



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



CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE
E ALELOPÁTICA DE *Bauhinia holophylla* (BONG.) STEUD.

LAÍS GOYOS PIERONI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP
2013



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE
E ALELOPÁTICA DE *Bauhinia holophylla* (BONG.) STEUD.

LAÍS GOYOS PIERONI

Prof.^a Dr.^a ANNE LÍGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO

ORIENTADORA

Prof.^o Dr.^o LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

COLABORADOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica Vegetal.

BOTUCATU - SP

2013



unesp

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



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

Pieroni, Laís Goyos.

Constituintes químicos e atividades antioxidante e alelopática de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud / Laís Goyos Pieroni. – Botucatu : [s.n.], – 2013

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

Orientador: Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro

Capes: 20303009

1. Alelopatia. 2. Agentes alelopáticos. 3. Plantas dos cerrados – Composição. 4. Flavonoides.

Palavras-chave: Alelopatia; Antioxidante; Cerrado; Fabaceae; Flavonoides.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a oportunidade de realização deste trabalho à Professora Dr.^a Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro. Agradeço por ter acreditado que eu seria capaz de realizar e concluir este trabalho.

Agradeço ao Prof.^o Dr.^o Wagner Vilegas e à Prof.^a Dr.^a Lourdes Campaner dos Santos por terem cedido os seus laboratórios para a realização de diversos experimentos. Agradeço também aos alunos Claudinha, Leonardo, Fabi, Marcelo Tangerina, Maria do Socorro, Magela, Aline Coqueiro, Lima Neto, Raíssa, Luísa, Cássia, Silvia, Felipe, Fabiano e aos outros alunos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Fitoquímica pela atenção dispensada.

Ao Dr. Nivaldo Boralle, pela realização dos experimentos de RMN e ao Dr. Alberto Camilo Alécio pelos experimentos de MS.

Ao Prof.^o Dr.^o Luiz Fernando Rolim de Almeida e ao seu aluno Danilo, pelo acompanhamento nos experimentos de alelopatia e discussões sobre o tema e resultados.

Às alunas do Programa de Pós-graduação em Botânica, Tais Carboni e Camila, pela hospitalidade em Botucatu.

Ao Prof.^o Dr.^o José Roberto Bosqueiro e as suas alunas Pri, Nathalia Camaforte e Natalia Violato pela ajuda com os equipamentos nos experimentos de atividade antioxidante e conteúdo de fenóis totais.

Ao Prof.^o Dr.^o Valdecir Farias Ximenes por ceder seu laboratório para uso do HPLC analítico e pelas diversas discussões sobre atividade antioxidante.

Aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Leo, Cate, Danilo, Helena, Alessandra e Fernanda pela companhia ao longo destes anos, conversas, discussões e viagens a congressos.

Ao Jardim Botânico Municipal de Bauru e à Mariana Ninno Rissi pela ajuda com as coletas do material vegetal.

À Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Studart da Fonseca Vaz pela recepção no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e pela ajuda com a identificação do material vegetal.

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

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

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

À minha família, aos meus amigos e ao meu namorado, Vinícius, pela paciência e apoio durante estes dois anos, muito obrigada!

PIERONI, L.G. CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ALELOPÁTICA DE *Bauhinia holophylla* (BONG.) STEUD. 2013. Dissertação – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO

Recentemente, o Cerrado foi incluído na lista das áreas críticas para a conservação no mundo. Ocupando 21% do território nacional, estima-se que 800 espécies de plantas vasculares, entre árvores e arbustos, sejam endêmicas deste bioma. O estudo das plantas medicinais nativas do Cerrado e respectivos aleloquímicos pode representar significativo potencial para a busca de produtos naturais. Os flavonoides compreendem um dos principais grupos de substâncias antioxidantes de origem vegetal. Assim, as propriedades antioxidantes dos flavonoides têm atraído a atenção para a prevenção de doenças crônico-degenerativas e outras patologias. *Bauhinia* L. (Fabaceae) compreende aproximadamente 300 espécies, sendo *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. um arbusto típico do cerrado, muito utilizado na medicina popular; porém, não há estudos sobre a constituição química e atividade farmacológica desta espécie. Os objetivos deste trabalho foram realizar estudo fitoquímico a partir de folhas secas de *Bauhinia holophylla* e ensaios químicos biológicos com extratos e frações ativas. Para tanto, foram realizadas coleta de folhas, obtenção de extrato hidroalcoólico, extração líquido-líquido (LLE) entre diferentes solventes orgânicos e água para obtenção de frações enriquecidas, fracionamento através de diferentes técnicas cromatográficas (GPC, HPLC-RI, CC) e identificação das substâncias isoladas (HPLC-ESI-IT-MS, FIA-EIS-IT-MS/MSⁿ, RMN). A atividade antioxidante do extrato e das frações enriquecidas foi avaliada utilizando o método de sequestro de radicais pelo DPPH. O perfil cromatográfico (*fingerprint*) do extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* foi avaliado por HPLC-UV-PDA e o potencial alelopático através da germinação de sementes e crescimento inicial de raiz de *Cucumis sativus* L. e *Hordeum vulgare* L. embebidas em diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico (10 mg.L⁻¹; 20 mg.L⁻¹; 40 mg.L⁻¹; 80 mg.L⁻¹; 160 mg.L⁻¹ e 320 mg.L⁻¹). Os resultados obtidos mostraram que o extrato hidroalcoólico possui compostos derivados de heterosídeos de flavonoides, glicosídeos e lactonas. O fracionamento por GPC da fração *n*-butanólica obtida por LLE possibilitou a identificação de 10 diferentes compostos. As análises por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-EIS-IT-MS/MSⁿ da fração *n*-butanólica detectou todos os compostos isolados, além de possibilitar a identificação de mais 6 outros compostos. A análise por DPPH mostrou que a fração *n*-butanólica possui alta atividade antioxidante (CE₅₀ = 4,495 µg.mL⁻¹) quando comparada com os padrões positivos (rutina - CE₅₀ = 2,475 µg.mL⁻¹; quercetina - CE₅₀ = 2,288 µg.mL⁻¹ e ácido gálico - CE₅₀ = 0,729 µg.mL⁻¹). O ensaio para determinação do teor de fenóis totais justificou a alta atividade antioxidante desta fração (29,276 ± 2,045 mg de EAG/g extrato). O estudo da atividade alelopática indicou que o extrato hidroalcoólico das folhas de *B. holophylla* reduziu de forma marcante a germinação das sementes de *H. vulgare*, porém não afetou o processo germinativo de *C. sativus*. Por outro lado, o crescimento inicial das raízes de *C. sativus* e *H. vulgare* foi afetado em todas as concentrações utilizadas, porém mais acentuado nas concentração mais altas. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que *B. holophylla* é uma espécie promissora na busca por compostos biologicamente ativos.

Palavras-chave: alelopatia, antioxidante, Cerrado, Fabaceae, flavonoides.

PIERONI, L.G. CHEMICAL CONSTITUENTS, ANTIOXIDANT AND ALLELOPATHIC ACTIVITIES FROM *Bauhinia holophylla* (BONG.) STEUD. 2013. Dissertação – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ABSTRACT

Recently, the Cerrado has been included in the list of critical areas for conservation in the world. Occupying 21% of the Brazilian territory, it is estimated that 800 species of vascular plants, including trees and shrubs, are endemic to this biome. The study of medicinal plants in the Cerrado and their allelochemicals is important in the search for natural products. The flavonoids comprise a major group of natural antioxidant substances. Thus, the antioxidant properties of flavonoids have attracted attention to the prevention of chronic degenerative diseases and other pathologies. *Bauhinia* L. (Fabaceae) comprises about 300 species, *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. is a typical bush from savannah, widely used in folk medicine, but there are no studies on the chemical composition and pharmacological activity of this species. The objectives of this study were the phytochemical study from dried leaves of *Bauhinia holophylla*, biological and chemical assays with extracts and active fractions. The aerial parts were collected, dried and powdered, obtaining hydroalcoholic extract. Liquid-liquid extraction (LLE) between different organic solvents and water obtained enriched fractions. The fractionation was performed using different chromatographic techniques (GPC, HPLC-RI, CC) and the identification of substances isolated was performed using HPLC-ESI-IT-MS, FIA-EIS-IT-MS/MSⁿ, NMR. The antioxidant activity of the extract and fractions was performed using the method of sequestration by DPPH radicals. The chromatographic profile (fingerprint) of the hydroalcoholic extract of *B. holophylla* was evaluated by HPLC-UV-PDA and allelopathic potential through seed germination and initial root growth of *Cucumis sativus* L. and *Hordeum vulgare* L. soaked in different concentrations of hydroalcoholic extract (10 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹, 80 mg.L⁻¹, 160 mg.L⁻¹ and 320 mg.L⁻¹). The results showed that the hydroalcoholic extract has compounds derived from glycosides of flavonoids, lactones and glycosides. Fractionation by GPC of *n*-butanol fraction obtained by LLE provided the identification of 10 different compounds. The analyzes by HPLC-ESI-IT-MS and FIA-EIS-IT-MS/MSⁿ of the *n*-butanol fraction provided the identification of all compounds detected and enable the identification of over 6 other compounds. The DPPH assay showed that the *n*-butanol fraction possesses high antioxidant activity (CE₅₀ = 4.495 µg.mL⁻¹) when compared with positive standards (rutin – CE₅₀ = 2.475 µg.mL⁻¹; quercetin – CE₅₀ = 2.288 µg.mL⁻¹ and gallic acid – CE₅₀ = 0.729 µg.mL⁻¹). The test for determining the total phenols content justified the high antioxidant activity of this fraction (29.276 ± 2.045 mg GAE / g extract). The study of allelopathic activity indicated that the hydroalcoholic extract from the leaves of *B. holophylla* reduced the germination of *H. vulgare*, but did not affect the germination of *C. sativus*. Moreover, the initial growth of the roots of *C. sativus* and *H. vulgare* was affected at all concentrations used, but more pronounced in higher concentration. The results presented in this study demonstrate that *B. holophylla* is a promising species in the search for biologically active compounds.

Keywords: allelopathy, antioxidant, Cerrado, Fabaceae, flavonoids.

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Comprimento de onda
δ	Deslocamento químico
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Ionização química em pressão atmosférica)
CC	Cromatografia em coluna
CCDc	Cromatografia em Camada Delgada comparativa
CCDp	Cromatografia em Camada Delgada preparativa
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
d.i.	Diâmetro interno
DPPH	1,1-difenil-1-picril-hidrazila
EEtOH 70%	Extrato hidroalcoólico
FIA-EIS-IT-MS	Flow Injection Analysis (Inserção direta da amostra por fluxo controlado)
Fr. <i>n</i> -BuOH	Fração <i>n</i> -butanólica
Fr. DCM	Fração Diclorometano
Fr. Hex.	Fração Hexânica
Fr. H ₂ O	Fração aquosa
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlations
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteronuclear through Multiple Quantum Coherence
GPC	Gel Chromatography Permeation (Cromatografia por permeação em gel)
HPLC-UV-PDA	High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Visible-Photodiode Array
HPLC-ESI-IT-MS	High Performance Liquid Chromatography - Electrospray-Ion Trap - Mass Spectrometry
HPLC-RI	High Performance Liquid Chromatography – Refraction Index (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de Índice de Refração)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LLE	Liquid-liquid Extraction (extração líquido-líquido)
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NP/PEG	Natural Product/Polyethylenoglicol Reagent
PTFE	Politetrafluoroetileno (<i>Teflon</i>)

SPE-C ₁₈	Solid Phase Extraction (Extração em fase sólida em fase reversa Sílica C ₁₈)
RDA	Retro Diels-Alder
R _t	Tempo de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
t	Tripleto
T	Tesla
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY-1D	Total correlation spectroscopy-1D
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Representação gráfica através de vegetação do conceito “floresta-ecótono-campo” de cerrado (COUTINHO, 1978).	23
Figura 1.2. Distribuição geográfica do cerrado brasileiro (em preto) (Durigan <i>et al.</i> , 2004).	24
Figura 1.3. Esqueleto básico de um flavonoide (anéis A, B e C).	26
Figura 1.4. Distribuição geográfica de <i>B. gardneri</i> (●), <i>B. goyanensis</i> (●), <i>B. grandifolia</i> (●), <i>B. holophylla</i> (●) e <i>B. leptantha</i> (●) no Brasil (VAZ & TOZZI, 2003).	30
Figura 1.5. Folhas de <i>Bauhinia</i> L. Foto: Laís Goyos Pieroni.	30
Figura 1.6. <i>Bauhinia holophylla</i> (Bong.) Steud. Foto: Laís Goyos Pieroni.	32
Figura 4.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico por percolação de <i>B. holophylla</i>	40
Figura 4.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico por maceração de <i>B. holophylla</i>	40
Figura 4.3. Extração líquido-líquido do extrato EtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i>	42
Figura 4.4. Análise por CCDc de sílica dos extratos e frações de <i>B. holophylla</i> [EEtOH percolação (1); EEtOH maceração (2); fração hexânica (3); fração diclorometano (4); fração <i>n</i> -butanólica (5); fração aquosa (6); quercetina (7); apigenina (8); rutina (9); α -amirina (10); revelador: anisaldeído/ H ₂ SO ₄].	43
Figura 4.5. HPLC-UV-PDA do EEtOH 70% de <i>B. holophylla</i> . (Coluna Phenomenex [®] Luna C ₁₈ , 250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m; fase móvel: Água ultra pura + ácido acético 0,1% (A) e MeOH + ácido acético 0,1% (B); gradiente: 25% a 100% de B em A em 70 minutos; volume de injeção: 20,0 μ L; fluxo: 0,8 mL.min ⁻¹ , λ =254nm) e espectros de absorção na região do UV dos picos destacados.	45
Figura 4.6. Análise por CCDc de sílica das frações obtidas após fracionamento por GPC em Sephadex LH-20. Frações 33 a 64. Solvente AcOEt: ác. acético: ác. fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v), revelador anisaldeído/H ₂ SO ₄	46

Figura 4.7. Análise por CCDc de sílica das frações obtidas após fracionamento por GPC em Sephadex LH-20. Frações 97 a 133. Solvente AcOEt: ác. acético: ác. fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v:v), revelador NP/PEG.	47
.....	
Figura 4.8. Análise por CCDc de sílica das frações reunidas da Fr. <i>n</i> -BuOH. Frações 33 a 64. Solvente AcOEt: ác. acético: ác. fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v:v), revelador anisaldeído/H ₂ SO ₄ .	47
.....	
Figura 4.9. Nomenclatura utilizada para flavonoides glicosilados (exemplo: apigenina-7- <i>O</i> -rutinosídeo) (MA et al., 1997; CUYCKENS & CLAEYS, 2004).	53
.....	
Figura 4.10. Representação de íons produtos característicos formados pela clivagem de uma C-hexose (A) e de uma <i>O</i> -hexose (B). O sinal ± indica os modos de ionização, positivo ou negativo (CUIYCKENS & CLAEYS, 2004).	53
.....	
Figura 4.11. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh1 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	54
.....	
Figura 4.12. Espectro de massas de segunda ordem de Bh1 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	55
.....	
Figura 4.13. Espectro de Bh1 obtido por espectroscopia na região do UV.	55
.....	
Figura 4.14. Espectro de RMN de ¹ H de Bh1 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 11,7 T).	57
.....	
Figura 4.15. Espectro de RMN de ¹ H (ampliação na região de δ 6,05 a δ 7,45) de Bh1 (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 11,7 T).	58
.....	
Figura 4.16. Estrutura química de Bh1 .	59
.....	
Figura 4.17. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh2 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	60
.....	
Figura 4.18. Espectro de massas de segunda ordem de Bh2 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	61
.....	
Figura 4.19. Espectro de Bh2 obtido por espectroscopia na região do UV.	61
.....	

Figura 4.20. Espectro de RMN de ^1H de Bh2 (MeOH- d_4 ; 11,7 T).	63
Figura 4.21. Espectro de RMN de ^1H (ampliação na região de δ 6,0 a δ 7,9) de Bh2 (MeOH- d_4 ; 11,7 T).	64
Figura 4.22. Estrutura química de Bh2 .	65
Figura 4.23. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh3 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	66
Figura 4.24. Espectro de massas de segunda, terceira e quarta ordens de Bh3 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	67
Figura 4.25. Espectro de Bh3 obtido por espectroscopia na região do UV.	67
Figura 4.26. Espectro de RMN de ^1H de Bh3 (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 0,9 a δ 4,1; (B) Ampliação na região de δ 5,1 a δ 6,9.	69
Figura 4.27. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh3 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	70
Figura 4.28. Experimento gHMQC de Bh3 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	71
Figura 4.29. Experimento gHMBC de Bh3 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	72
Figura 4.30. Experimento TOCSY 1D de Bh3 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	73
Figura 4.31. Estrutura química de Bh3 .	75
Figura 4.32. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh4 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	76
Figura 4.33. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de Bh4 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	76

Figura 4.34. Espectro de Bh4 obtido por espectroscopia na região do UV.	77
Figura 4.35. Espectro de RMN de ^1H de Bh4 (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 3,22 a δ 3,68; (B) Ampliação na região de δ 5,4 a δ 7,7.	79
Figura 4.36. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh4 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	80
Figura 4.37. Experimento gHMQC de Bh4 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	81
Figura 4.38. Experimento gHMBC de Bh4 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	82
Figura 4.39. Experimento TOCSY 1D de Bh4 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	83
Figura 4.40. Estrutura química de Bh4	85
Figura 4.41. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh5 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	86
Figura 4.42. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de Bh5 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	86
Figura 4.43. Espectro de Bh5 obtido por espectroscopia na região do UV.	87
Figura 4.44. Espectro de RMN de ^1H de Bh5 (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 3,20 a δ 4,20; (B) Ampliação na região de δ 5,5 a δ 7,6.	89
Figura 4.45. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh5 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	90
Figura 4.46. Experimento gHMQC de Bh5 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	91
Figura 4.47. Experimento gHMBC de Bh5 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	92
Figura 4.48. Experimento TOCSY 1D de Bh5 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	93

Figura 4.49. Estrutura química de Bh5	95
Figura 4.50. Proposta de fragmentação baseado na nomenclatura de Ma et al. (1997) para quercetina-3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranosídeo.	95
Figura 4.51. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh6-a (A) e Bh6-b (B), analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	97
Figura 4.52. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de Bh6-a (A) e Bh6-b (B), analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	98
Figura 4.53. Espectros de Bh6-a (A) e Bh6-b (B) obtido por espectroscopia na região do UV.	99
Figura 4.54. Espectro de RMN de ^1H de Bh6 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	102
Figura 4.55. Espectro de RMN de ^1H de Bh6-a (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 0,3 a δ 4,30.	103
Figura 4.56. Espectro de RMN de ^1H de Bh6-a (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 5,20 a δ 7,60.	104
Figura 4.57. Espectro de RMN de ^1H de Bh6-b (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 0,90 a δ 4,10.	105
Figura 4.58. Espectro de RMN de ^1H de Bh6-b (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 5,30 a δ 7,50.	106
Figura 4.59. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh6 (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 0 a δ 115; (a) – Bh6-a ; (b) – Bh6-b	107
Figura 4.60. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh6 (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 120 a δ 176; (a) – Bh6-a ; (b) – Bh6-b	108
Figura 4.61. Experimento gHMQC de Bh6 (DMSO- d_6 ; 11,7 T); (a) – Bh6-a ; (b) – Bh6-b	109
Figura 4.62. Experimento gHMBC de Bh6 (DMSO- d_6 ; 11,7 T); (a) – Bh6-a ; (b) – Bh6-b	110

Figura 4.63. Experimento TOCSY 1D de Bh6-a (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	111
Figura 4.64. Experimento TOCSY 1D de Bh6-b (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	112
Figura 4.65. Estrutura química de Bh6-a (A) e Bh6-b (B).	114
Figura 4.66. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh7 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	115
Figura 4.67. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de Bh7 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	115
Figura 4.68. Espectro de Bh7 obtido por espectroscopia na região do UV.	116
Figura 4.69. Espectro de RMN de ¹ H de Bh7 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 0,90 a δ 4,10; (B) Ampliação na região de δ 5,2 a δ 7,4.	118
Figura 4.70. Espectro de RMN de ¹³ C de Bh7 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	119
Figura 4.71. Experimento gHMQC de Bh7 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	120
Figura 4.72. Experimento gHMBC de Bh7 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	121
Figura 4.73. Experimento TOCSY 1D de Bh7 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	122
Figura 4.74. Estrutura química de Bh7 .	124
Figura 4.75. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh9 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	125
Figura 4.76. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de Bh9 , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).	125
Figura 4.77. Espectro de Bh9 obtido por espectroscopia na região do UV.	126

Figura 4.78. Espectro de RMN de ^1H de Bh9 (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 2,30 a δ 3,80; (B) Ampliação na região de δ 5,3 a δ 7,6.	128
Figura 4.79. Experimento gHMQC de Bh9 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	129
Figura 4.80. Experimento gHMBC de Bh9 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	130
Figura 4.81. Estrutura química de Bh9 .	132
Figura 4.82. Espectro de massas de primeira ordem (modo <i>full-scan</i>) de Bh11 , analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).	133
Figura 4.83. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de Bh11 , analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).	133
Figura 4.84. Espectro de Bh11 obtido por espectroscopia na região do UV.	134
Figura 4.85. Espectro de RMN de ^1H de Bh11 (Piridina- d_5 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 3,60 a δ 5,20; (B) Ampliação na região de δ 5,3 a δ 6,7.	135
Figura 4.86. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh11 (Piridina- d_5 ; 11,7 T).	136
Figura 4.87. Experimento gHSQC de Bh11 (Piridina- d_5 ; 11,7 T).	137
Figura 4.88. Experimento gHMBC de Bh11 (Piridina- d_5 ; 11,7 T).	138
Figura 4.89. Estrutura química de Bh11 . Legenda: setas azuis indicam a correlação observada no experimento de gHMBC.	139
Figura 4.90. Espectro de massas de primeira e segunda ordens de Bh12 , analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).	140
Figura 4.91. Espectro de RMN de ^1H de Bh12 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	142
Figura 4.92. Espectro de RMN de ^{13}C de Bh12 (DMSO- d_6 ; 11,7 T).	143

Figura 4.93. Experimento gHSQC de Bh12 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	144
Figura 4.94. Experimento gHMBC de Bh12 (DMSO-d ₆ ; 11,7 T).	145
Figura 4.95. Estrutura química de Bh12 . Legenda: setas azuis indicam a correlação observada no experimento de gHMBC.	146
Figura 4.96. Espectro de massas de primeira e segunda ordens de Bh13 , analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).	147
Figura 4.97. Espectro de RMN de ¹ H de Bh13 (CDCl ₃ ; 11,7 T).	148
Figura 4.98. Espectro de RMN de ¹³ C de Bh13 (CDCl ₃ ; 11,7 T).	149
Figura 4.99. Estrutura química de Bh13	150
Figura 5.1. HPLC-ESI-IT-MS da fração <i>n</i> -BuOH de <i>B. holophylla</i> . (Coluna Phenomenex [®] Luna C ₁₈ , 250 x 4,6 mm i.d., 5µm; fase móvel: água ultra pura + ácido acético 0,1% (A) e MeOH + ácido acético 0,1% (B); gradiente: 25% to 100% de B em A em 70 minutos; volume de injeção: 20,0 µL; fluxo: 0,8 mL.min ⁻¹ , λ=254nm).	152
Figura 5.2. Espectros de massas de segunda ordem da Fr. <i>n</i> -BuOH de <i>B. holophylla</i> , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos). Legenda: () número referente ao pico no cromatograma obtido por HPLC-ESI-IT-MS.	157
Figura 5.3. Espectros de massas de segunda ordem da Fr. <i>n</i> -BuOH de <i>B. holophylla</i> , analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos). Legenda: () número referente ao pico no cromatograma obtido por HPLC-ESI-IT-MS.	158
Figura 5.4. Moléculas propostas no estudo da fração <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>B. holophylla</i> por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS.	159
Figura 6.1. Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Follin-Ciocalteau. R ² = correlação linear.	160
Figura 6.2. Esquema do método usado na quantificação de fenóis totais.	161

Figura 6.3. Concentração de fenóis totais do EEtOH 70% e das frações obtidas de <i>B. holophylla</i> .	162
Figura 6.4. Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância sequestradora de radicais livres, no caso DPPH.	163
Figura 6.5. Esquema do método usado na determinação da atividade antioxidante usando o reagente de DPPH.	164
Figura 6.6. Esquema do método usado na determinação da atividade alelopática do extrato EtOH 70%.	168
Figura 6.7. Germinação final de <i>Cucumis sativus</i> , em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	170
Figura 6.8. Índice de velocidade de germinação (IVG) de <i>Cucumis sativus</i> , em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	170
Figura 6.9. Crescimento inicial de raiz de <i>Cucumis sativus</i> , em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	171
Figura 6.10. Germinação final de <i>Hordeum vulgare</i> , em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	172
Figura 6.11. Índice de velocidade de germinação (IVG) de <i>Hordeum vulgare</i> , em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	172
Figura 6.12. Crescimento inicial de raiz de <i>Hordeum vulgare</i> , em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Quantidade obtida de extratos e seus rendimentos.	40
Tabela 4.2. Quantidade obtida de frações e seus rendimentos.	42
Tabela 4.3. Gradiente de eluição empregado na separação por HPLC-UV-PDA dos metabólitos encontrados no EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i>	44
Tabela 4.4. Agrupamento das frações resultantes do fracionamento da Fr. <i>n</i> -BuOH por GPC das folhas de <i>B. holophylla</i>	48
Tabela 4.5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh1	59
Tabela 4.6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 11,7 T) de Bh2	65
Tabela 4.7. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh3	74
Tabela 4.8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh4	84
Tabela 4.9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh5	94
Tabela 4.10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh6-a e Bh6-b	113
Tabela 4.11. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh7	123
Tabela 4.12. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh9	131
Tabela 4.13. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (Piridina- d_5 , 11,7 T) de Bh11	139
Tabela 4.14. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de Bh12	146
Tabela 4.15. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl $_3$, 11,7 T) de Bh13	150

Tabela 5.1. Gradiente de eluição empregado na separação por HPLC-UV-PDA dos metabólitos encontrados no EEtOH 70% das folhas de <i>B. holophylla</i> .	151
Tabela 5.2. Compostos identificados da fração <i>n</i> -BuOH das folhas de <i>B. holophylla</i> por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-EIS-IT-MS/MS ⁿ .	153
Tabela 6.1. Atividade antioxidante (CE ₅₀) do extrato EtOH 70% e da fração <i>n</i> -BuOH de <i>B. holophylla</i> .	165
Tabela 6.2. Porcentagem final de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e crescimento inicial de raiz (mm) de sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) e cevada (<i>Hordeum vulgare</i>) sob efeito do extrato EtOH 70% de <i>Bauhinia holophylla</i> durante cinco dias.	169

Sumário

1. Introdução	22
Cerrado: um complexo de biomas.....	22
Metabólitos secundários e sua importância químico-medicinal.....	25
O gênero <i>Bauhinia</i> L.....	29
2. Objetivos	33
Gerais.....	33
Específicos.....	33
3. Materiais e métodos	34
Reagentes e reveladores.....	34
Equipamentos e procedimentos.....	34
4. Estudo químico	39
Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos.....	39
Perfil químico do extrato hidroalcoólico (EEtOH 70%) de <i>B. holophylla</i>	43
Fracionamento da fração <i>n</i> -butanólica.....	46
Elucidação estrutural.....	52
Elucidação estrutural de Bh1.....	54
Elucidação estrutural de Bh2.....	60
Elucidação estrutural de Bh3.....	66
Elucidação estrutural de Bh4.....	75
Elucidação estrutural de Bh5.....	85
Elucidação estrutural de Bh6.....	95
Elucidação estrutural de Bh7.....	114
Elucidação estrutural de Bh9.....	124
Elucidação estrutural de Bh11.....	132

Elucidação estrutural de Bh12.....	140
Elucidação estrutural de Bh13.....	147
5. HPLC-ESI-IT-MS e FIA-EIS-IT-MS/MSⁿ da fração <i>n</i>-butanólica de <i>B. holophylla</i>.....	150
6. Ensaio químicos e biológicos.....	159
Quantificação de fenóis totais.....	169
Ensaio antioxidante com DPPH.....	162
Atividade alelopática.....	166
7. Conclusões.....	175
Referências bibliográficas.....	177

1. INTRODUÇÃO

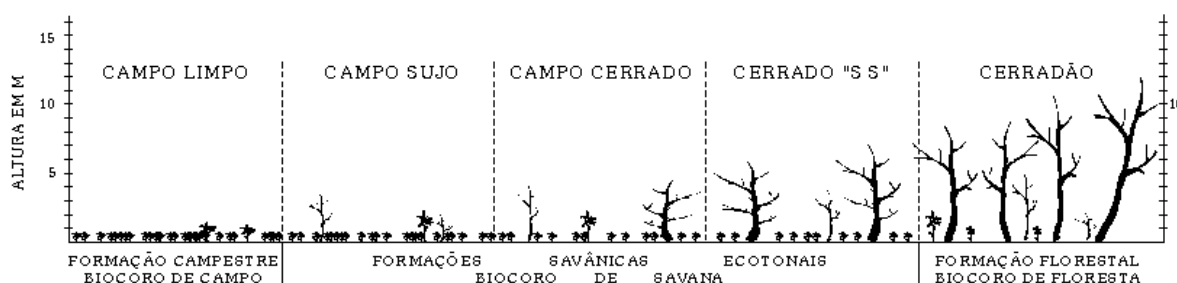
Cerrado: um complexo de biomas

Primeiramente, é necessária a diferenciação dos conceitos de domínio e bioma. A palavra *domínio* deve ser entendida, segundo Coutinho (2002), como “uma área do espaço geográfico onde predominam certas características morfoclimáticas e fitogeográficas, distintas daquelas predominantes nas demais áreas. Isso significa dizer que outras feições morfológicas ou condições ecológicas podem ocorrer em um mesmo domínio, além daquelas predominantes. Assim, no espaço do domínio do Cerrado, nem tudo que ali se encontra é bioma de cerrado. Veredas, matas de galeria, matas mesófilas de interflúvio, são alguns exemplos de representantes de outros tipos de bioma, distintos daquele de cerrado, que ocorrem em meio àquele mesmo espaço”.

Levando-se em conta as definições de bioma apresentadas por diversos autores (CLAPHAM Jr., 1973, p. 14; DAJOZ, 1993, p. 280; CRAWLEY, 1989, p. 27; COX & MOORE, 1993, p. 8; WALTER, 1986) podemos pontuar cinco características comuns: que o conceito de bioma é fisionômico, isto é, leva-se em conta a aparência geral da vegetação, resultante do predomínio de certas formas de vida; o conceito de bioma é funcional, levando-se em conta aspectos como os ritmos de crescimento e reprodução; o conceito de bioma não é florístico, ou seja, a afinidade taxonômica das espécies que aparecem em várias unidades de um mesmo bioma é irrelevante; o conceito de bioma é delimitado pela vegetação, mas engloba além dela, toda a demais biota; e, por último, o conceito de bioma é aplicável à Terra como um todo e não a esta ou àquela região (BATALHA, 2011).

Seguindo estas definições, Batalha (2011) afirma que podemos classificar o cerrado *sensu lato* como formado por três biomas: o campo tropical, com o estrato herbáceo contínuo e pequenos arbustos em baixa densidade; a savana, onde o estrato herbáceo é quase contínuo,

interrompido apenas por arbustos e árvores em densidades variáveis e a floresta estacional, onde predominam árvores de maior porte, com as copas formando um dossel. Estes dois últimos possuem seus padrões de crescimento associados às estações úmidas e secas alternantes. Considerando a classificação fisionômica de Coutinho (1978) (Figura 1.1), o campo limpo está incluído no bioma de campo tropical; o campo sujo, o campo cerrado e o cerrado *sensu stricto* ficam incluídos no bioma de savana e, no bioma de floresta estacional, incluímos, pois, o cerradão. Ainda, segundo Batalha (2011), podemos usar a palavra “cerrado” em três sentidos: 1) Cerrado, com a inicial maiúscula, quando estivermos nos referindo ao domínio fitogeográfico do Cerrado, incluindo não só o cerrado *sensu lato*, mas também os outros tipos vegetacionais que ali se encontram; 2) cerrado *sensu lato* ou simplesmente cerrado, quando estivermos nos referindo ao cerrado enquanto tipo vegetacional, formado pelo complexo de biomas acima descrito; e 3) cerrado *sensu stricto*, quando estivermos nos referindo a uma das fisionomias savânicas do cerrado *sensu lato*.



Fonte: Coutinho, L. M., 1978. *Revta. Brasil Bot.* 1:17-24.

Figura 1.1. Representação gráfica através de vegetação do conceito “floresta-ecótono-campo” de cerrado (COUTINHO, 1978).

Recentemente, o Cerrado foi incluído na lista dos 25 *hot spots* – as áreas críticas para a conservação no mundo, definidas com base na existência de espécies endêmicas e na biodiversidade (MYERS et al., 2000). Ocupando 21% do território brasileiro, é considerado a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002). Estima-se que a vegetação do cerrado tenha em torno de 160.000 espécies, entre plantas, animais e fungos (DIAS, 1990). Alguns autores estimam que haja 800 espécies de plantas vasculares, entre árvores e arbustos,

consideradas como endêmicas de cerrado, sendo assim a mais diversificada savana tropical do mundo, com uma grande diversidade de habitats e alternância de espécies (RATTER, 1997; RATTER, 2003).

O Cerrado ocorre no Brasil Central como área “core” (FERRI, 1977) e abrange os estados de Goiás, Mato Grosso do Sul, Tocantins, oeste da Bahia e de Minas Gerais, sul do Mato Grosso e Maranhão, norte do Piauí e Rondônia e como área disjunta em outros Estados (EITEN, 1990) (Figura 1.2).



Figura 1.2. Distribuição geográfica do cerrado brasileiro (em preto) (DURIGAN et al., 2004).

O cerradão é a forma principal de cerrado original que ocorre no estado de São Paulo (EITEN, 1990), sendo também a forma dominante no município de Bauru (CAVASSAN 1990; PINHEIRO, 2000). Poucos, porém, são os registros disponíveis sobre a distribuição da vegetação nativa que recobria o município de Bauru. Cavassan (1990), em constantes visitas às diversas manchas de vegetação nativa no município de Bauru, identificou maior ocorrência de vegetação do tipo cerradão.

O fragmento florestal que está presente no município de Bauru constitui umas das poucas áreas de cerrado protegidas no estado de São Paulo. Este fragmento está sob os cuidados de três instituições. O Instituto Lauro de Souza Lima mantém há mais de 50 anos

uma área de aproximadamente 217 hectares de vegetação nativa que a Instituição tem a intenção de preservar (CAVASSAN, 1990; PINHEIRO, 2000). O Jardim Botânico Municipal de Bauru abriga desde 1994 uma área de 321,17 hectares de cerrado nativo (PINHEIRO, 2000), que são utilizados para projetos de pesquisas e educação ambiental. A área pertencente ao *Campus* de Bauru da Universidade Estadual Paulista – UNESP possui ao todo 387,20 ha, sendo que 132,0126 ha foram destinados a ser "Área de Reserva Legal". Os locais que mantêm esta vegetação natural remanescente em Bauru estão incluídos entre as áreas prioritárias para a conservação no estado de São Paulo (CAVALCANTI & JOLY, 2002) e estudos enfocando o conhecimento dessa vegetação tornam-se necessários para subsidiar futuros projetos de manejo dessas reservas.

Metabólitos secundários e sua importância químico-medicinal

As plantas vasculares sintetizam uma ampla gama de moléculas orgânicas, denominadas metabólitos secundários. Compostos fenólicos são considerados metabólitos secundários, pois são sintetizados durante o desenvolvimento normal da planta e sob condições de estresse, como infecções, injúrias, radiação ultravioleta, entre outros. O termo “composto fenólico” ou “fenol” engloba aproximadamente oito mil compostos naturais, que têm em comum um anel aromático com pelo menos uma hidroxila substituinte (STALIKAS, 2010).

Uma das maiores classes de compostos fenólicos é a dos ácidos fenólicos. O nome “ácido fenólico”, em geral, descreve fenóis que possuem pelo menos um ácido carboxílico funcional (STALIKAS, 2010). Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos quanto para o organismo, sendo, por isso,

indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças (SOARES, 2002).

Os flavonoides pertencem ao grupo dos polifenóis e, geralmente, são encontrados na forma heterosídica. São moléculas planares e sua variação estrutural depende do padrão de substituição: hidroxilação, metoxilação, glicosilação (STALIKAS, 2010). São amplamente encontrados em frutas e vegetais. Diversos efeitos positivos dos flavonoides para a saúde humana já foram descritos (ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITAIN, 2007; MERTENS-TALCOTT et al., 2004). As propriedades biológicas dos flavonoides dependem fortemente do tamanho, natureza e posição dos substituintes e do número e da posição dos grupos hidroxílicos na molécula. Estrutura catecol ou *o*-dihidroxi no anel B, a presença de insaturação na posição C2-C3 em conjunção com a função 4-oxo do anel C e grupos hidroxílicos em posição C3 e C5 são algumas das características que aumentam esta capacidade antioxidante (Figura 1.3). São estes fatores que determinarão se um flavonoide agirá como um agente antioxidante ou um modulador enzimático, ou se possuirá propriedade antimutagênica ou citotóxica. (FARKAS, 2004; RAHMAN, 2007).

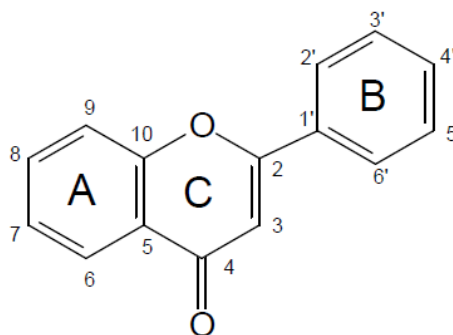


Figura 1.3. Esqueleto básico de um flavonoide (anéis A, B e C).

Uma das atividades mais estudadas dos flavonoides é sua proteção contra o estresse oxidativo (RAHMAN, 2007). Nos processos metabólicos normais, a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) é compensada por um completo sistema antioxidante endógeno. No entanto, devido a diferentes fatores, pode-se

produzir um excesso destes radicais livres resultando numa situação de estresse oxidativo. As enfermidades cardiovasculares e o câncer, os processos inflamatórios, as patologias autoimunes, desordens do sistema digestório e enfermidades neuro-degenerativas, como o Parkinson e o Mal de Alzheimer, são relacionadas a este dano oxidativo.

Os antioxidantes são compostos que protegem as células contra os efeitos daninhos causados por estas espécies reativas. A capacidade dos flavonoides em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos é, talvez, sua atividade mais importante e a mais estudada nos últimos anos. Diversos estudos epidemiológicos demonstraram o efeito que exerce uma dieta rica em frutas frescas e vegetais contra o risco de contrair enfermidades cardiovasculares e certos cânceres. Estes efeitos benéficos foram atribuídos, em parte, à presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, os quais exerceriam seus efeitos como resultado de suas propriedades antioxidantes (MUSCHIETTI, 2009).

As propriedades doadoras de elétrons dos flavonoides estão muito bem definidas e explicam a atividade antioxidante *in vitro* destes compostos. O conceito básico compreende uma transição redox mediante a qual a molécula antioxidante (Fl-OH) doa um elétron ao radical livre (R). Durante o transcurso desta transferência de elétrons, o caráter radical é transferido ao antioxidante, formando um antioxidante radical derivado (Fl-Ox) (MUSCHIETTI, 2009).

Outra importante função desempenhada pelos metabólitos secundários é a sua propriedade alelopática. Rice (1984) definiu alelopatia como: “qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico, que uma planta (incluindo micro-organismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

Atualmente são conhecidos cerca de 10 mil metabólitos secundários com ação alelopática (ALMEIDA, 1988). Os compostos já identificados pertencem a diversos grupos

químicos, atribuindo-se maior importância aos terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos (MALHEIROS & PERES, 2001).

No Brasil, os estudos com alelopatia são, muitas vezes, restritos às espécies de *Eucalyptus* L'Hér. (ALVES, 1999), ou à influência de plantas cultivadas e invasoras sobre os cultivos, principalmente em manejo com rotação de culturas (FERREIRA & AQUILA, 2000). Em espécies do Cerrado foram detectados inibidores de germinação de sementes de tomate em folhas e extratos de *Calea cuneifolia* DC. (COUTINHO & HASHIMOTO, 1971), *Wedelia paludosa* DC. (BARBOSA, 1972), *Miconia albicans* (Sw.) Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit e *Drimys winteri* Forst (GORLA & PEREZ, 1997). Pires et al. (2001) avaliaram o efeito do extrato aquoso de folhas de *Leucaena leucocephala* sobre a germinação e o desenvolvimento das plantas daninhas desmódio (*Desmodium purpureum*), picão preto (*Bidens pilosa*) e caruru (*Amaranthus hybridus*) e observou que a cobertura do solo com aquele extrato apresentava propriedades de controle de plantas daninhas e que esse efeito era atribuído principalmente ao aleloquímico mimosina. Silva et al. (2006), avaliaram o potencial alelopático de 15 espécies arbóreas nativas do Cerrado em sementes de alface, milho, feijão e picão, atribuindo os efeitos alelopáticos ao terpenos.

Os aleloquímicos são uma alternativa viável para substituir produtos disponíveis no mercado possuindo as mesmas funções dos defensivos agrícolas sintéticos (herbicidas, inseticidas e nematicidas) (FERREIRA & AQUILA, 2000), reduzindo assim a poluição ambiental e aumentando a produtividade agrícola. A riqueza química dos extratos de plantas aromáticas e medicinais faz com que sejam reconhecidos como fontes de compostos biologicamente ativos, sendo que as substâncias alelopáticas podem apresentar características químicas semelhantes às das substâncias com efeitos terapêuticos (MATHELA, 1991; CUTLER & CUTLER, 1999; MACÍAS et al., 2003).

Neste contexto, o interesse em avaliar o potencial medicinal de plantas nativas do Cerrado e identificar as substâncias ativas nos extratos e/ou frações, sendo os compostos fenólicos um dos principais grupos estudados, pode representar um significativo avanço para a busca de novos medicamentos, além de fornecer informações importantes para estratégias de manejo e conservação do Cerrado (ALMEIDA, 2006).

O gênero *Bauhinia* L.

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) compreende aproximadamente 300 espécies, encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta. No Brasil, as plantas do gênero *Bauhinia* são conhecidas como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi” (Figura 1.4 e 1.5). As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, especialmente *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*, são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, como diarreia, como anti-inflamatório, diurético e, principalmente, no controle do diabetes (CECHINEL FILHO, 2009; VASCONCELOS et al., 2004).

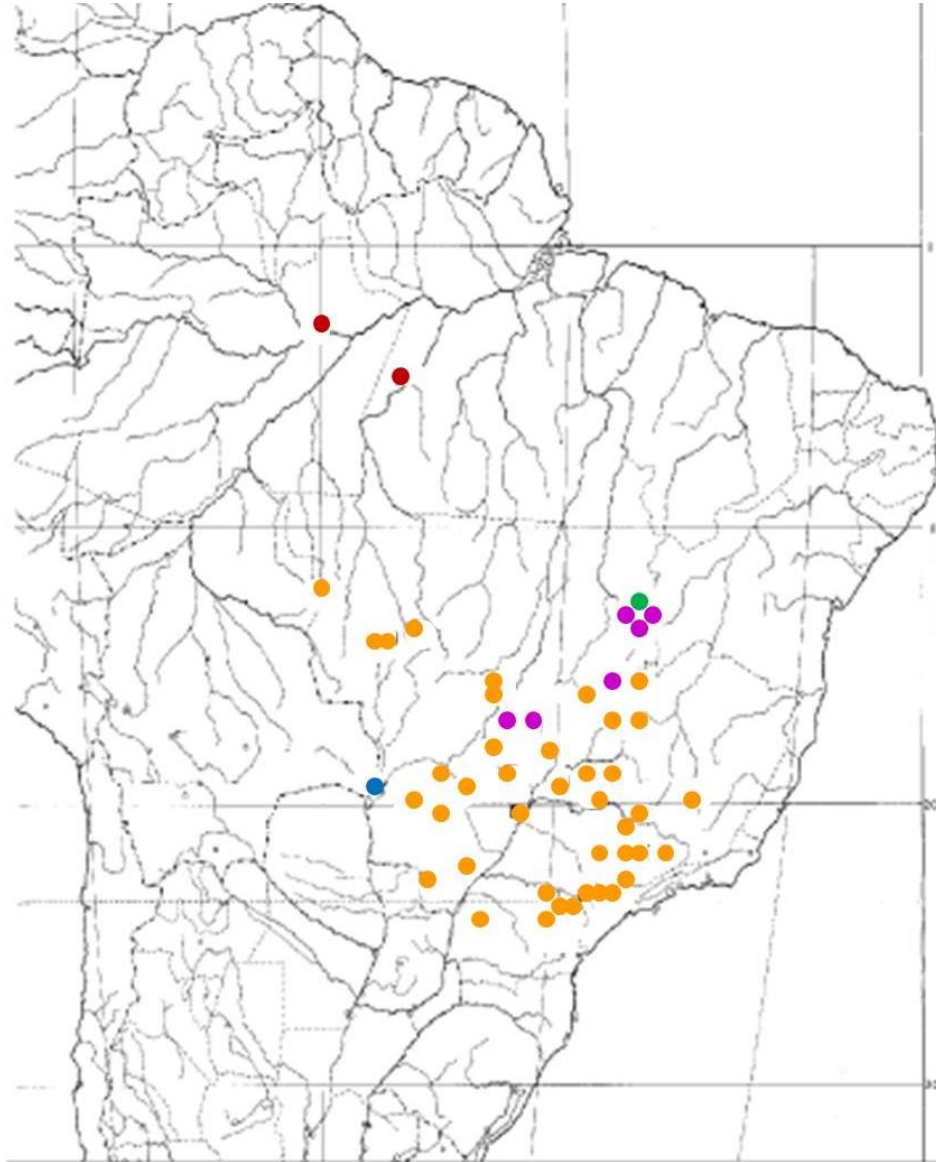


Figura 1.4. Distribuição geográfica de *B. gardneri* (●), *B. goyanensis* (●), *B. grandifolia* (●), *B. holophylla* (●) e *B. leptantha* (●) no Brasil (VAZ & TOZZI, 2003).



Figura 1.5. Folhas de *Bauhinia* L. Foto: Laís Goyos Pieroni.

Várias espécies de plantas deste gênero foram e estão sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente e, com isto, muitos compostos foram isolados e identificados. O gênero *Bauhinia* é caracterizado pelo acúmulo de flavonoides livres e heterosídeos de flavonoides (PIZZOLATTI et al., 2003; SALATINO et al., 1999), assim como outras classes de compostos orgânicos de interesse medicinal, incluindo terpenoides, esteroides, taninos e quinonas (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Biologicamente, a maioria dos trabalhos com espécies de *Bauhinia* é realizada com *B. forficata*, sendo considerada a verdadeira “Pata-de-vaca” pela maioria das populações rurais brasileiras e umas das espécies mais utilizadas em estudos contra diabetes (CECHINEL FILHO, 2009). Sua composição química ganhou, recentemente, grande atenção, principalmente devido ao isolamento do flavonoide kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnosídeo (kaempferitrina), ocorrendo exclusivamente nas folhas e usado como um marcador quimiotaxonômico (SILVA et al., 2000).

Existem outras espécies de *Bauhinia* conhecidas e muito usadas na medicina popular, como *B. monandra*, *B. holophylla* e *B. rufa*, porém poucos ou nenhum são os estudos sobre a constituição química e atividade farmacológica destas espécies (SILVA; CECHINEL FILHO, 2002).

Deste gênero, *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. é um arbusto típico do Cerrado (Figura 1.6), principalmente em sua fisionomia savânica de cerrado. É uma espécie com alto IVI no Cerrado na região de Bauru (CAVASSAN, 2002). Caracteriza-se por ser um subarbusto xeromórfito, desde 0,4m até arbustiva ca. 2m, no campo e no cerrado aberto perturbado; arvoreta 3-4m em cerradão. As folhas são inteiras, acuminadas ou curtamente bilobadas, com face abaxial tomentosa e os ramos da inflorescência angulosos, com entrenós em zigue e zague (VAZ & TOZZI, 2003).



Figura 1.6. *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. Foto: Laís Goyos Pieroni.

