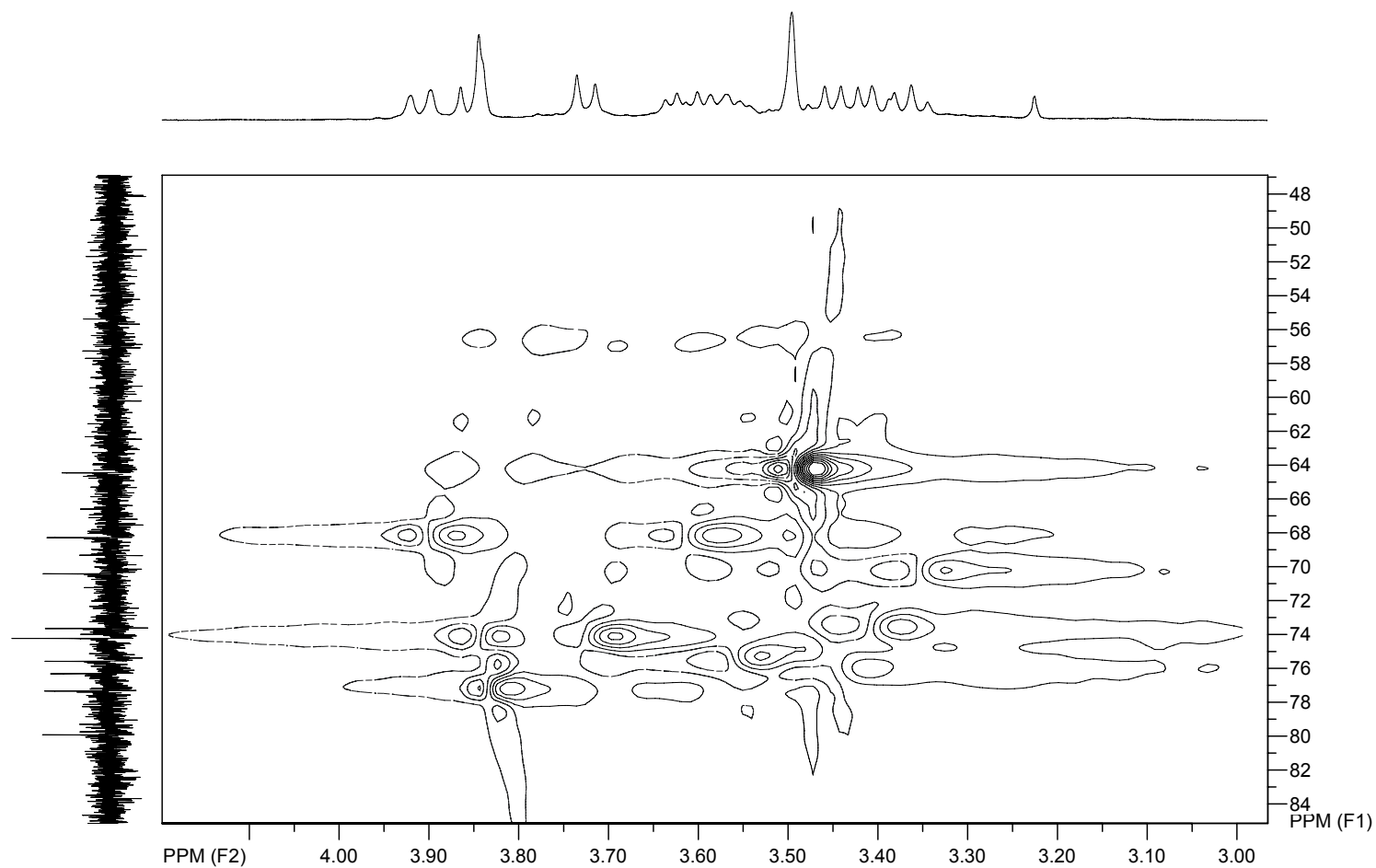


Figura 25 –Expansão (δ_H 3 a 4 ppm) do experimento de HMQC da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D₂O como solvente.