A ampla utilização de espécies do gênero *Bauhinia* na medicina popular, a sua distribuição por todo o país e a deficiência de dados químicos e farmacológicos aprofundados justificam os estudos fitoquímicos deste importante gênero botânico.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Realizar estudo fitoquímico a partir de folhas secas de *Bauhinia holophylla* e ensaios biológicos com extratos e frações.

Objetivos específicos

- Coleta de folhas e confecção de exsicata;
- preparação de extratos por percolação;
- extrações líquido-líquido dos extratos para obtenção de frações enriquecidas;
- testes de atividade antioxidante com as frações obtidas;
- realização do Perfil Cromatográfico (*Fingerprint*) das frações mais ativas nos testes antioxidantes;
- testes de atividade alelopática na germinação e crescimento inicial de plântulas;
- fracionamento e isolamento de substâncias;
- identificação de substâncias isoladas através de métodos espectrométricos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e reveladores

Solventes PA: acetato de etila, *n*-butanol, etanol, clorofórmio, hexano, metanol, diclorometano (Synthlab).

Solventes grau HPLC: Acetonitrila, ácido acético e metanol (Merck e Mallinckrodt) e água purificada em sistema Milli-Q.

Solventes deuterados: DMSO-*d*₆, CDCl₃, Piridina-*d*₅, MeOH-*d*₄ (Aldrich).

Reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Aldrich).

Reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica).

Padrões: Apigenina, luteolina, quercetina, rutina (Sigma Aldrich) e ácido gálico (Vetec).

Reveladores para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDc)

Luz UV 254-366 nm.

Anisaldeído / H₂SO₄ (WAGNER et al., 1984).

NP/PEG (WAGNER et al., 1984).

Equipamentos e Procedimentos

Cromatografia Em Camada Delgada Comparativa – CCDc

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDc) foram utilizadas placas comerciais preparadas de sílica gel 60 (Merck[®]), de tamanho 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente. As amostras foram aplicadas através de microcapilares de vidro nas placas na forma de soluções, em solventes bastante voláteis, facilmente eliminados após a aplicação. As amostras foram aplicadas em forma de ponto de 0,3 mm de diâmetro, 1,5 cm acima da borda inferior e 1,0 cm de distância das adjacentes. As placas foram eluídas em diferentes sistemas de solventes orgânicos (fase móvel).

Cromatografia em coluna aberta – CC

Foi utilizada sílica gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck®). A quantidade de sílica empregada foi de 20 vezes a quantidade de amostra (20 g sílica: 1 g amostra). As aplicações foram realizadas pela impregnação do extrato em uma pequena quantidade de sílica posteriormente aplicada no topo da coluna. As eluições foram realizadas com o aumento da força de eluição da fase móvel, utilizando misturas de solventes orgânicos (hexano, diclorometano, acetato de etila metanol, etc). As frações foram coletadas pela observação das manchas eluídas e/ou por frações de 10 mL.

Cromatografia em permeação em gel - GPC

O fracionamento por cromatografia em permeação em gel foi feito em coluna de vidro de 80 x 2,0 cm (d.i.), empacotada com Sephadex LH-20 (Pharmacia®). O solvente foi bombeado na coluna por meio de uma bomba peristáltica (Pharmacia®) modelo P1 18-1110-91 a um fluxo de $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As frações com aproximadamente 5,0 mL foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia®). Utilizou-se centrífuga da marca CELM, modelo COMBATE, a 2500 rpm na preparação do extrato para o fracionamento em cromatografia por permeação em gel.

Pesagens

Para pesagens dos extratos e frações foi utilizada Balança analítica (Metler Toledo, AB265-S DualRange) com capacidade para 220 g e legibilidade de 0,01 mg/0,1 mg.

Concentração dos extratos

A concentração do extrato e das amostras foi efetuada em evaporador rotativo (Heidolph®, Laborota 4001 – Efficient) equipado com bomba à vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control).

Foi utilizado filtro com membrana de PTFE (politetrafluoretileno, Teflon®, Millipore®) com poro de 0,45 e 0,20 μm para preparo de amostras para análise por HPLC.

Procedimento cromatográfico para o *clean-up*

O *clean-up* do extrato EtOH 70% foi realizado em cartucho de extração em fase sólida (SPE) (Strata-X, Phenomenex[®]) de fase reversa (C₁₈) com 500,0 mg de adsorvente. A concentração final foi de 1 mg da amostra para cada 10 mg de C₁₈. O cartucho foi previamente ativado com MeOH (15 mL) e depois ambientado com H₂O (10 mL). O material a ser aplicado no suporte de SPE foi previamente solubilizado em aproximadamente 0,5 mL de MeOH com auxílio de ultrassom, sendo posteriormente adicionados 2 mL de H₂O. A eluição no suporte de C₁₈ obedeceu à seguinte ordem de eluição: MeOH/H₂O (2:8, v/v), MeOH/H₂O (1:1, v/v) e MeOH. Alíquotas de 5 mL foram coletadas para cada composição do eluente empregado na dessorção dos analitos. Em seguida, as frações foram filtradas em discos de 0,20 µm de poro (Millipore[®]). A fração MeOH/H₂O 1:1 (v:v) foi analisada por HPLC.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (modo analítico)

A análise do perfil químico (“fingerprint”) do extrato EtOH 70% foi realizada em cromatógrafo Accela High Speed LC (Thermo Cientific[®]). Coluna Luna Phenomenex[®] C₁₈, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm; fase móvel: H₂O + Ácido Acético 0,1% (A) e MeOH + Ácido Acético 0,1% (B); gradiente linear: 25% de A a 100% de B em 70 minutos; volume de injeção: 20,0 µL; fluxo: 0,8 mL.min⁻¹, λ=254nm.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (modo semipreparativo)

As análises no modo semipreparativo foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (semipreparativo) (Knauer[®]), acoplado a um detector de índice de refração, Smartline RI Detector 2300/2400 (Knauer[®]) com coluna de fase reversa C₁₈ (Phenomenex[®]) (250 x 10 mm d.i.) com partícula de tamanho médio de 10 µm.

Espectrofotômetro

Espectrofotômetro PowerWave XS BioTek[®] para medição da absorbância nos ensaios de quantificação de fenóis totais e atividade antioxidante, realizados junto ao laboratório do Prof.º Dr.º José Roberto Bosqueiro da Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru, SP.

FIA-EIS-IT-MS e HPLC-ESI-IT-MS/MSⁿ

Espectrômetro de massas acoplado a um trapeador de íons, *Ion Trap* (IT), Accela High Speed LC (Thermo Cientific[®]), acoplado a Accela LCQ Fleet (Thermo Cientific[®]) com Ion Trap 3D e ionização por *eletrospray* (ESI), equipado com Thermo Xcalibur software versão 2.1 (Thermo Cientific[®]) para tratamento dos dados. Os espectros foram obtidos pela técnica de análise por injeção em fluxo (FIA). Modo negativo e/ou positivo para os espectros de primeira ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MSⁿ). Condições: voltagem do capilar – 4 V, voltagem do spray –5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ. O primeiro evento foi uma varredura completa *full-scan* dos espectros de massas para a adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MSⁿ realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30 % da energia total do instrumento. Condições HPLC-MS: Coluna Luna Phenomenex[®] C₁₈, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm; fase móvel: H₂O + Ácido Acético 0,1% (**A**) e MeOH + Ácido Acético 0,1% (**B**); gradiente linear: 25% de **A** a 100% de **B** em 70 minutos; volume de injeção: 20,0 µL; fluxo: 0,8 mL.min⁻¹, λ=254nm.

As análises de FIA-EIS-IT-MS e HPLC-ESI-IT-MS/MSⁿ foram realizadas junto ao grupo do Prof.º Dr.º Wagner Vilegas e da Prof.ª Dr.ª Lourdes Campaner dos Santos do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química – UNESP, Araraquara, SP.

Ressonância Magnética Nuclear – RMN

Espectrômetro Varian INOVA 500 (11,7 Tesla), operando a 500 MHz para ^1H e a 125 MHz para ^{13}C . O TMS foi usado como padrão interno para determinação dos deslocamentos químicos.

As análises de RMN foram realizadas junto ao Instituto de Química – UNESP, Araraquara, SP.

4. ESTUDO QUÍMICO

Coleta do material vegetal e obtenção dos extratos

Folhas (1,6 Kg) de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. foram coletadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru, localizado às margens da Rodovia Comandante João R. de Barros – SP 225 (22°20'30'' S e 49°00'30'' W) no mês de janeiro de 2011 pela mestrandia em Botânica Laís Goyos Pieroni. Cinco ramos férteis foram utilizados para identificação e herborização. A identificação da espécie foi realizada pela Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Studart da Fonseca Vaz, do herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, taxonomista especialista no gênero. Exsiccatas foram incluídas no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, sob números de registro RB 507.043, RB 507.045, RB 507.046, RB 507.47 e RB 507.048.

As folhas de *B. holophylla* foram secas em estufa a 45°C por 4 dias. Após a secagem, foram pulverizadas em moinho de facas. Os extratos foram preparados por percolação exaustiva do pó. Uma quantidade do pó (220 g) foi intumescida com etanol 70% (v/v) durante 2 horas. Em seguida, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + EtOH 70%), com altura de enchimento de 5:1 (percolador:pó das folhas secas). A vazão do solvente foi de 1,0-2,0 mL/min/Kg de planta. Após a extração, os líquidos extratores foram concentrados sob pressão reduzida, em temperatura inferior a 50°C. O extrato foi transferido para vidros tarados e deixado em capela até completa eliminação dos solventes (Figura 4.1). A fim de verificar qual metodologia de extração nos forneceria um rendimento maior do extrato, foi feita a maceração das folhas de *B. holophylla* com EtOH 70% , conforme mostra a Figura 4.2. Os rendimentos das duas metodologias de extração utilizadas são comparados na Tabela 4.1.

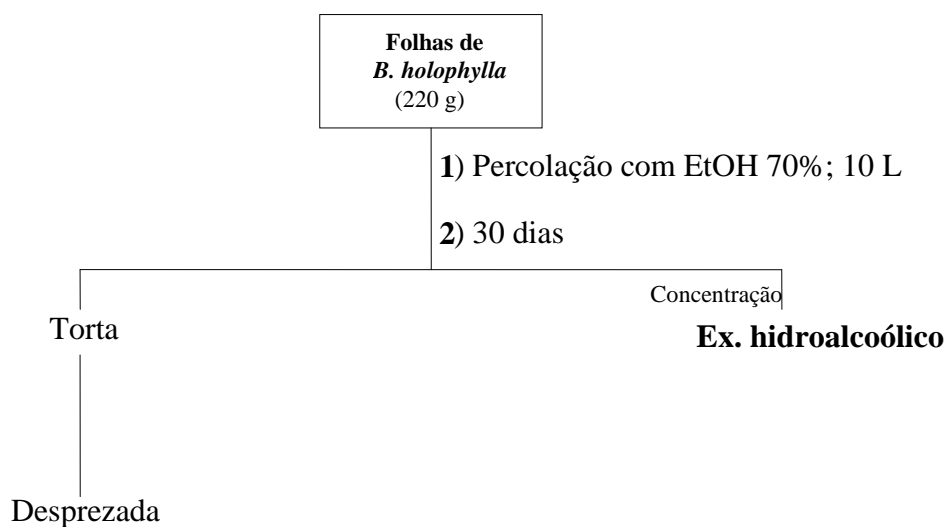


Figura 4.1. Obtenção do extrato hidroalcoólico por percolação de *B. holophylla*.

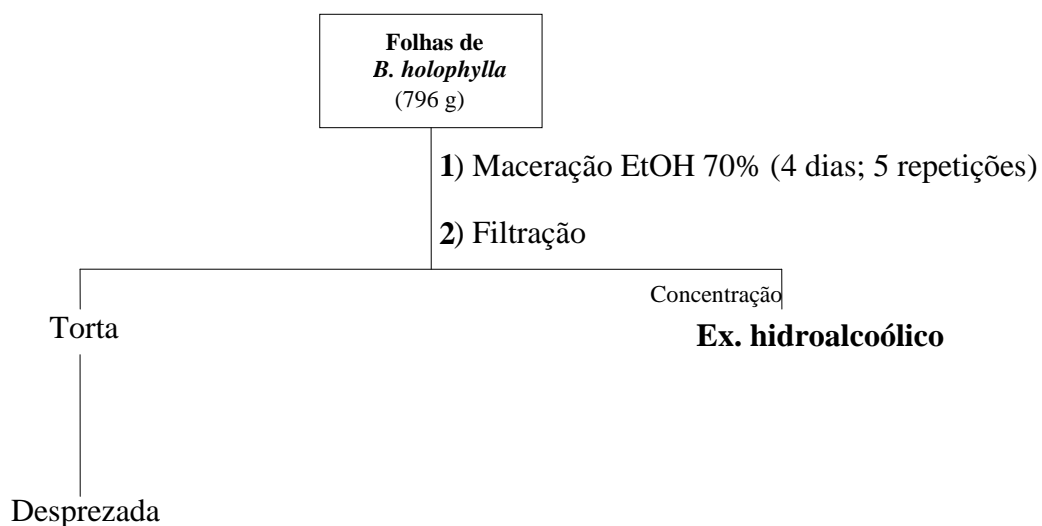


Figura 4.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico por maceração de *B. holophylla*.

Tabela 4.1. Quantidade obtida de extratos e seus rendimentos.

Extratos	Massa (g)	Rendimento (%)
EEtOH 70% (maceração)	95,0	12,0
EEtOH 70% (percolação)	65,0	29,5

A percolação também é conhecida por lixiviação. É uma das técnicas mais eficientes para a extração de componentes ativos de extratos vegetais e caracteriza-se pela extração

exaustiva de substâncias ativas. Consiste em submeter a amostra (parte da planta de interesse, droga, etc) pulverizada, previamente intumescida no solvente de escolha e devidamente armazenada em um recipiente cilíndrico ou cônico (percolador de vidro ou metal), à ação de um solvente que atravessa toda extensão do recipiente, deslocando-se de cima para baixo. O produto obtido é denominado de percolado. Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias ativas presentes em pequenas quantidades, quando estas são pouco solúveis ou ainda quando o preço da droga vegetal é relativamente alto. Em função do caráter cinético da percolação, a difusão será acentuadamente mais rápida que na maceração, pois o equilíbrio absoluto entre as concentrações dos líquidos intra e extracelular nunca será atingido, uma vez que o solvente é constantemente renovado. Desta maneira é possível obter o esgotamento total da droga vegetal. A extração continuará ocorrendo enquanto houver material para dissolver, e enquanto o solvente for renovado (SIMÕES et al. 2007).

Para efeitos de padronização dos extratos para o Projeto Temático “FITOTERÁPICOS PADRONIZADOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS CRÔNICAS” (FAPESP - Proc. N^o. 09/52237-9) optou-se pela utilização do extrato obtido a partir da percolação exaustiva do pó das folhas de *B. holophylla*.

O EEtOH 70% foi submetido à extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, DCM e *n*-BuOH), obtendo-se frações semipurificadas. Este tipo de metodologia proporciona a obtenção de frações enriquecidas, a partir dos extratos polares (CALIXTO & YUNES, 2001). Aproximadamente 15 g do extrato foram particionados entre 500 mL de água e 500 mL de hexano em um funil de separação. Em seguida, a fase aquosa foi particionada também com 500 mL de DCM e *n*-BuOH (Figura 4.3, tabela 4.2).

As frações obtidas nas partições foram analisadas por CCDc, usando como fase móvel AcOEt: ác.acético: ác. Fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v:v) e padrões de quercetina,

apigenina, rutina e α -amirina (Figura 4.4). Utilizaram-se como reveladores luz UV (254 nm e 366 nm), anisaldeído/ H_2SO_4 e NP/PEG (WAGNER et al., 1984).

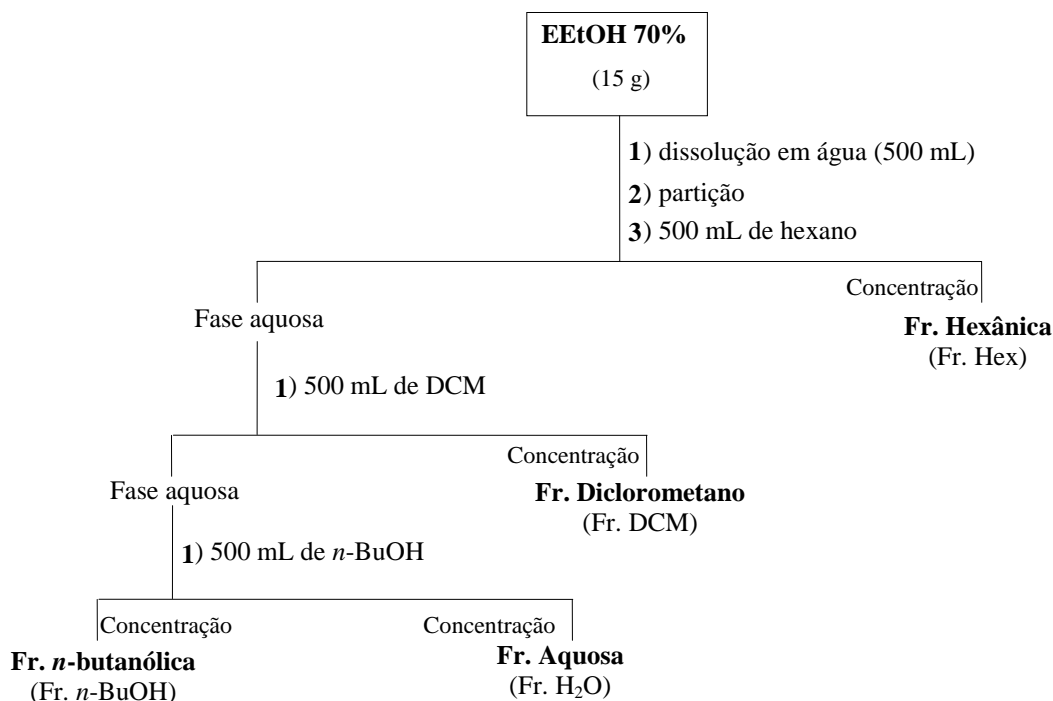


Figura 4.3. Extração líquido-líquido do extrato EtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

Tabela 4.2. Quantidade obtida de frações e seus rendimentos.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
Fr. Hex	0,4	2,8
Fr. DCM	0,3	2,0
Fr. <i>n</i> -BuOH	3,0	20,0
Fr. H_2O	7,0	46,6
Precipitado	4,0	26,6

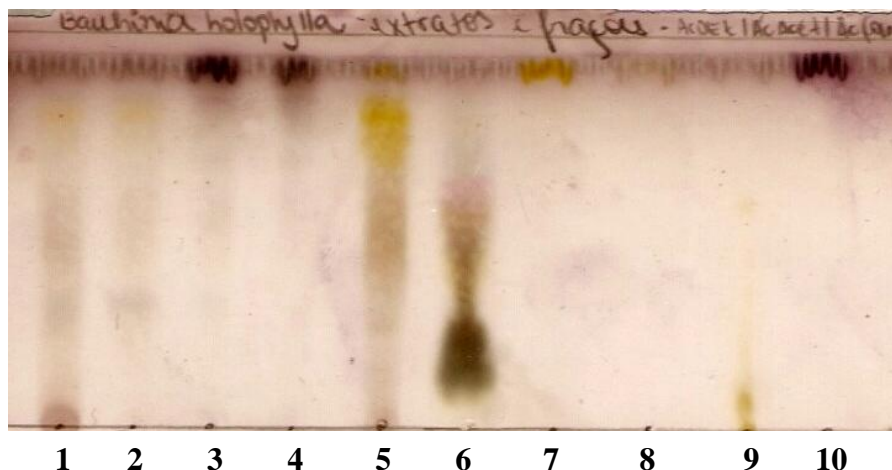


Figura 4.4. Análise por CCDc de sílica dos extratos e frações de *B. holophylla* [EEtOH percolação (1); EEtOH maceração (2); fração hexânica (3); fração diclorometano (4); fração *n*-butanólica (5); fração aquosa (6); quercetina (7); apigenina (8); rutina (9); α -amirina (10); revelador: anisaldeído/ H_2SO_4].

A fração *n*-BuOH apresentou um perfil flavonoídico, constituído por agliconas e alguns monoglicosídeos. A fração aquosa continha uma grande quantidade de açúcares livres. As frações DCM e Hexânica apresentaram terpenos em sua constituição. Por isso, optou-se pela escolha da fração *n*-butanólica para fracionamento, isolamento e identificação de substâncias ativas e realização de HPLC-MS e FIA-EIS-IT-MS, por serem os flavonoides substâncias de grande interesse químico e farmacológico.

Perfil químico do extrato hidroalcoólico (EEtOH 70%) de *B. holophylla*

As amostras foram preparadas utilizando 50 mg do extrato EtOH 70% das folhas de *B. holophylla* seguindo a metodologia descrita na página 34, item 3, material e métodos. O *clean up* foi realizado em um cartucho de SPE com fase reversa C_{18} . Muitos extratos contêm quantidades significativas de carboidratos e/ou material lipídico que interferem potencialmente na sua avaliação. Etapas de *clean-up* são fundamentais para eliminar compostos indesejáveis presentes na matriz (WELLUM & KIRBY, 1981).

Após vários testes, otimizou-se a eluição usando como fase móvel MeOH e H₂O purificada, ambos acidificados com Ácido Acético 0,1%. (Tabela 4.3). O resultado está na figura 4.5.

Tabela 4.3. Gradiente de eluição empregado na separação por HPLC-UV-PDA dos metabólitos encontrados no EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

Tempo (min)	Água + Ácido acético 0,1% (%)	MeOH + Ácido acético 0,1% (%)
0	75	25
20	50	50
40	30	70
70	0	100

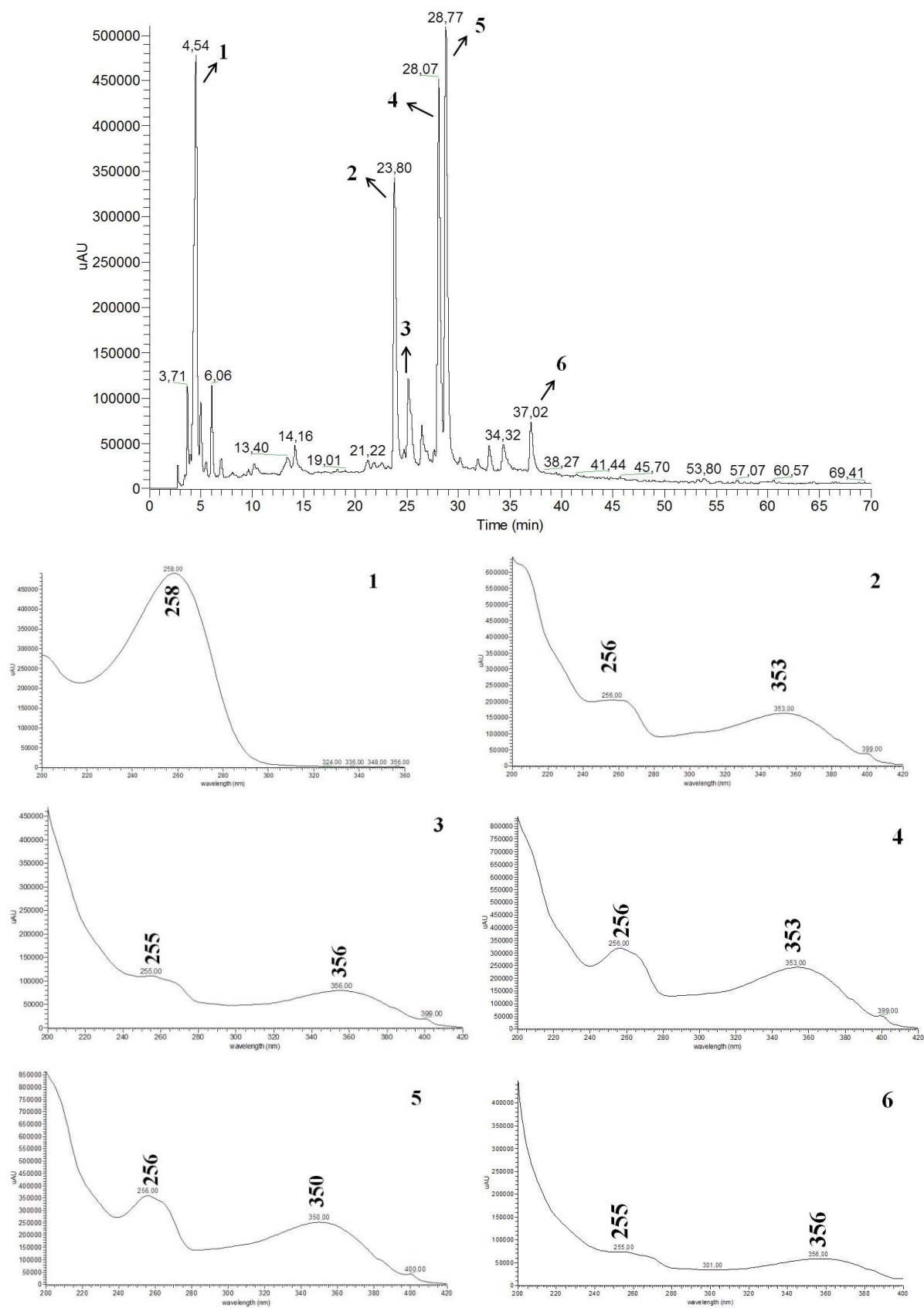


Figura 4.5. HPLC-UV-PDA do EtOH 70% de *B. holophylla*. (Coluna Phenomenex[®] Luna C₁₈, 250 x 4,6 mm i.d., 5 μ m; fase móvel: Água ultra pura + ácido acético 0,1% (A) e MeOH + ácido acético 0,1% (B); gradiente: 25% a 100% de B em A em 70 minutos; volume de injeção: 20,0 μ L; fluxo: 0,8 mL.min⁻¹, λ =254nm) e espectros de absorção na região do UV dos picos destacados.

A análise dos espectros de absorção no UV dos picos destacados revela que eles apresentam padrão similar de absorção ao redor de 330-380 nm e 240-280 nm, sugerindo que estes flavonoides podem ser derivados de flavonóis (picos **2, 3, 4 e 6**) e flavonas (picos **5**). A análise do espectro de UV do pico **1** revela um padrão similar de absorção aos de glicosídeos cianogênicos (MABRY et al., 1970).

Fracionamento da fração *n*-butanólica (Fr. *n*-BuOH)

Uma alíquota da fração *n*-BuOH (3,0 g) foi submetida à cromatografia por permeação em gel (GPC) em coluna de Sephadex LH-20 (Pharmacia®). A amostra foi solubilizada em 20,0 mL de MeOH e centrifugados à 2500 rpm, por duas vezes, 8 minutos cada. O sobrenadante foi aplicado na coluna, utilizando MeOH como eluente. Foram coletadas 170 frações, posteriormente monitoradas por CCDc (Figura 4.6 e 4.7). As frações que apresentaram R_f semelhantes foram agrupadas em novas frações e submetidas a novos fracionamentos (Figura 4.8, Tabela 4.4).

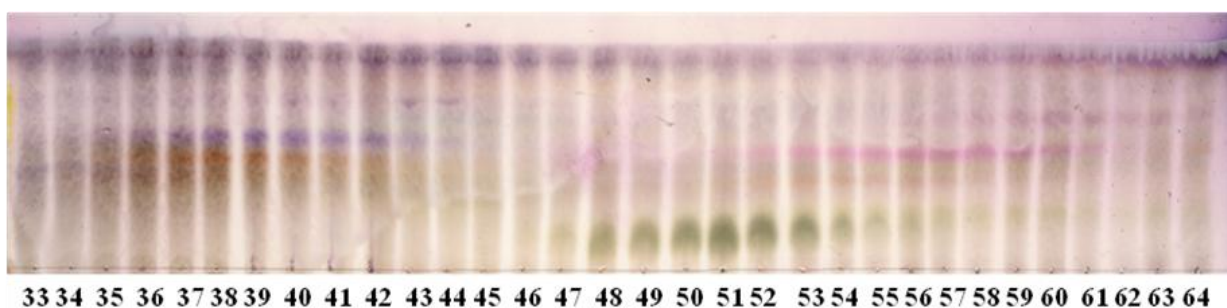
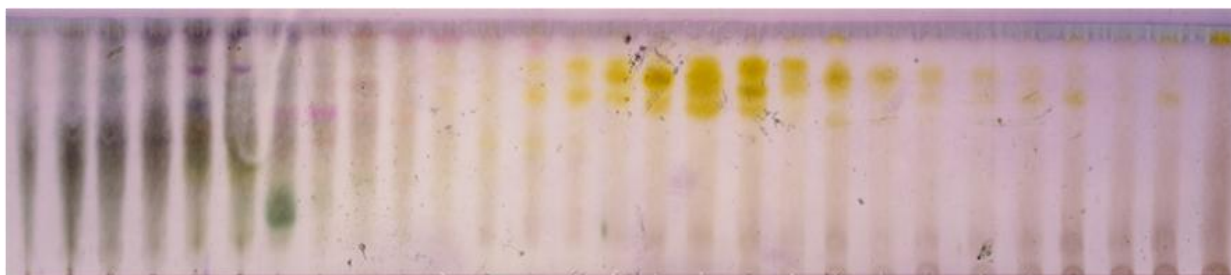


Figura 4.6. Análise por CCDc de sílica das frações obtidas após fracionamento por GPC em Sephadex LH-20. Frações 33 a 64. Solvente AcOEt: ác. acético: ác. fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v:v), revelador anisalaldeído/H₂SO₄.



97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133

Figura 4.7. Análise por CCDc de sílica das frações obtidas após fracionamento por GPC em Sephadex LH-20. Frações 97 a 133. Solvente AcOEt: ác. acético: ác. fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v:v), revelador NP/PEG.



1 19 25 31 36 45 47 55 61 65 73 79 88 92 94 97 101 109 114 125 130 135 138 139 143 148 154 170

Figura 4.8. Análise por CCDc de sílica das frações reunidas da Fr. *n*-BuOH. Frações 33 a 64. Solvente AcOEt: ác. acético: ác. fórmico: água (100:11:11:26, v:v:v:v), revelador anisaldeído/H₂SO₄.

Tabela 4.4. Agrupamento das frações resultantes do fracionamento da Fr. *n*-BuOH por GPC das folhas de *B. holophylla*.

Fração	Frações reunidas	Massa (g)
01	01-18	0,0467
19	19-24	0,0381
25	25-30	0,0688
31	31-35	0,0831
36	36-44	0,2472
45	45-46	0,0513
47	47-54	0,3234
55	55-60	0,0901
61	61-64	0,0418
65	65-71	0,0514
72	72-78	0,0480
79	79-87	0,0637
88	88-91	0,0477
92	92-93	0,0316
94	94-96	0,0515
97	97-100	0,2117
101	101-108	0,3409
109	109-113	0,1579
114	114-124	0,2027
125	125-134	0,0979
135	135-137	0,0199
138	138	0,0080
139	139-142	0,0202
143	143-147	0,0217
148	148-153	0,0427
154	154-169	0,0223
170	170	0,1570
Total		2,5873

As frações obtidas a partir do agrupamento foram analisadas novamente por CCDc e por HPLC-UV-PDA. Aquelas que apresentaram perfis de flavonoides foram submetidas a novos fracionamentos, dependendo da característica de cada amostra.

Fração 154

A fração 154 apresentou uma mancha amarelada quando analisada por CCDc (revelada com anisaldeído/H₂SO₄) indicando a presença de flavonoide (WAGNER & BLADT, 1996), porém ainda continha impurezas. A amostra (22,3 mg) foi submetida à extração em fase sólida (SPE) em cartucho (Strata-X, Phenomenex[®]) de fase reversa (C₁₈) com 500,0 mg de adsorvente, ativado com 15,0 mL de MeOH e ambientado com 10,0 mL de H₂O. Coletaram-se 3 frações, eluídas em H₂O/MeOH (8:2, v/v), H₂O/MeOH (1:1, v/v) e MeOH, respectivamente. A fração eluída em MeOH (**Bh1**) apresentou-se aparentemente pura quando analisada por CCDc e foi submetida a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D.

Fração 170

A fração 170, assim como a fração 154, apresentou uma mancha amarelada quando analisada por CCDc (revelada com anisaldeído/H₂SO₄) indicando a presença de flavonoide (WAGNER & BLADT, 1996), porém ainda continha impurezas. A amostra (157,0 mg) foi submetida à extração em fase sólida (SPE) em cartucho (Strata-X, Phenomenex[®]) de fase reversa (C₁₈) com 500,0 mg de adsorvente, ativado com 15,0 mL de MeOH e ambientado com 10,0 mL de H₂O. Coletaram-se 3 frações, eluídas em H₂O/MeOH (8:2, v/v), H₂O/MeOH (1:1, v/v) e MeOH, respectivamente. A fração eluída em MeOH (**Bh2**) apresentou-se aparentemente pura quando analisada por CCDc e foi submetida a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D.

Fração 101

A fração 101 apresentou uma mistura de manchas amarelas/alaranjadas quando analisada por CCDc (revelada com NP/PEG) indicando a presença de flavonoides (WAGNER & BLADT, 1996). A fração 101 foi purificada por HPLC-RI, no modo semipreparativo. A amostra (0,34 g) foi solubilizada em 3,4 mL de MeOH/H₂O (1:1; v/v), filtrada em filtro com membrana PTFE de 0,45 µm, obtendo-se uma solução de 100,0 mg.mL⁻¹. A fase móvel empregada foi MeOH (**A**) + H₂O (**B**), sendo 50% de **A** em **B** (isocrático), com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹.

Foram realizadas 18 injeções de 70,0 µL cada, coletando-se 11 frações. Foram isoladas as substâncias **Bh3** (21,9 mg), **Bh4** (18,9 mg), **Bh5** (8,0 mg), **Bh6** (9,4 mg) e **Bh7** (16,0 mg), que se apresentaram aparentemente puras quando analisadas por CCDc, sendo submetidas a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D/2D.

Fração 114

A fração 114 apresentou uma mistura de manchas amarelas/alaranjadas quando analisada por CCDc (revelada com NP/PEG) indicando a presença de flavonoides (WAGNER & BLADT, 1996). A fração 114 foi purificada por HPLC-RI, no modo semipreparativo. A amostra (0,2 g) foi solubilizada em 2,0 mL de MeOH/H₂O (1:1; v/v), filtrada em filtro com membrana PTFE de 0,45 µm, obtendo-se uma solução de 100,0 mg.mL⁻¹. A fase móvel empregada foi MeOH (**A**) + H₂O (**B**), sendo 50% de **A** em **B** (isocrático), com fluxo de 2,0 mL.min⁻¹.

Foram realizadas 11 injeções de 70,0 µL cada, coletando-se 11 frações. Foram isoladas as substâncias **Bh8** (5,5 mg), **Bh9** (8,8 mg), **Bh10** (38,4 mg), que se apresentaram aparentemente puras quando analisadas por CCDc, sendo submetidas a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D/2D.

Fração 47

A fração 47 apresentou cristais amorfos de cor branca, porém ainda continha impurezas. Foi submetida, então, a várias etapas de recristalização. A amostra foi inicialmente dissolvida a quente em MeOH. Essa solução foi deixada em repouso, em baixa temperatura por 12 horas. Após 12 horas de resfriamento, os cristais precipitaram e o sobrenadante foi retirado com uma pipeta. Após a limpeza total dos cristais, a substância 47 (**Bh11**) foi submetida a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D/2D.

Fração 55

A fração 55 apresentou manchas violetas quando analisada por CCDc (revelada com anisaldeído/H₂SO₄). Foi submetida a um novo fracionamento em coluna cromatográfica (CC) de sílica-gel (Fase normal). A amostra (0,090 g) foi impregnada em uma pequena quantidade de sílica posteriormente aplicada no topo da coluna. As eluições foram realizadas com o aumento da força de eluição da fase móvel, utilizando gradiente de hexano, AcOEt e MeOH. Foram coletadas 25 frações, monitoradas por CCDc. As frações 8-11 apresentaram R_f semelhantes e foram agrupadas, fornecendo a substância 55.8 (**Bh12**), que foi submetida a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D/2D.

Fração 36

A fração 36 apresentou manchas roxas quando analisada por CCDc (revelada com anisaldeído/H₂SO₄). Foi submetida a um novo fracionamento em coluna cromatográfica (CC) de sílica-gel (Fase normal). A amostra (0,187 g) foi impregnada em uma pequena quantidade de sílica posteriormente aplicada no topo da coluna. As eluições foram realizadas com o aumento da força de eluição da fase móvel, utilizando gradiente de hexano, AcOEt e MeOH. Foram coletadas 17 frações, monitoradas por CCDc. As frações 6-12 apresentaram R_f semelhantes e foram agrupadas, fornecendo a substância 36.6 (**Bh13**) que foi submetida a experimentos de HPLC-UV, FIA-EIS-IT-MS e RMN 1D.

Elucidação estrutural

Ao lado na Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a Espectrometria de Massas (MS) é, certamente, a ferramenta mais importante na determinação estrutural de compostos orgânicos e de produtos naturais, oferecendo uma sensibilidade excepcional. No entanto, a interpretação dos espectros de massas é mais complexa do que a dos espectros de RMN (ZHOU et al, 1996; CSEKE et al., 2006).

Uma das técnicas mais utilizadas em MS para obtenção de espectro de massas e investigação estrutural de flavonoides tem sido a ionização por *eletrospray* (ESI). Esta técnica possibilita a clivagem do anel C pelo mecanismo de fragmentação Retro-Diels-Alder (RDA), gerando íons ${}^{ij}A^{-/+}$ e ${}^{ij}B^{-/+}$ e fornece os fragmentos diagnósticos para identificação do flavonoide, assim como o número e o tipo de constituintes no anel-A e anel-B. Ma e colaboradores (1997) propuseram uma nomenclatura para a designação destes fragmentos diagnósticos em flavonoides, como esquematizado na figura 4.9. Para agliconas livres, os íons ${}^{ij}A^{-/+}$ e ${}^{ij}B^{-/+}$ referem-se aos fragmentos contendo o anel-A e o anel-B intactos, respectivamente. As letras *i* e *j* referem-se à ligação do anel C que foi clivada. A maioria das rotas de fragmentação resultantes dos íons A e B requer a clivagem das ligações C - C do anel-C nas posições 1/3, 0/2, 0/3, 0/4 ou 2/4, dependendo fortemente do padrão de substituição e da classe do flavonoide estudado. Por exemplo, um grupo OH na posição 3 de flavonóis resulta numa maior quantidade e diferentes possibilidades de fragmentação quando comparados às flavonas. Íons produtos de *m/z* abaixo dos valores da aglicona são típicos do mecanismo de fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado (MA et al., 1997; CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

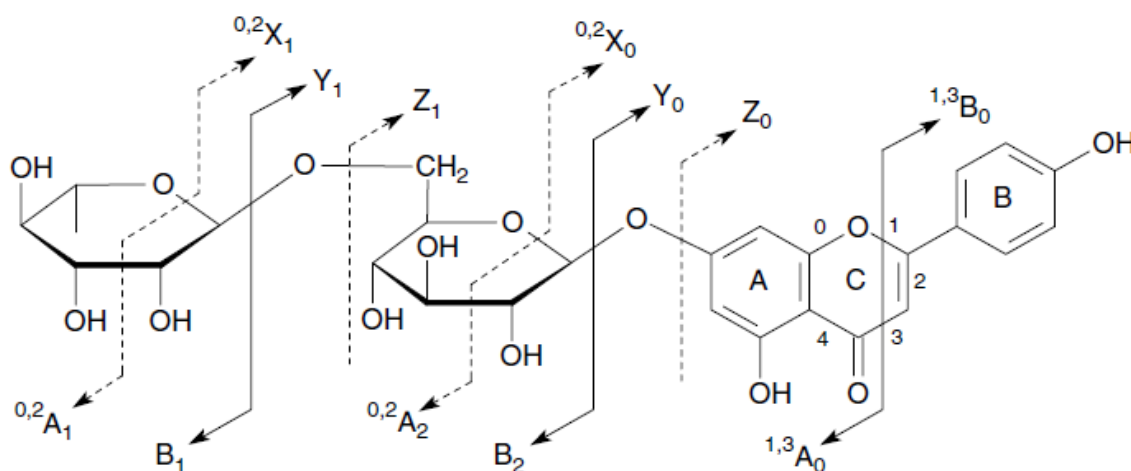


Figura 4.9. Nomenclatura utilizada para flavonoides glicosilados (exemplo: apigenina-7-O-rutinosídeo) (MA et al., 1997; CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

Em flavonoides *C*-glicosilados, o açúcar é ligado diretamente ao núcleo do flavonoide por uma ligação *C*-*C*, dificilmente clivada. Já em flavonoides *O*-glicosilados, a ligação *O*-*C* é mais susceptível a clivagem. Por isso, é possível diferenciá-los através da análise do espectro de massas. Em flavonoides *C*-glicosilados a via de fragmentação preferencial é aquela que ocorre através da clivagem interna da unidade sacarídica, e em flavonoides *O*-glicosilados é favorecida a eliminação intacta do açúcar (Figura 4.10) (CUIYCKENS & CLAEYS, 2004).

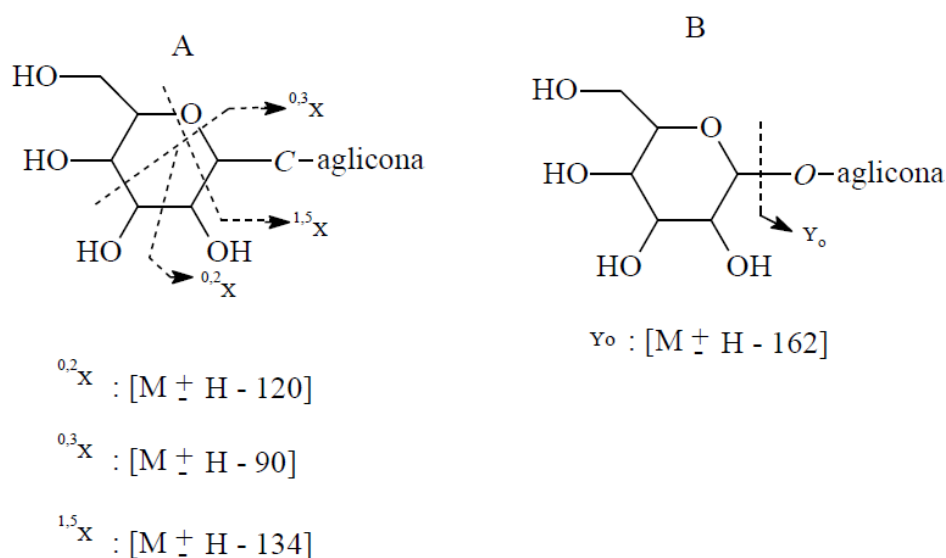


Figura 4.10. Representação de íons produtos característicos formados pela clivagem de uma *C*-hexose (A) e de uma *O*-hexose (B). O sinal \pm indica os modos de ionização, positivo ou negativo (CUIYCKENS & CLAEYS, 2004).

Considerando o perfil flavonoídico da fração *n*-BuOH, foi utilizada, além das técnicas de UV e RMN, a técnica de FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ (modo negativo, para flavonoides) para a elucidação estrutural das substâncias isoladas.

Elucidação estrutural de Bh1

A fração 154 (22,3 mg) foi submetida à separação cromatográfica por SPE, dando origem a 1,7 mg de uma substância isolada (154.3).

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh1** (Figura 4.11) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 285. Através da análise do espectro de segunda ordem do íon precursor m/z 285 $[M - H]^-$ (Figura 4.12), foram observados fragmentos em m/z 241 $[M - COOH - H]^-$, m/z 199 $[M - 86 - H]^-$ e em m/z 151 $[M - 134 - H]^-$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonoides com anel-A dihidroxilado.

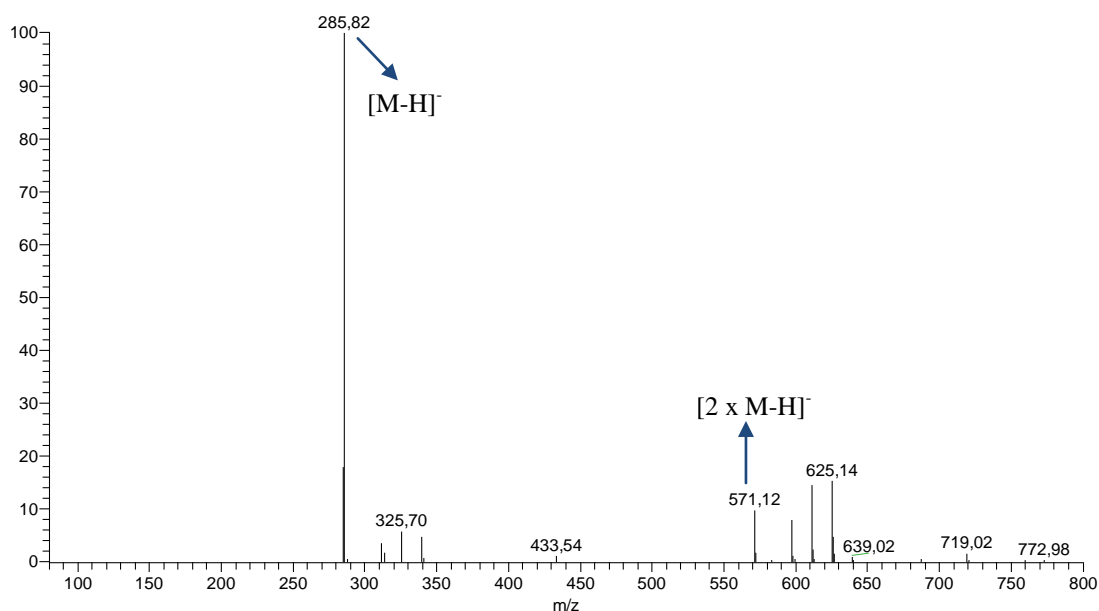


Figura 4.11. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh1**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

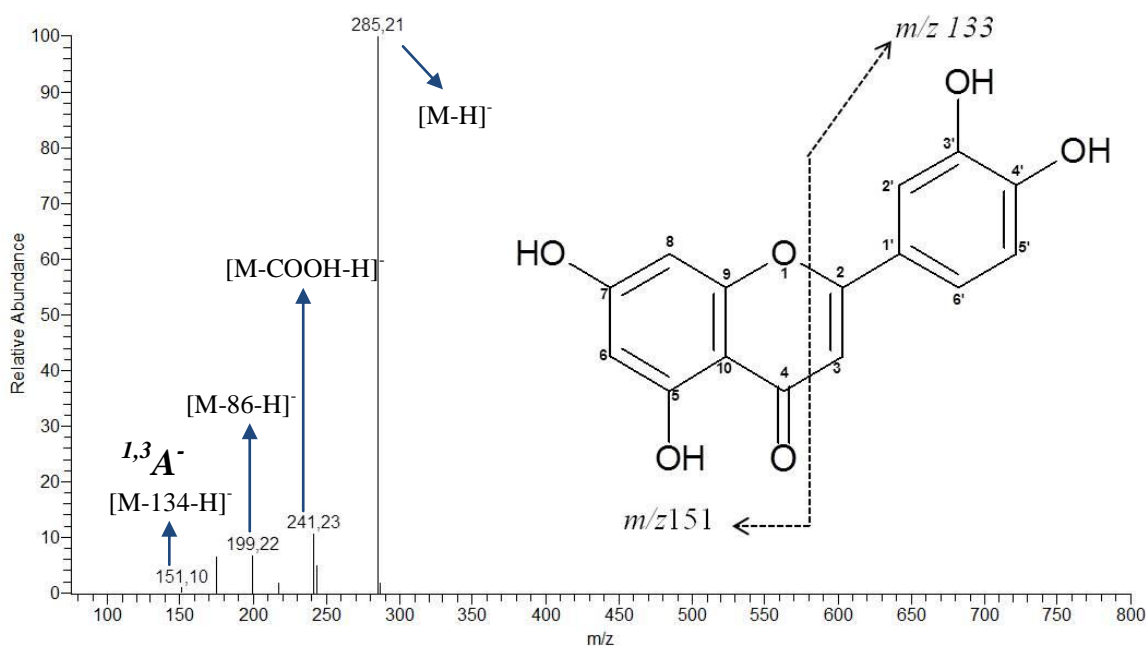


Figura 4.12. Espectro de massas de segunda ordem de **Bh1**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh1** na região do UV (Figura 4.13) foram observadas bandas em 254 (Banda II), 265 e 350 nm (Banda I), características de flavonas (MABRY et al., 1970). Esses dados foram coerentes com os valores encontrados na literatura para a luteolina (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

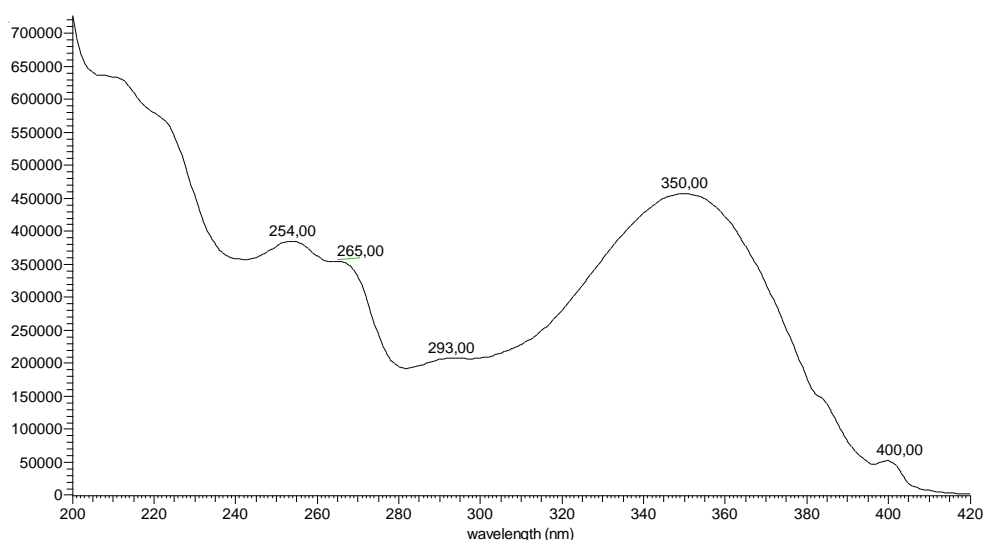


Figura 4.13. Espectro de **Bh1** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ¹H de **Bh1** (Figuras 4.14 e 4.15) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram

visualizados dois dubletos, um em δ 6,87 (H5', $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 7,41 (H2', $J = 2,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,38 (H6', $J = 2,0$ e $7,0$ Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,18 (H6) e δ 6,43 (H8), ambos com $J = 2,0$ Hz, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta* e um singlete em δ 6,65, correspondente ao H3 de uma flavona (Tabela 4.5).