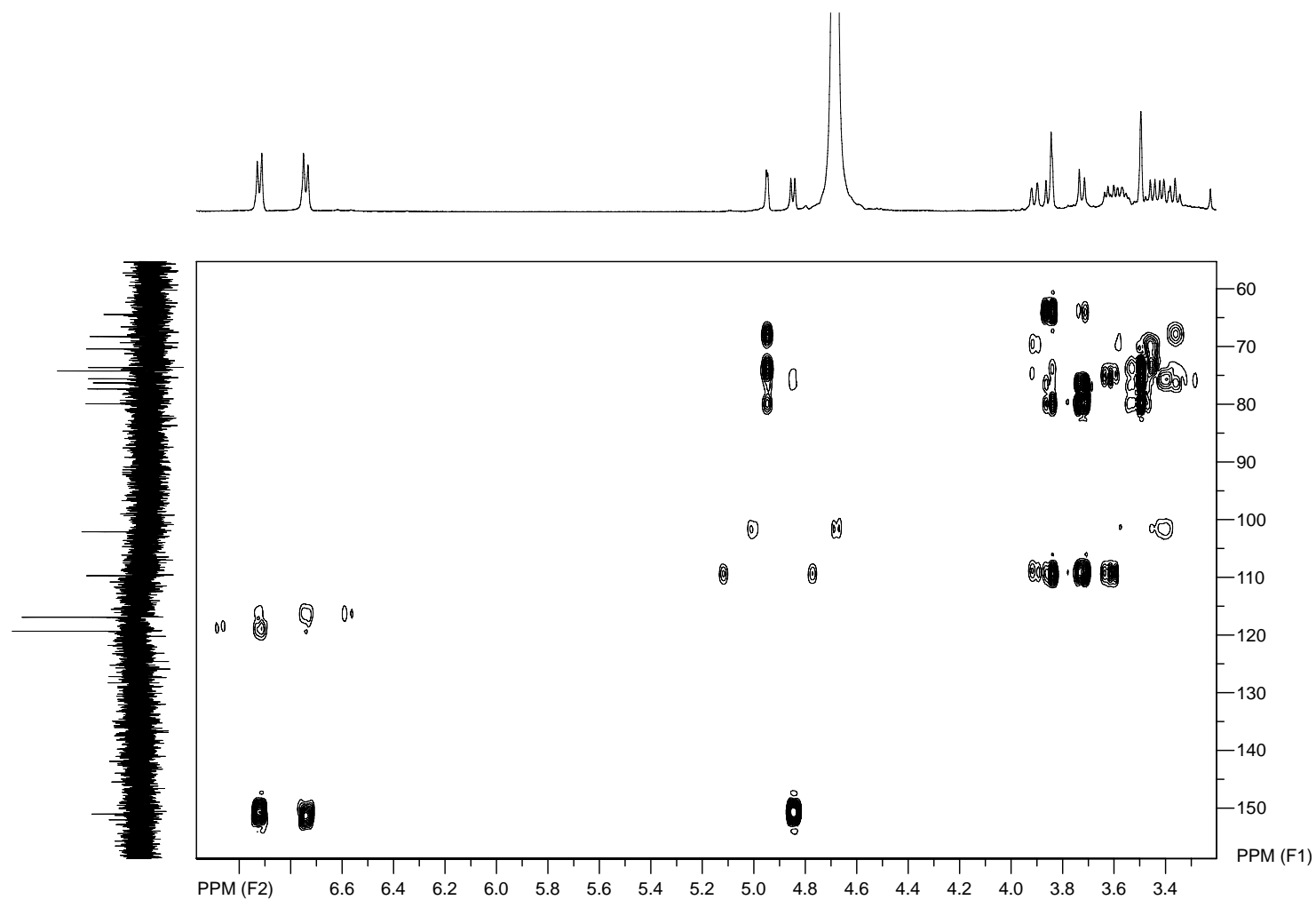


Figura 26 – Experimento de HMBC com acoplamento em 4Hz da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D₂O como solvente.

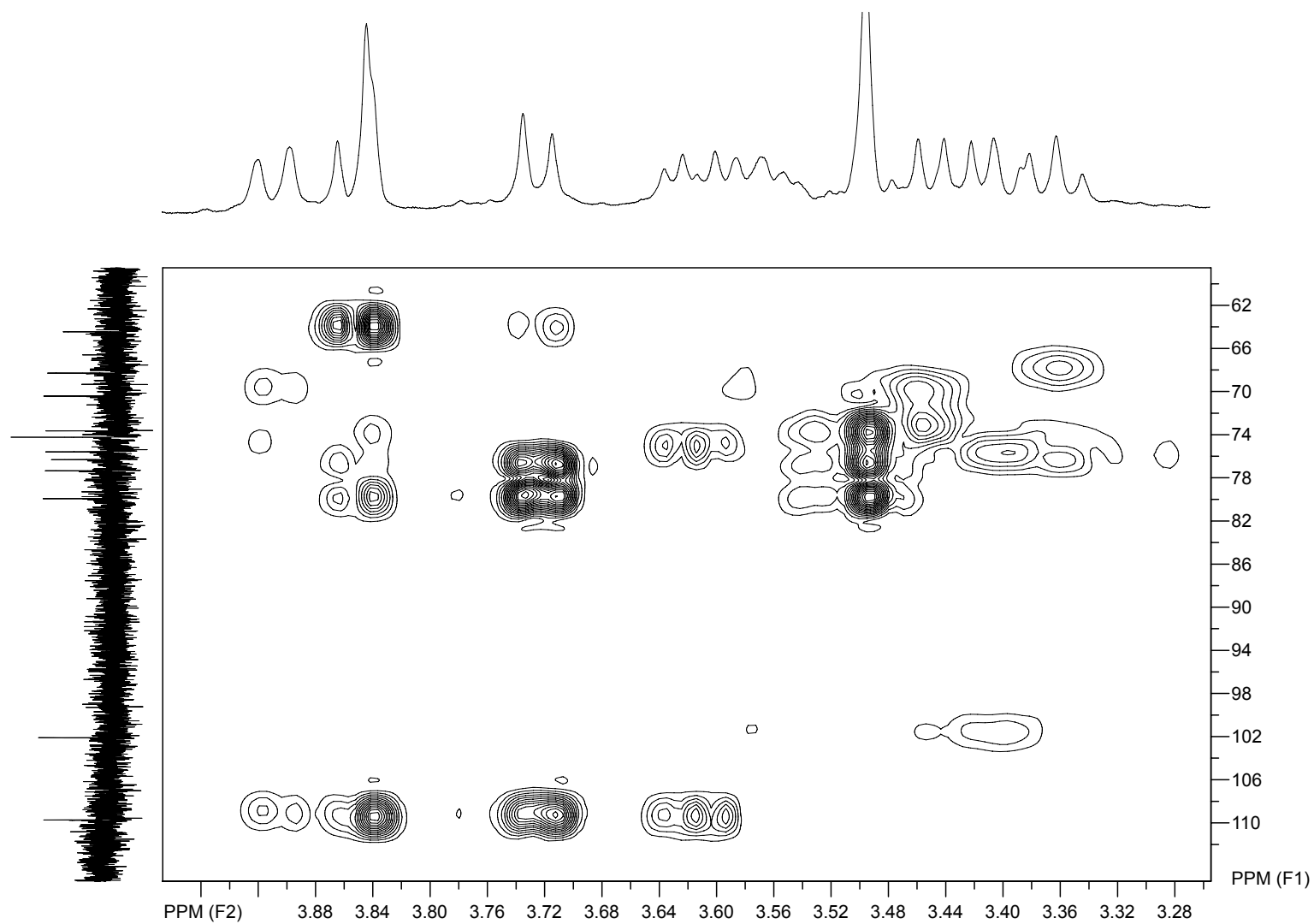


Figura 27 –Expansão (δ_{H} 3 a 4 ppm) do experimento de HMBC com acoplamento em 4Hz da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D_2O como solvente.

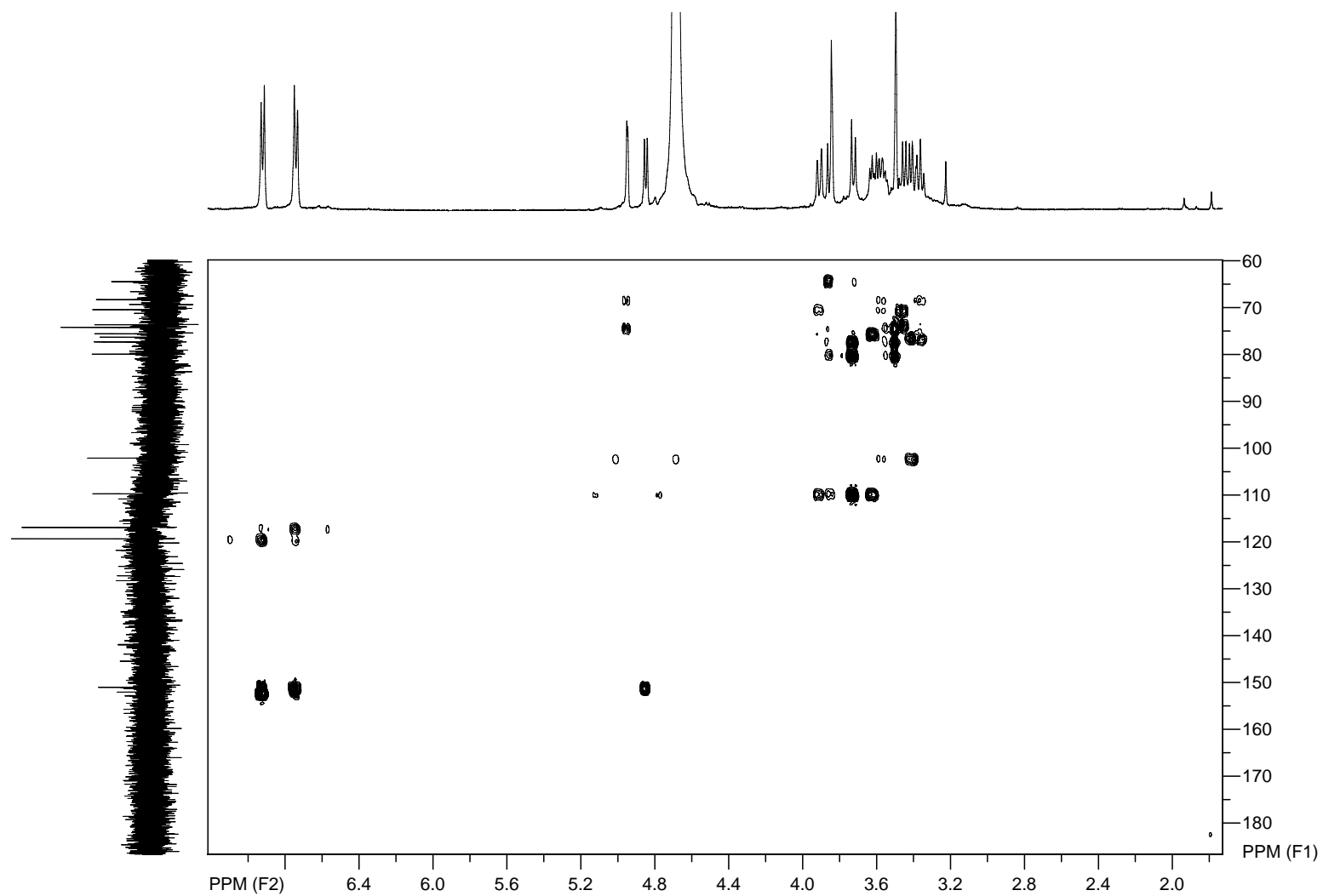


Figura 28 –Experimento de HMBC com acoplamento em 8 Hz da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D₂O como solvente.