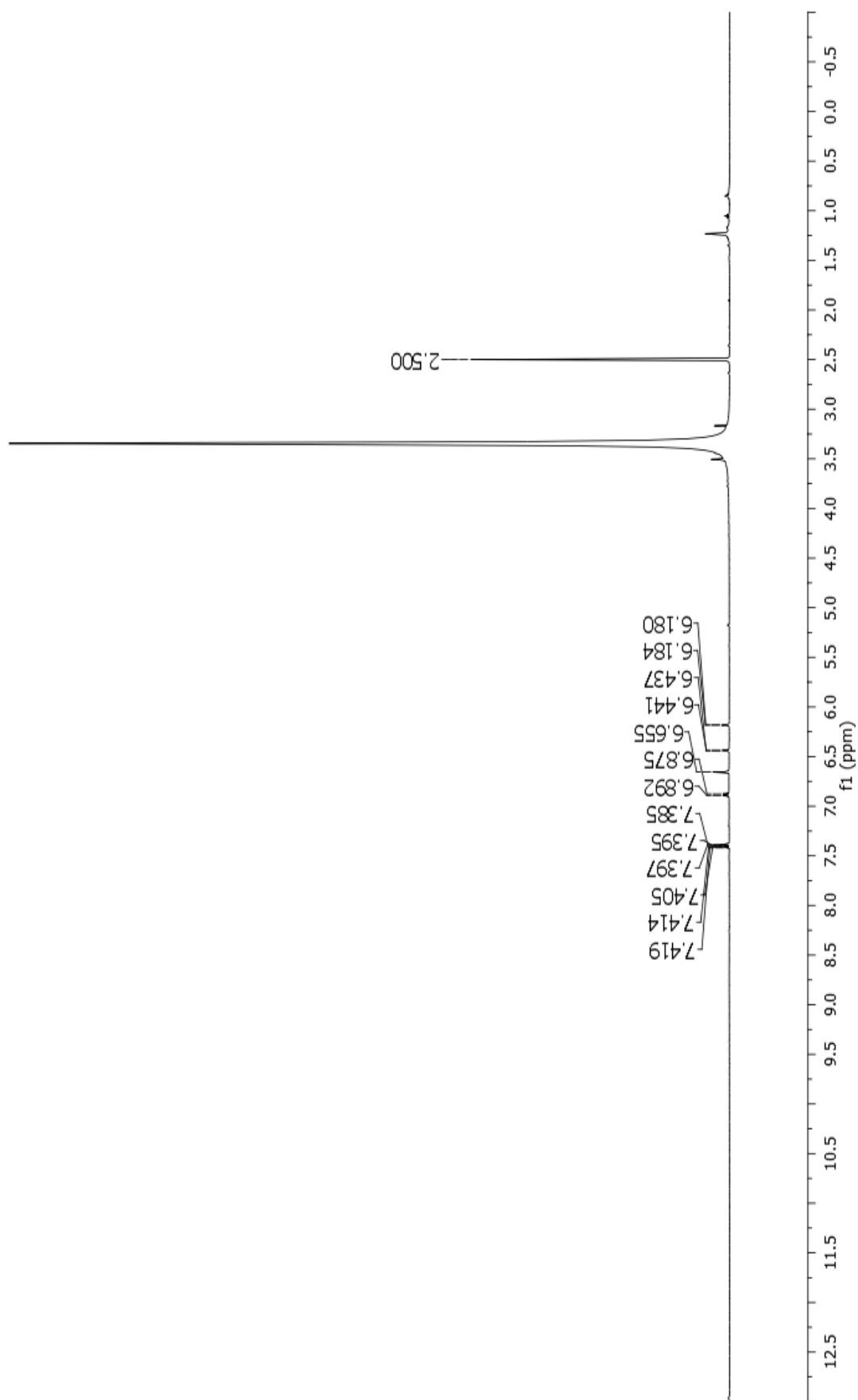


Figura 4.14. Espectro de RMN de ^1H de **Bh1** ($\text{DMSO-}d_6$; 11,7 T).

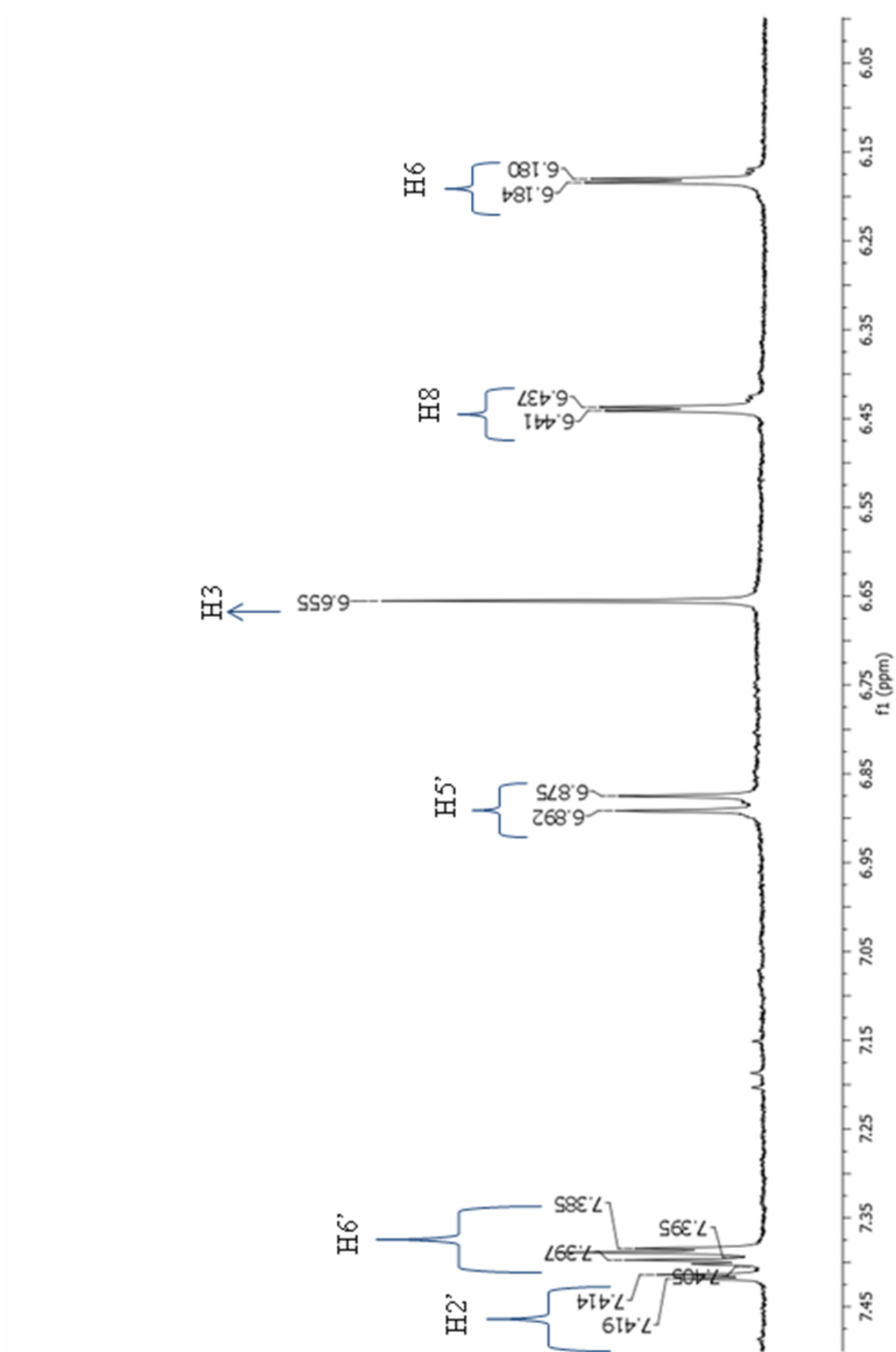
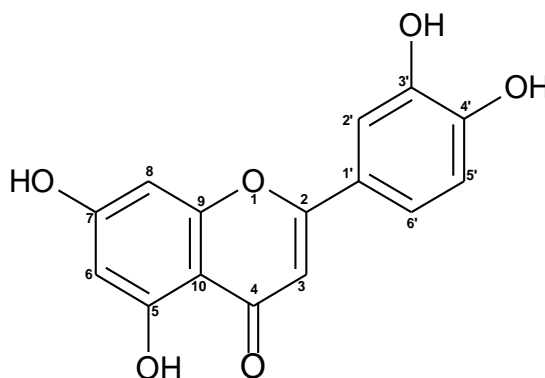


Figura 4.15. Espectro de RMN de ^1H (ampliação na região de δ 6,05 a δ 7,45) de **Bh1** ($\text{DMSO-}d_6$; 11,7 T).

Tabela 4.5. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh1**.

<i>Posições</i>	<i>^1H</i>
2	
3	6,65 (s)
4	
5	
6	6,18 (d, $J = 2,0$)
7	
8	6,43 (d, $J = 2,0$)
9	
10	
1'	
2'	7,41 (d, $J = 2,5$)
3'	
4'	
5'	6,87 (d, $J = 8,5$)
6'	7,38 (dd, $J = 2,0;$ 7,0)

Os dados encontrados foram comparados com a literatura, tornando possível a identificação de **Bh1** como sendo a luteolina (ANDERSEN & MARKHAM, 2006) (Figura 4.16).

**Figura 4.16.** Estrutura química de **Bh1**.

Elucidação estrutural de Bh2

A fração 170 (157,0 mg) foi submetida à separação cromatográfica por SPE, dando origem a 13,0 mg de uma substância isolada (170.3).

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh2** (Figura 4.17) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 301. Através da análise do espectro de segunda ordem (Figura 4.18), foram observados fragmentos em m/z 271 $[M - 2H - CO - H]^-$, em m/z 179 $[M - 122 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e em m/z 151 $[M - 150 - H]$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonoides com anel-A dihidroxilado.

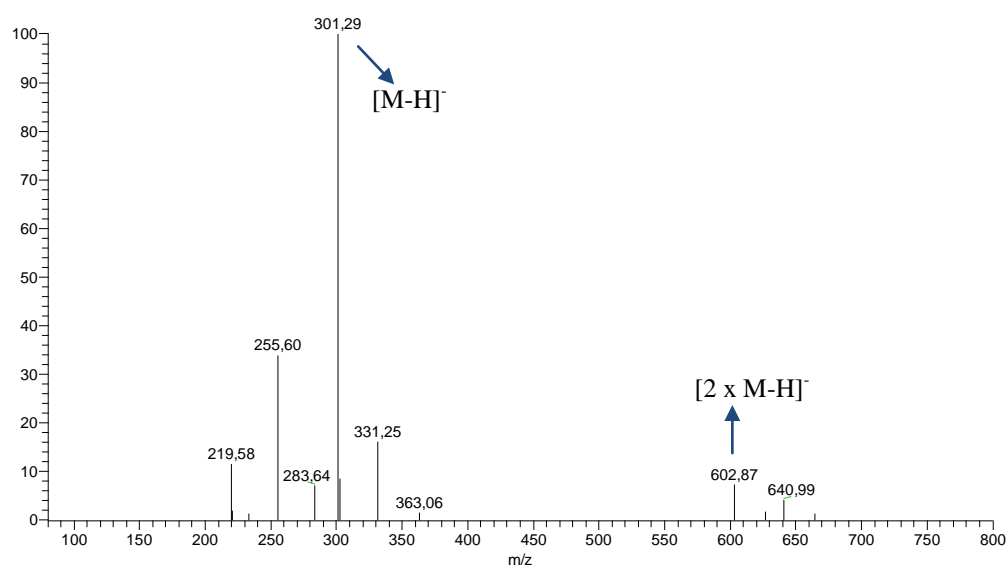


Figura 4.17. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh2**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

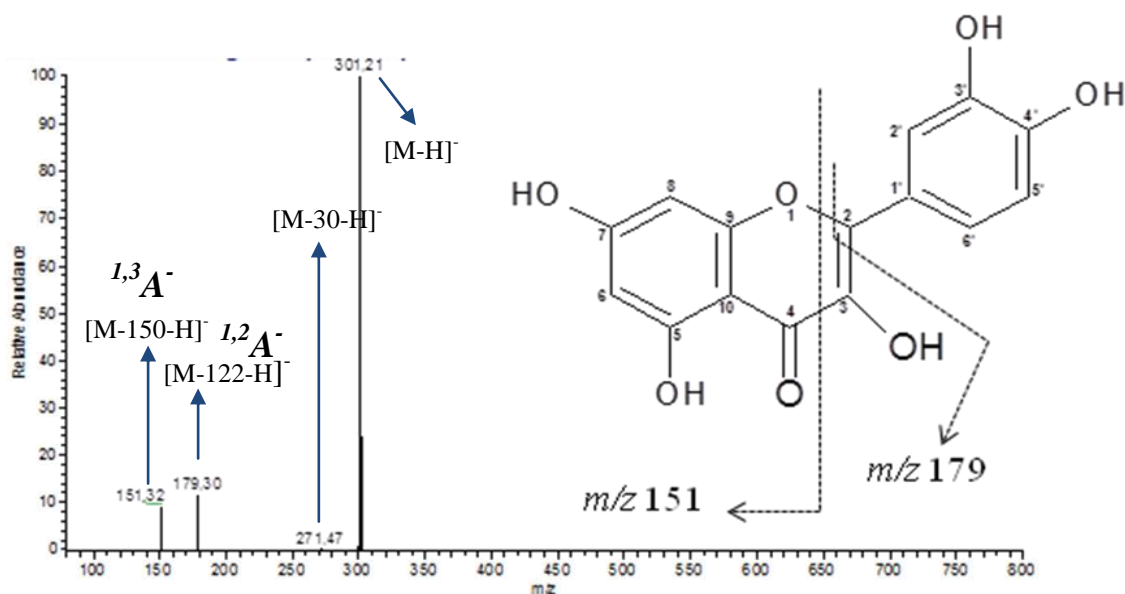


Figura 4.18. Espectro de massas de segunda ordem de **Bh2**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh2** na região do UV (Figura 4.19) foram observadas bandas em 255 (Banda II), 309 e 371 nm (Banda I), características de flavonóis com a hidroxila do C3 livre (MABRY et al., 1970). Esses dados foram coerentes com os valores encontrados na literatura para a quercetina (ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

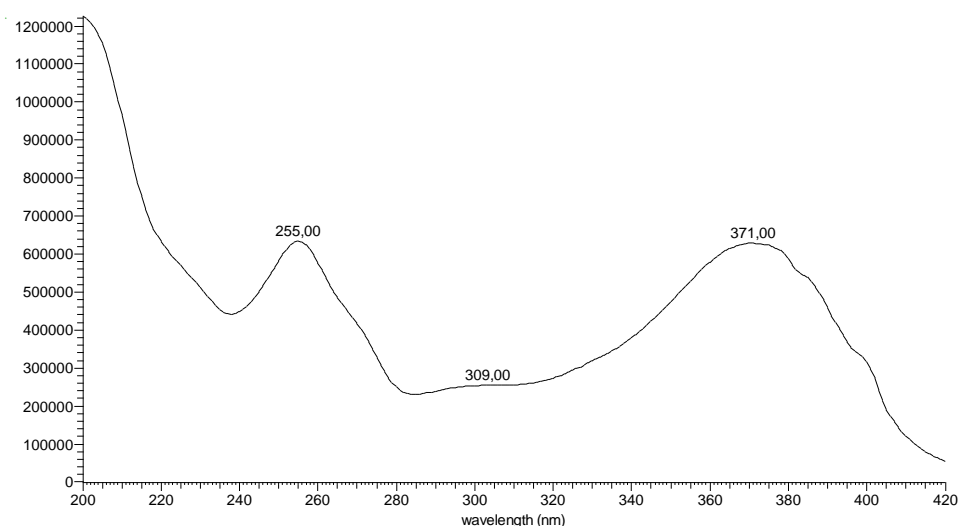


Figura 4.19. Espectro de **Bh2** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh2** (Figuras 4.20 e 4.21) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram

visualizados dois dubletos, um em δ 6,93 (H5', $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 7,78 (H2', $J = 2,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,67 (H6', $J = 8,5$ Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,23 (H6) e δ 6,44 (H8), ambos com $J = 2,0$ Hz, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta* (Tabela 4.6).

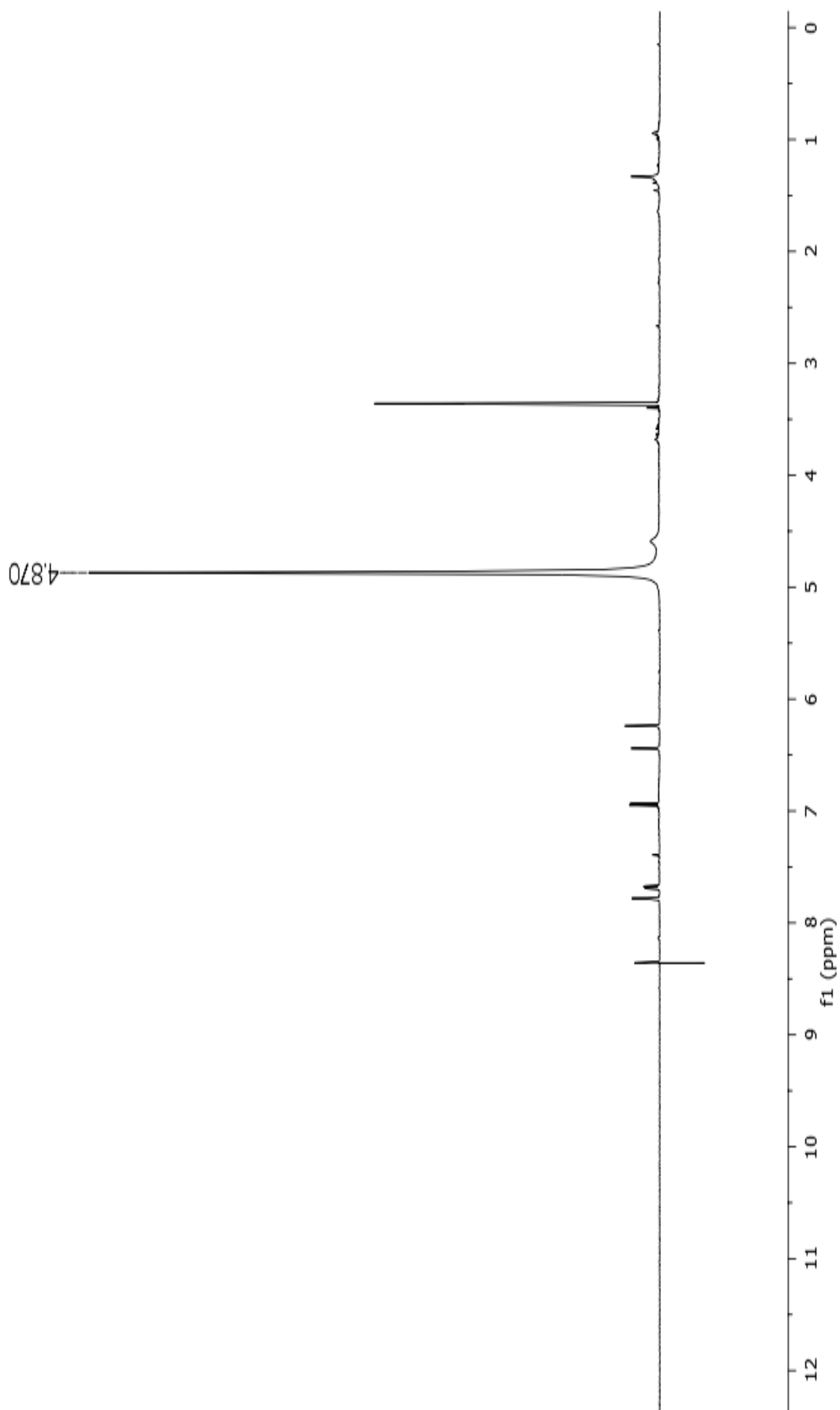


Figura 4.20. Espectro de RMN de ^1H de **Bh2** ($\text{MeOH-}d_4$; 11,7 T).

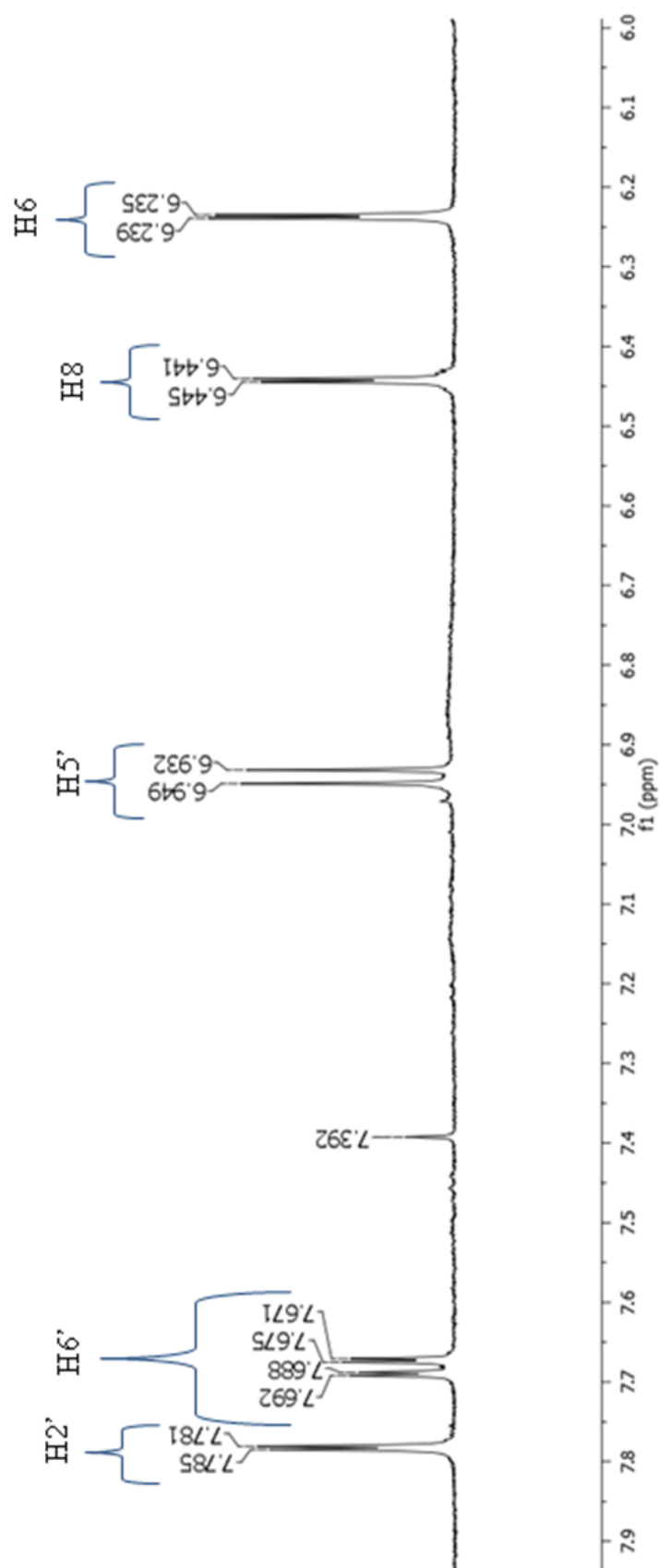
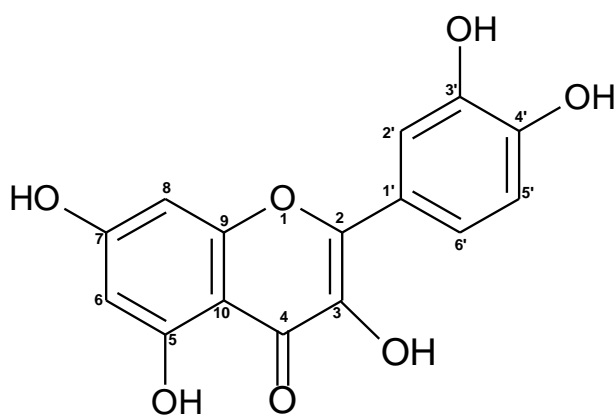


Figura 4.21. Espectro de RMN de ^1H (ampliação na região de δ 6,0 a δ 7,9) de **Bh2** ($\text{MeOH-}d_4$; 11,7 T).

Tabela 4.6. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , 11,7 T) de **Bh2**.

<i>Posições</i>	^1H
2	
3	
4	
5	
6	6,23 (d, $J = 2,0$)
7	
8	6,44 (d, $J = 2,0$)
9	
10	
1'	
2'	7,78 (d, $J = 2,5$)
3'	
4'	
5'	6,93 (d, $J = 8,5$)
6'	7,67 (dd, $J = 2,0;$ 8,5)

Os dados encontrados foram comparados com a literatura, tornando possível a identificação de **Bh2** como sendo a quercetina (ANDERSEN & MARKHAM, 2006) (Figura 4.22).

**Figura 4.22.** Estrutura química de **Bh2**.

Elucidação estrutural de Bh3

A fração 101 (340,9 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 21,9 mg da substância **Bh3** (101.5).

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh3** (Figura 4.23) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 463. Através da análise do espectro de segunda, terceira e quarta ordens (Figura 4.24), foram observados fragmentos em m/z 316 $[M - 147 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de deoxihexose, O-substituída na aglicona do flavonoide; m/z 271 $[M - 192 - H]^-$ sugerindo a presença do íon produto fragmento $[Y_0 - 2H - COOH]^-$ que indica a posição da ligação do açúcar na aglicona, já que é diagnóstico de flavonóis 3-O-monoglicosídeos (ABLAJAN et al., 2006) e em m/z 179 $[M - 284 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma miricetina-O-deoxihexosídeo.

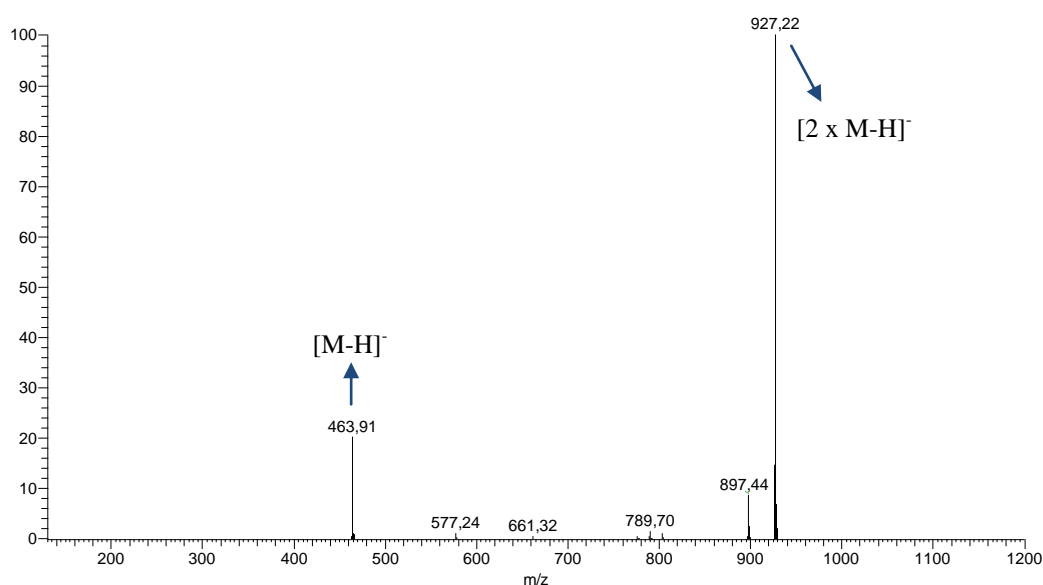


Figura 4.23. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh3**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

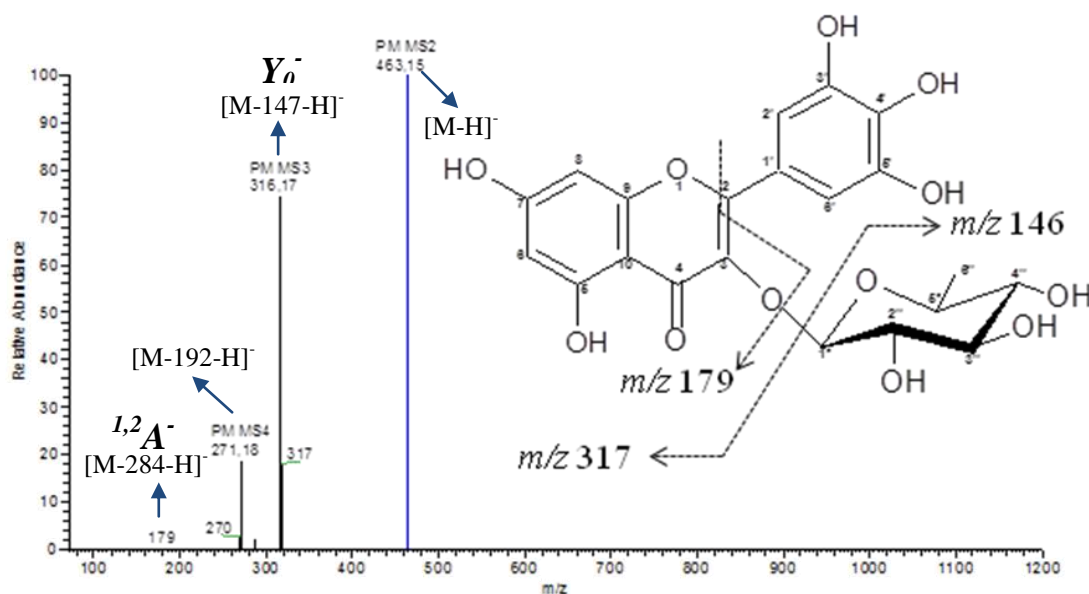


Figura 4.24. Espectro de massas de segunda, terceira e quarta ordens de **Bh3**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh3** na região do UV (Figura 4.25) foram observadas bandas em 256 nm (Banda II) e 352 nm (Banda I), características de flavonóis com a hidroxila do C3 substituída (MABRY et al., 1970; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

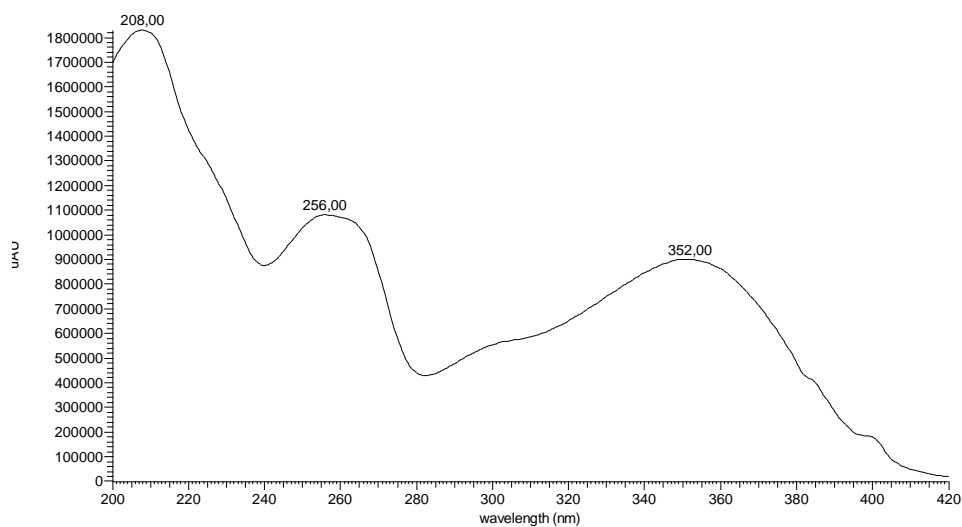


Figura 4.25. Espectro de **Bh3** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh3** (Figura 4.26) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foi visualizado um singlete em δ 6,88, correspondente aos hidrogênios H2' e H6'. Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,19 (H6) e δ 6,36 (H8), ambos com $J = 2,0$ Hz, o que evidencia dois

hidrogênios com acoplamento em *meta*. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,19 ($J = 1,5$), que corresponde ao hidrogênio anomérico (H1'').

Os dados fornecidos pelos espectros gHMQC e gHMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh3** (Figura 4.27, 4.28 e 4.29, Tabela 4.7). Através da análise do espectro gHMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,19 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,68 (C8), δ 161,39 (C5), δ 164,41 (C7) e δ 104,10 (C10). Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,37 na posição 8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,82 (C6), δ 164,41 (C7), δ 156,53 (C9) e em δ 104,10 (C10).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,19 (H1'') e o carbono em δ 134,37 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

O experimento TOCSY 1D (Figura 4.30), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado, o sinal em δ 5,19, apresentou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 3,97 (H2''); δ 3,53 (H3''); δ 3,15 (H4''); δ 3,33 (H5''); δ 0,83 (H6'') indicando tratar-se de uma rhamnose.

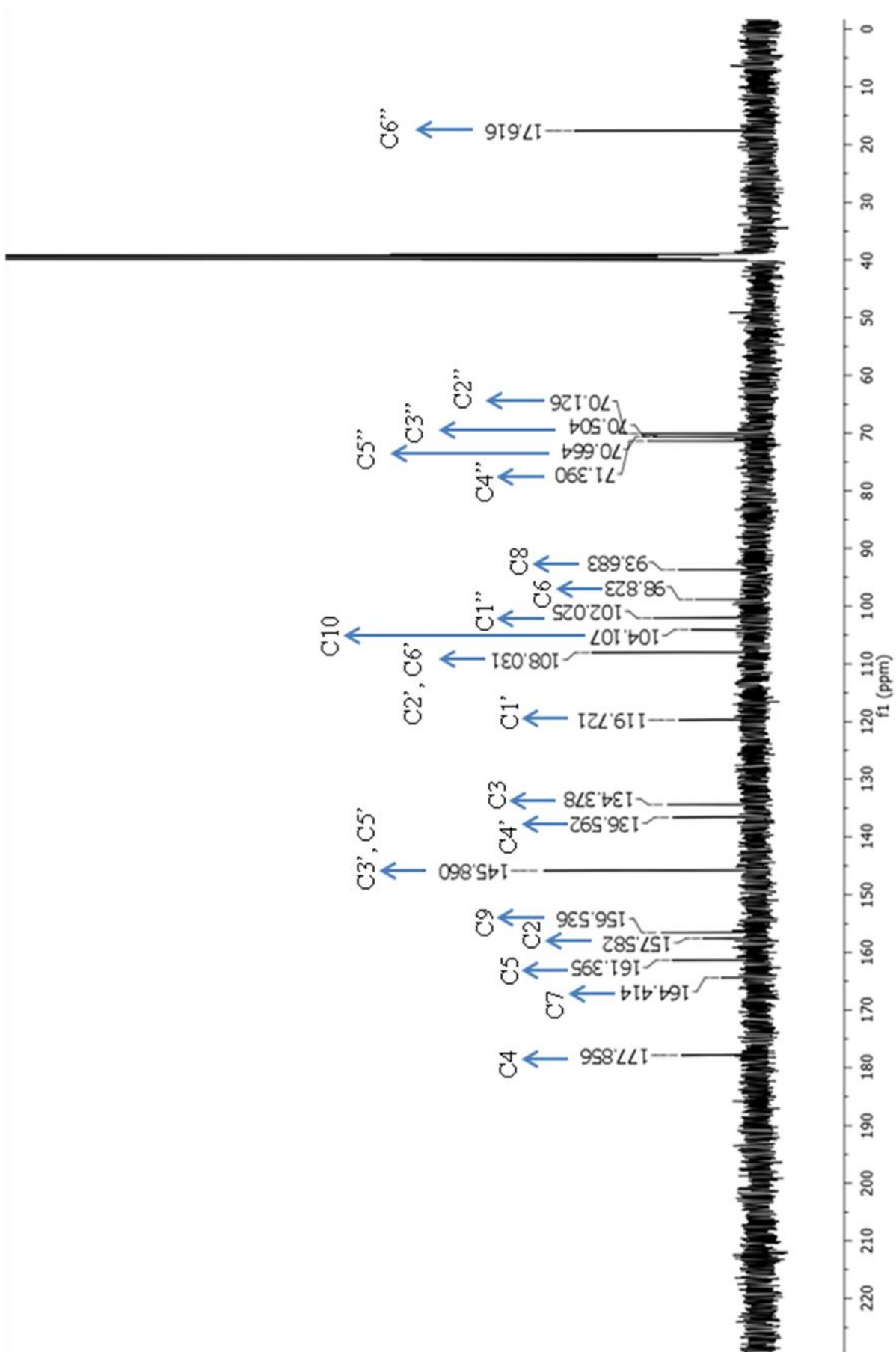


Figura 4.27. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh3** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

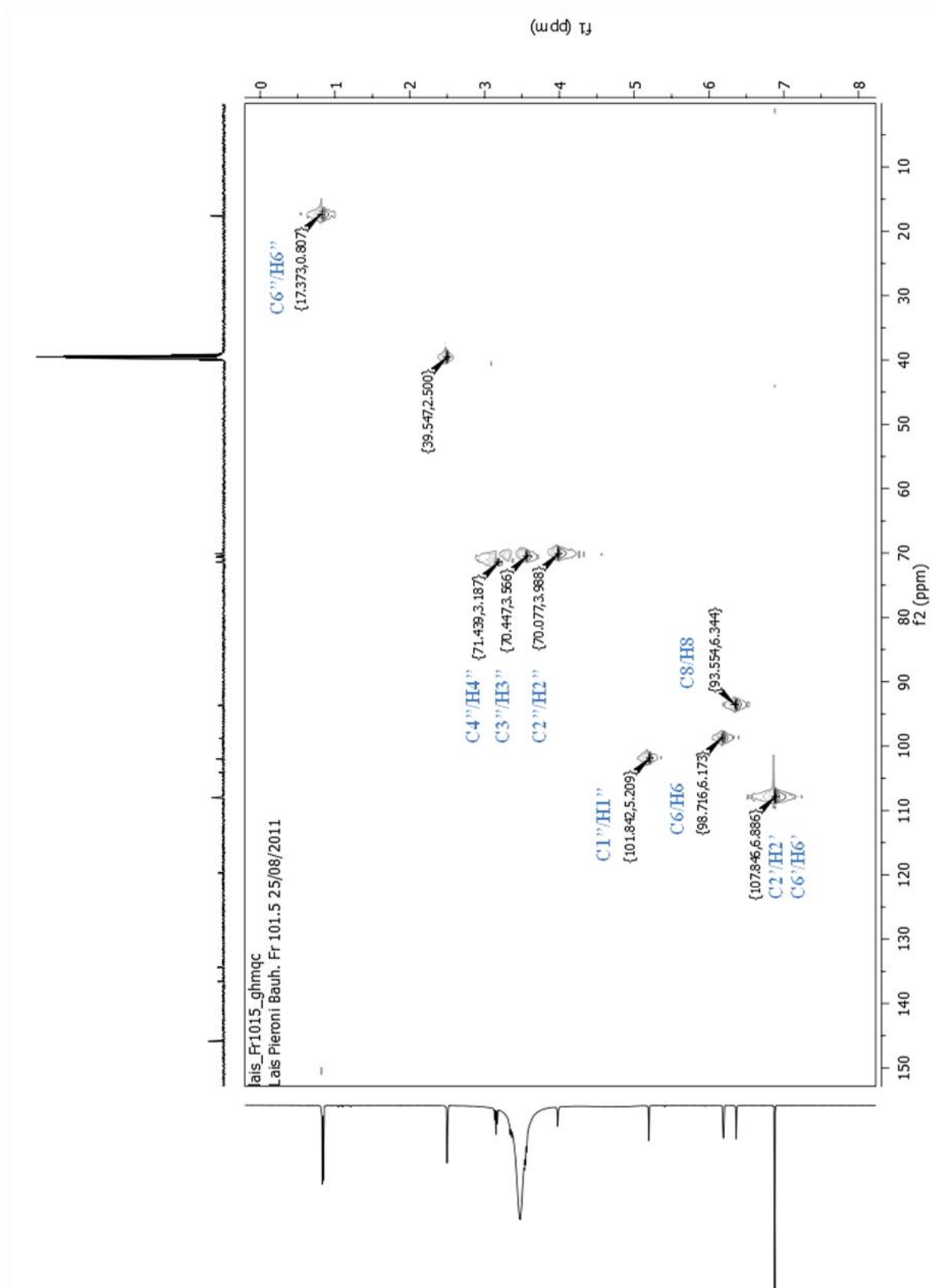


Figura 4.28. Experimento gHMBC de **Bh3** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

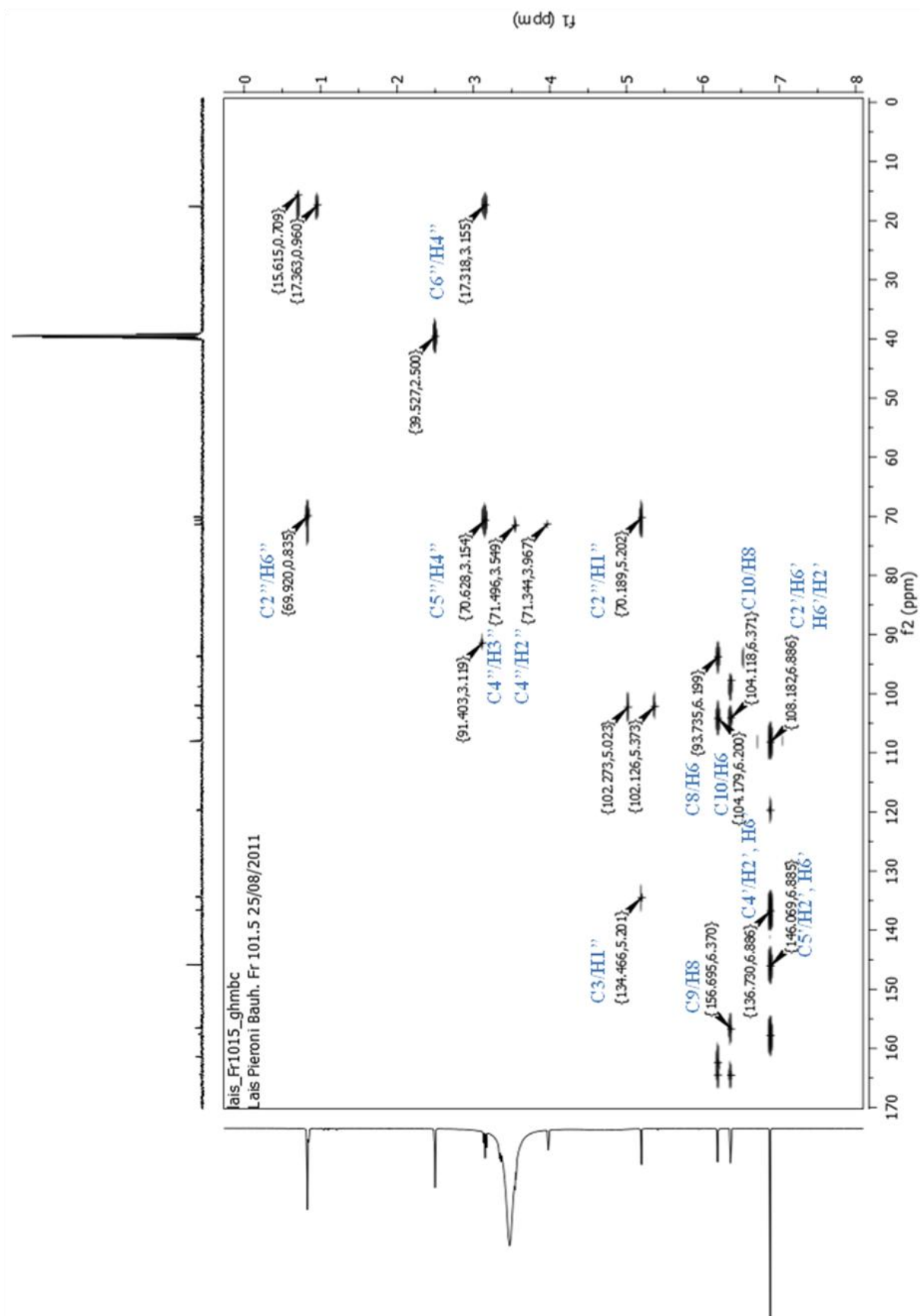


Figura 4.29. Experimento gHMBC de **Bh3** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

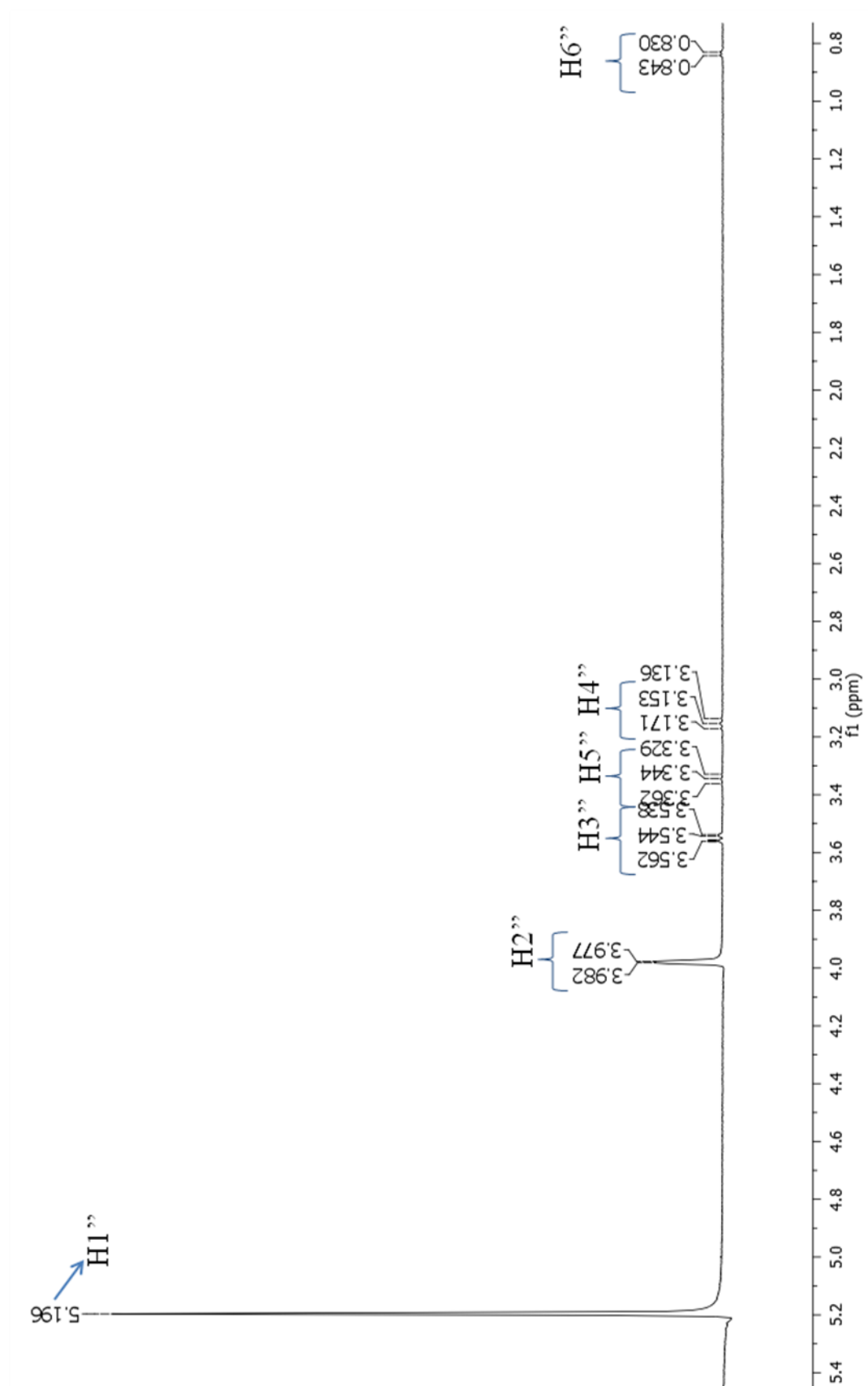


Figura 4.30. Experimento TOCSY 1D de **Bh3** (DMSO-d₆; 11,7 T).