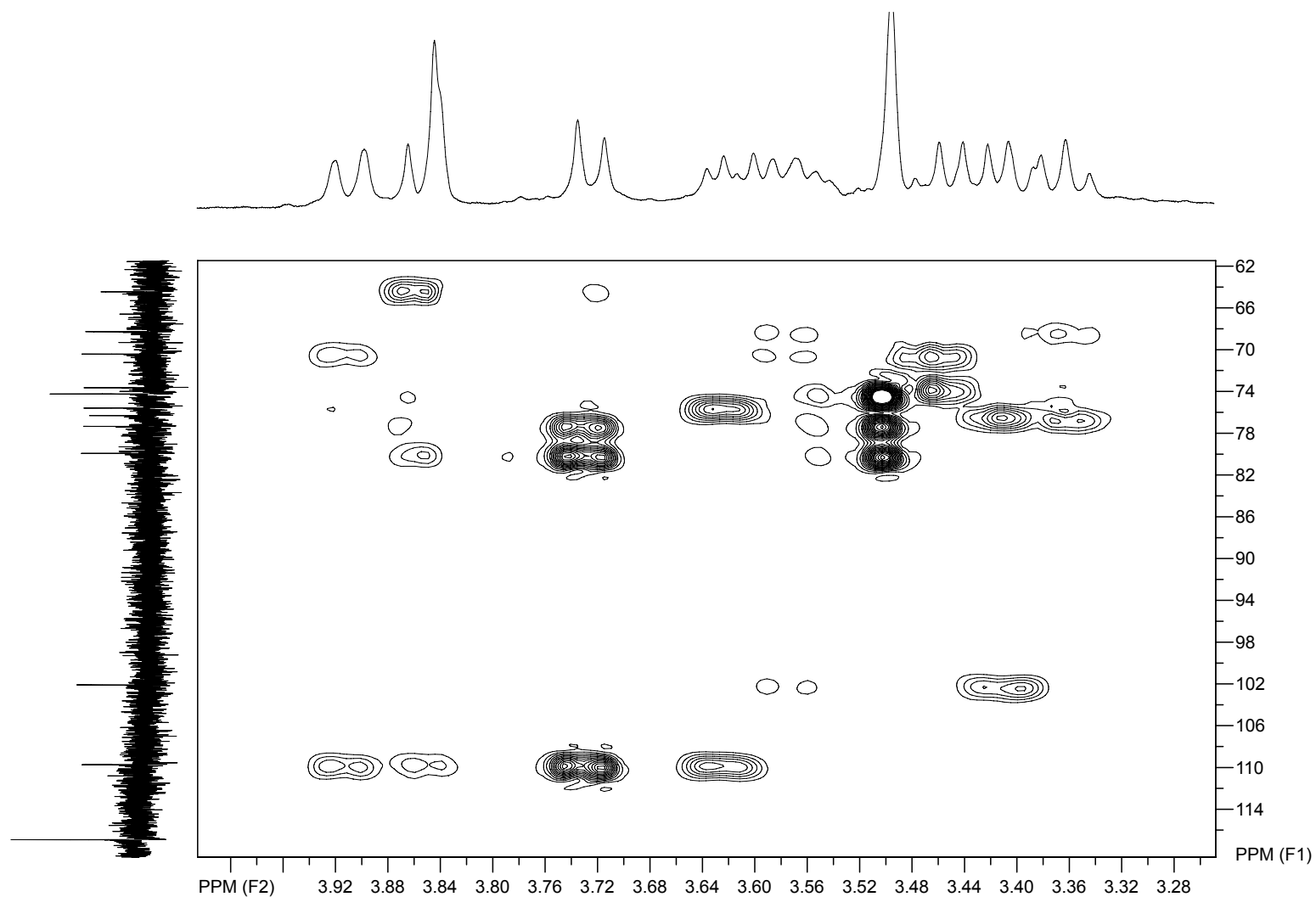


Figura 29 – Expansão (δ_{H} 3 a 4 ppm) do experimento de HMBC com acoplamento em 8Hz da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D_2O como solvente.