Tabela 4.7. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh3**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
2		157,58
3		134,37
4		177,85
5		161,39
6	6,19 (d, $J = 2,0$)	98,82
7		164,41
8	6,36 (d, $J = 2,0$)	93,68
9		156,53
10		104,10
1'		119,72
2'	6,88 (s)	108,03
3'		145,86
4'		136,59
5'		145,86
6'	6,88 (s)	108,03
Rhamnose		
1''	5,19 (d, $J = 1,5$)	102,02
2''	3,97 (dd, $J = 1,5; 3,5$)	70,12
3''	3,53 (dd, $J = 3,5; 9,0$)	70,50
4''	3,15 (t, $J = 8,5$)	71,39
5''	3,33 (dd, $J = 6,5; 9,0$)	70,66
6''	0,83 (d, $J = 6,0$)	17,61

Esses dados, comparados com a literatura, permitiram a identificação de **Bh3** como sendo miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (MABRY et al., 1970; HARBORNE, 1996; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). (Figura 4.31).

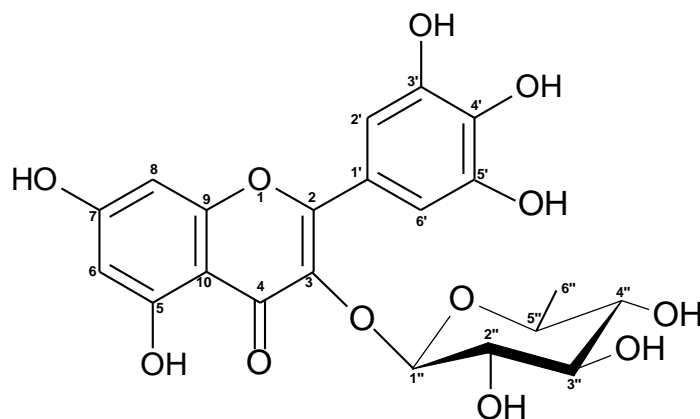


Figura 4.31. Estrutura química de **Bh3**.

Elucidação estrutural de **Bh4**

Os espectros de UV, MS e RMN das substâncias **Bh4** e **Bh8** foram idênticos. Portanto, a discussão desses dados será feita com a denominação de **Bh4**. A fração 101 (340,9 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 18,9 mg da substância **Bh4** (101.6). A fração 114 (202,7 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 5,5 mg da substância **Bh8** (114.6). No total, obtiveram-se 24,4 mg de **Bh4**.

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh4** (Figura 4.32) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 463. Através da análise do espectro de segunda e terceira ordens (Figura 4.33), foram observados fragmentos em m/z 302 $[M - 162 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de hexosídeo. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-*O*-hexosídeo.

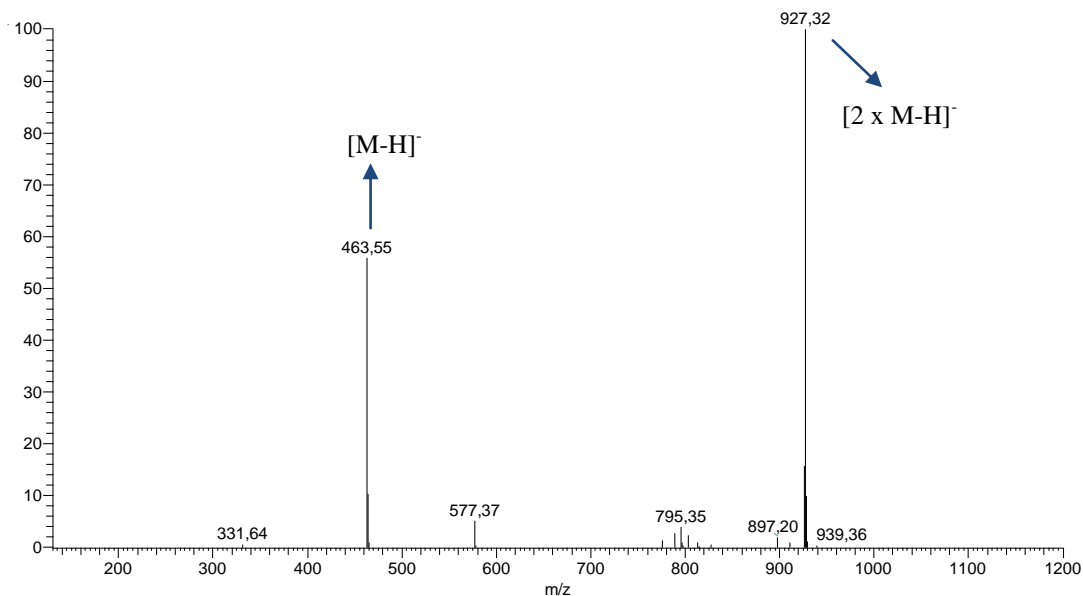


Figura 4.32. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh4**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

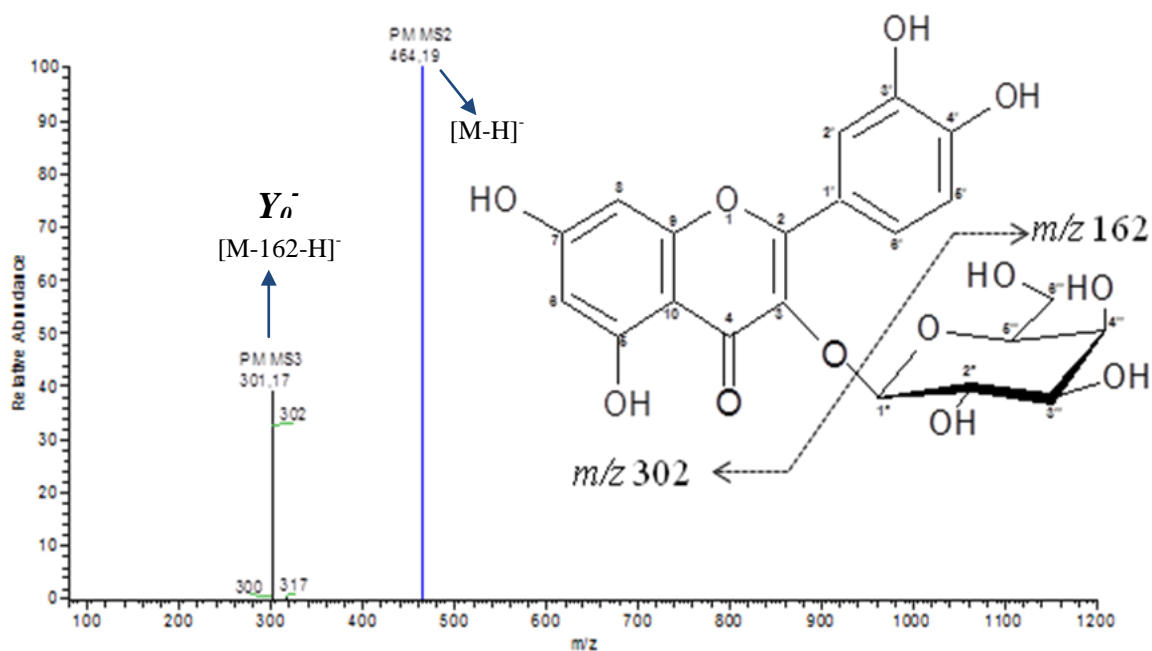


Figura 4.33. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de **Bh4**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh4** na região do UV (Figura 4.34) foram observadas bandas em 256 nm (Banda II) e 356 nm (Banda I), características de flavonóis com a hidroxila do C3 substituída (MABRY et al., 1970; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

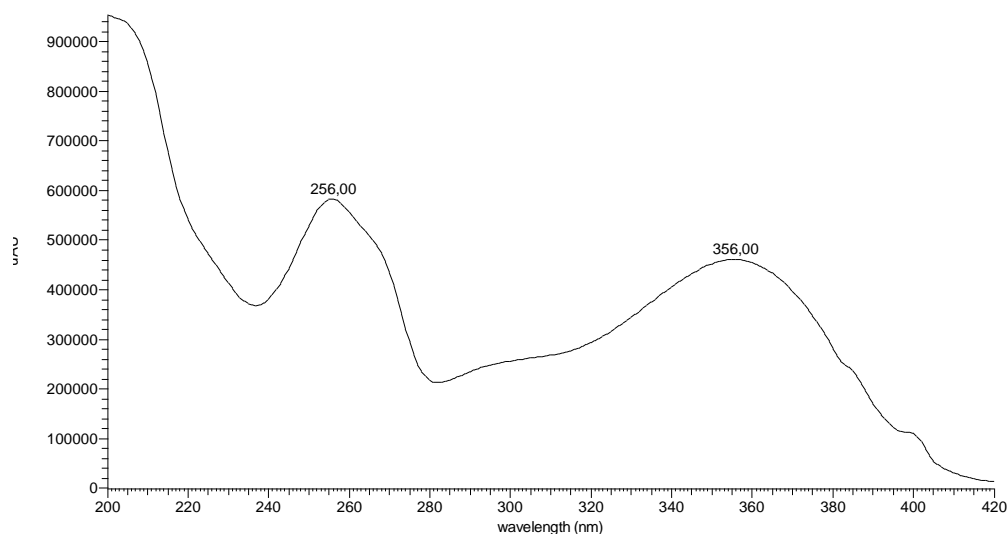


Figura 4.34. Espectro de **Bh4** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh4** (Figura 4.35) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram visualizados dois dubletos, um em δ 6,80 (H5', $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 7,53 (H2', $J = 2,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,64 (H6', $J = 2,5$ e 8,5 Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,19 (H6) e δ 6,39 (H8), com $J = 2,0$ e 1,5 Hz, respectivamente, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta*. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,35 ($J = 7,5$), que corresponde ao hidrogênio anomérico (H1'').

Os dados fornecidos pelos espectros *g*HMQC e *g*HMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh4** (Figura 4.36, 4.37 e 4.38; Tabela 4.8). Através da análise do espectro *g*HMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,19 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,59 (C8), δ 161,23 (C5) e δ 103,88 (C10). Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,39 na posição 8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,74 (C6), δ 164,33 (C7) e δ 156,24 (C9).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,35 (H1'') e o carbono em δ 133,50 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

O experimento TOCSY 1D (Figura 4.39), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado, o sinal em δ 5,35, apresentou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 3,55 (H2'' e H3''); δ 3,65 (H4''); δ 3,36 (H5'' e H6'') indicando tratar-se de uma galactose.

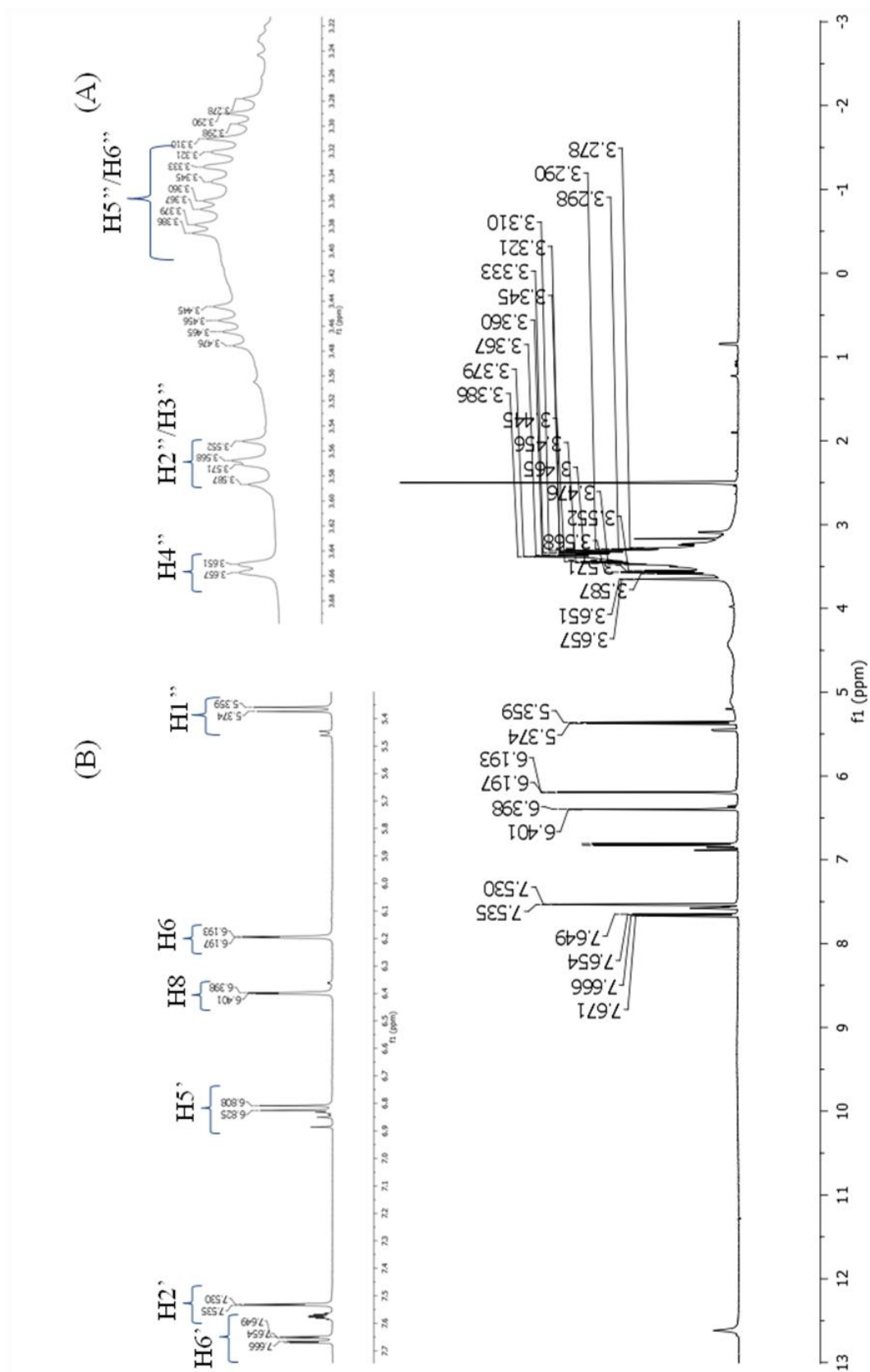


Figura 4.35. Espectro de RMN de ^1H de **Bh4** (DMSO-d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 3,22 a δ 3,68; (B) Ampliação na região de δ 5,4 a δ 7,7.

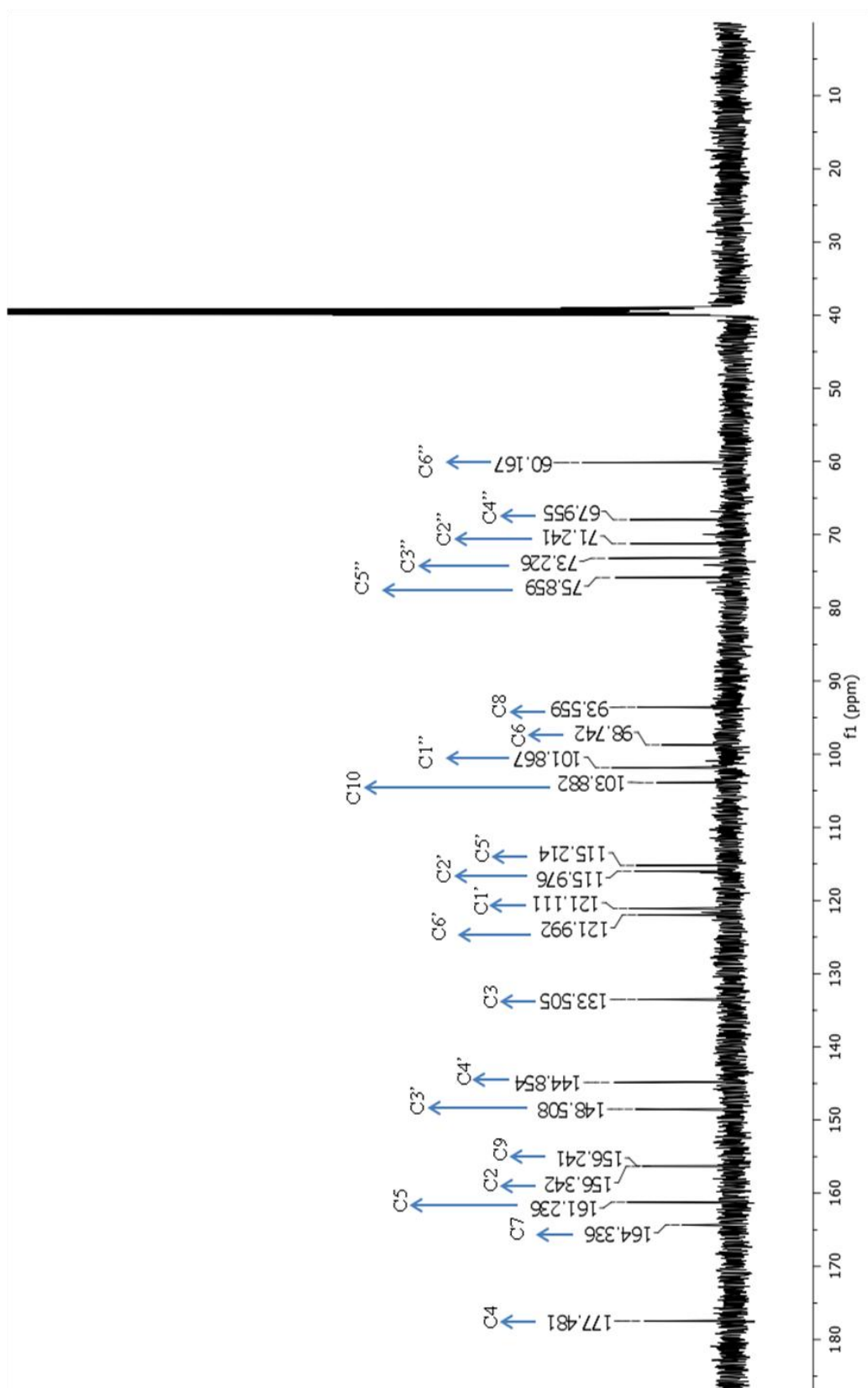


Figura 4.36. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh4** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

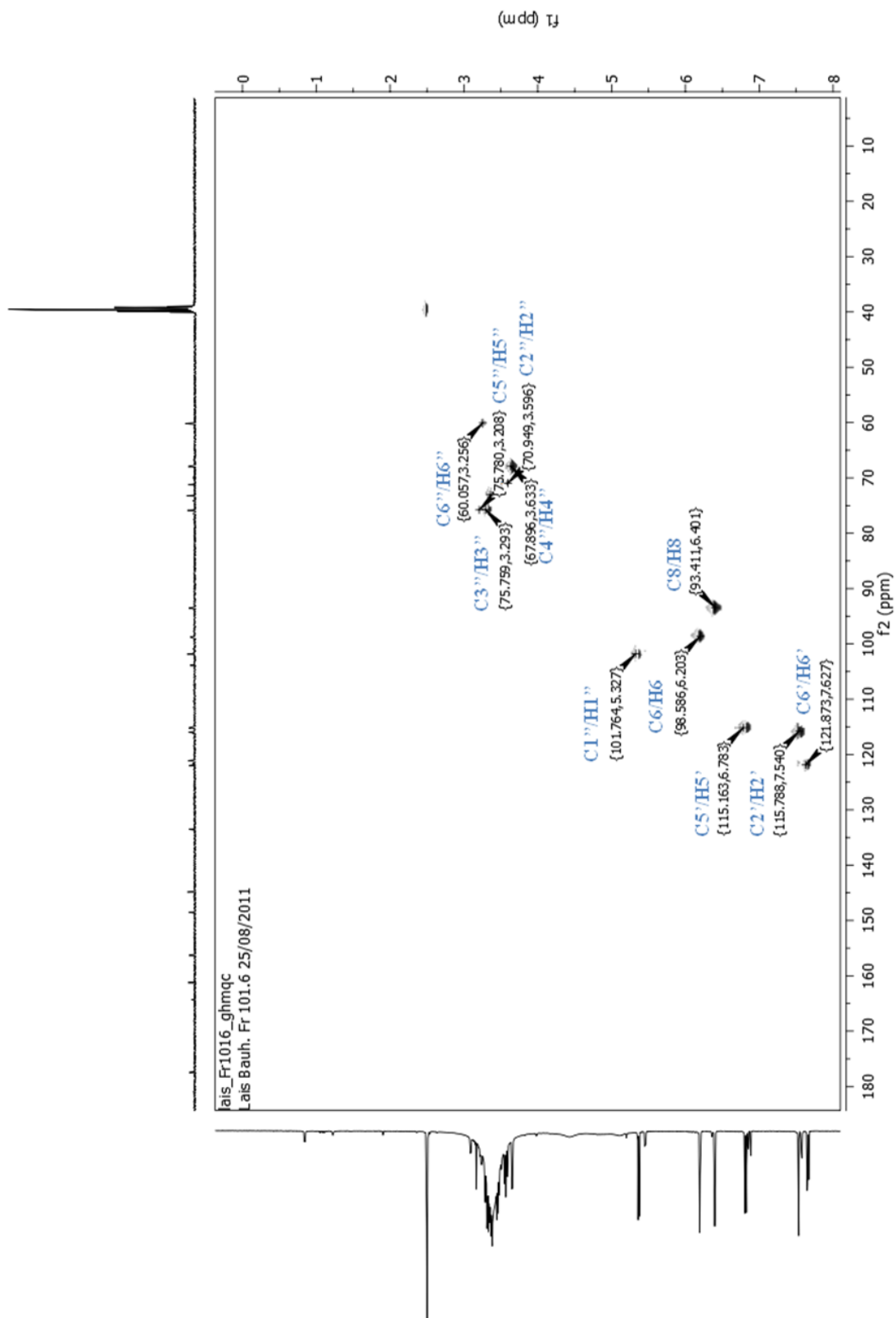


Figura 4.37. Experimento gHMQC de **Bh4** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

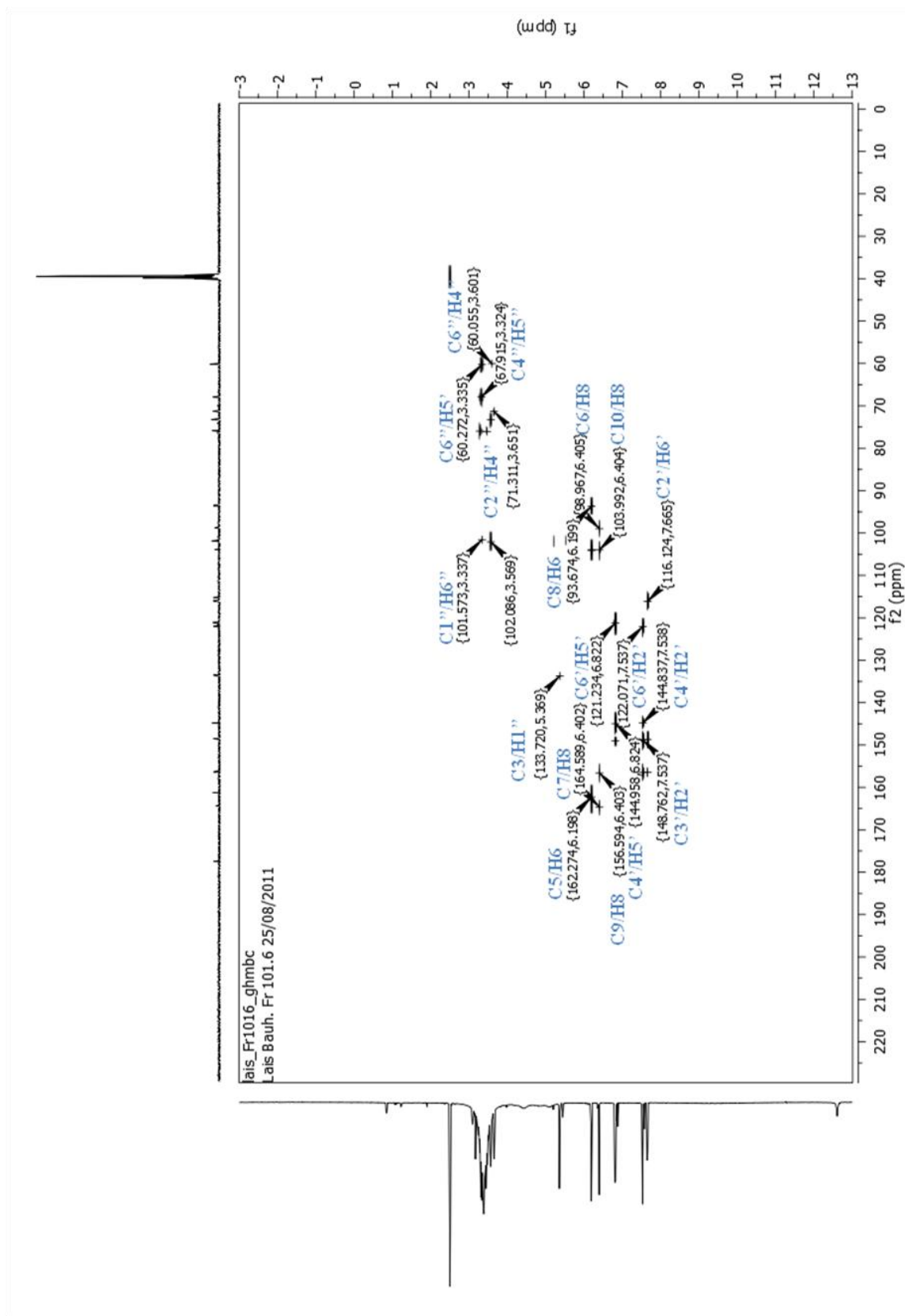


Figura 4.38. Experimento gHMBC de **Bh4** (DMSO-d₆; 11,7 T).

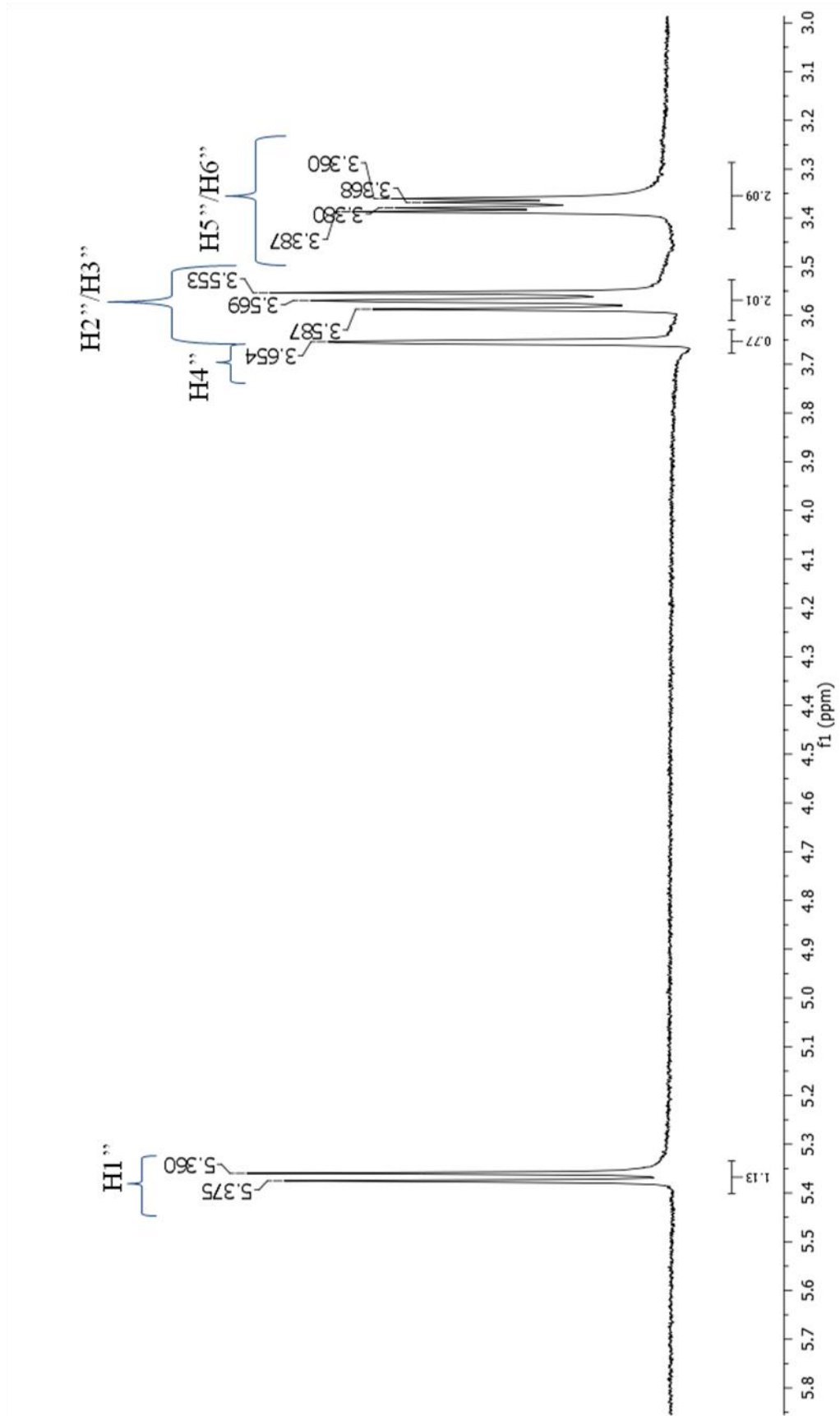


Figura 4.39. Experimento TOCSY 1D de **Bh4** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

Tabela 4.8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh4**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
2		156,34
3		133,50
4		177,48
5		161,23
6	6,19 (d, $J = 2,0$)	98,74
7		164,33
8	6,39 (d, $J = 1,5$)	93,59
9		156,24
10		103,88
1'		121,11
2'	7,53 (d, $J = 2,5$)	115,97
3'		148,50
4'		144,85
5'	6,80 (d, $J = 8,5$)	115,21
6'	7,64 (dd, $J = 2,5; 8,5$)	121,99
Galactose		
1''	5,35 (d, $J = 7,5$)	101,86
2''	3,55 (dd, $J = 8,0; 9,5$)	71,24
3''	3,55 (dd, $J = 8,0; 9,5$)	73,22
4''	3,65 (d, $J = 3,0$)	67,95
5''	3,36 (dd, 3,5 e 4,0; 10,0)	75,85
6''	3,36 (dd, 3,5 e 4,0; 10,0)	60,16

Esses dados, comparados com a literatura, permitiram a identificação de **Bh4** como sendo quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (MABRY et al., 1970; HARBORNE, 1994; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). (Figura 4.40).

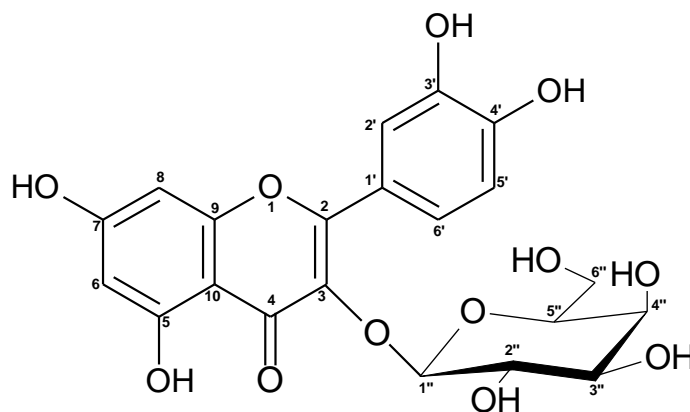


Figura 4.40. Estrutura química de **Bh4**.

Elucidación estructural de **Bh5**

Os espectros de UV, MS e RMN das substâncias **Bh5** e **Bh10** foram idênticos. Portanto, a discussão desses dados será feita com a denominação de **Bh5**. A fração 101 (340,9 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 8,0 mg da substância **Bh5** (101.8). A fração 114 (202,7 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 38,4 mg da substância **Bh10** (114.9). No total, obtiveram-se 46,4 mg de **Bh5**.

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh5** (Figura 4.41) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 433. Através da análise do espectro de segunda e terceira ordens (Figura 4.42), foram observados fragmentos em m/z 302 $[M - 132 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de pentosídeo, O-substituída na aglicona do flavonoide; em m/z 179 $[M - 254 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e em m/z 151 $[M - 282 - H]^-$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-O-pentosídeo.

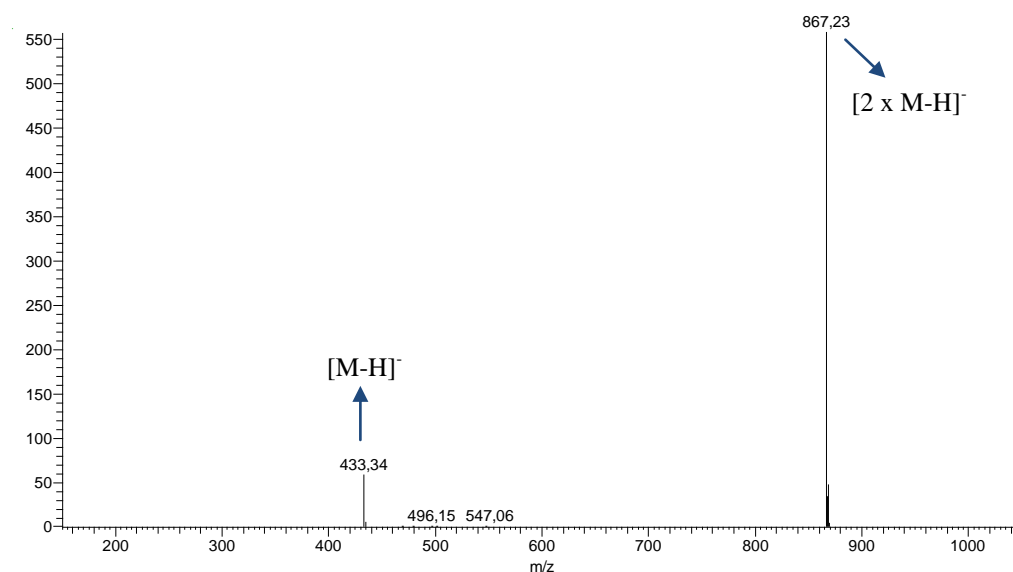


Figura 4.41. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh5**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

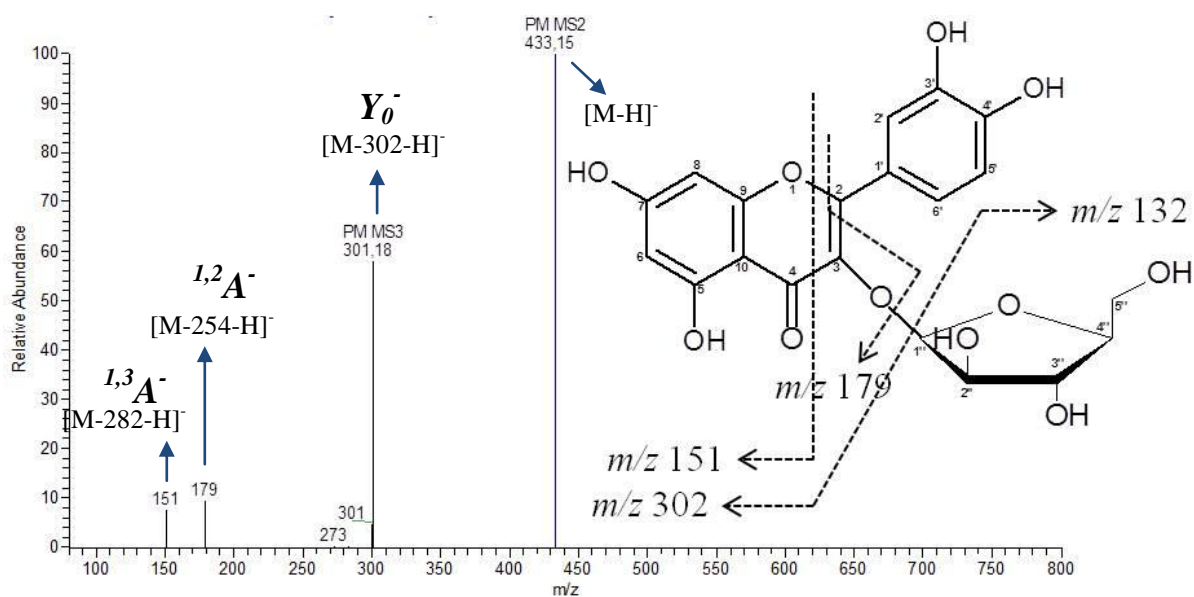


Figura 4.42. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de **Bh5**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh5** na região do UV (Figura 4.43) foram observadas bandas em 256 nm (Banda II) e 353 nm (Banda I), características de flavonóis com a hidroxila do C3 substituída (MABRY et al., 1970; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

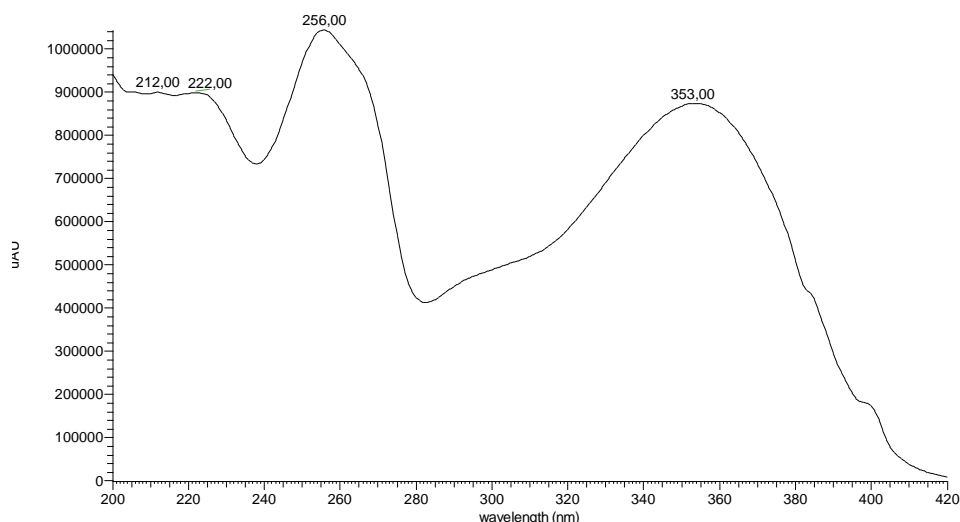


Figura 4.43. Espectro de **Bh5** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh5** (Figura 4.44) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram visualizados dois dubletos, um em δ 6,84 ($\text{H5}'$, $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 7,48 ($\text{H2}'$, $J = 2,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,54 ($\text{H6}'$, $J = 2,5$ e 8,0 Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,19 (H6) e δ 6,40 (H8), com $J = 2,0$ e 1,5 Hz, respectivamente, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta*. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,58 ($J = 1,0$ Hz), que corresponde ao hidrogênio anomérico ($\text{H1}''$).

Os dados fornecidos pelos espectros *g*HMQC e *g*HMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh5** (Figura 4.45, 4.46 e 4.47; Tabela 4.9). Através da análise do espectro *g*HMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,19 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,60 (C8), δ 161,23 (C5), δ 164,43 (C7) e δ 103,91 (C10). Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,40 na posição 8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,74 (C6), δ 164,43 (C7), δ 156,38 (C9) e δ 103,91 (C10).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,58 (H1'') e o carbono em δ 133,38 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

O experimento TOCSY 1D (Figura 4.48), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado, o sinal em δ 5,58, apresentou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 4,15 (H2''); δ 3,71 (H3''); δ 3,55 (H4'') e δ 3,27 (H5''), indicando tratar-se de uma arabinose.

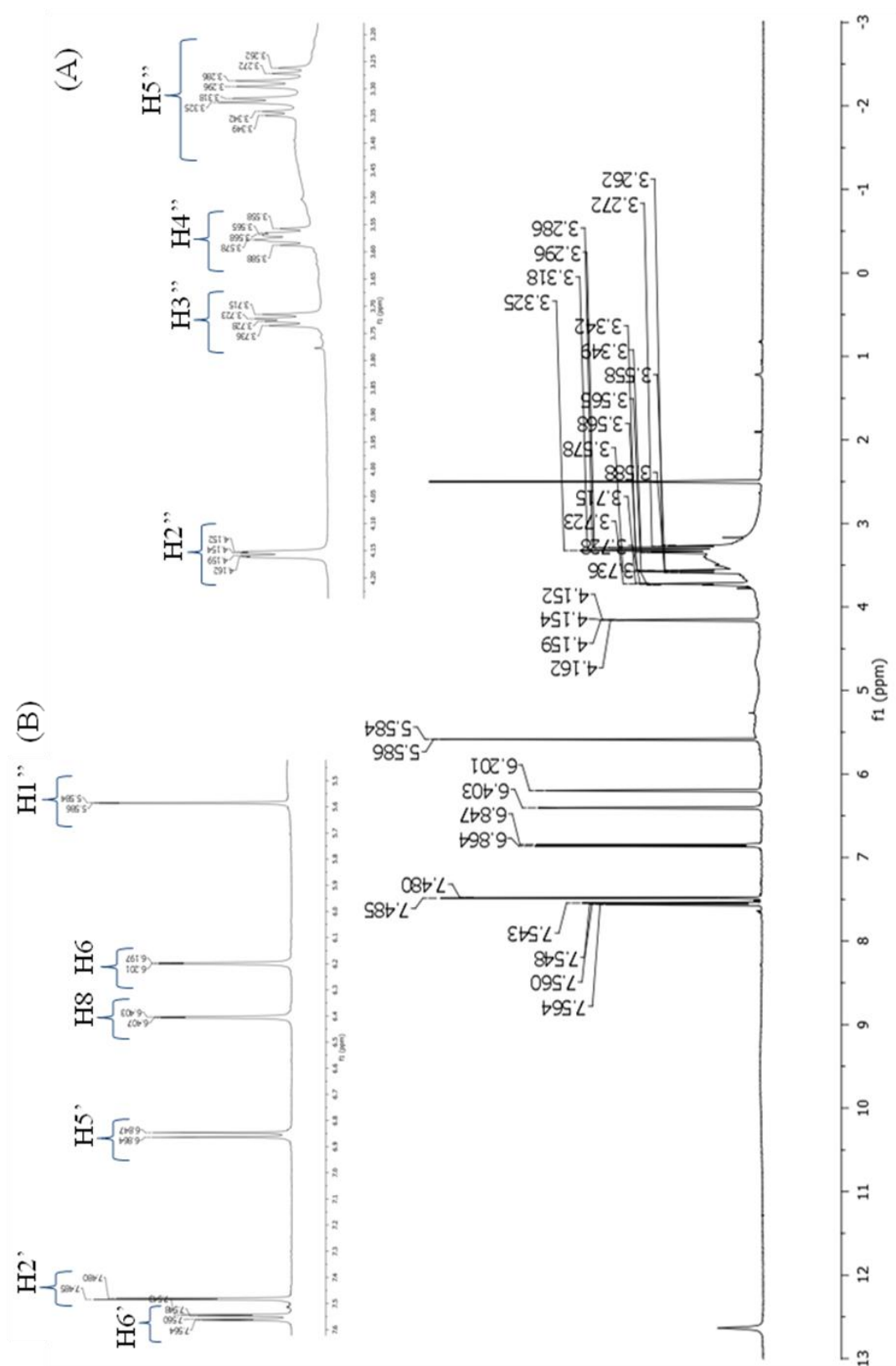


Figura 4.44. Espectro de RMN de ^1H de **Bh5** (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 3,20 a δ 4,20; (B) Ampliação na região de δ 5,5 a δ 7,6.