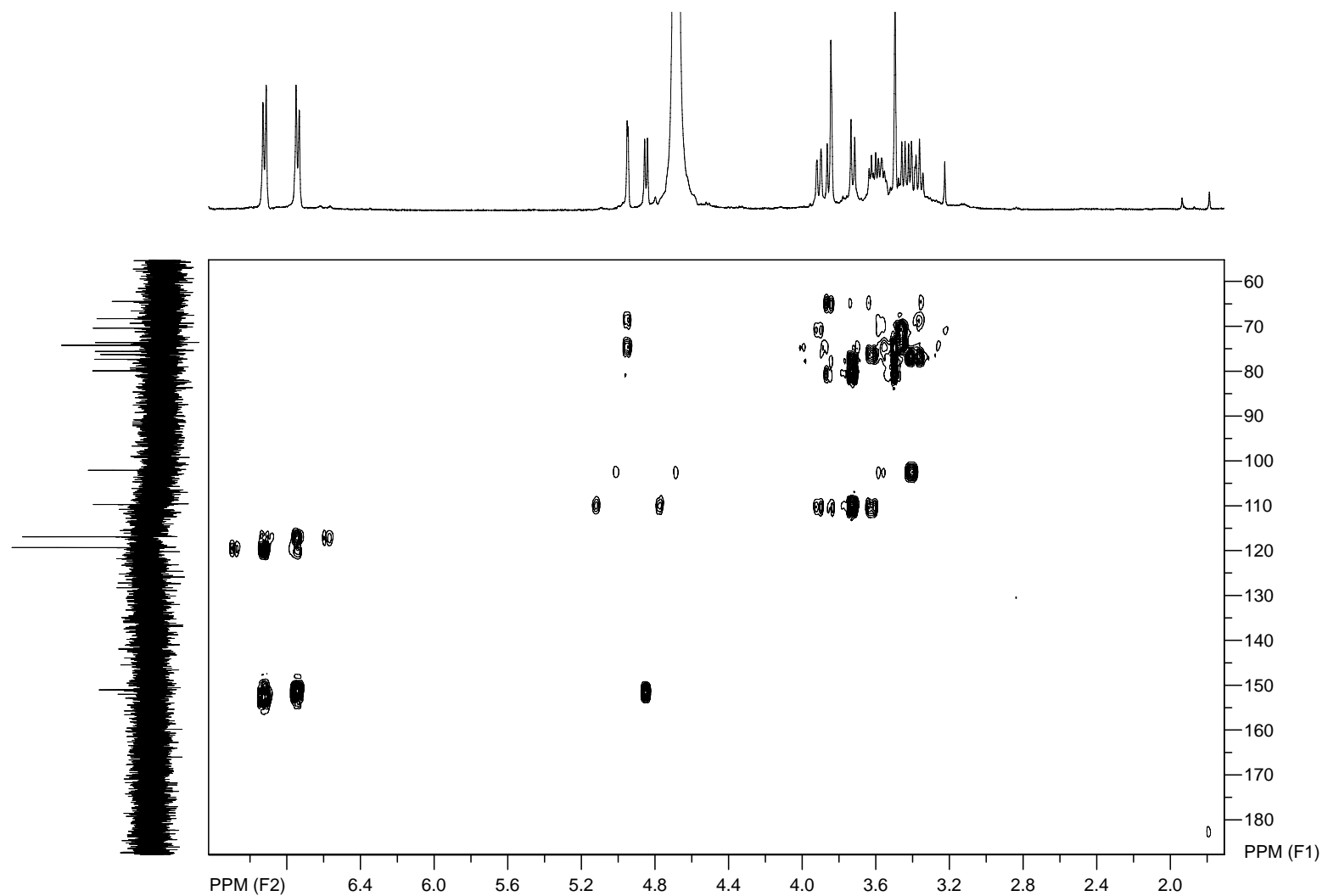


Figura 30 – Experimento de HMBC com acoplamento em 12Hz da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D₂O como solvente.