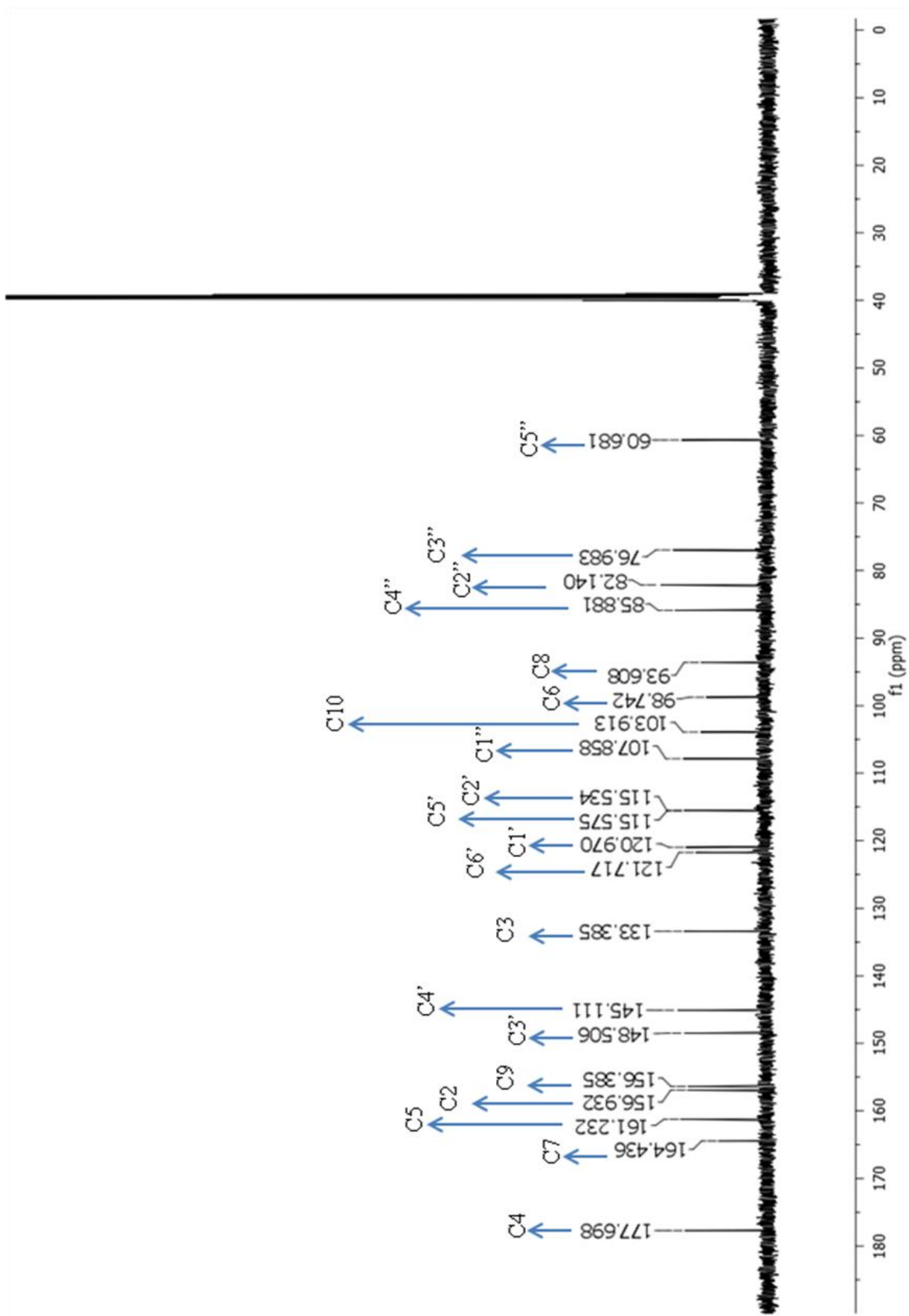


Figura 4.45. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh5** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

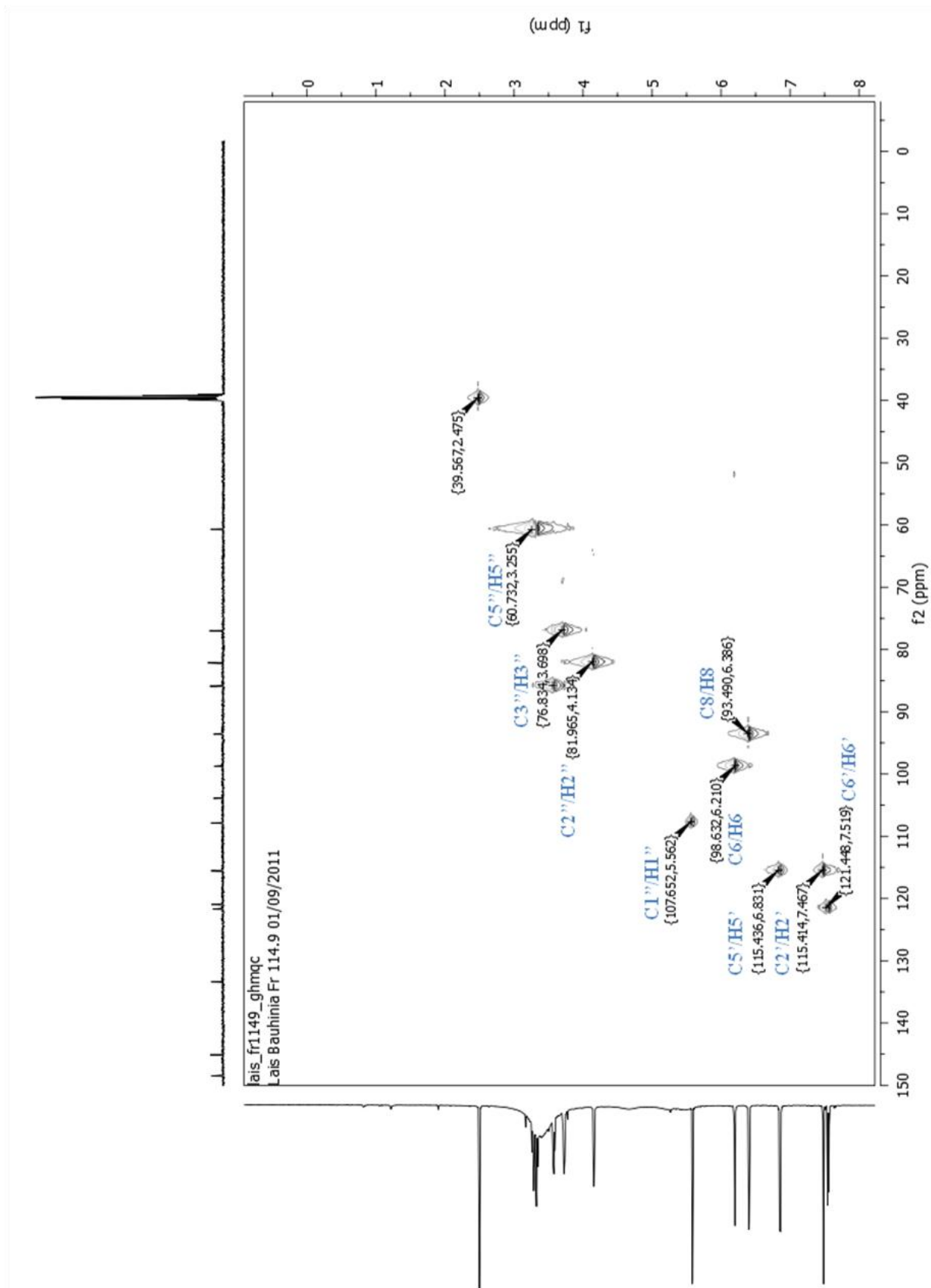


Figura 4.46.. Experimento gHMQC de **Bh5** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

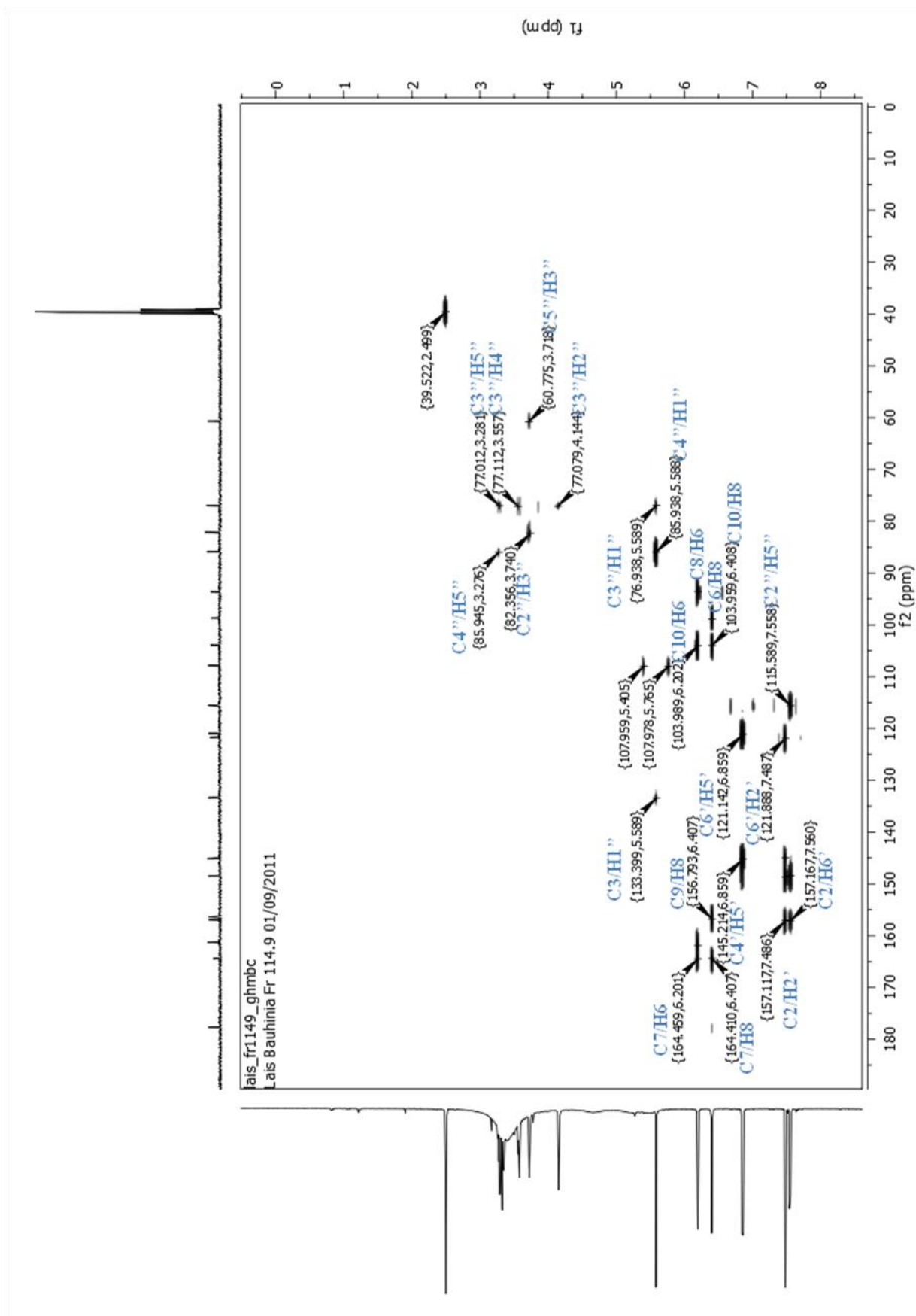


Figura 4.47. Experimento gHMBC de Bb5 (DMSO-d₆; 11,7 T).

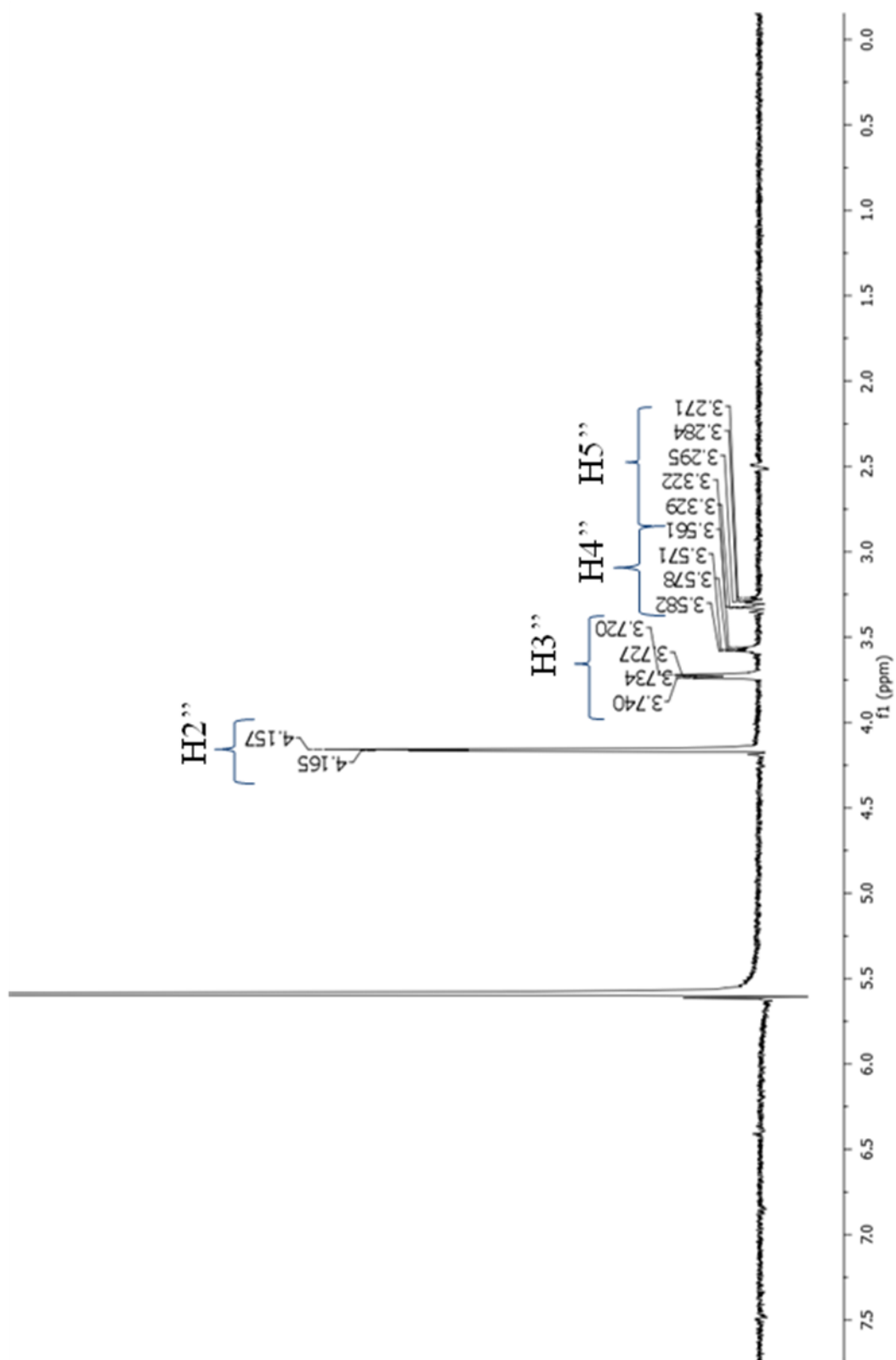


Figura 4.48. Experimento TOCSY 1D de **Bh5** (DMSO-d₆; 11,7 T).

Tabela 4.9. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh5**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
2		156,93
3		133,38
4		177,69
5		161,23
6	6,19 (d, $J = 2,0$)	98,74
7		164,43
8	6,40 (d, $J = 2,0$)	93,60
9		156,38
10		103,91
1'		120,97
2'	7,48 (d, $J = 2,5$)	115,53
3'		148,50
4'		145,11
5'	6,84 (d, $J = 8,5$)	115,57
6'	7,54 (dd, $J = 2,5; 8,0$)	121,71
Arabinose		
1''	5,58 (d, $J = 7,5$)	107,85
2''	4,15 (dd, $J = 1,0; 4,0$)	82,14
3''	3,71 (dd, $J = 4,0; 6,5$)	76,98
4''	3,55 (dd, $J = 3,5; 10,5$)	85,88
5''	3,26 (m)	60,68

Esses dados, comparados com a literatura, permitiram a identificação de **Bh5** como sendo quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (MABRY et al., 1970; HARBORNE, 1994; ANDERSEN & MARKHAM, 2006) (Figura 4.49). A figura 4.50 esquematiza a proposta de fragmentação de **Bh5** observada no espectro de MS, de acordo com a proposta de nomenclatura de Ma et al., 1997.

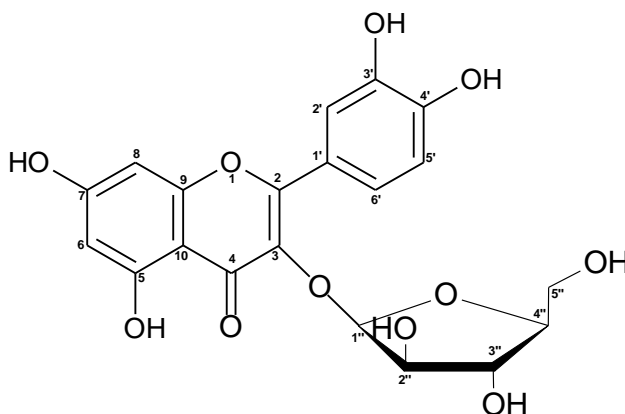


Figura 4.49. Estrutura química de **Bh5**.

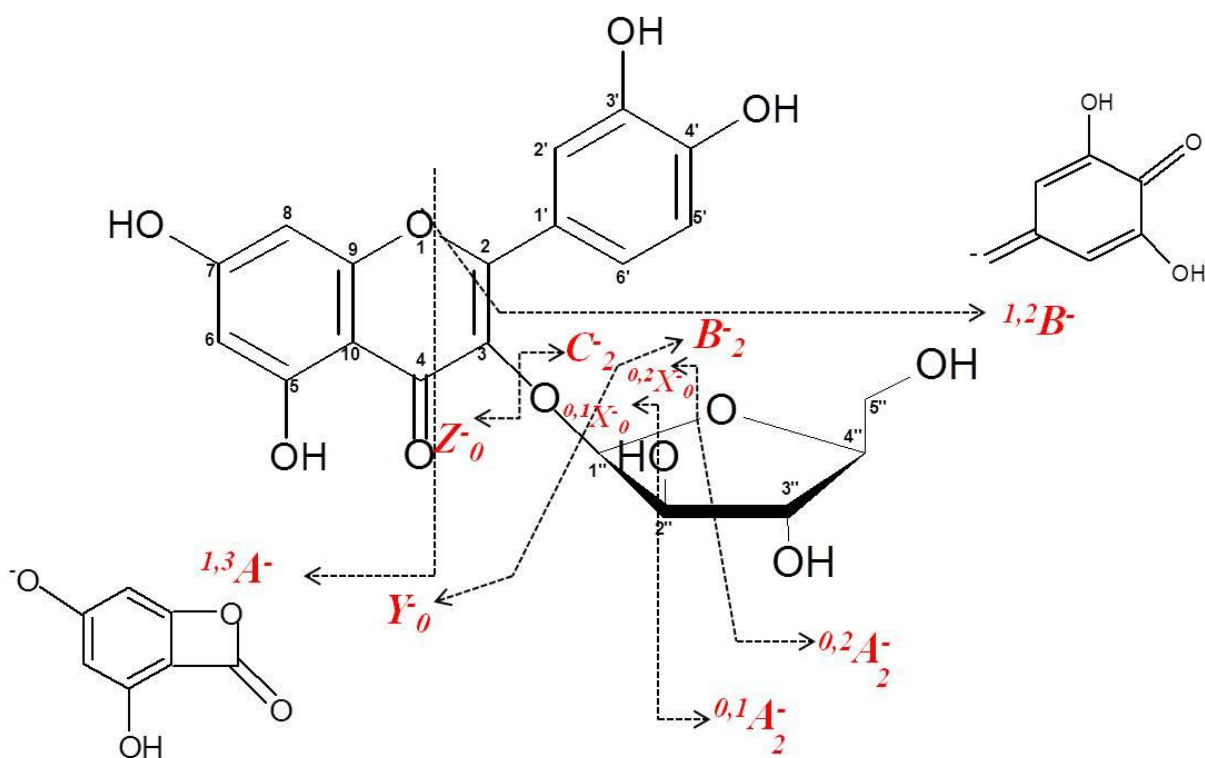


Figura 4.50. Proposta de fragmentação baseado na nomenclatura de Ma et al. (1997) para quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo.

Elucidação estrutural de **Bh6**

A fração 101 (340,9 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 9,4 mg da substância **Bh6** (101.9). A substância **Bh6** foi obtida como uma mistura, portanto a discussão dos dados será feita para **Bh6-a** e **Bh6-b**.

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh6-a** (Figura 4.51) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 433. Através da análise do espectro de segunda e terceira ordens (Figura 4.52), foram observados fragmentos em m/z 301 $[M - 132 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de pentosídeo, O-substituída na aglicona do flavonoide; m/z 179 $[M - 254 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e em m/z 151 $[M - 282 - H]^-$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonoides com anel-A dihidroxilado. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-*O*-pentosídeo.

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh6-b** (Figura 4.51) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 447. Através da análise do espectro de segunda e terceira ordens (Figura 4.52), foram observados fragmentos em m/z 301 $[M - 147 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de deoxihexosídeo, O-substituída na aglicona do flavonoide; m/z 179 $[M - 268 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e em m/z 151 $[M - 296 - H]^-$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonoides com anel-A dihidroxilado. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-*O*-deoxihexosídeo.

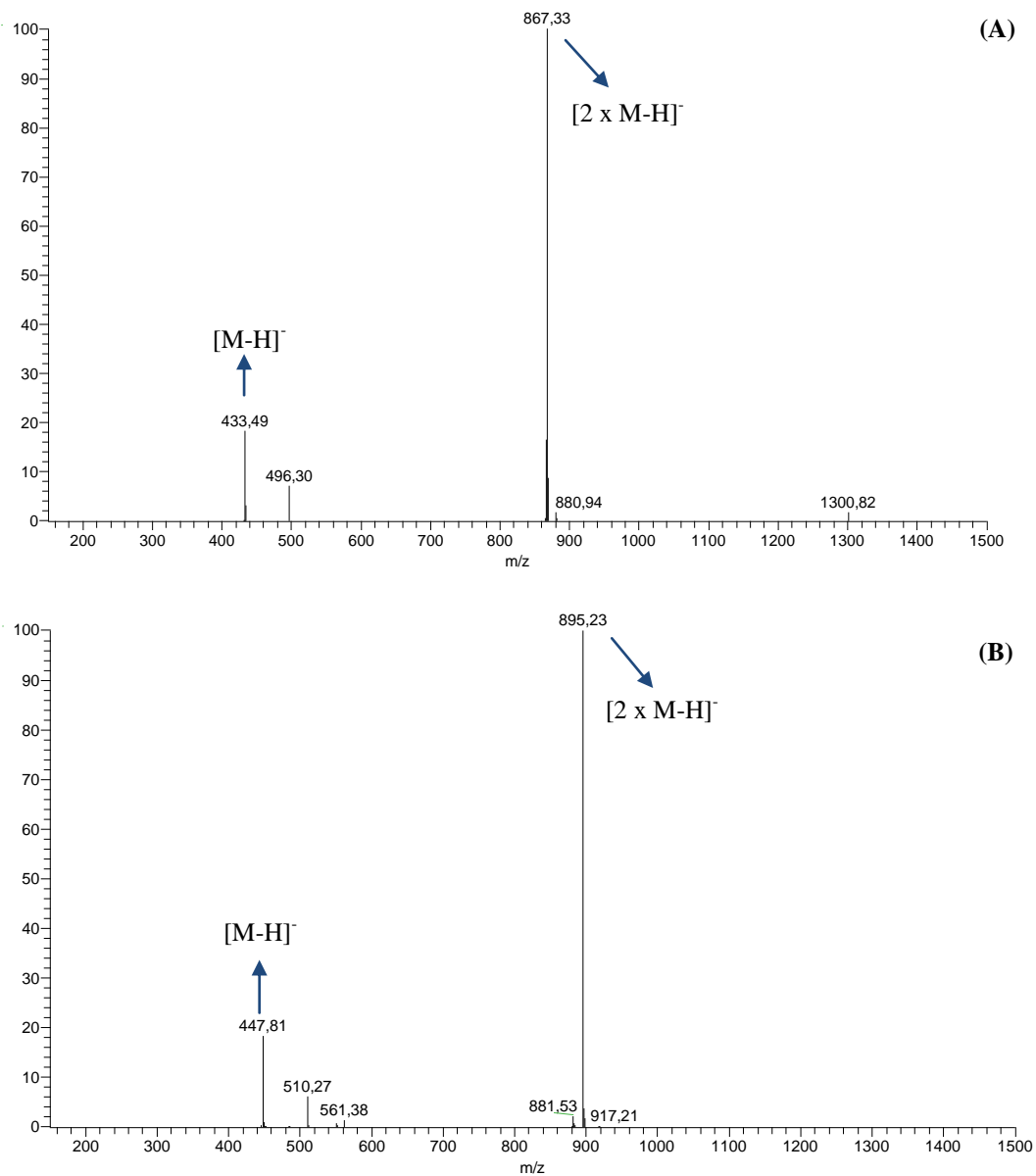


Figura 4.51. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh6-a** (A) e **Bh6-b** (B), analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

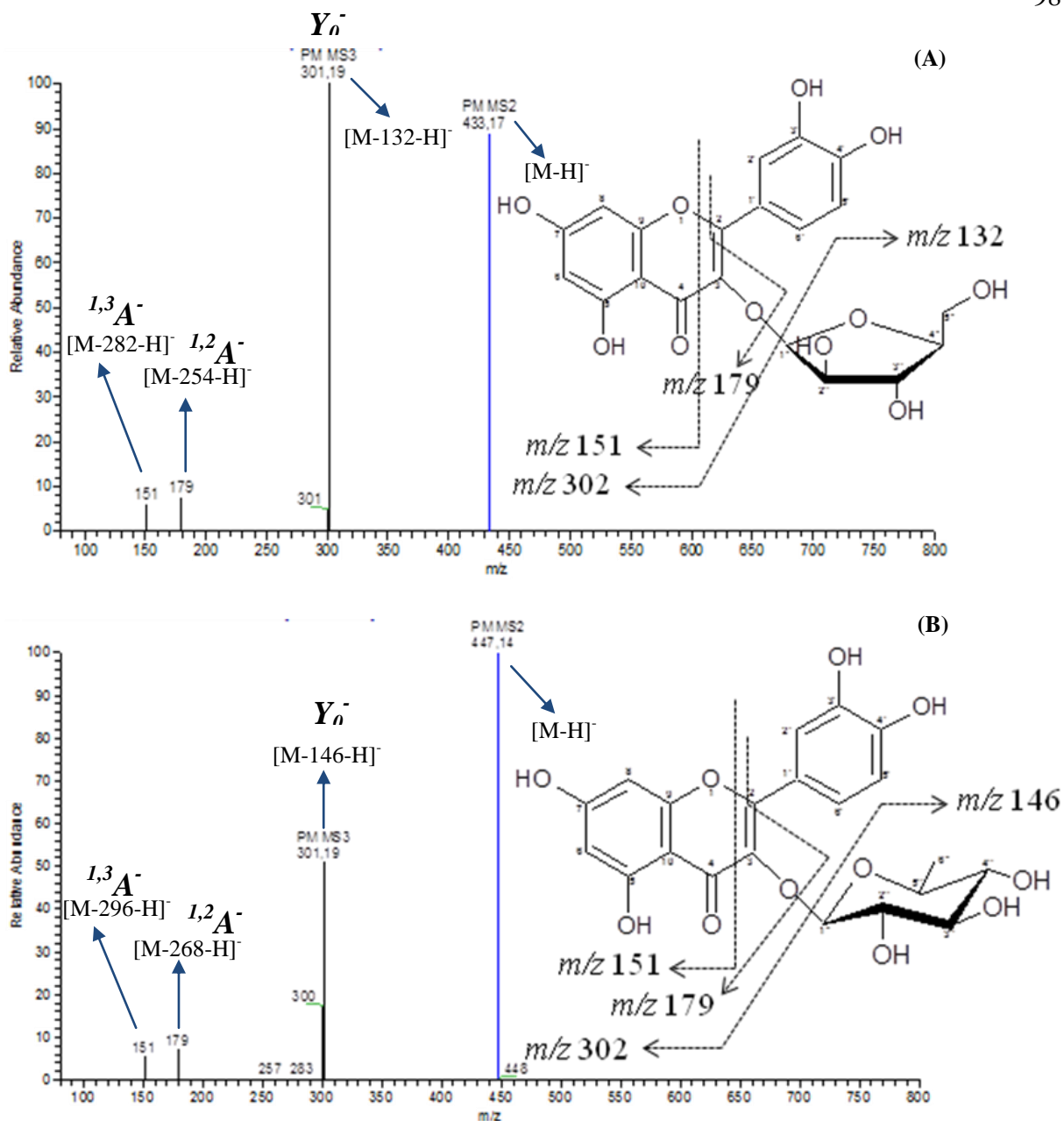


Figura 4.52. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de **Bh6-a** (A) e **Bh6-b** (B), analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh6-a** na região do UV (Figura 4.53) foram observadas bandas em 256 nm (Banda II) e 354 nm (Banda I). No espectro de absorção de **Bh6-b** na região do UV (Figura 4.53) foram observadas bandas em 256 nm (Banda II) e 350 nm (Banda I). Esses dados são característicos de flavonóis com a hidroxila do C3 substituída (MABRY et al., 1970; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

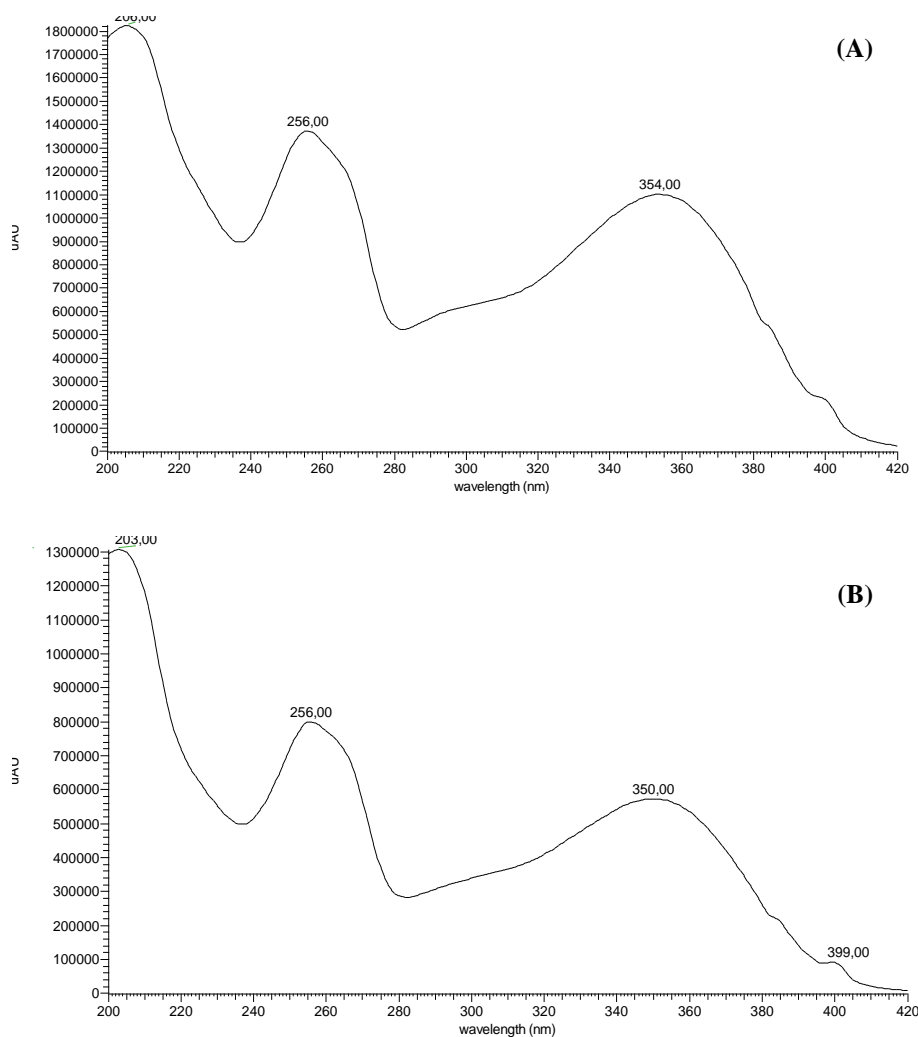


Figura 4.53. Espectros de **Bh6-a** (A) e **Bh6-b** (B) obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh6-a** (Figuras 4.54, 4.55 e 4.56) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram visualizados dois dubletos, um em δ 6,83 ($\text{H5}'$, $J = 6,5$ Hz) e outro em δ 7,47 ($\text{H2}'$, $J = 2,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,53 ($\text{H6}'$, $J = 2,0$ e 8,0 Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,18 (H6) e δ 6,36 (H8), com $J = 1,5$ e 2,0 Hz, respectivamente, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta*. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,57 ($J = 1,0$ Hz), que corresponde ao hidrogênio anomérico ($\text{H1}''$).

Os dados fornecidos pelos espectros gHMQC e gHMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh6-a** (Figura 4.57, 4.58; 4.59 e 4.60; Tabela 4.10). Através da

análise do espectro gHMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,18 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,70 (C8), δ 161,20 (C5), δ 164,73 (C7) e δ 103,91 (C10). Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,36 na posição 8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,80 (C6), δ 164,43 (C7) e δ 156,39 (C9).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,57 (H1'') e o carbono em δ 133,33 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

O experimento TOCSY 1D (Figura 4.61), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado, o sinal em δ 5,57, apresentou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 4,14 (H2''); δ 3,71 (H3''); δ 3,55 (H4'') e δ 3,25 (H5''), indicando tratar-se de uma arabinose.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh6-b** (Figuras 4.62, 4.63 e 4.64) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram visualizados dois dubletos, um em δ 6,85 (H5', $J = 6,5$ Hz) e outro em δ 7,29 (H2', $J = 2,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,23 (H6', $J = 2,0$ e $8,0$ Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,18 (H6) e δ 6,38 (H8), com $J = 1,5$ e $2,0$ Hz, respectivamente, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta* (Tabela xxx). A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,25 ($J = 1,5$ Hz), que corresponde ao hidrogênio anomérico (H1'').

Os dados fornecidos pelos espectros gHMQC e gHMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh6-b** (Figura 4.57, 4.58; 4.59 e 4.60; Tabela 4.10). Através da análise do espectro gHMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,18 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,64 (C8), δ 161,28 (C5), δ 164,73 (C7) e δ 103,91 (C10). Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,38 na posição

8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,80 (C6), δ 164,43 (C7) e δ 156,39 (C9).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,25 (H1'') e o carbono em δ 134,18 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

O experimento TOCSY 1D (Figura 4.65), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado, o sinal em δ 5,25, apresentou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 3,97 (H2''); δ 3,49 (H3'') e δ 0,80 (H6''), indicando tratar-se de uma rhamnose.

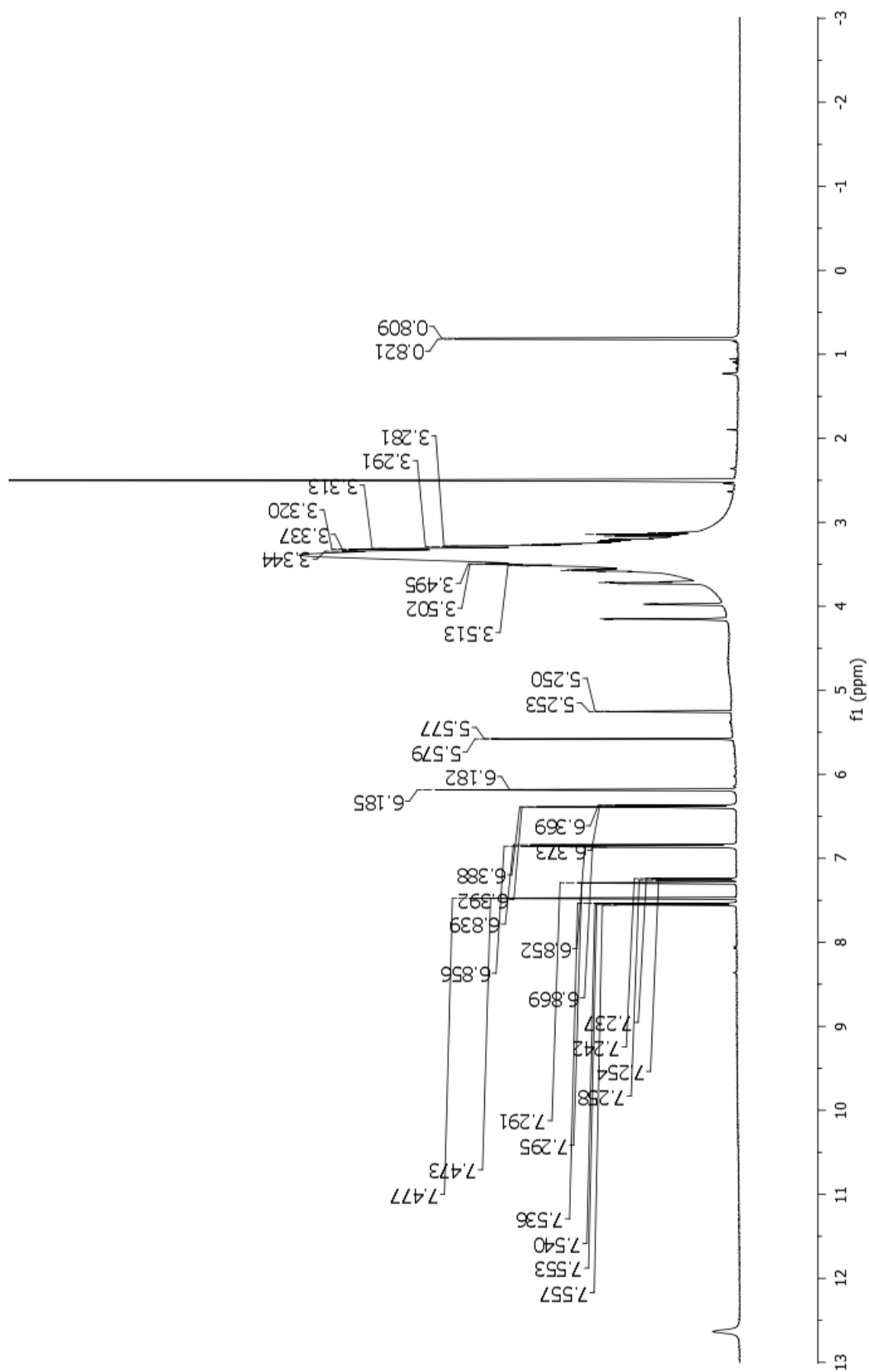


Figura 4.54. Espectro de RMN de ^1H de **Bh6** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

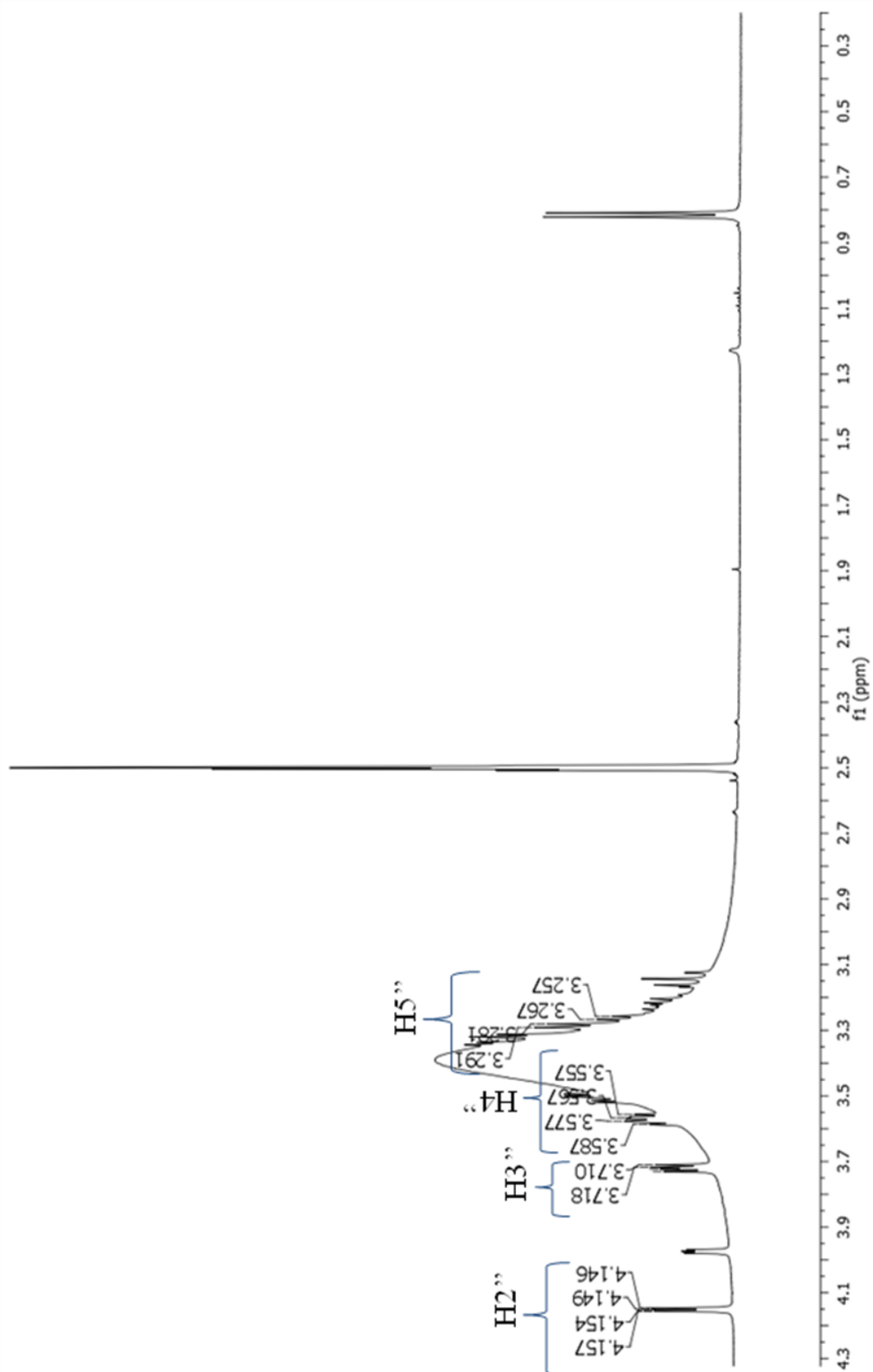


Figura 4.55. Espectro de RMN de ^1H de **Bh6-a** (DMSO-d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 0,3 a δ 4,30.

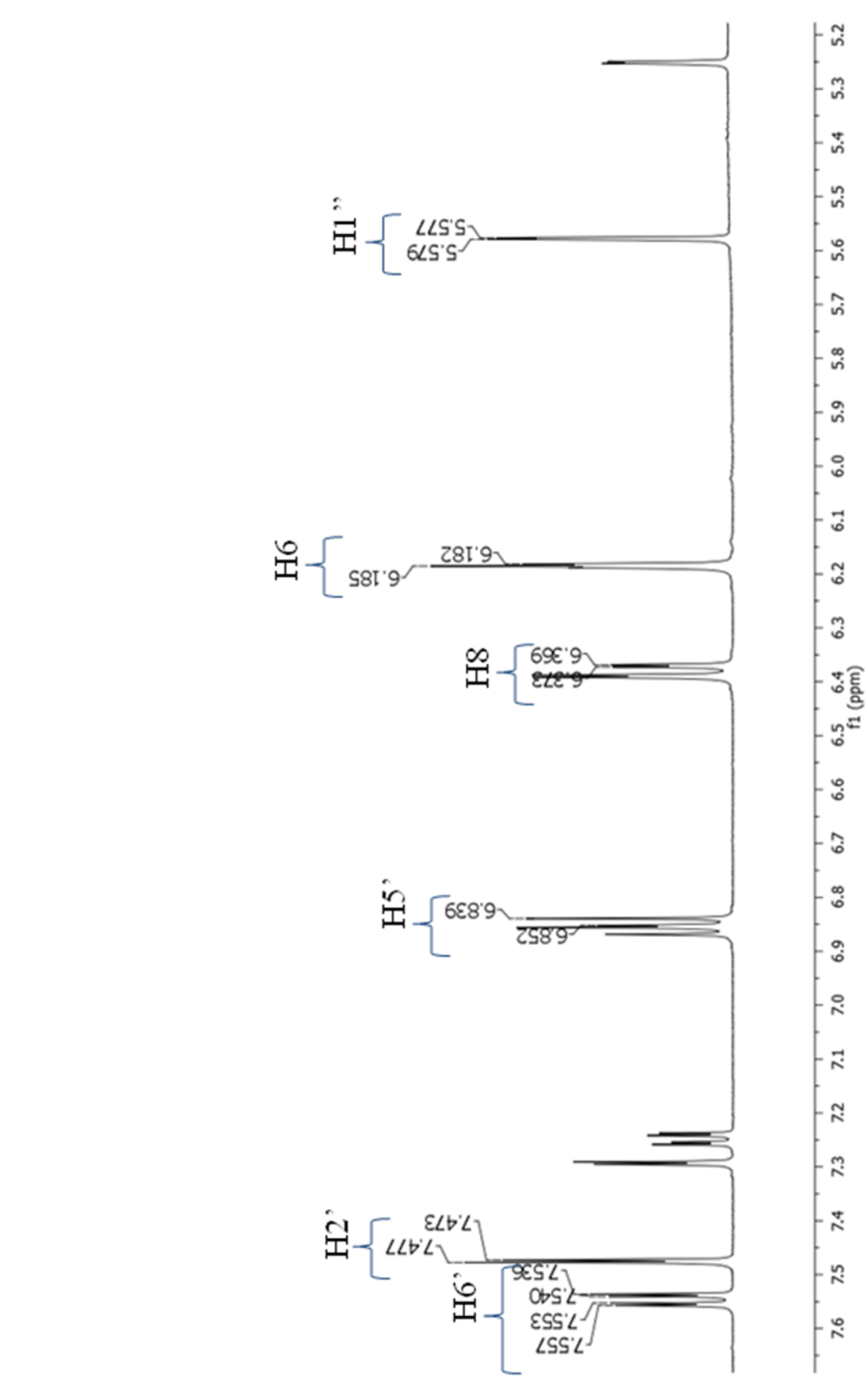


Figura 4.56. Espectro de RMN de ^1H de **Bh6-a** (DMSO-d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 5,20 a δ 7,60.

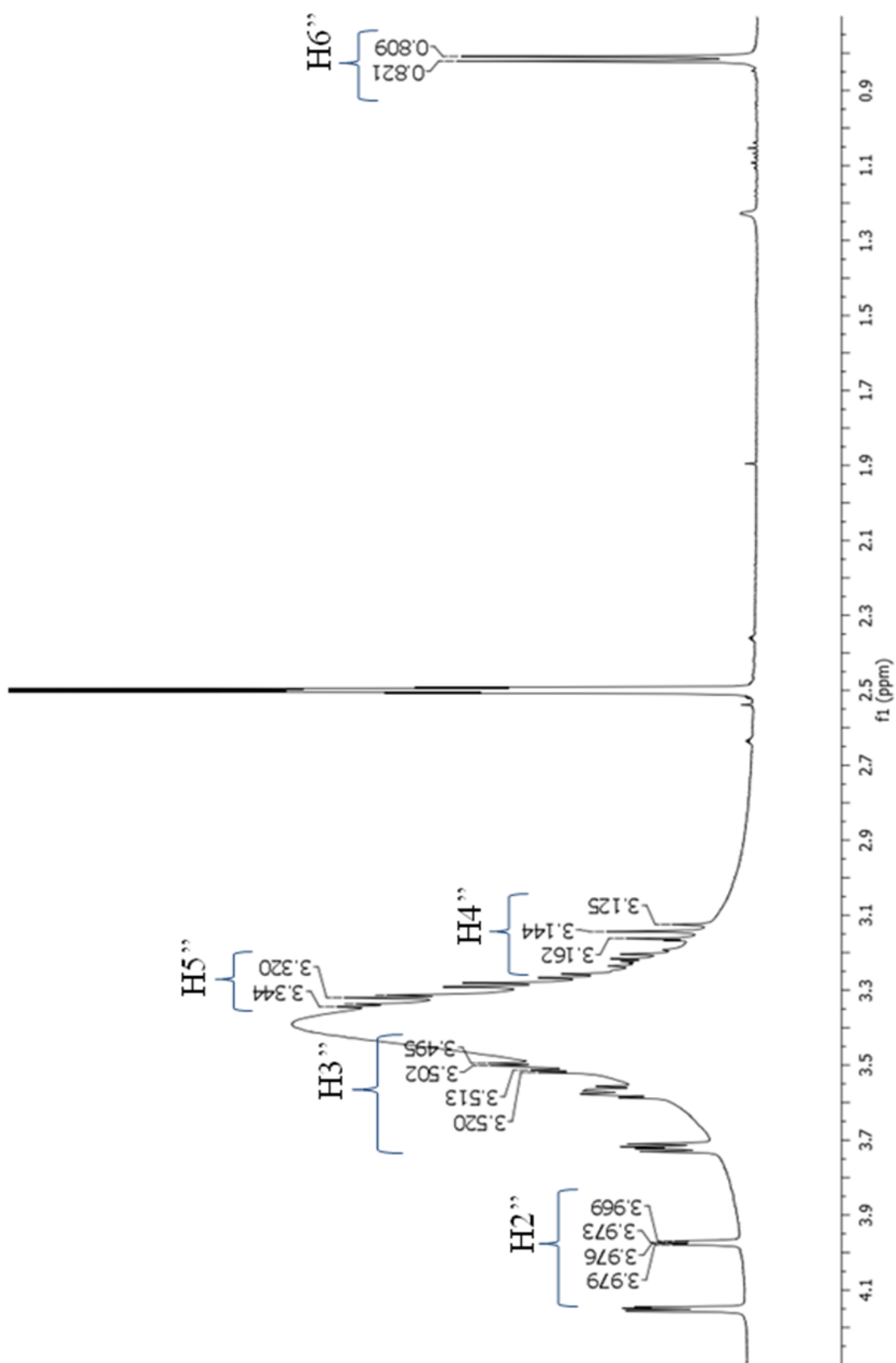


Figura 4.57. Espectro de RMN de ^1H de **Bh6-b** (DMSO-d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 0,90 a δ 4,10.