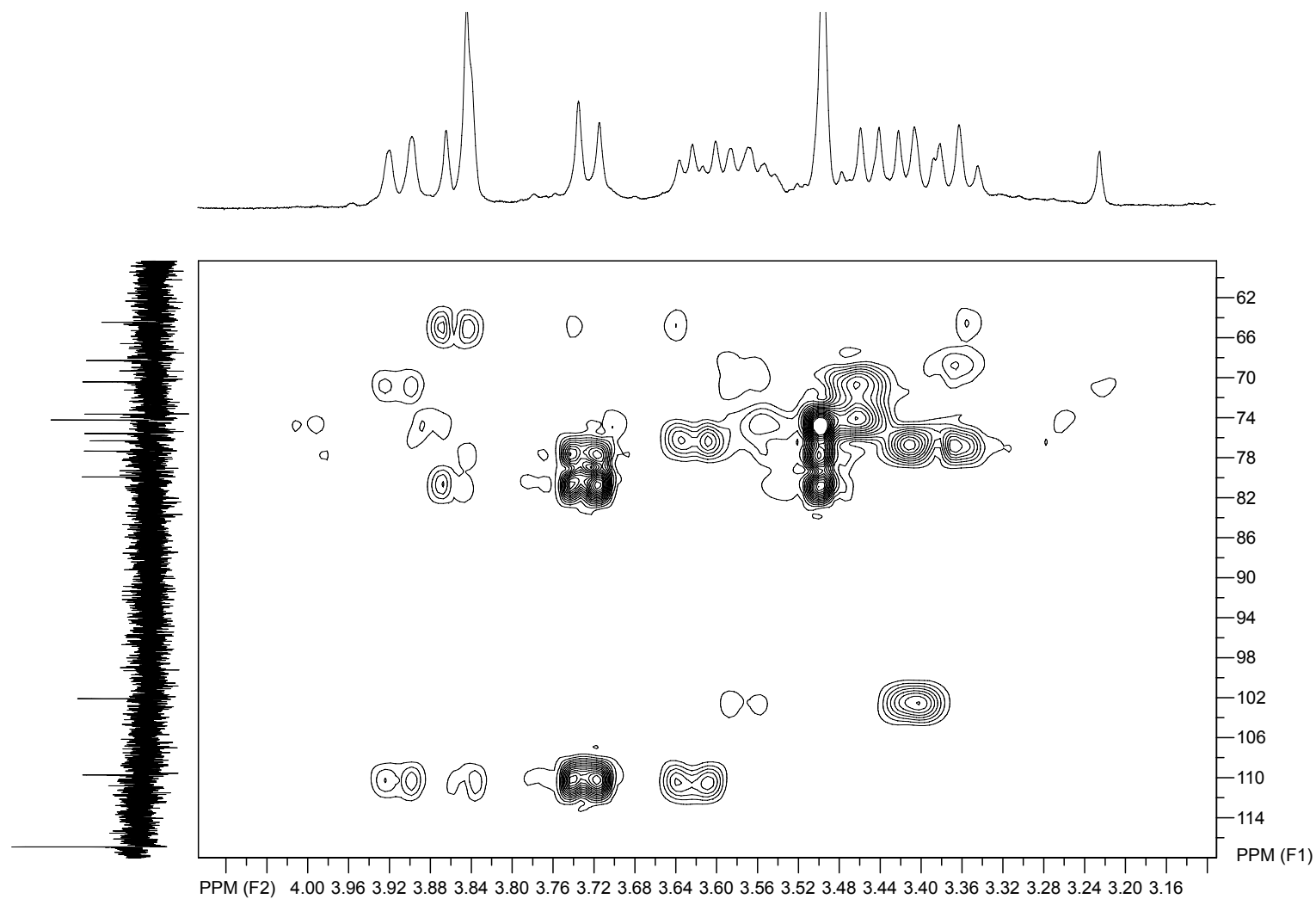
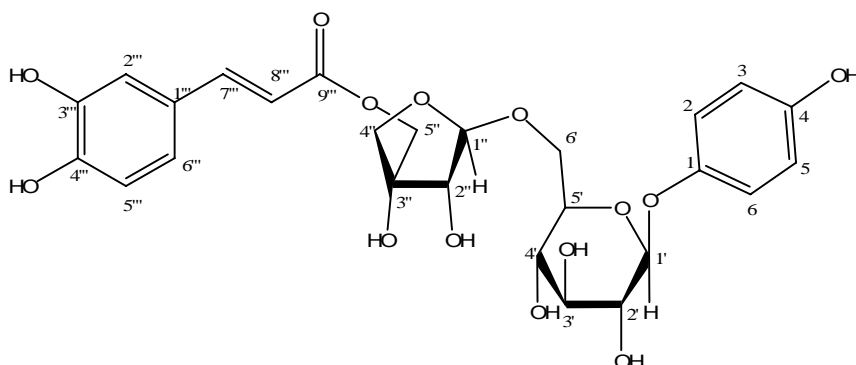


Figura 31 – Expansão (δ_{H} 3 a 4 ppm) do espectro de HMBC com acoplamento em 12Hz da substância BuOH 1.6 em aparelho de 500 MHz utilizando D_2O como solvente.



4-fenol-1-O-(5''-O-Cafeoil)-β-D-apiofuranosil-(1''→6')-O-β-D-glucopiranosídeo

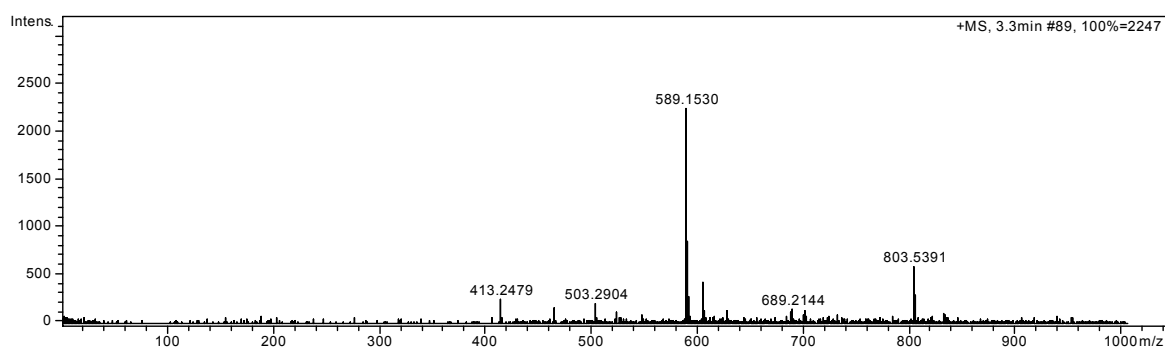
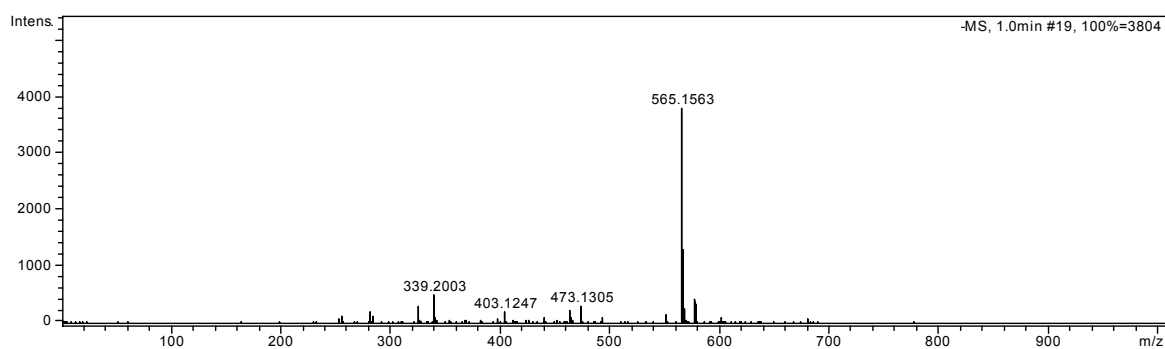
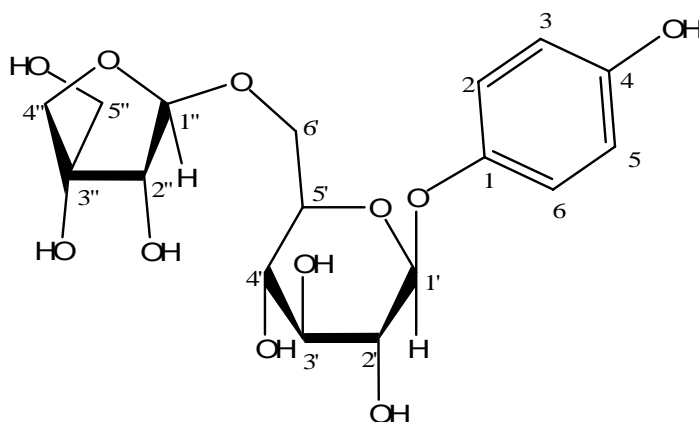


Figura 32 - Estrutura química, identificação, espectros de massas em alta resolução de íons precursoros nos modos de ionização negativo (superior) e positivo (inferior) obtidos para a substância BuOH 2.4 em EM.



4-fenol-1- O- β -D-glucopiranosídeo (6' \rightarrow 1'') O- β -D-apiofuranosil

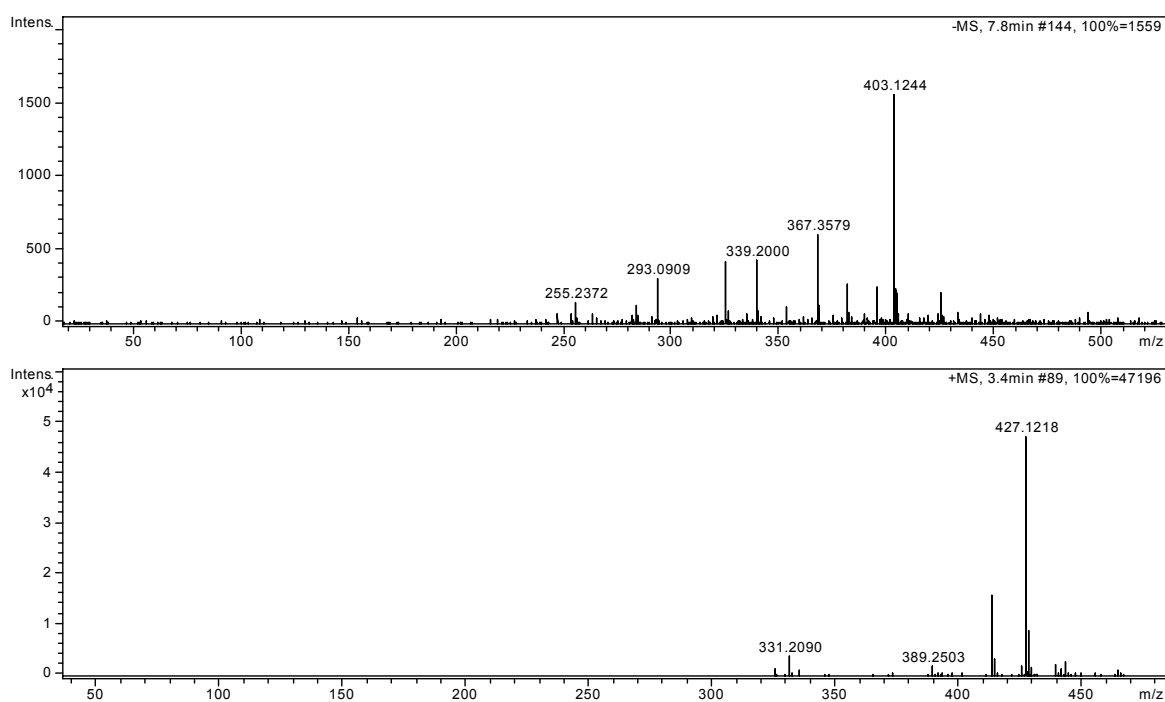
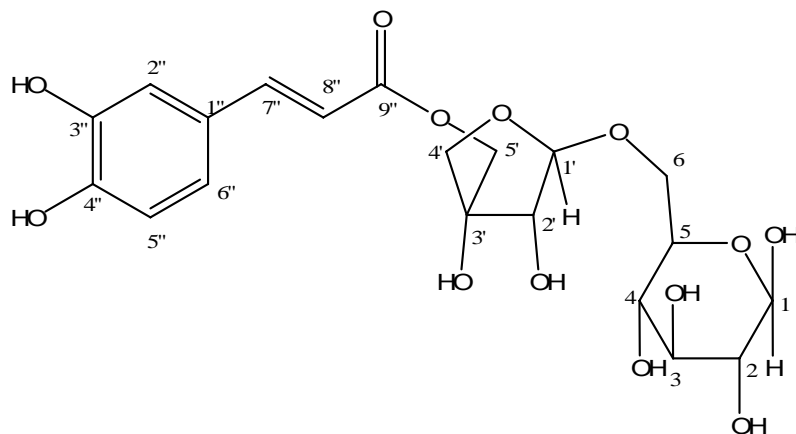