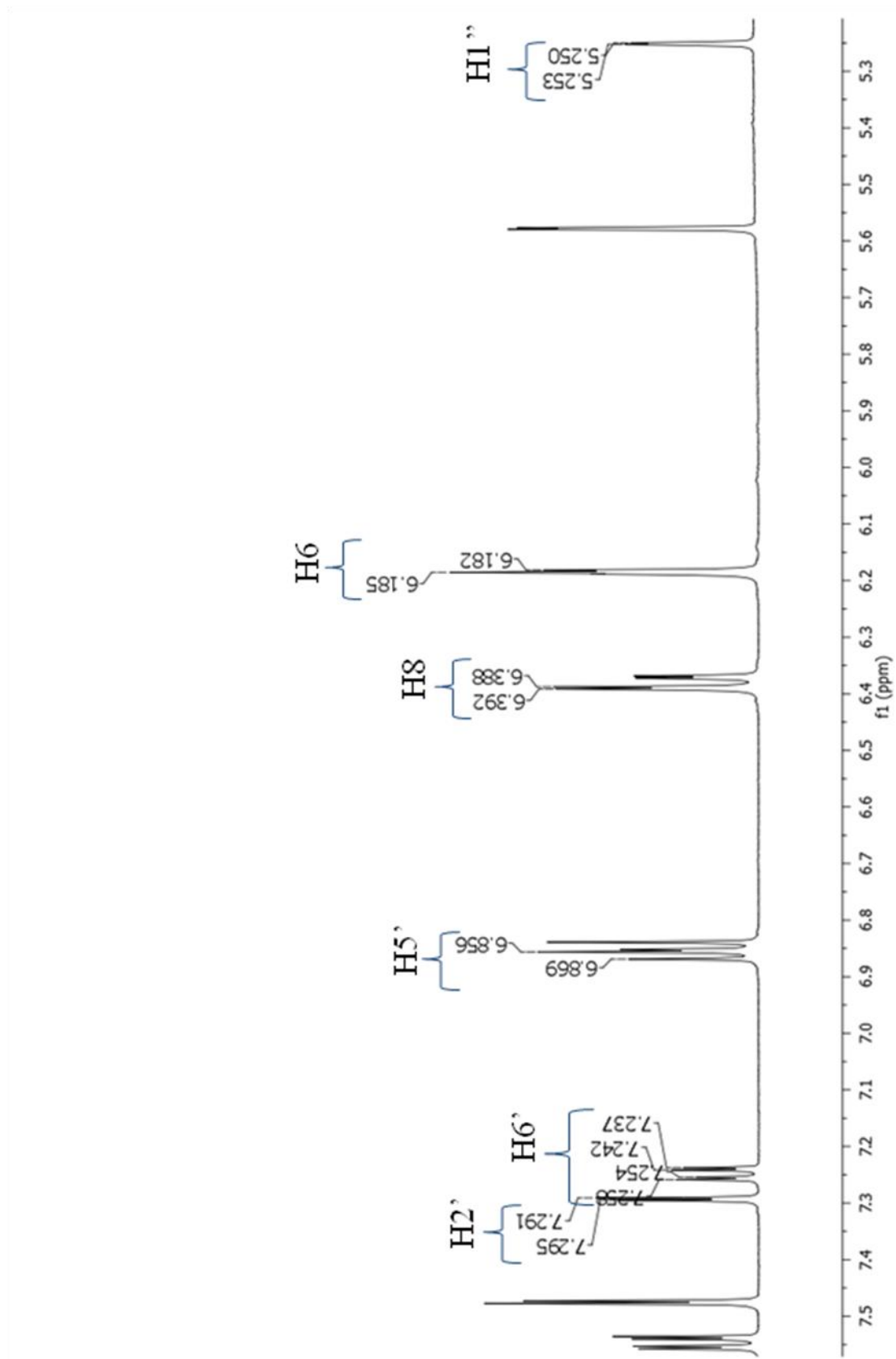


Figura 4.58. Espectro de RMN de ^1H de **Bh6-b** (DMSO-d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 5,30 a δ 7,50.

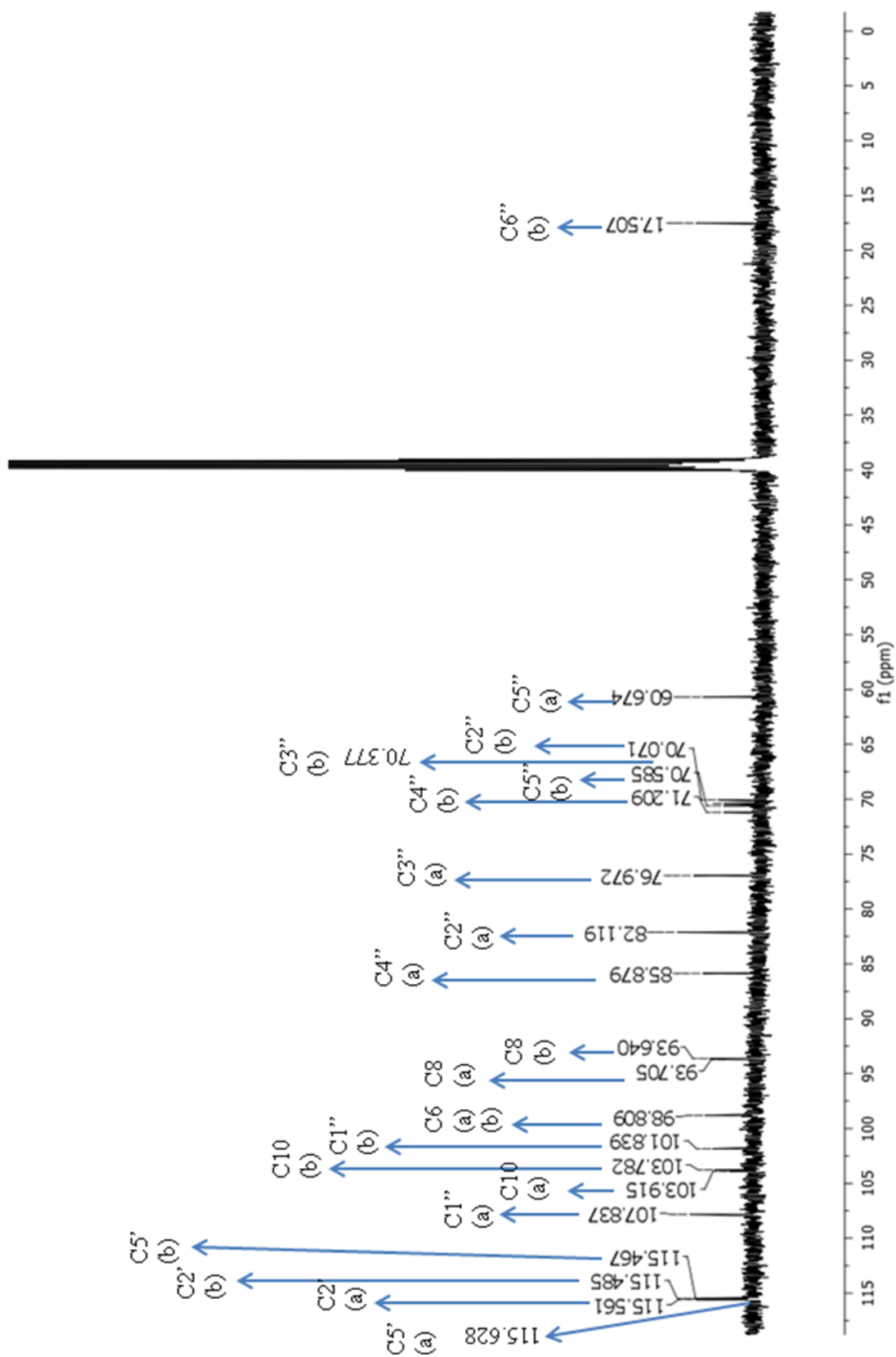


Figura 4.59. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh6** (DMSO- d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 0 a δ 115; (a) – **Bh6-a**; (b) – **Bh6-b**.

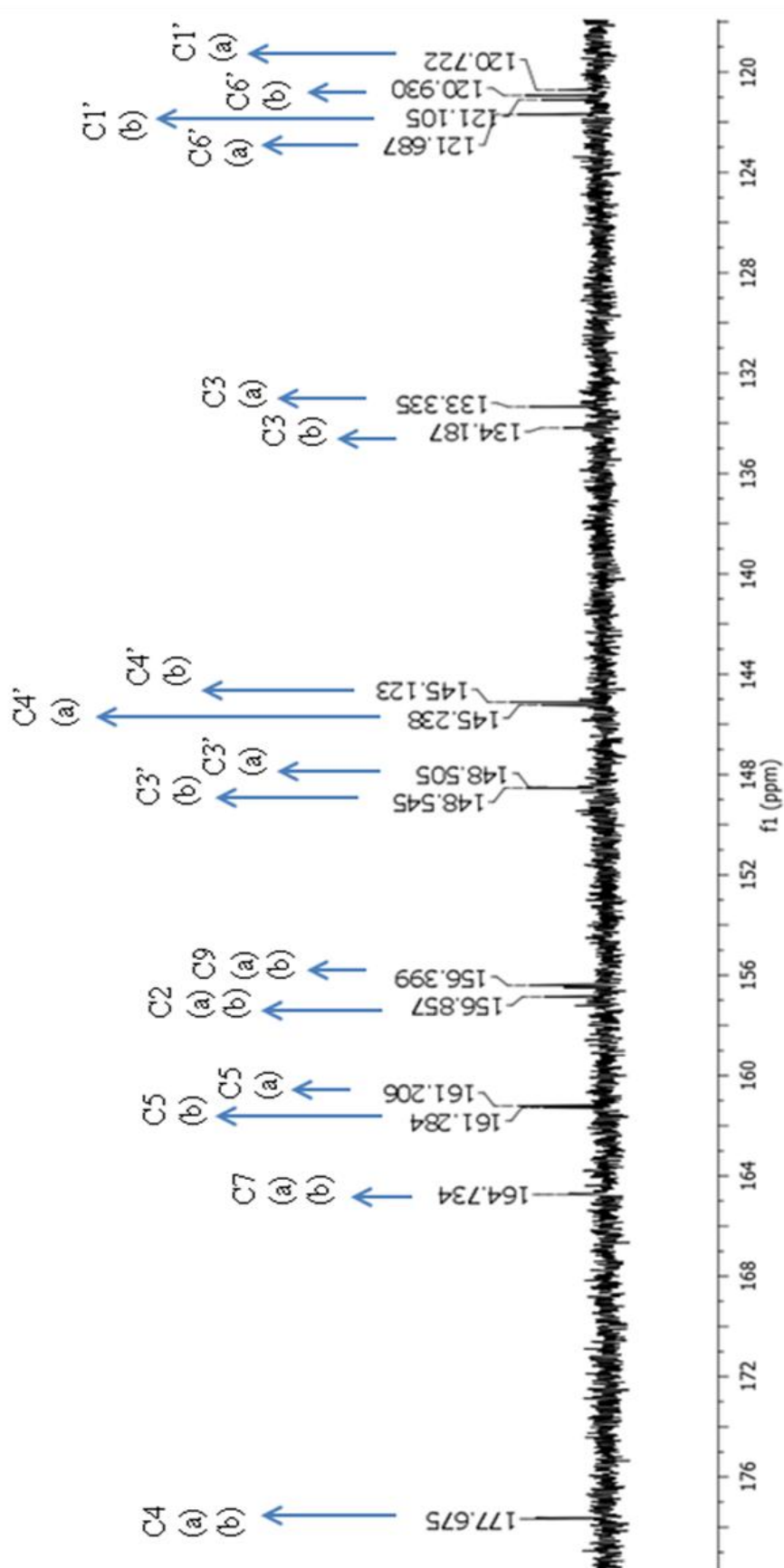


Figura 4.60. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh6** (DMSO-d_6 ; 11,7 T). Ampliação na região de δ 120 a δ 176; (a) – **Bh6-a**; (b) – **Bh6-b**.

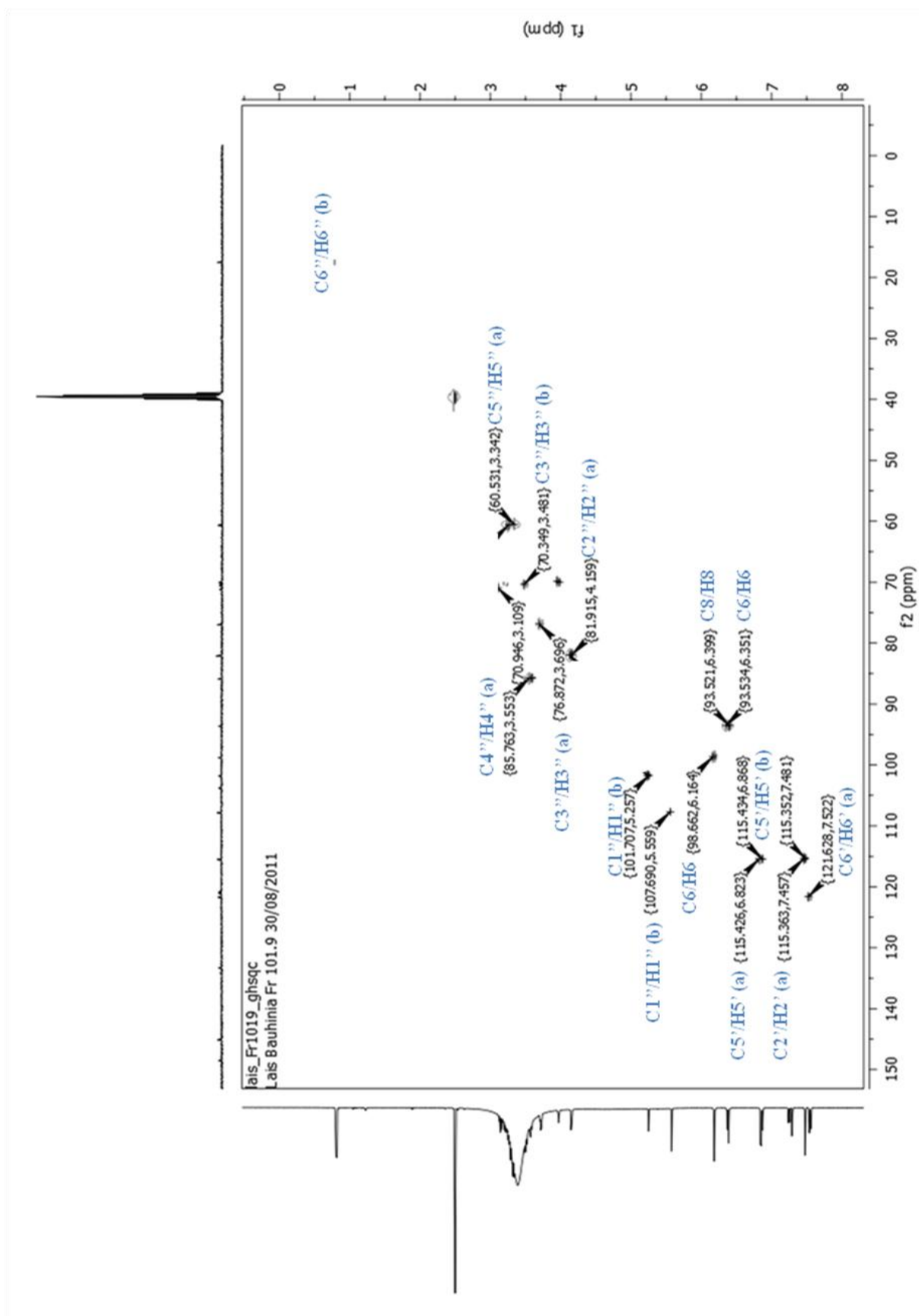


Figura 4.61. Experimento gHMOC de **Bh6** (DMSO- d_6 ; 11,7 T); (a) – **Bh6-a**; (b) – **Bh6-b**.

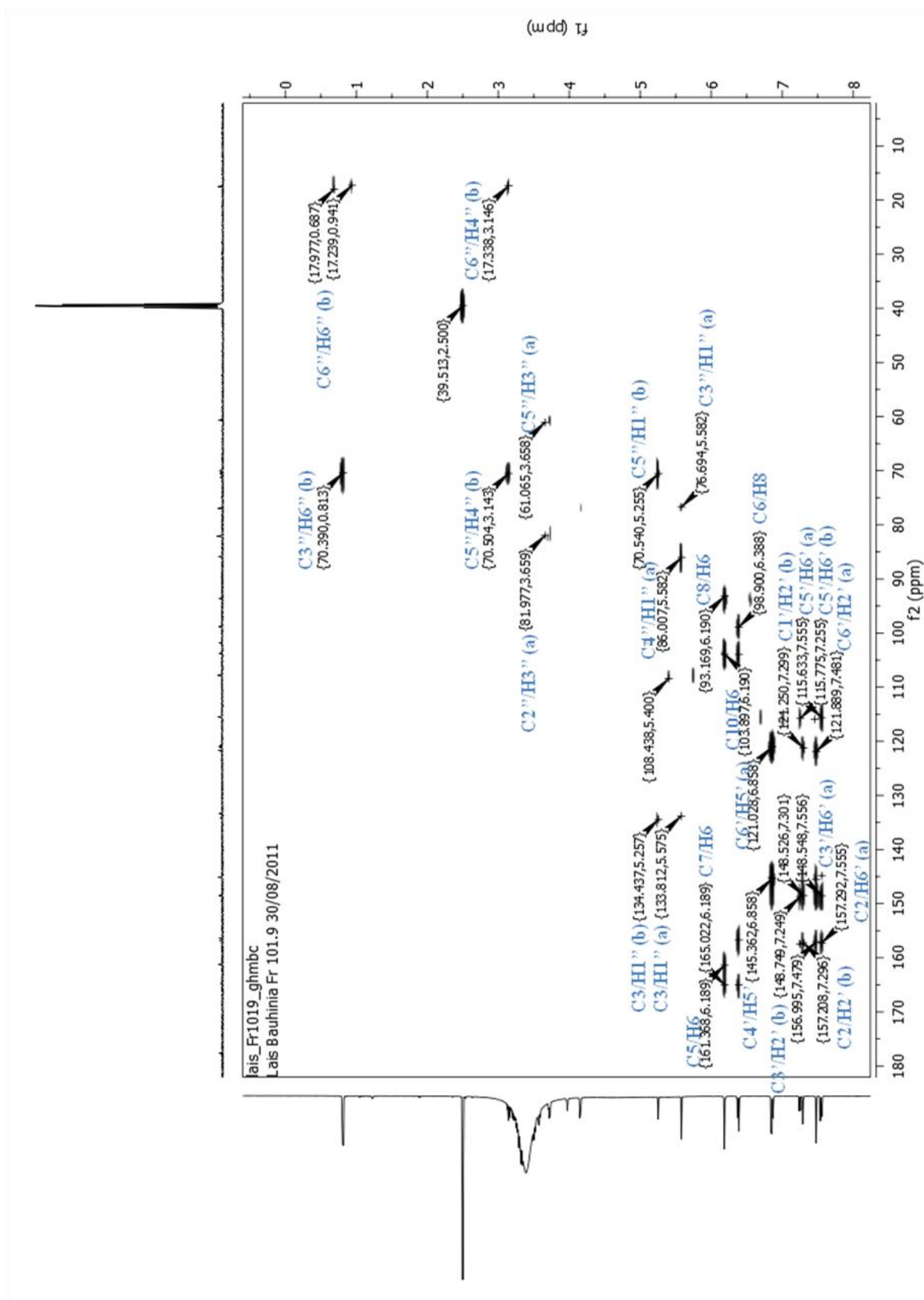


Figura 4.62. Experimento gHMBC de **Bh6** (DMSO- d_6 ; 11,7 T); (a) – **Bh6-a**; (b) – **Bh6-b**.

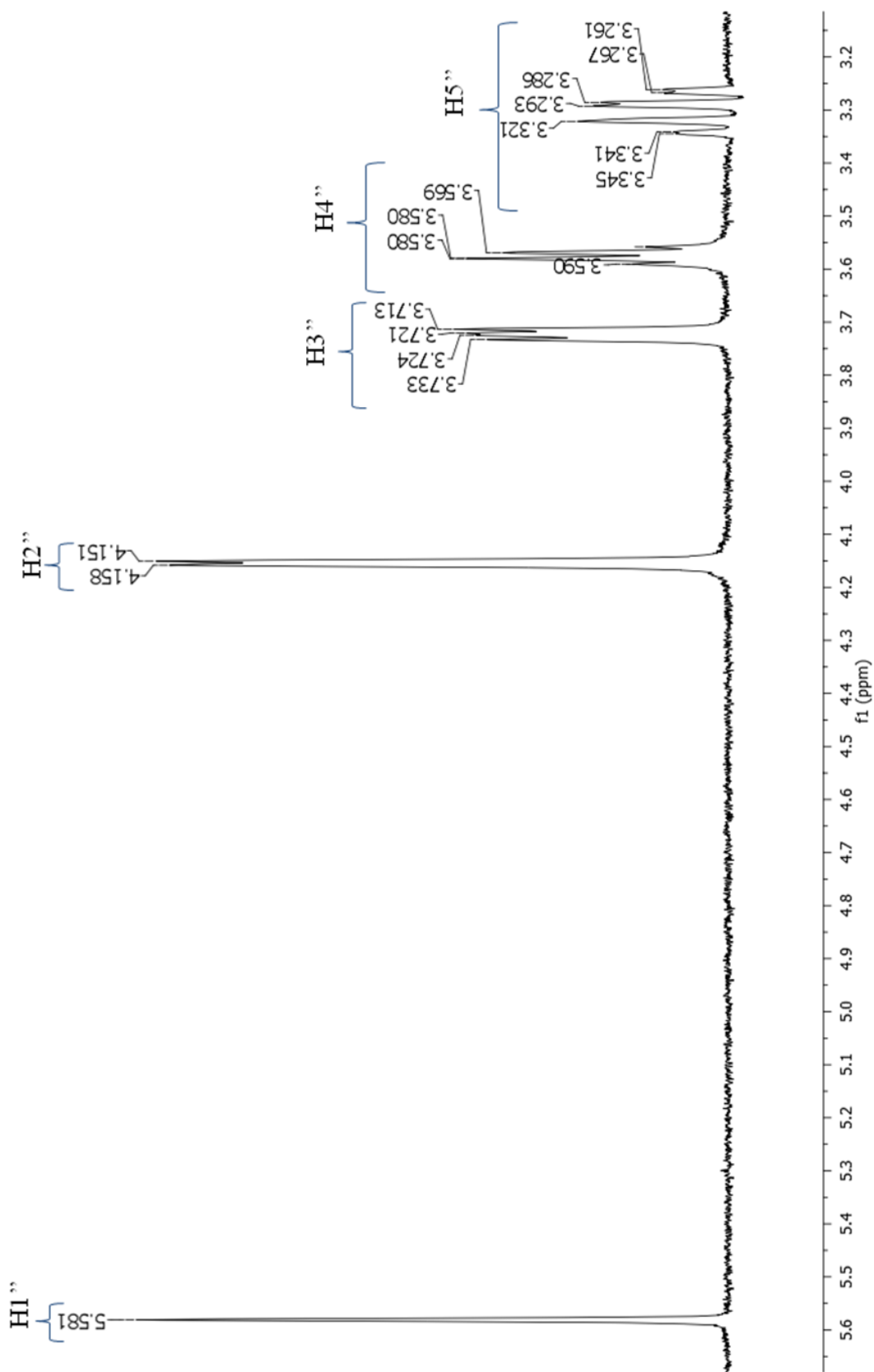


Figura 4.63. Experimento TOCSY 1D de **Bh6-a** (DMSO-d₆; 11,7 T).

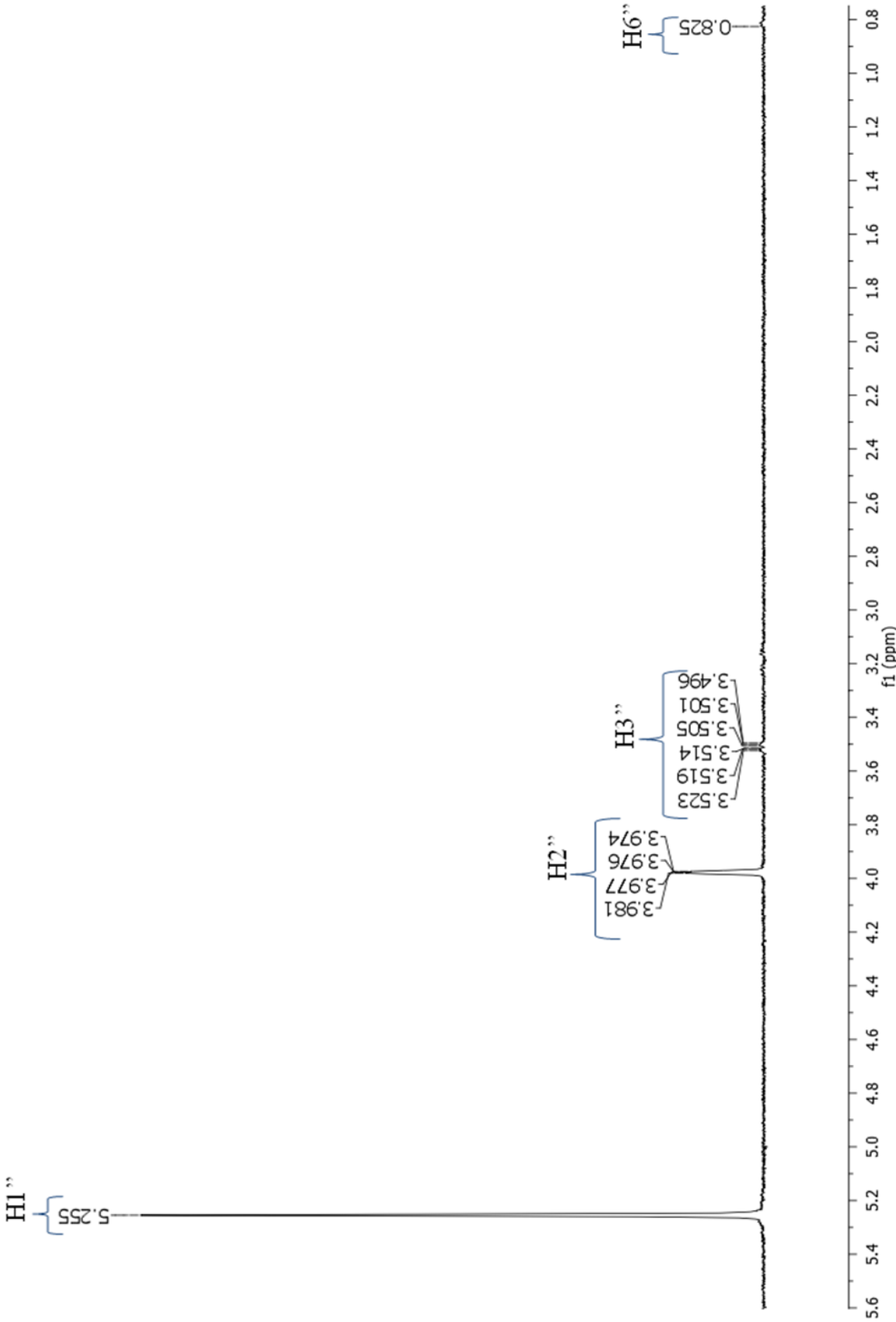
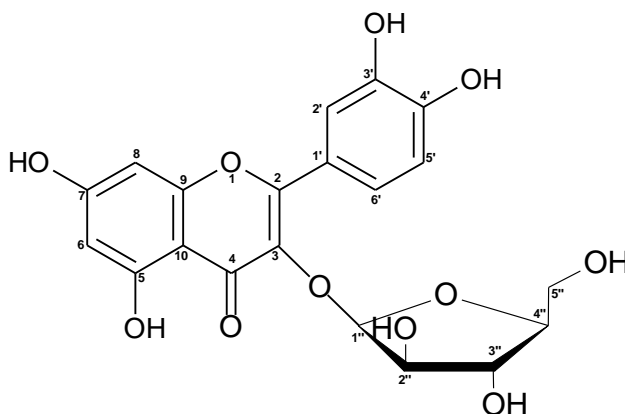
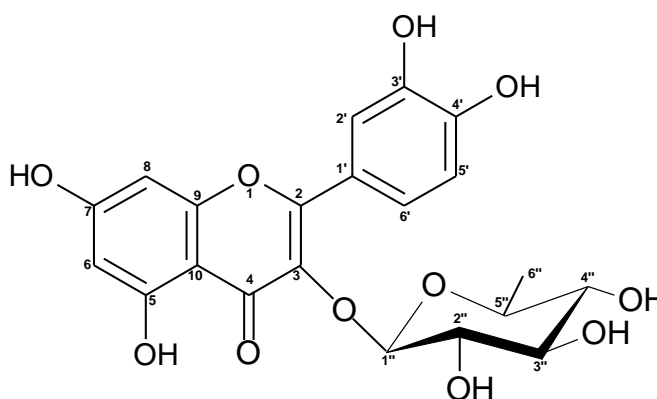


Figura 4.64. Experimento TOCSY 1D de **Bh6-b** (DMSO-d₆; 11,7 T).

Tabela 4.10. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh6-a** e **Bh6-b**.

<i>Posições</i>	^1H (<i>Bh6-a</i>)	^{13}C (<i>Bh6-a</i>)	^1H (<i>Bh6-b</i>)	^{13}C (<i>Bh6-b</i>)
2		156,85		156,85
3		133,33		134,18
4		177,67		177,67
5		161,20		161,28
6	6,18 (d, $J = 1,5$)	98,80	6,18 (d, $J = 1,5$)	98,80
7		164,73		164,73
8	6,36 (d, $J = 2,0$)	93,70	6,38 (d, $J = 2,0$)	93,64
9		156,39		156,39
10		103,91		103,78
1'		120,72		121,10
2'	7,47 (d, $J = 2,0$)	115,56	7,29 (d, $J = 2,0$)	115,48
3'		148,50		148,54
4'		145,23		145,12
5'	6,83 (d, $J = 6,5$)	115,62	6,85 (d, $J = 6,5$)	115,46
6'	7,53 (dd, $J = 2,0; 8,0$)	121,68	7,23 (dd, $J = 2,0; 8,0$)	120,93
Arabinose		Rhamnose		
1''	5,57 (d, $J = 1,0$)	107,83	5,25 (d, $J = 1,5$)	101,83
2''	4,14 (dd, $J = 1,5; 4,0$)	82,11	3,96 (dd, $J = 2,0; 3,0$)	70,07
3''	3,71 (dd, $J = 4,0; 6,5$)	76,97	3,49 (dd, $J = 3,5; 9,0$)	70,37
4''	3,55 (dd, $J = 3,5; 10,5$)	85,87	3,12 (t, $J = 9,5; 9,0$)	71,20
5''	3,25 (m)	60,67	3,32 (dd, $J = 6,5; 9,0$)	70,58
6''			0,80 (d, $J = 6,0$)	17,50

Os dados obtidos, comparados com a literatura, permitiram a identificação de **Bh6-a** como sendo quercetina-3- O - α -L-arabinofuranosídeo e de **Bh6-b** como sendo quercetina-3- O - α -L-rhamnopiranosídeo (quercitrina) (MABRY et al., 1970; HARBORNE, 1994; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). (Figura 4.65).

(A). **Bh6-a**(B). **Bh6-b****Figura 4.65.** Estrutura química de **Bh6-a** (A) e **Bh6-b** (B).

Elucidación estructural de **Bh7**

A fração 101 (340,9 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, dando origem a 16,0 mg da substância **Bh7** (101.9.1). Os espectros de UV, MS e RMN da substância **Bh7** foram idênticos aos de **Bh6-b**, verificando-se assim que **Bh6** é uma mistura das substâncias **Bh5** e **Bh7**.

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh7** (Figura 4.66) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 447. Através da análise do espectro de segunda, terceira e quarta ordens (Figura 4.67), foram observados fragmentos em m/z 301 $[M - 147 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de deoxihexosídeo,

O-substituída na aglicona do flavonoide; m/z 179 $[M - 268 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e em m/z 151 $[M - 296 - H]^-$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonoides com anel-A dihidroxilado. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-*O*-deoxihexosídeo.

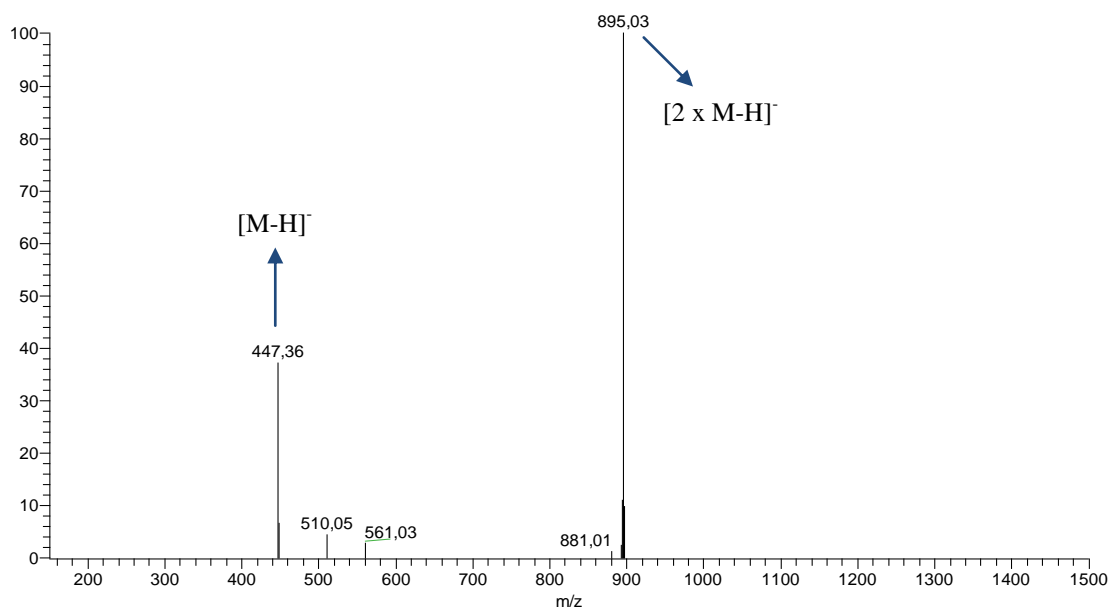


Figura 4.66. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh7**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

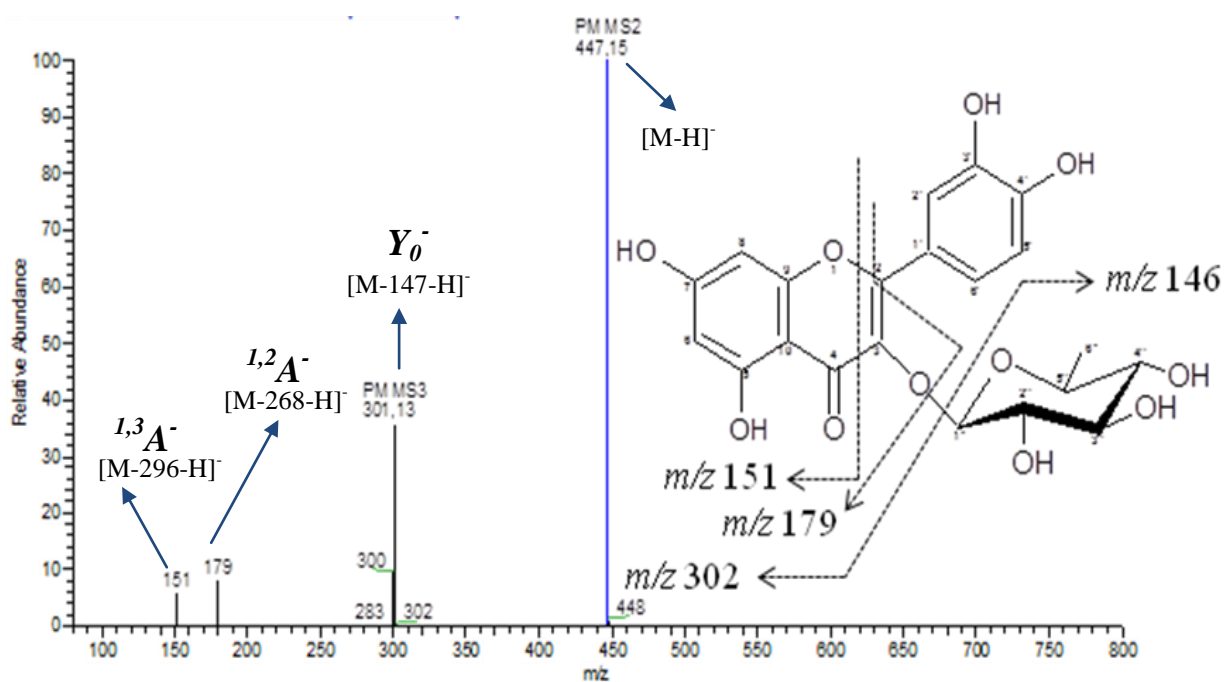


Figura 4.67. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de **Bh7**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh7** na região do UV (Figura 4.68) foram observadas bandas em 255 nm (Banda II) e 350 nm (Banda I), características de flavonóis com a hidroxila do C3 substituída (MABRY et al., 1970; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

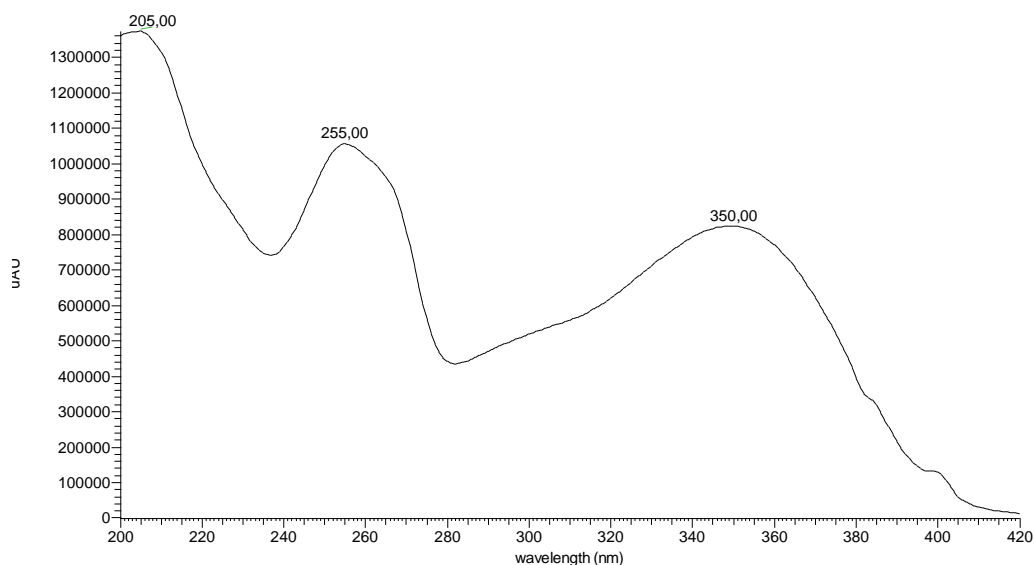


Figura 4.68. Espectro de **Bh7** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh7** (Figura 4.69) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram visualizados dois dubletos, um em δ 6,85 ($\text{H5}'$, $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 7,29 ($\text{H2}'$, $J = 2,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,23 ($\text{H6}'$, $J = 2,0$ e 8,0 Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,19 (H6) e δ 6,37 (H8), ambos com $J = 2,0$ Hz, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta*. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,24 ($J = 1,5$ Hz), que corresponde ao hidrogênio anomérico ($\text{H1}''$).

Os dados fornecidos pelos espectros *g*HMQC e *g*HMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh7** (Figura 4.70, 4.71 e 4.72; Tabela 4.11). Através da análise do espectro *g*HMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,19 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,79 (C8), δ 161,36 (C5) e δ 104,07 (C10).

Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,37 na posição 8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,88 (C6), δ 164,60 (C7), δ 156,57 (C9) e δ 104,07 (C10).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,24 (H1'') e o carbono em δ 134,28 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

O experimento TOCSY 1D (Figura 4.73), mostrou que quando o hidrogênio anomérico foi irradiado, o sinal em δ 5,24, apresentou correlação com os sinais de hidrogênio em δ 3,96 (H2''); δ 3,49 (H3''), δ 3,12 (H4'') e δ 0,80 (H6''), indicando tratar-se de uma rhamnose.

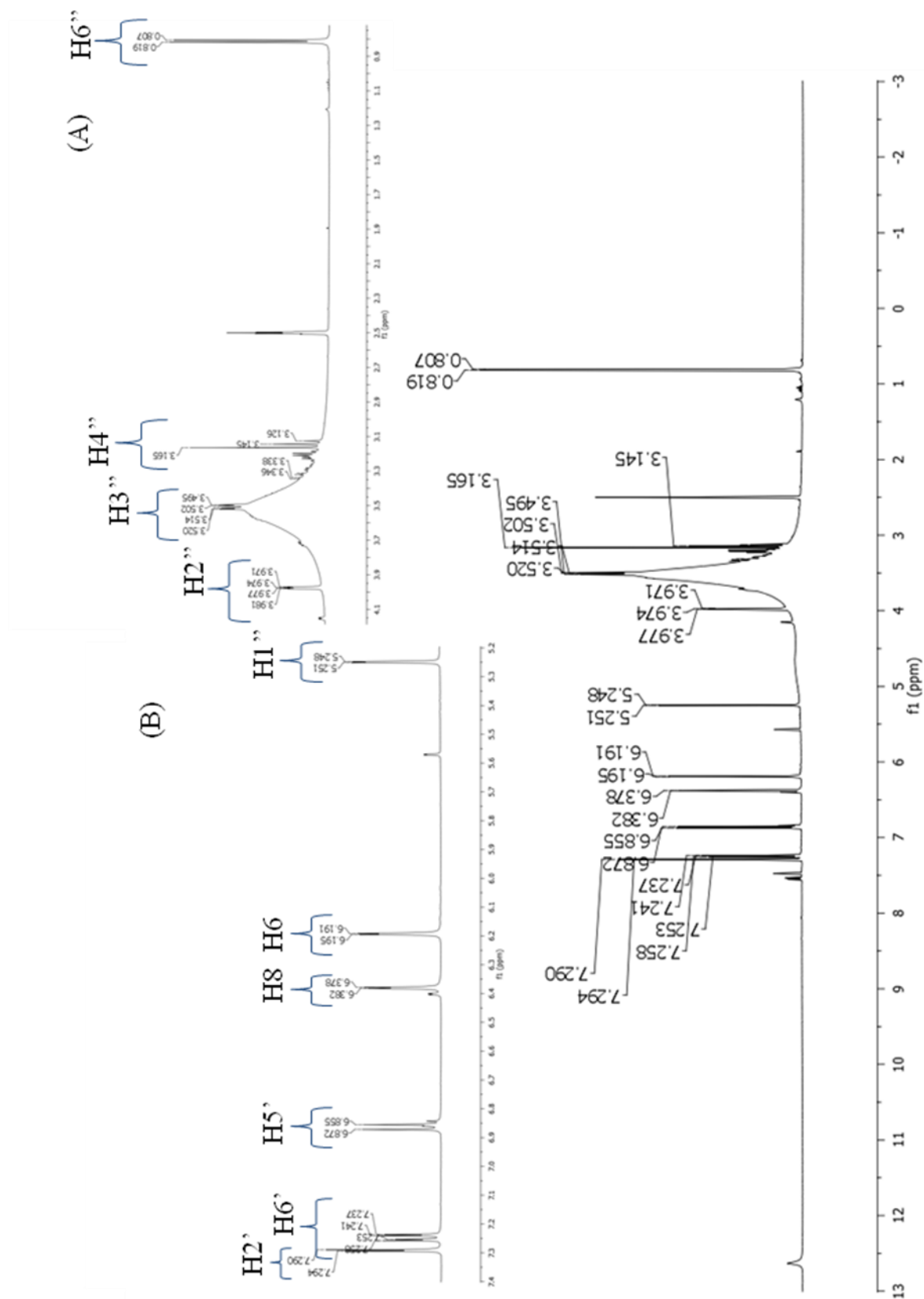


Figura 4.69. Espectro de RMN de ^1H de **Bh7** (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 0,90 a δ 4,10; (B) Ampliação na região de δ 5,2 a δ 7,4.