Figura 33 - Estrutura química, identificação, espectros de massas em alta resolução de íons precursoros nos modos de ionização negativo (superior) e positivo (inferior) obtidos para a substância BuOH 1.6 em EM.



5'-O-Cafeoil-β-apiofuranosil-(1'→6)-O-β-glucopiranosídeo

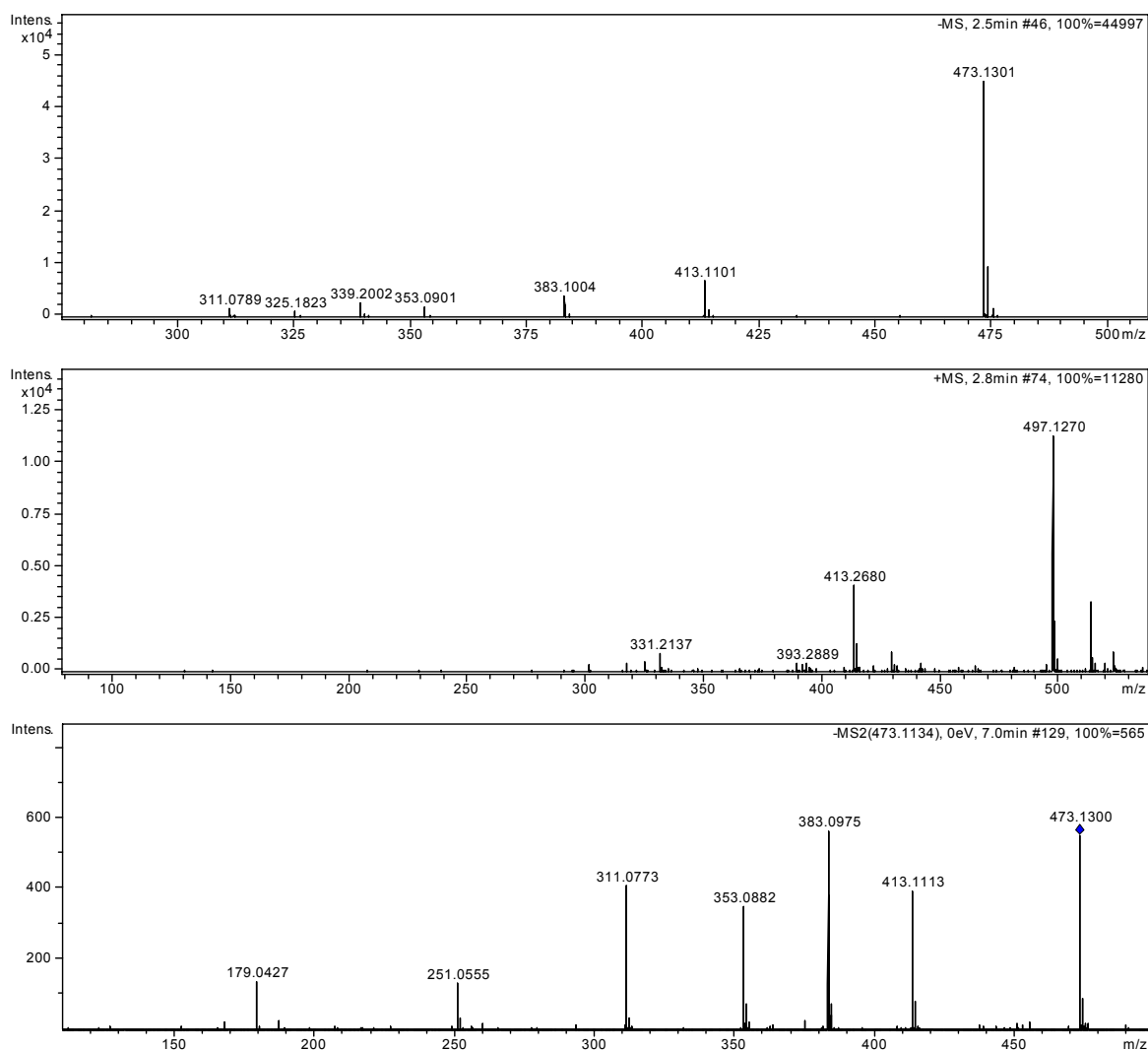


Figura 34 - Estrutura química, identificação, espectros de massas em alta resolução de íons precursores nos modos de ionização negativo, positivo e EM/EM obtidos para a substância Prep – 1 em EM.