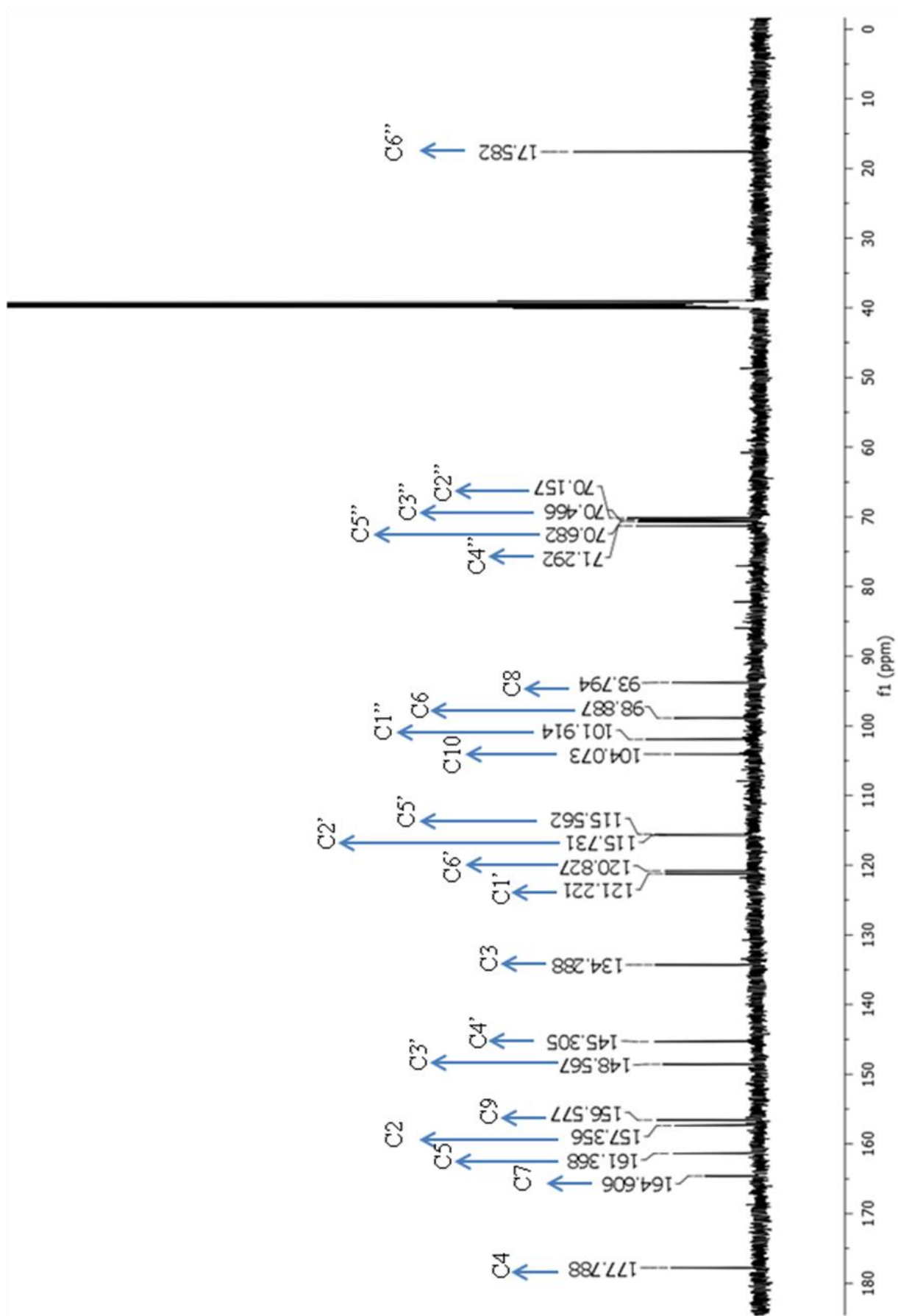


Figura 4.70. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh7** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

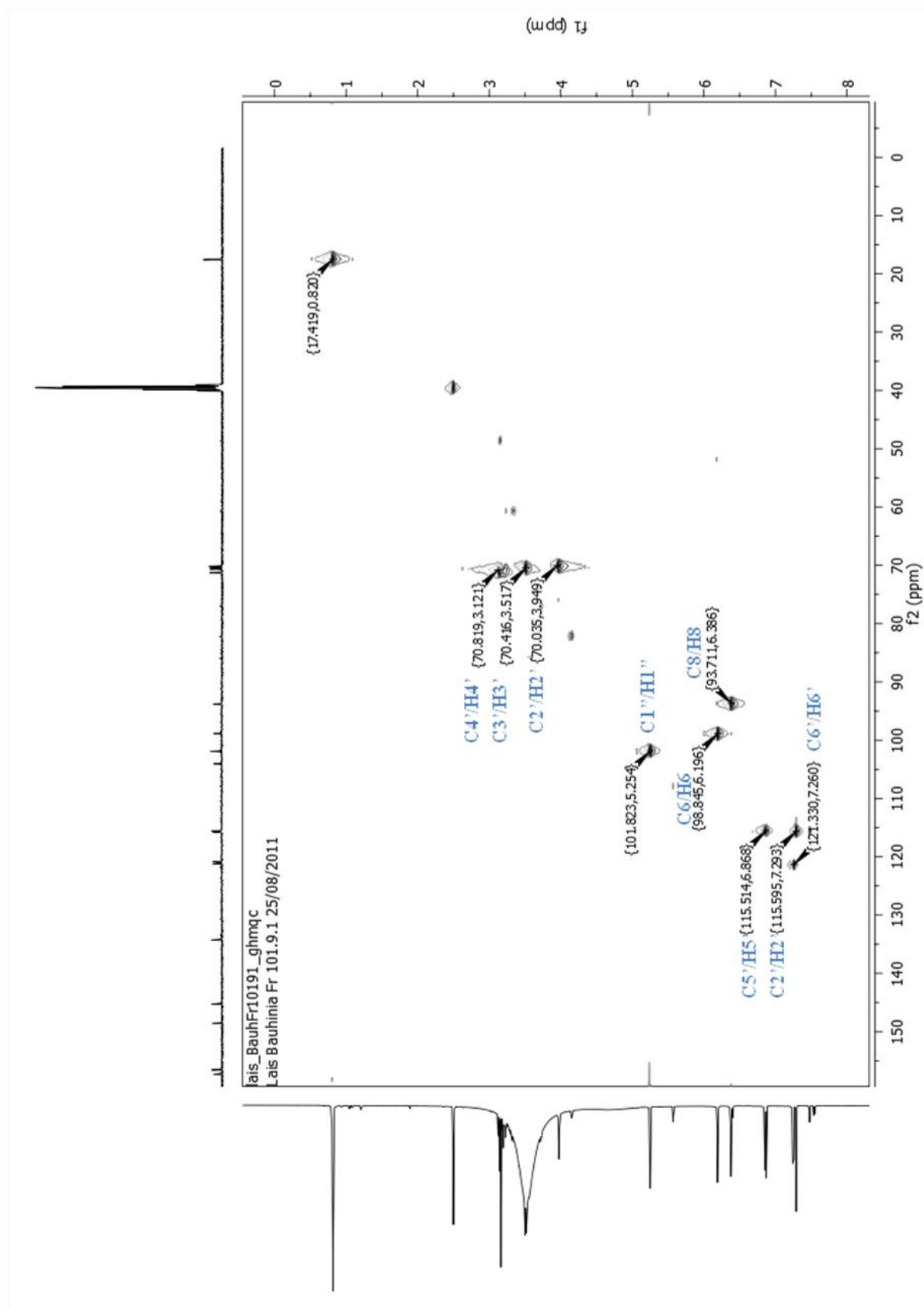


Figura 4.71. Experimento gHMQC de **Bh7** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

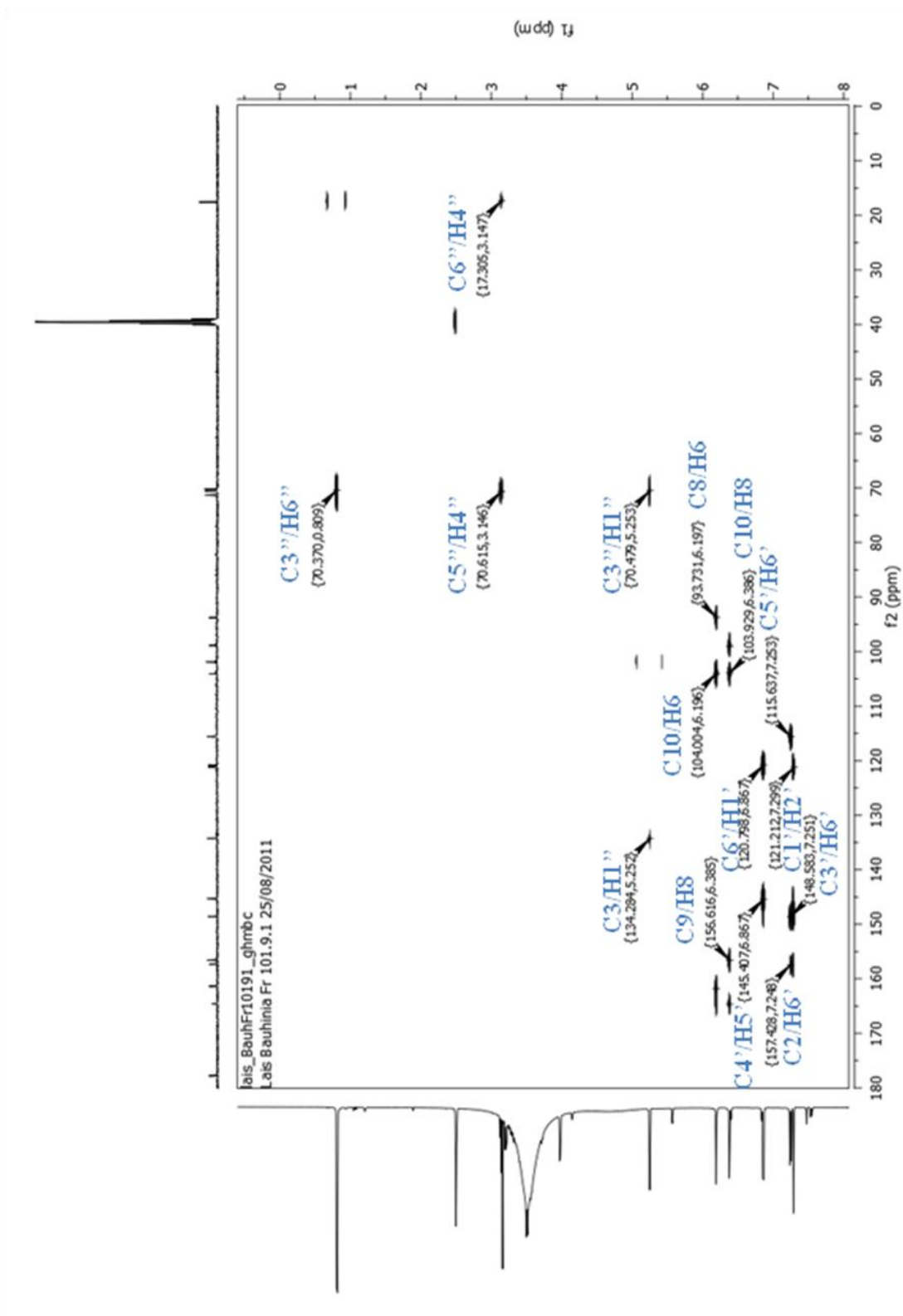


Figura 4.72. Experimento gHMBC de **Bh7** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

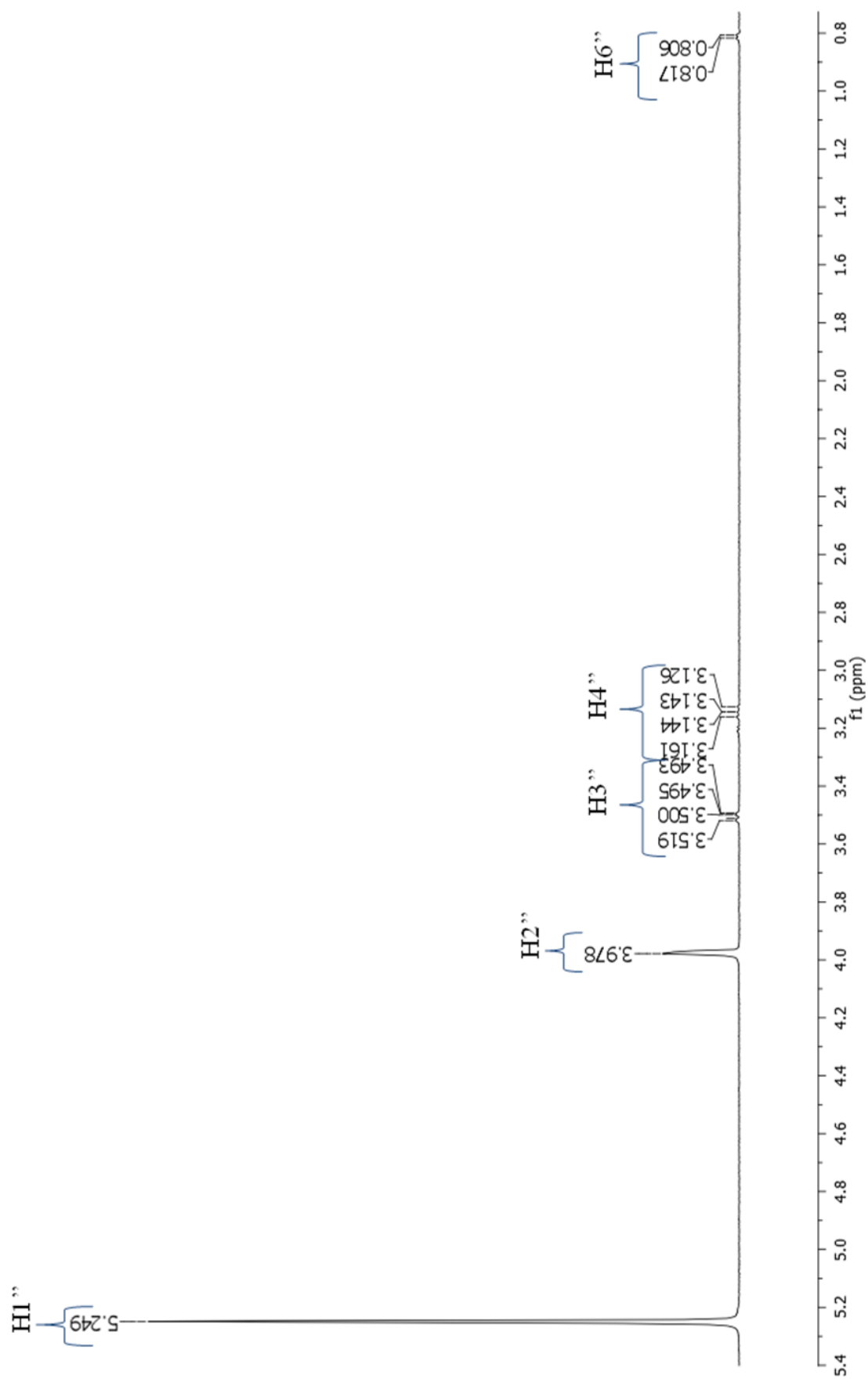


Figura 4.73. Experimento TOCSY 1D de **Bh7** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

Tabela 4.11. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh7**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
2		157,35
3		134,28
4		177,78
5		161,36
6	6,19 (d, $J = 2,0$)	98,88
7		164,60
8	6,37 (d, $J = 2,0$)	93,79
9		156,57
10		104,07
1'		121,22
2'	7,29 (d, $J = 2,0$)	115,73
3'		148,56
4'		145,30
5'	6,85 (d, $J = 8,5$)	115,56
6'	7,23 (dd, $J = 2,0; 8,0$)	120,82
Rhamnose		
1''	5,24 (d, $J = 1,5$)	101,91
2''	3,96 (dd, $J = 2,0; 3,0$)	70,15
3''	3,49 (dd, $J = 3,5; 9,0$)	70,46
4''	3,12 (t, $J = 9,5; 9,0$)	71,29
5''	3,32 (dd, $J = 6,5; 9,0$)	70,68
6''	0,80 (d, $J = 6,0$)	17,58

Os dados obtidos, comparados com a literatura, permitiram a identificação de **Bh7** como sendo quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (quercitrina) (MABRY et al., 1970; HARBORNE, 1994; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). (Figura 4.74).

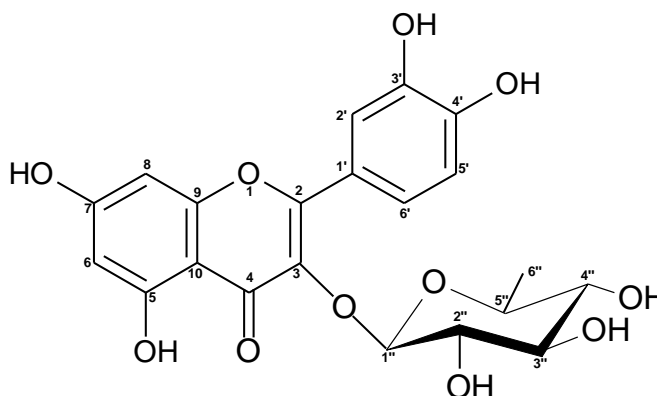


Figura 4.74. Estrutura química de **Bh7**.

Elucidação estrutural de **Bh9**

A fração 114 (202,7 mg) foi submetida à separação cromatográfica por HPLC-RI, no modo semipreparativo, fornecendo 8,8 mg da substância **Bh9** (114.9).

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh9** (Figura 4.75) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula desprotonada $[M - H]^-$ em m/z 433. Através da análise do espectro de segunda, terceira e quarta ordens (Figura 4.76), foram observados fragmentos em m/z 301 $[M - 132 - H]^-$, sugerindo a perda de uma unidade de pentosídeo, O-substituída na aglicona do flavonoide; m/z 179 $[M - 254 - H]^-$, íon produto $^{1,2}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonóis (3-OH) com anel-A dihidroxilado e em m/z 151 $[M - 282 - H]^-$, íon produto $^{1,3}A^-$ típico da fragmentação RDA em flavonoides com anel-A dihidroxilado. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de uma quercetina-*O*-pentosídeo.

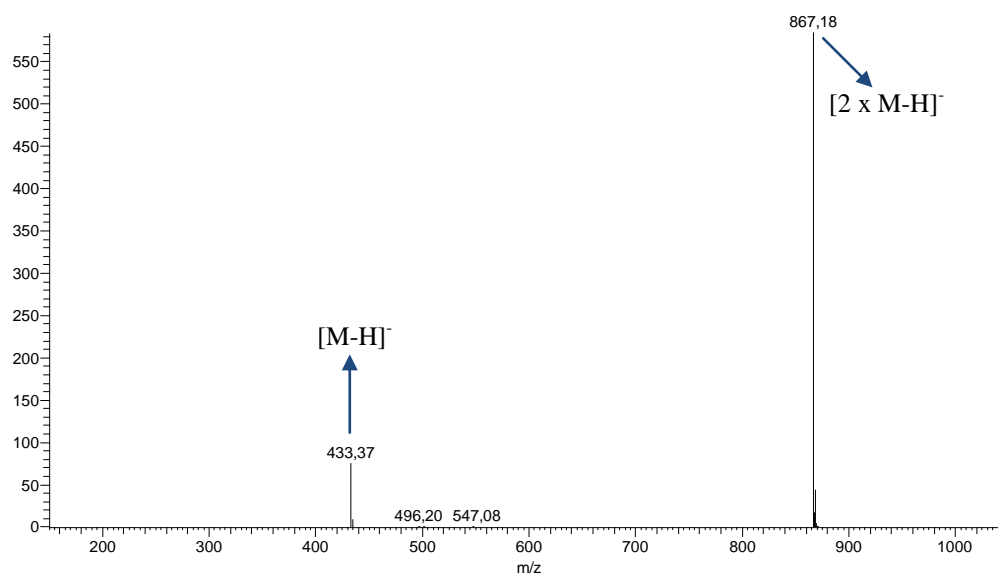


Figura 4.75. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh9**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

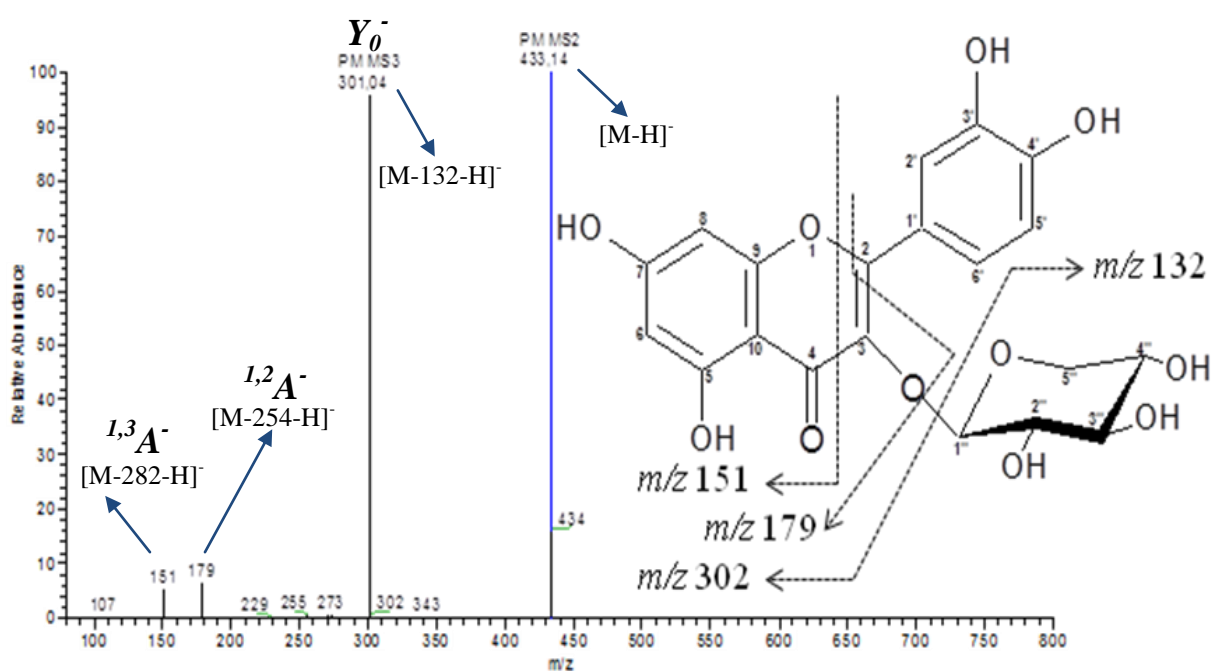


Figura 4.76. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de **Bh9**, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh9** na região do UV (Figura 4.77) foram observadas bandas em 255 nm (Banda II) e 355 nm (Banda I), características de flavonóis com a hidroxila do C3 substituída (MABRY et al., 1970; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

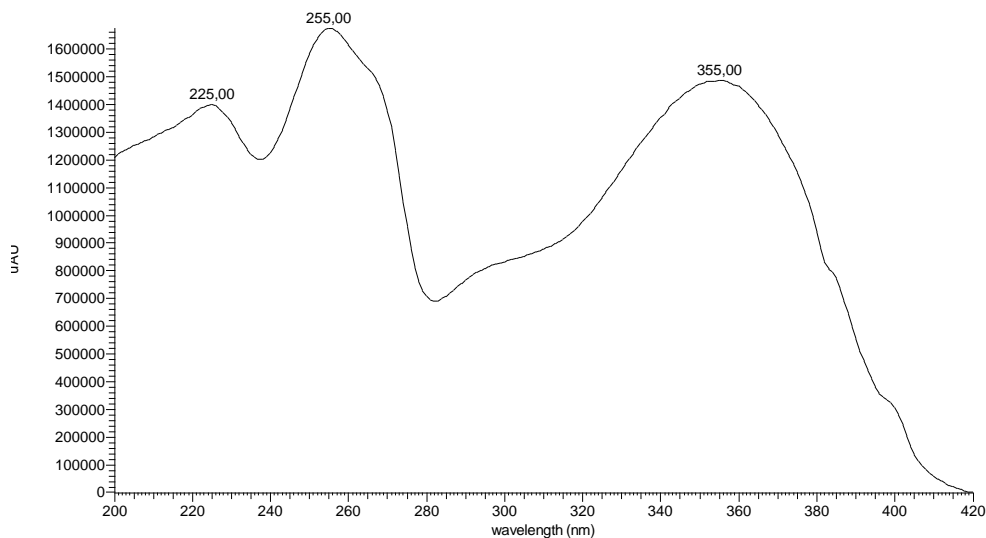


Figura 4.77. Espectro de **Bh9** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh9** (Figura 4.78) apresentou sinais na região de aromáticos, correspondentes aos encontrados em espectros de flavonoides. Foram visualizados dois dubletos, um em δ 6,83 ($\text{H5}'$, $J = 8,5$ Hz) e outro em δ 7,58 ($\text{H2}'$, $J = 2,0$ Hz) e um duplo dubleto em δ 7,52 ($\text{H6}'$, $J = 2,0$ e 8,5 Hz). Apresentou, também, dois dubletos em δ 6,19 (H6) e δ 6,36 (H8), ambos com $J = 1,5$ Hz, o que evidencia dois hidrogênios com acoplamento em *meta*. A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um dubleto em δ 5,24 ($J = 7,5$ Hz), que corresponde ao hidrogênio anomérico ($\text{H1}''$).

Os dados fornecidos pelos espectros gHMQC e gHMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e a previsão para os carbonos de **Bh9**, já que não foi obtido o espectro de ^{13}C (Figura 4.79 e 4.80; Tabela 4.12). Através da análise do espectro gHMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,19 na posição 6, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 93,48 (C8), δ 161,34 (C5), δ 165,39 (C7) e δ 103,60 (C10). Confirmou-se, também, a posição do hidrogênio em δ 6,36 na posição 8, devido à correlação deste com os sinais de carbonos δ 98,71 (C6), δ 165,39 (C7), δ 156,61 (C9) e δ 103,60 (C10).

No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,24 (H1'') e o carbono em δ 133,31 (C3). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 3.

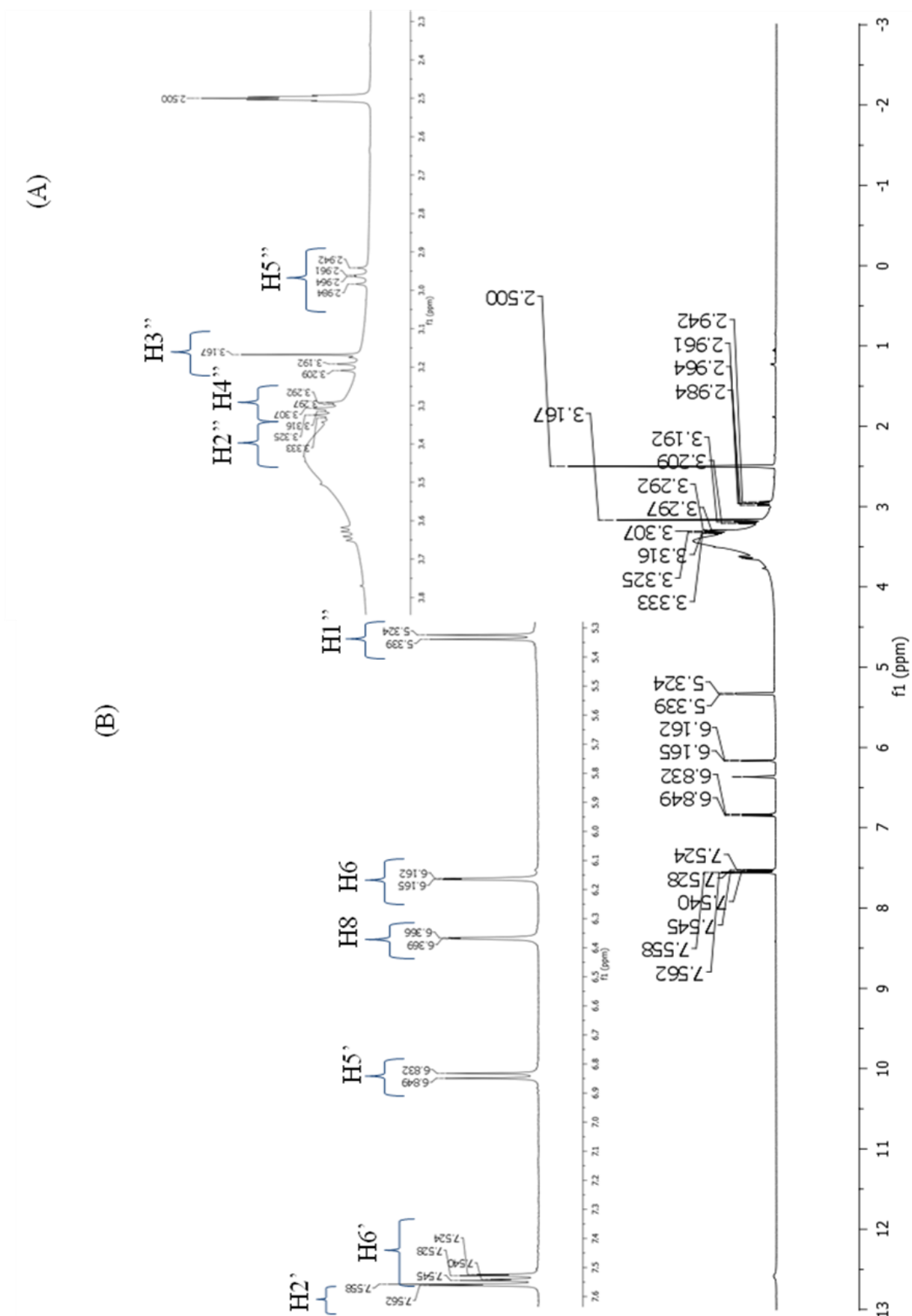


Figura 4.78. Espectro de RMN de ^1H de **Bh9** (DMSO- d_6 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 2,30 a δ 3,80; (B) Ampliação na região de δ 5,3 a δ 7,6.

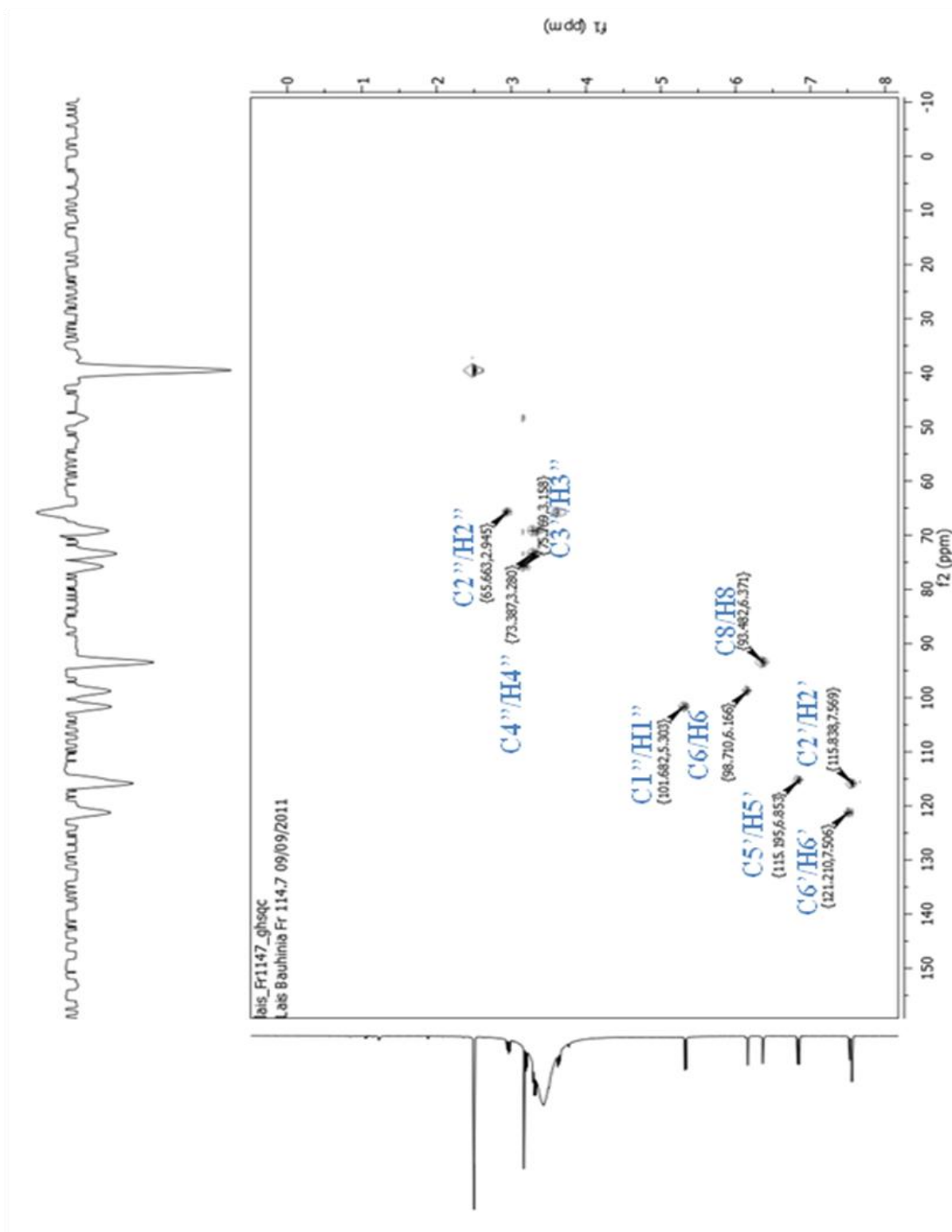


Figura 4.79. Experimento gHMQC de Bh9 (DMSO-d₆; 11,7 T).

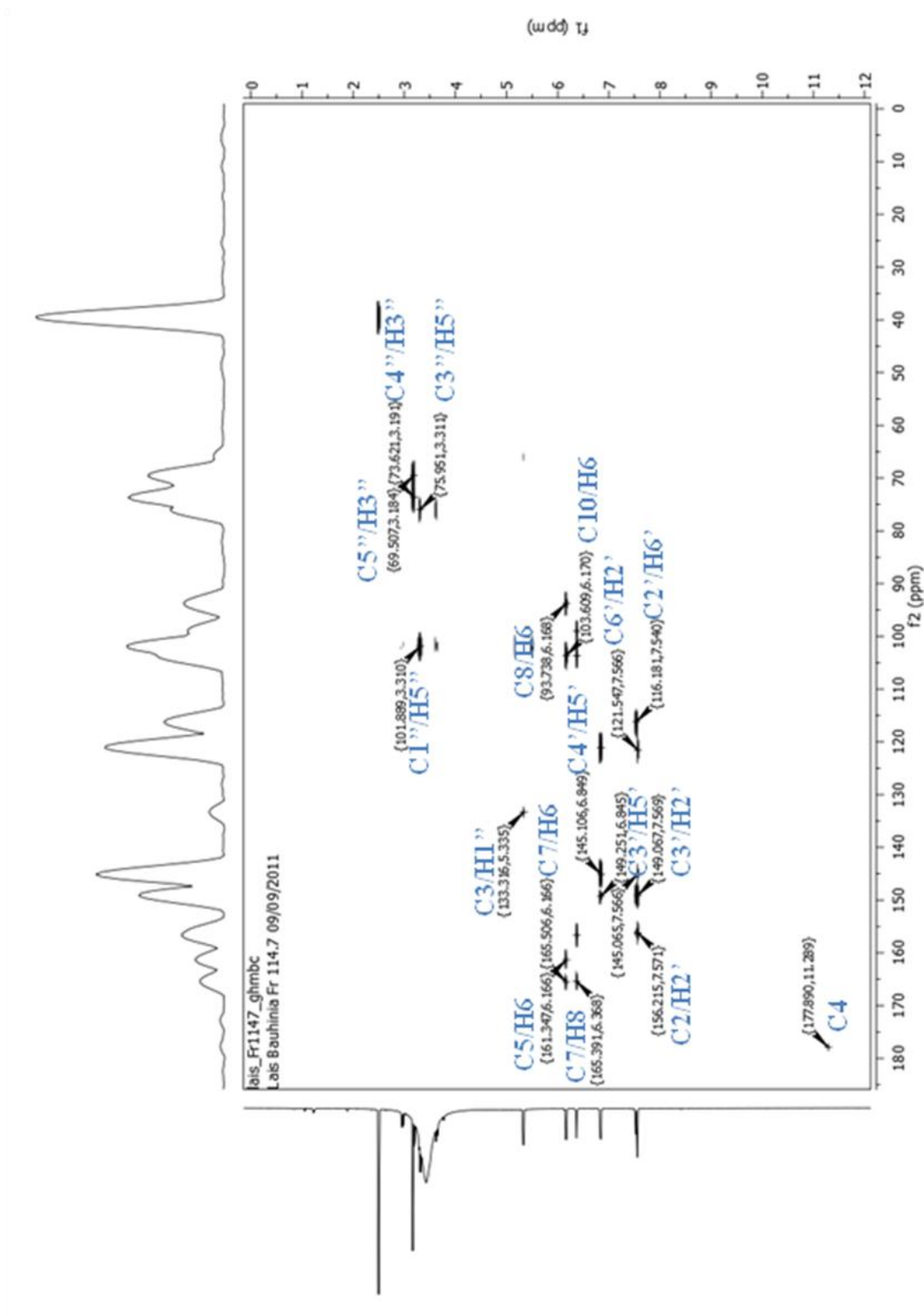


Figura 4.80. Experimento gHMBC de **Bh9** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

Tabela 4.12. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (DMSO- d_6 , 11,7 T) de **Bh9**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
2		156,35
3		133,31
4		177,89
5		161,34
6	6,19 (d, $J = 1,5$)	98,71
7		165,39
8	6,36 (d, $J = 1,5$)	93,48
9		156,61
10		103,60
1'		121,08
2'	7,58 (d, $J = 2,0$)	115,83
3'		149,06
4'		145,06
5'	6,83 (d, $J = 8,5$)	115,19
6'	7,52 (dd, $J = 2,0; 8,5$)	121,21
Xilose		
1''	5,24 (d, $J = 7,5$)	101,68
2''	2,94 (dd, $J = 9,5; 11,0$)	65,66
3''	3,16 (t, $J = 1,5$)	75,76
4''	3,29 (m)	73,38
5''	3,31 (m)	69,15

Os dados obtidos, comparados com a literatura, permitiram a identificação de **Bh9** como sendo quercetina-3-*O*- β -D-xilopiranosídeo (MABRY et al., 1970; HARBORNE, 1994; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). (Figura 4.81).

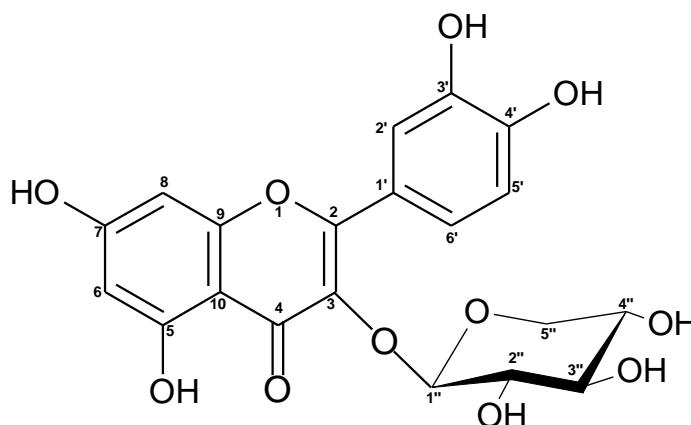


Figura 4.81. Estrutura química de **Bh9**.

Elucidação estrutural de **Bh11**

A fração 47 foi submetida a várias etapas de recristalização. Após a limpeza total dos cristais, obteve-se 38,0 mg da substância **Bh11** (Fração 47).

No espectro de massas de primeira ordem de **Bh11** (obtido por FIA-APCI-IT-MS/MSⁿ, modo positivo) (Figura 4.82) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 330, sugerindo a presença de um átomo de nitrogênio na molécula. Através da análise do espectro de segunda e terceira ordens (Figura 4.83), foram observados fragmentos significativos em m/z 312 $[M + H - H_2O]^+$, sugerindo a perda de uma unidade de H_2O e em m/z 168 $[M - 162 - H]^+$ sugerindo a perda de uma unidade de hexosídeo. Esse padrão de fragmentação sugere a presença de um glicosídeo cianogênico, previamente isolado em *Bauhinia fassoglensis* (FORT et al., 2001).

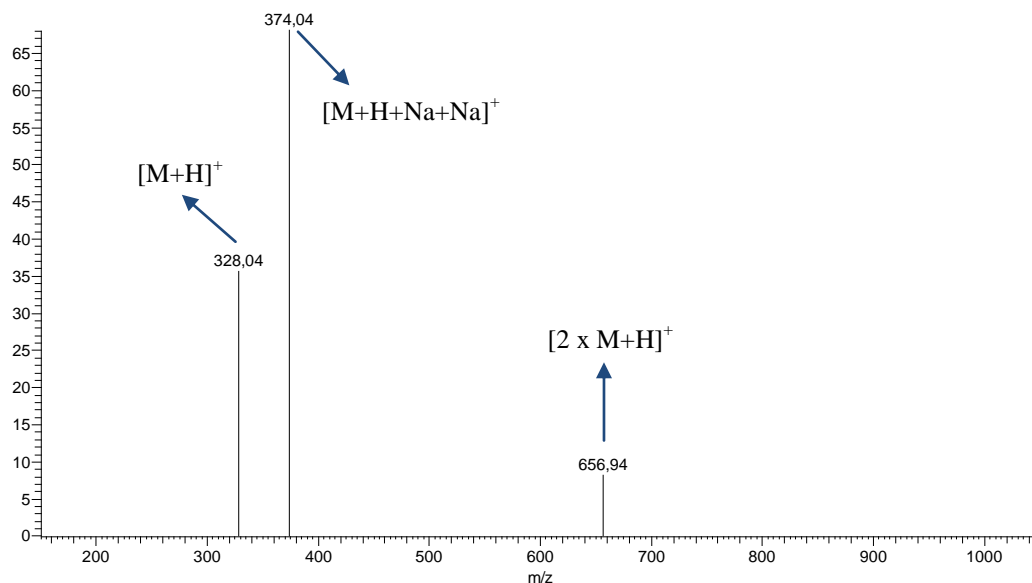


Figura 4.82. Espectro de massas de primeira ordem (modo *full-scan*) de **Bh11**, analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).

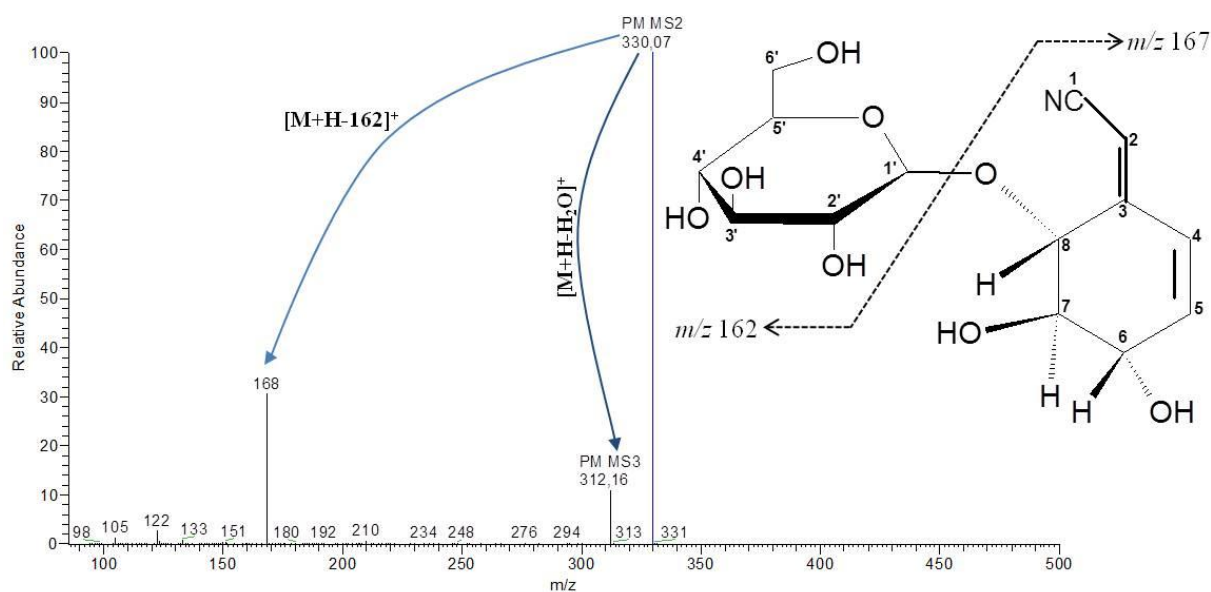


Figura 4.83. Espectro de massas de segunda e terceira ordens de **Bh11**, analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).

No espectro de absorção de **Bh11** na região do UV (Figura 4.84) foi observada uma banda intensa em 258 nm, compatível com o encontrado na literatura para glicosídeos cianogênicos (SOSA et al., 1976, WU et al., 1979; HAN et al., 2001).

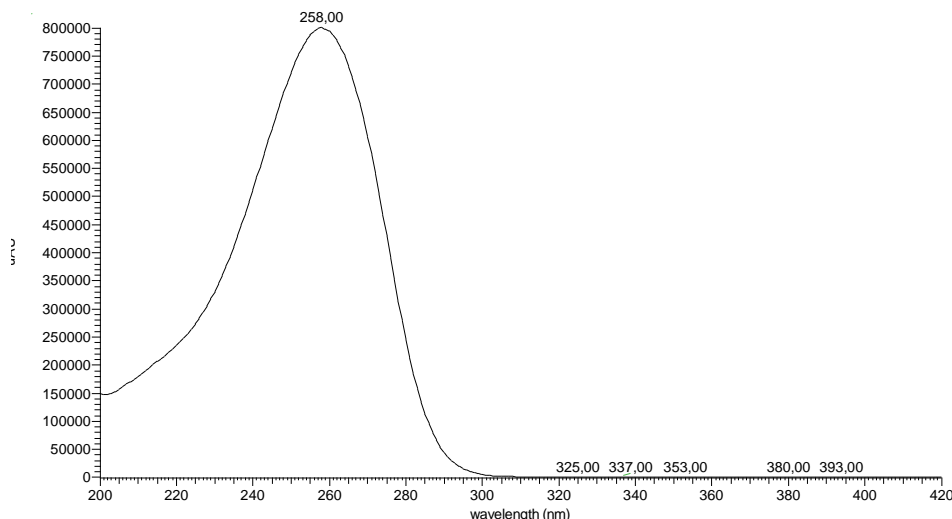


Figura 4.84. Espectro de **Bh11** obtido por espectroscopia na região do UV.

O perfil do espectro de RMN ^1H de **Bh11** (Figura 4.85) apresentou sinais de três hidrogênios olefínicos correspondentes aos encontrados na literatura para glicosídeos cianogênicos (SOSA et al., 1976, WU et al., 1979; HAN et al., 2001). Foi visualizado um dubleto em δ 6,21 (H4, $J = 10,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ 6,28 (H5, $J = 2,5$ e $10,0$ Hz). Apresentou, também, dois sinais sobrepostos em δ 5,51 (H1', anomérico, *overlap*) e δ 5,58 (H2, *overlap*); dois multipletos em δ 4,11 (H6, *overlap*) e δ 3,91 (H7); e outro sinal sobreposto em δ 4,16 (H8, *overlap*). A presença de uma unidade de açúcar foi verificada devido à presença de um tripleto em δ 4,32 (H2', $J = 8,0$ Hz); dois multipletos em δ 4,42 (H3') e δ 4,68 (H4'); um dubleto em δ 5,20 (H5', $J = 8,5$) e dois duplos dubletos em δ 4,22 (H6b', $J = 6,0$ e $12,0$ Hz) e δ 4,47 (H6a', $J = 1,5$ e $12,0$ Hz).

Os dados fornecidos pelos espectros gHMBC e gHMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh11** (Figura 4.86, 4.87 e 4.88; Tabela 4.13). Através da análise do espectro gHMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 6,21 na posição 4, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 97,04 (C2), δ 156,50 (C3), δ 71,67 (C6) e δ 78,32 (C7). No espectro gHMBC, também foram observadas correlações entre o

sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,51 (H1') e o carbono em δ 78,424 (C8). Com isso, pode-se propor que o açúcar está ligado na posição 8.

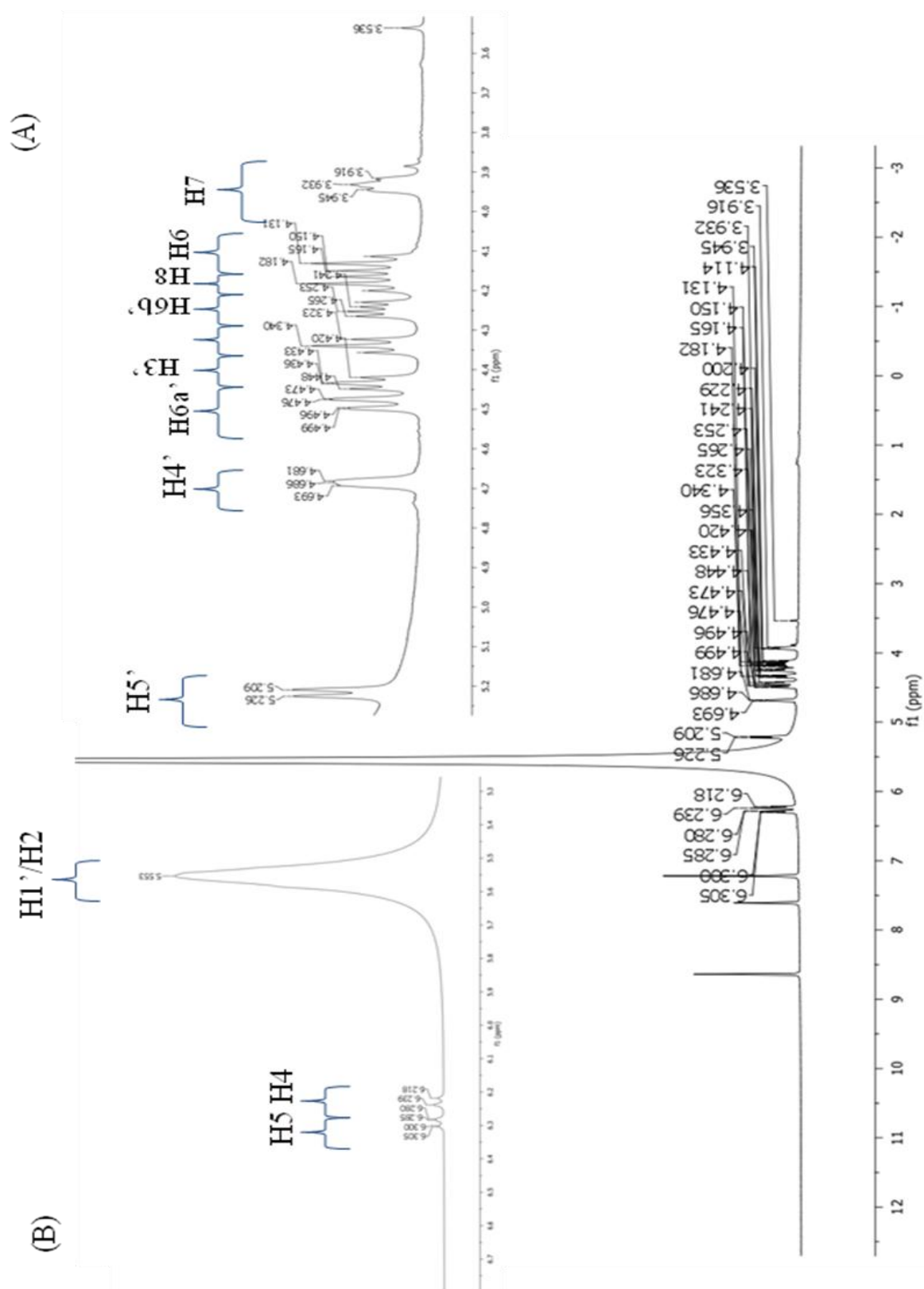


Figura 4.85. Espectro de RMN de ^1H de **Bh11** (Piridina- d_5 ; 11,7 T). (A) Ampliação na região de δ 3,60 a δ 5,20; (B) Ampliação na região de δ 5,3 a δ 6,7.

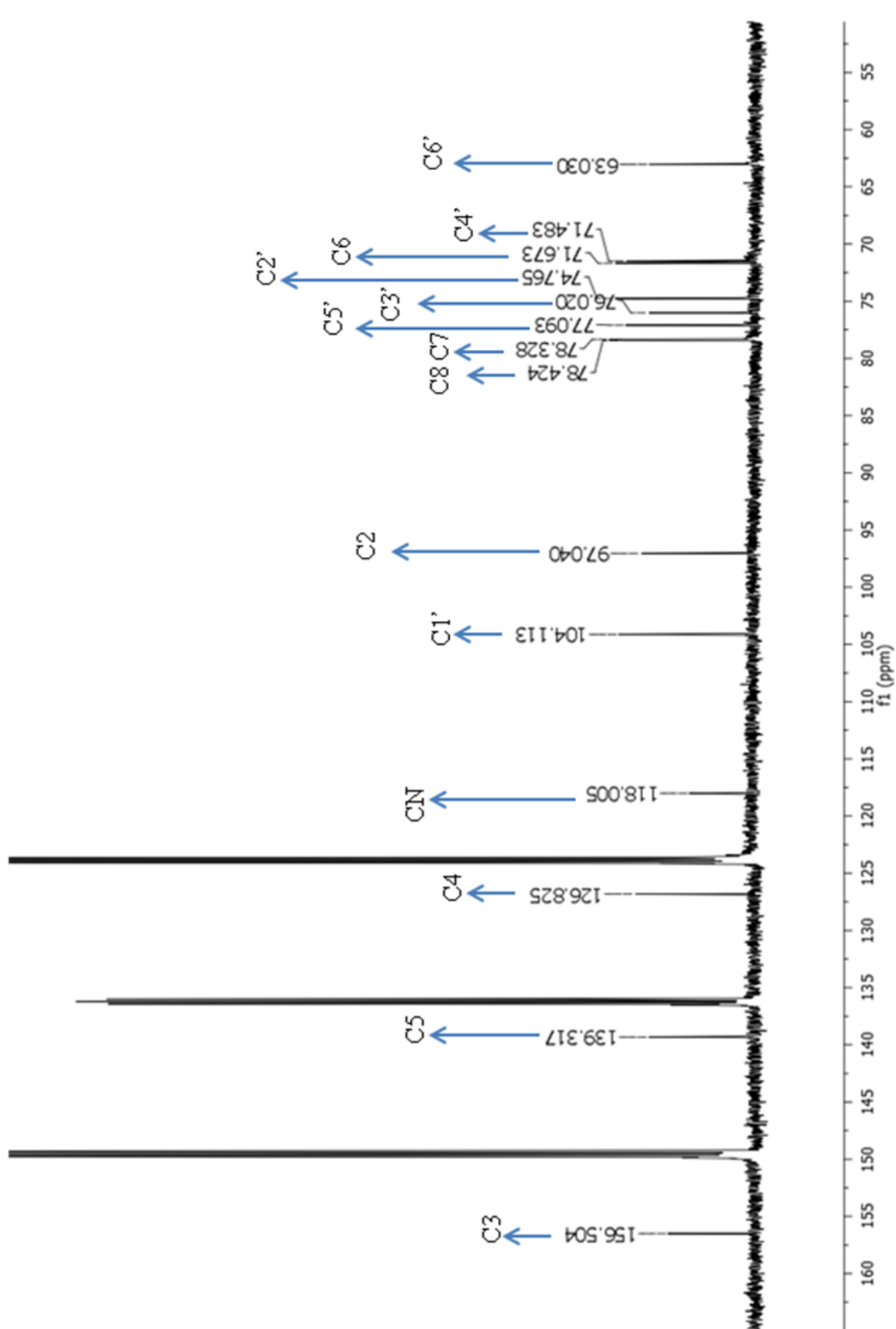


Figura 4.86. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh11** (Piridina- d_5 ; 11,7 T).

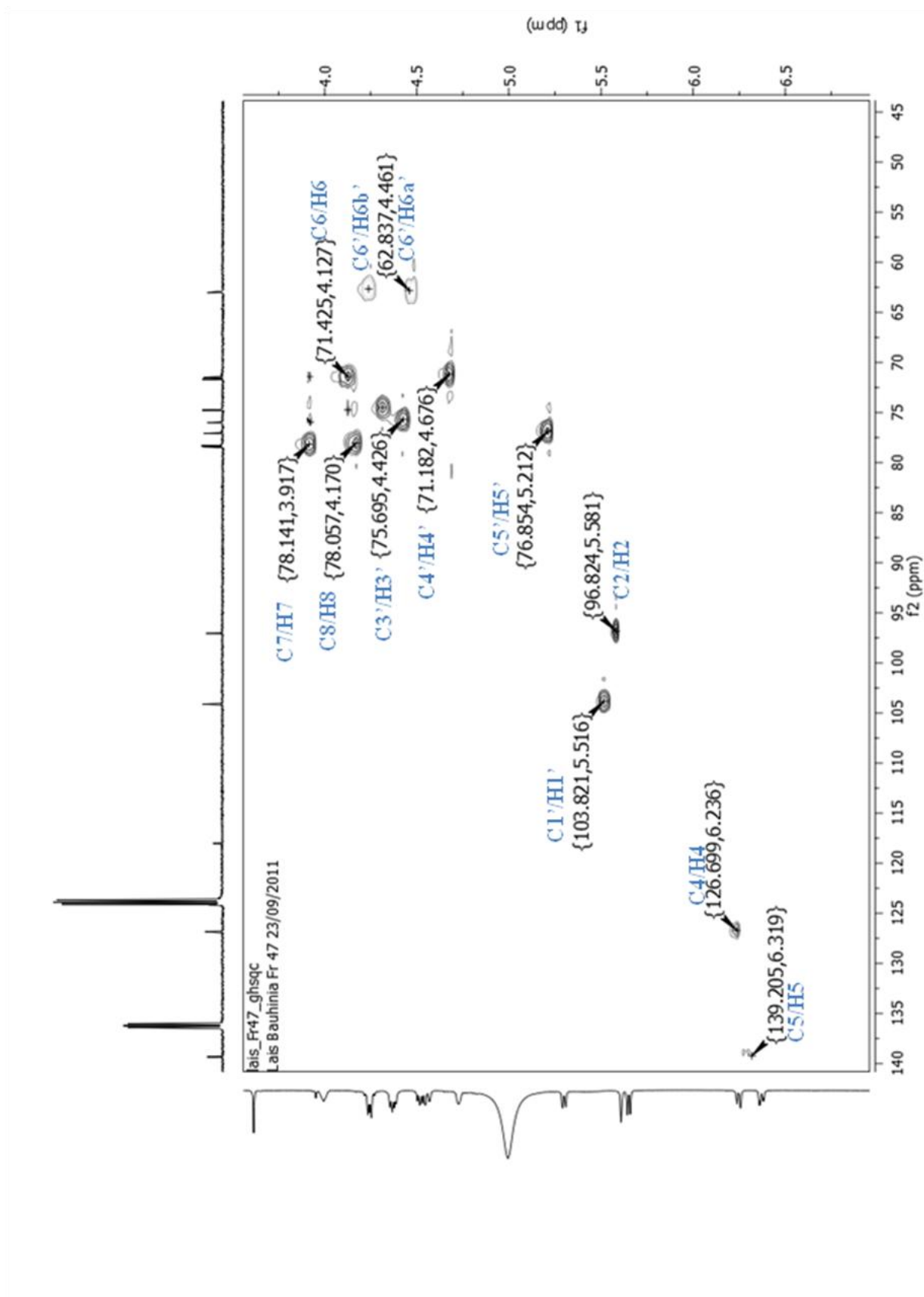


Figura 4.87. Experimento gHSQC de Bh11 (Piridina-d₅; 11,7 T).

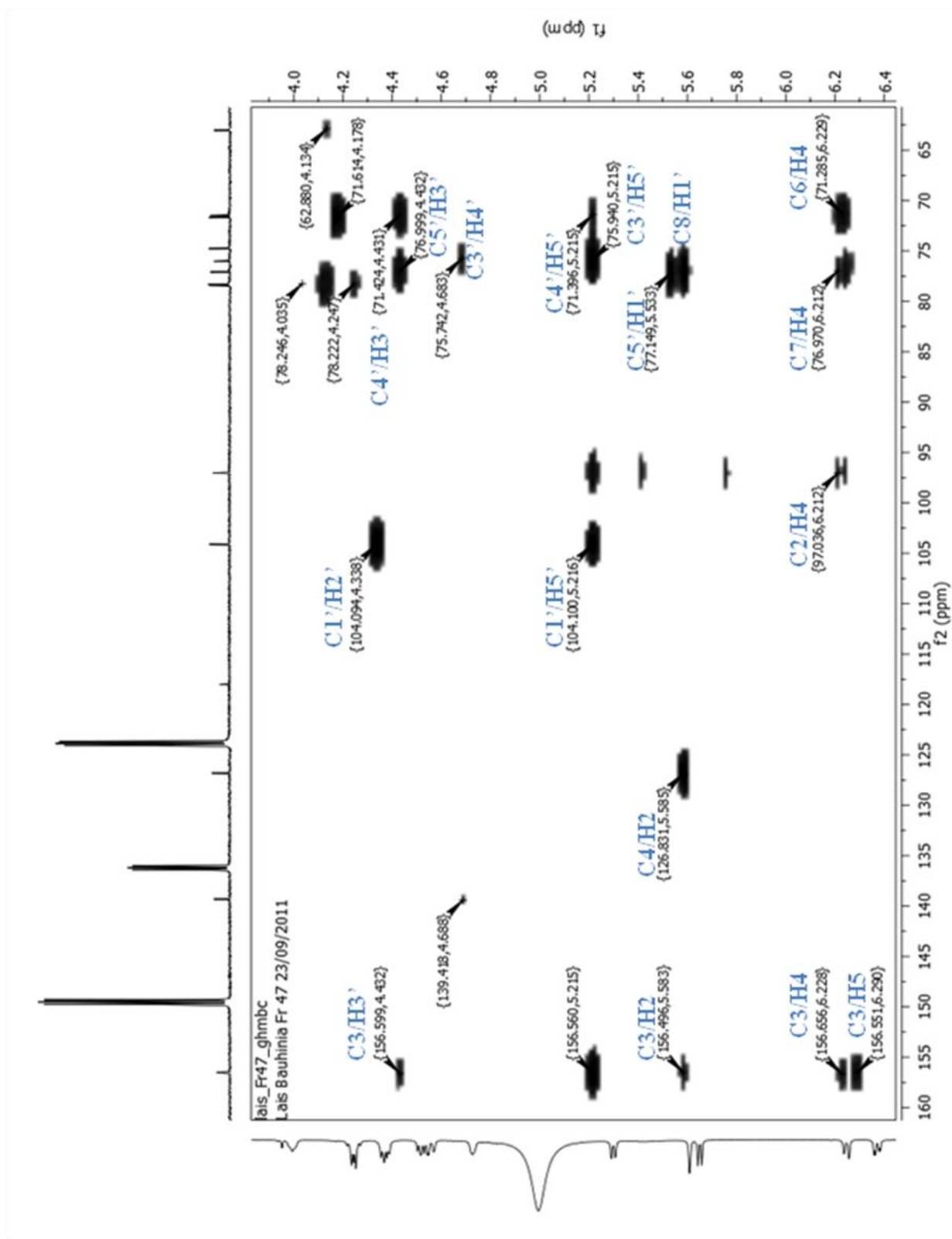
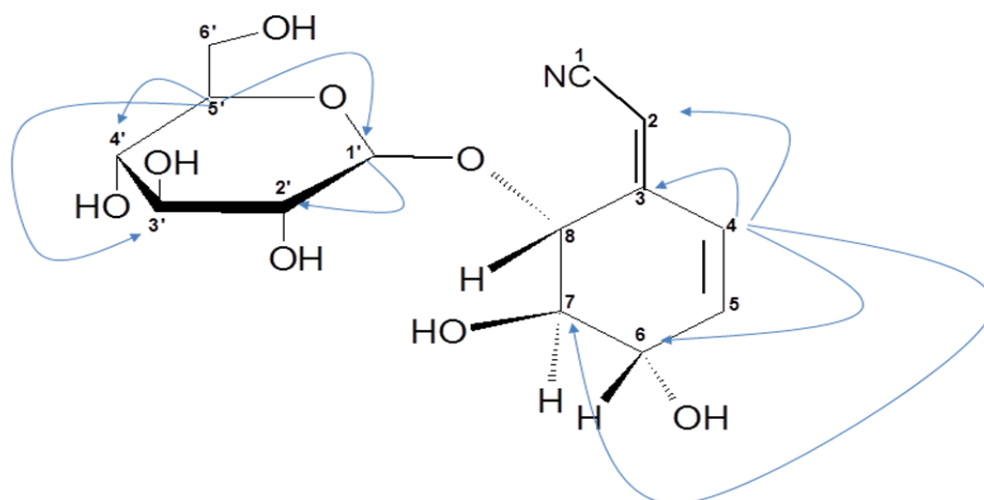


Figura 4.88. Experimento gHMBC de **Bh11** (Piridina- d_5 ; 11,7 T).

Tabela 4.13. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (Piridina- d_5 , 11,7 T) de **Bh11**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
CN		118,00
2	5,58 (<i>overlap</i>)	97,04
3		156,50
4	6,21 (d, $J = 10,5$)	126,82
5	6,28 (dd, $J = 2,5; 10,0$)	139,31
6	4,11 (m, <i>overlap</i>)	71,67
7	3,91 (m)	78,32
8	4,16 (<i>overlap</i>)	78,42
Glicose		
1'	5,51 (<i>overlap</i>)	104,11
2'	4,32 (t, $J = 8,0$)	74,76
3'	4,42 (m)	776,02
4'	4,68 (m)	71,48
5'	5,20 (d, $J = 8,5$)	70,68
6a'	4,47 (dd, $J = 1,5; 12,0$)	63,03
6b'	4,22 (dd, $J = 6,0; 12,0$)	

Os dados obtidos, comparados com a literatura disponível (SOSA et al., 1976, WU et al., 1979; HAN et al., 2001), permitiram a identificação de **Bh11** como sendo o lithospermosídeo (grifonina) (Figura 4.89).

**Figura 4.89.** Estrutura química de **Bh11**. Legenda: setas azuis indicam a correlação observada no experimento de gHMBC.

Elucidação estrutural de Bh12

A fração 55 (90,1 mg) foi submetida à separação cromatográfica por CC de sílica-gel, fornecendo 5,2 mg da substância **Bh12** (55.8).

No espectro de massas de primeira e segunda ordens de **Bh12** (Figura 4.90) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 183. Foi observado, também, um fragmento significativo em m/z 153 $[M + H - 30]^+$, em m/z 205 $[M + H + Na]^+$ e em m/z 223 $[M + H + K]^+$. Os dados obtidos no espectro de MS sugerem a presença de uma lactona, previamente isolada em *Bauhinia championii* (CHEN et al., 1985) e *B. aurea* (SHANG et al., 2012).

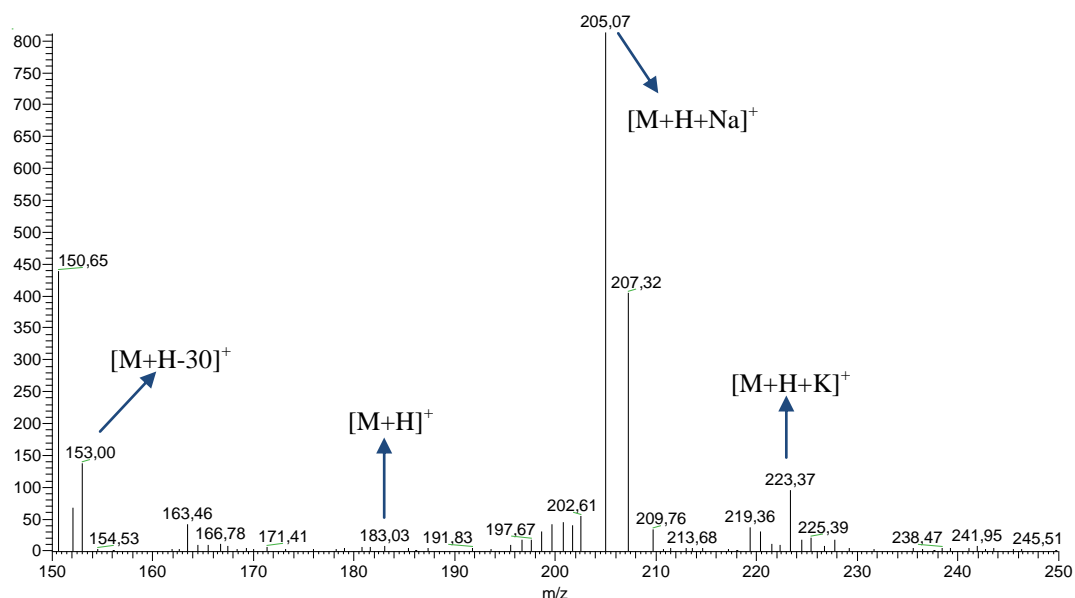


Figura 4.90. Espectro de massas de primeira e segunda ordens de **Bh12**, analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).

O perfil do espectro de RMN 1H de **Bh12** (Figura 4.91) apresentou sinais de três hidrogênios olefínicos correspondentes aos encontrados na literatura para lactonas (CHEN et al., 1985; SHANG et al., 2012). Foram visualizados dois duplo dubletos, um em δ 6,56 (H2, $J = 2,5$ e $10,0$ Hz) e outro em δ 6,21 (H3, $J = 2,0$ e $10,0$ Hz); um dubleto em δ 4,17 (H4, $J = 7,5$ Hz). Apresentou, também, um dubleto em δ 5,95 (H7, $J = 1,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ

4,86 (H6=H8, $J = 2,0$ e $10,5$ Hz). Um singlete intenso δ 3,34 confirmou a presença de metoxila.

Os dados fornecidos pelos espectros *g*HMQC e *g*HMBC possibilitaram a atribuição dos hidrogênios e carbonos de **Bh12** (Figura 4.92, 4.93 e 4.94; Tabela 4.14). Através da análise do espectro *g*HMBC confirmou-se a posição do hidrogênio em δ 4,17 na posição 4, devido à correlação deste com os sinais de carbonos em δ 119,05 (C2) e em δ 144,38 (C3). No espectro *g*HMBC, também foram observadas correlações entre o sinal do carbono 1 (C1) em δ 163,35 (H1') e os hidrogênios em δ 6,56 (H2), em δ 6,21 (H3), em δ 4,86 (H6; H8) e em δ 5,95 (H7). Observou-se, também, correlação entre a metoxila (OMe) com o carbono em δ 71,82. Com isso, pode-se propor que a OMe está ligada na posição 4.

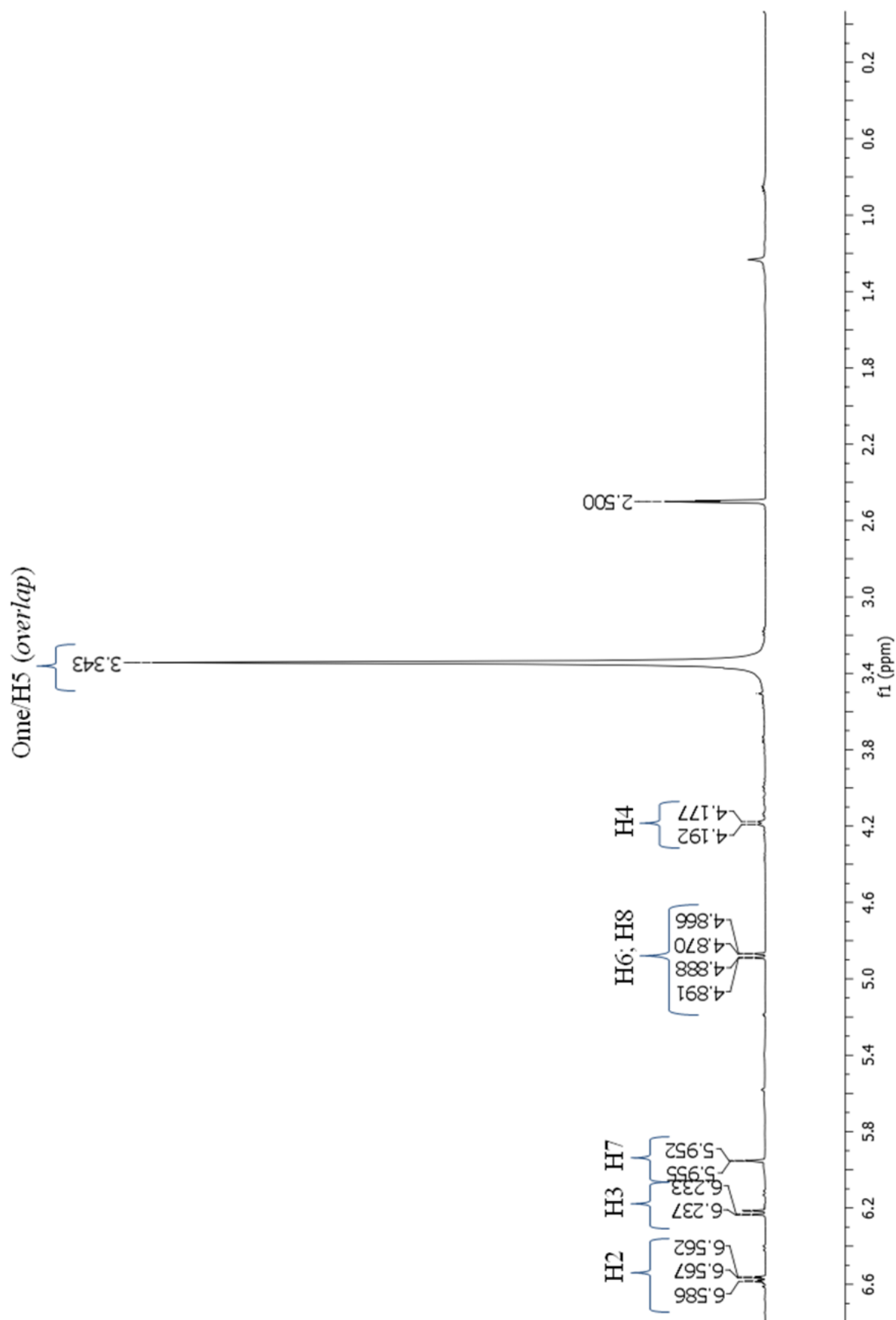


Figura 4.91. Espectro de RMN de ^1H de **Bh12** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

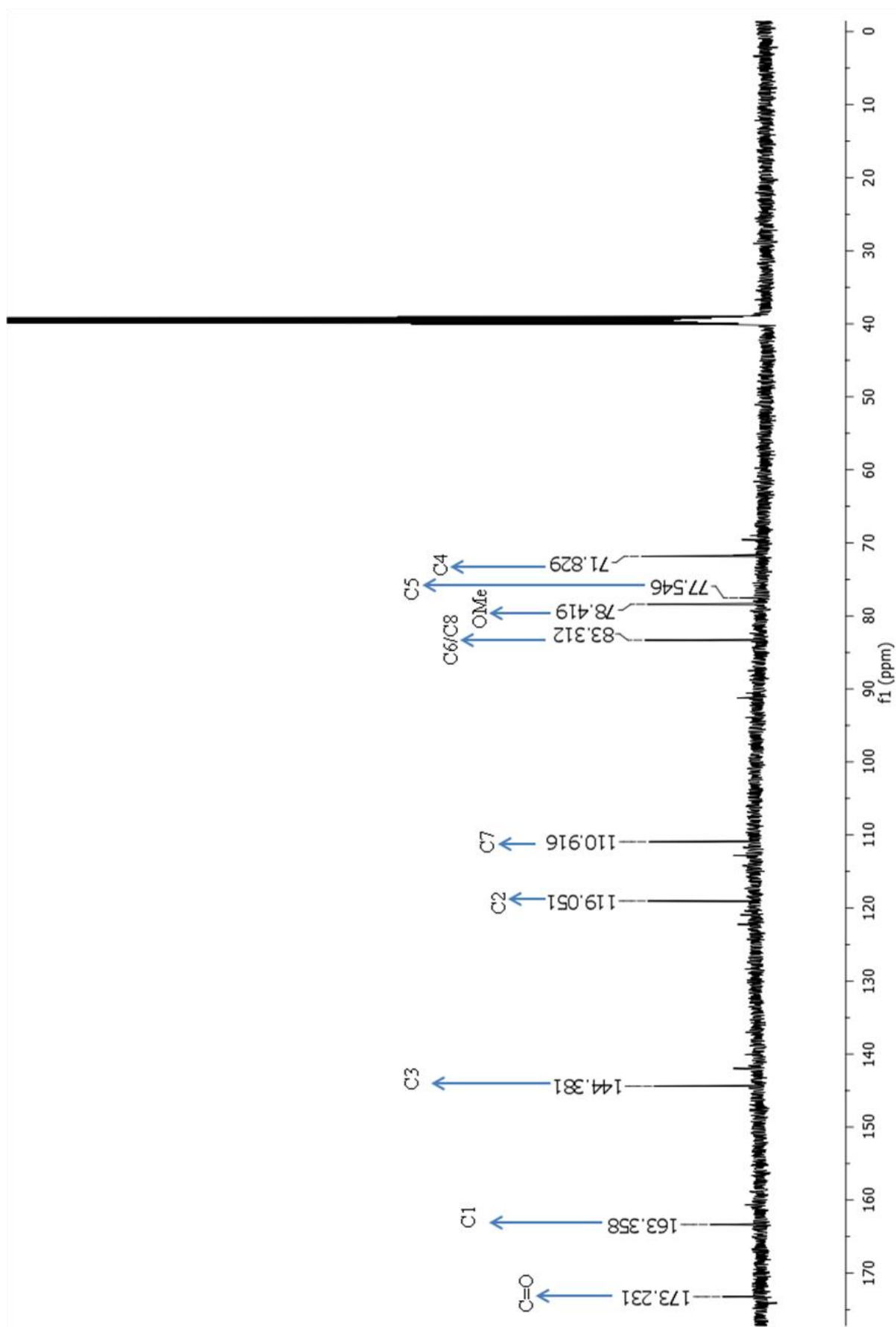


Figura 4.92. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh12** (DMSO-d_6 ; 11,7 T).

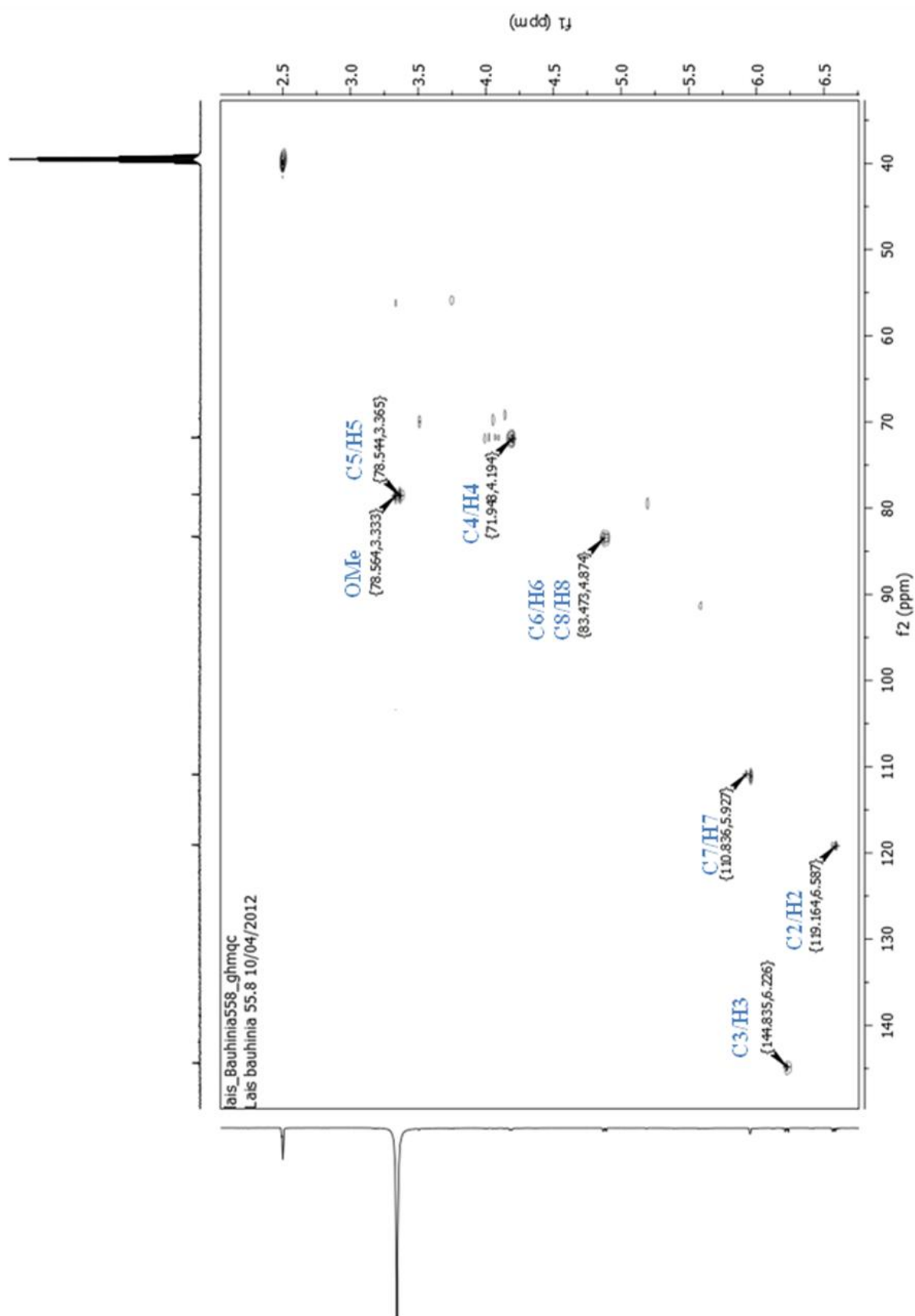


Figura 4.93. Experimento gHSQC de **Bh12** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

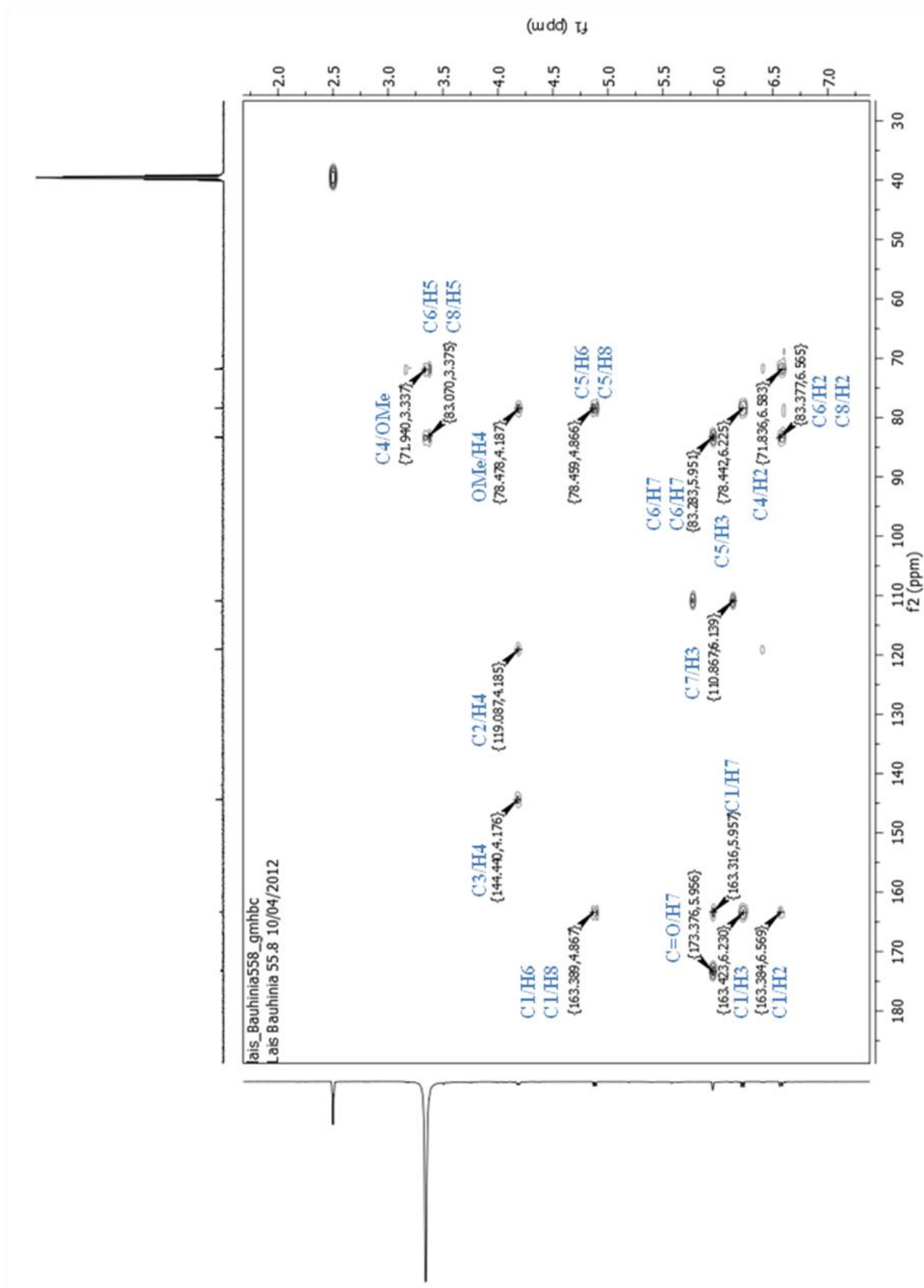
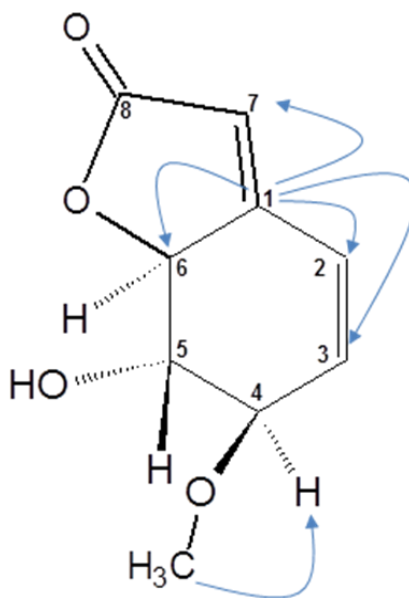


Figura 4.94. Experimento gHMBC de **Bh12** (DMSO- d_6 ; 11,7 T).

Tabela 4.14. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T) de **Bh12**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
1		163,35
2	6,56 (dd, $J = 2,0; 10,0$)	119,05
3	6,21 (dd, $J = 2,0; 10,0$)	144,38
4	4,17 (d, $J = 7,5$)	71,82
5	3,36 (s, overlap)	77,54
6	4,86 (dd, $J = 2,0; 10,5$)	83,31
7	5,95 (d, $J = 1,5$)	110,91
8	4,86 (dd, $J = 2,0; 10,5$)	83,31
C=O		173,23
OMe	3,34 (s)	78,41

Os dados obtidos, comparados com a literatura disponível (CHEN et al., 1985; SHANG et al., 2012), permitiram a identificação de **Bh12** como sendo bauginilídeo (Figura 4.95).

**Figura 4.95.** Estrutura química de **Bh12**. Legenda: setas azuis indicam a correlação observada no experimento de gHMBC.

Elucidação estrutural de Bh13

A fração 36 (247,2 mg) foi submetida à separação cromatográfica por CC de sílica-gel, fornecendo 10,1 mg da substância **Bh13** (36.6).

No espectro de massas de primeira e segunda ordens de **Bh13** (Figura 4.96) foi observado o pico correspondente ao íon precursor da molécula protonada $[M + H]^+$ em m/z 341. Foi observado, também, um fragmento significativo em m/z 323 $[M + H - H_2O]^+$, em m/z 309 $[M + H - CH_2]^+$ e em m/z 267 $[M + H - 4CH_2]^+$. Os dados obtidos no espectro de MS sugerem a presença de um hidrocarboneto linear, previamente isolado em *Bauhinia microstachya* (BIANCO & SANTOS, 2003).

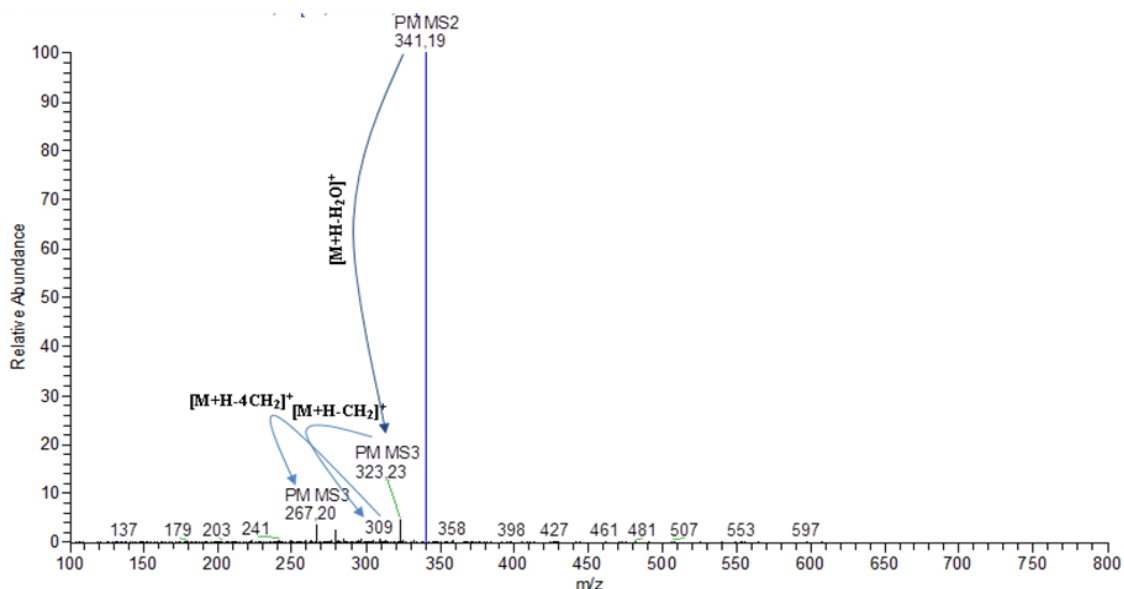


Figura 4.96. Espectro de massas de primeira e segunda ordens de **Bh13**, analisado em modo positivo. Condições (ver material e métodos).

O perfil do espectro de RMN 1H de **Bh13** (Figura 4.97, Tabela 4.15) apresentou um singlete largo e intenso em δ 1,25 representando uma larga cadeia de CH_2 e um multipeto em δ 0,80 atribuído ao CH_3 terminal. O perfil do espectro de RMN ^{13}C (Figura 4.98, Tabela 4.15) de **Bh13** apresentou sinais em δ 12,02 (CH_3), em δ 23,24 ($\alpha-CH_2$) e em δ ($\beta-CH_2$).

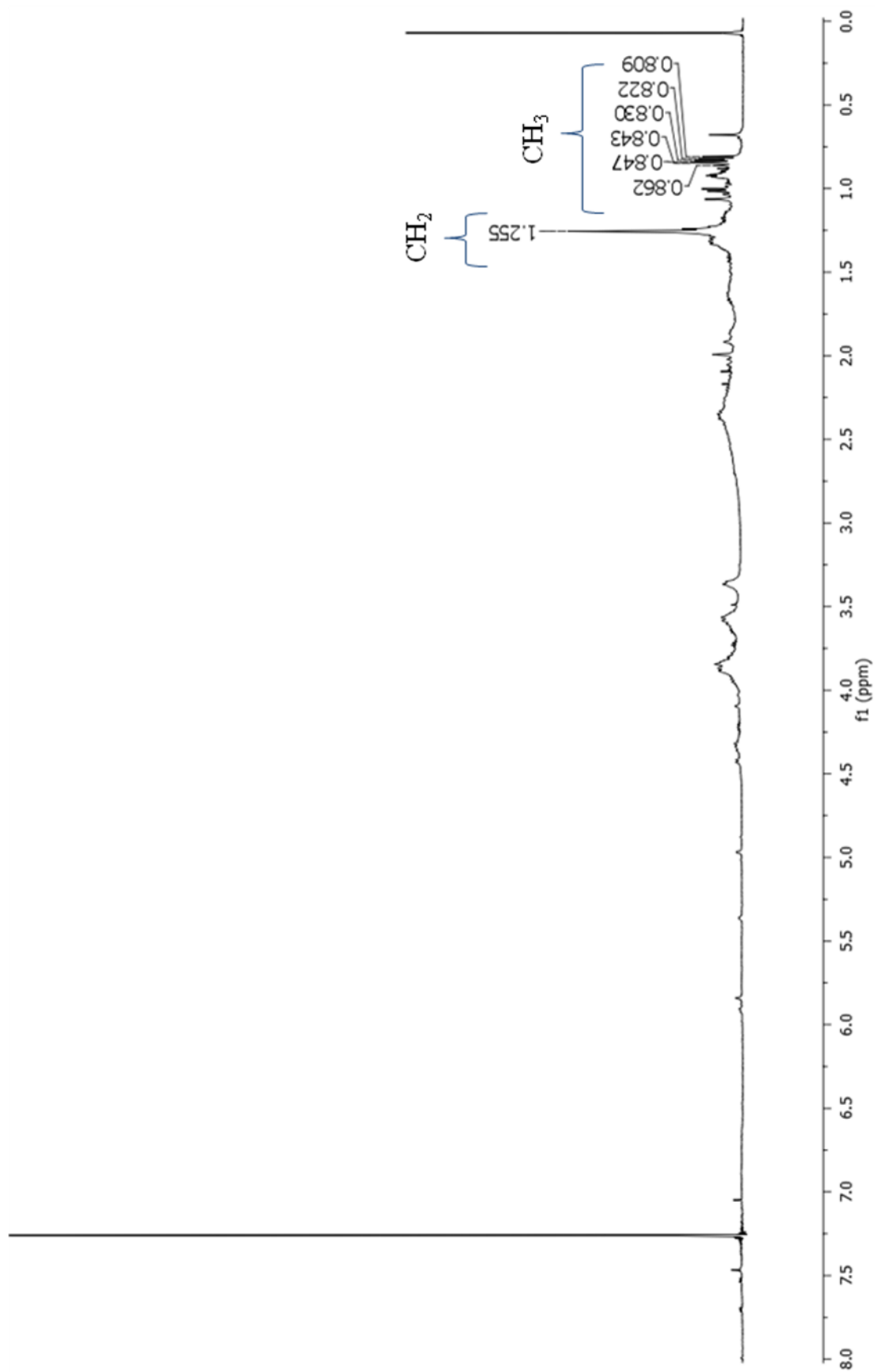


Figura 4.97. Espectro de RMN de ^1H de **Bh13** (CDCl_3 ; 11,7 T).

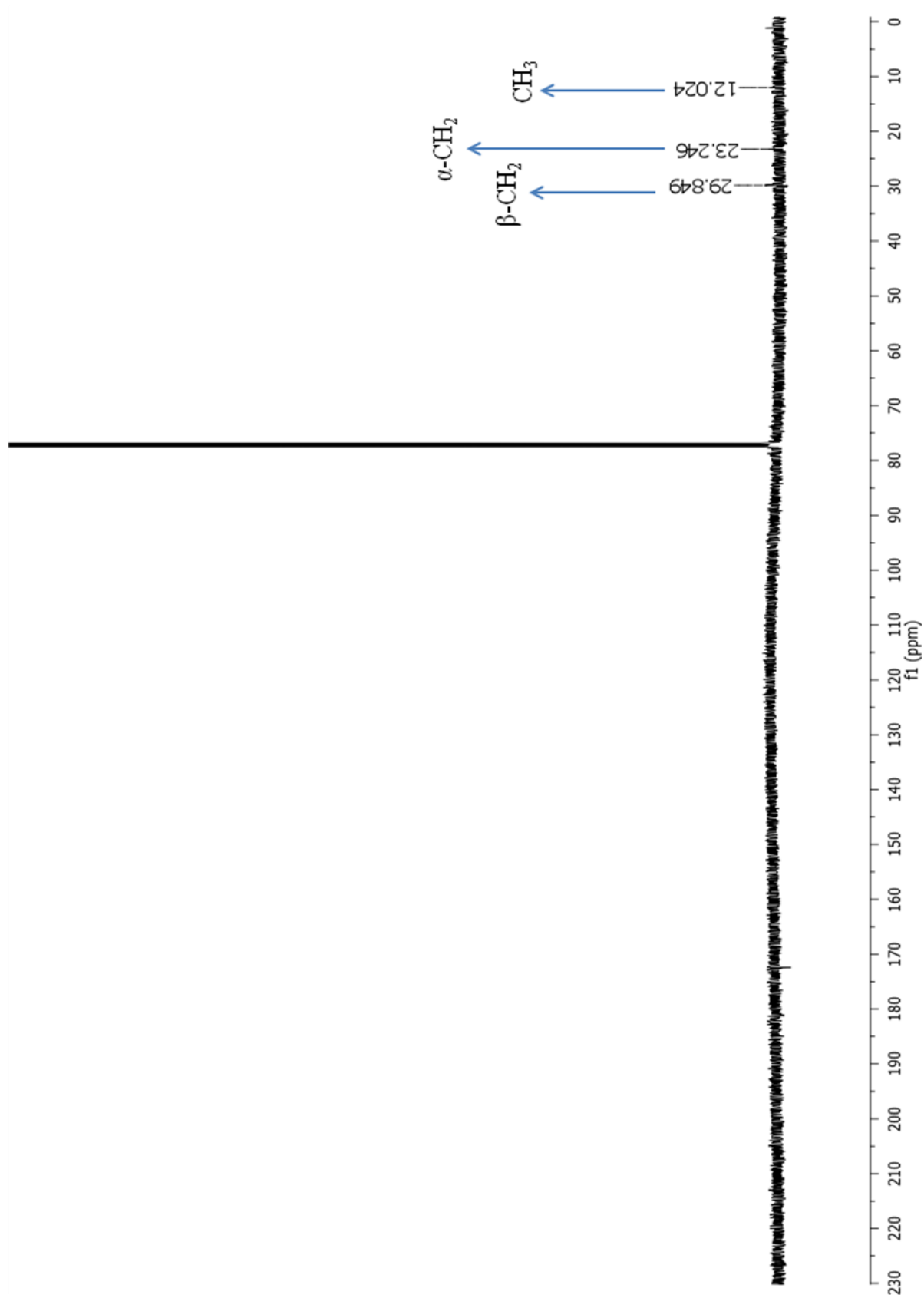
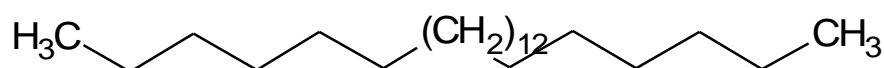


Figura 4.98. Espectro de RMN de ^{13}C de **Bh13** (CDCl_3 ; 11,7 T).

Tabela 4.15. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C (CDCl_3 , 11,7 T) de **Bh13**.

<i>Posições</i>	^1H	^{13}C
CH_3	0,80	12,02
$\alpha\text{-CH}_2$	1,25	23,24
$\beta\text{-CH}_2$	1,25	29,84

Os dados obtidos, comparados com a literatura disponível (BIANCO & SANTOS 2003; SILVERSTEIN et al., 2005, KUROSU et al., 2000), sugerem a identificação de **Bh13** como sendo o hidrocarboneto linear tetracosano ($\text{C}_{24}\text{H}_{50}$) (Figura 4.99).

**Figura 4.99.** Estrutura química de **Bh13**.

5. HPLC-ESI-IT-MS E FIA-EIS-IT-MS/MS^N DA FRAÇÃO *n*-BUTANÓLICA DE *B. holophylla*

A análise de misturas usando técnicas cromatográficas tem uma longa história na química de produtos naturais. O acoplamento entre cromatógrafo líquido e espectrômetro de massas (HPLC-MS) é muito utilizado na caracterização dos constituintes químicos dos extratos de plantas e traz uma economia de tempo na análise de um extrato vegetal, pois evita o isolamento dos constituintes químicos. Devido à grande sensibilidade, esse sistema muitas vezes consegue detectar compostos minoritários difíceis de serem isolados por técnicas clássicas de fitoquímica, além da quantidade de amostra necessária para a caracterização ser consideravelmente menor se comparada com a técnica de RMN, por exemplo (ZHOU et al, 1996; CSEKE et al., 2006).

A utilização de técnicas hífenadas na detecção de metabólitos secundários em um extrato bruto de planta tem sido aplicada como a “impressão digital” do extrato, ajudando

na identificação e autenticidade deste, além de proporcionar a identificação de possíveis adulterantes desses extratos (HOSTETTMANN et al., 2003).

Preparo da amostra

A fração *n*-BuOH (10,0 mg) foi submetida a um *clean-up* em cartucho Sep-Pak RP₁₈ eluído com MeOH : H₂O (1:1; v:v) . O eluato foi analisado por HPLC-ESI-IT-MS [Accela High Speed LC: Thermo Cientific[®], acoplado a Accela: Thermo Cientific[®] LCQ Fleet com Ion Trap 3D e ionização por *electrospray*; condições (Tabela 5.1)] e FIA-ESI-IT-MS/MSⁿ no modo negativo (Figura 5.1).

Tabela 5.1. Gradiente de eluição empregado na separação por HPLC-UV-PDA dos metabólitos encontrados no EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

Tempo (min)	Água + Ácido acético 0,1% (%)	MeOH + Ácido acético 0,1% (%)
0	75	25
20	50	50
40	30	70
70	0	100

Fragmentações no modo tandem auxiliaram a propor a presença de ácidos fenólicos e flavonóides. A tabela 5.2 mostra os compostos identificados com o auxílio da técnica de HPLC-ESI-IT-MS/MSⁿ. Destes, três são derivados da miricetina, cinco são derivados da quercetina, um derivado da luteolina, um derivado do kaempferol e três agliconas. Os compostos **1, 4, 5, 6, 8, 9, 12 e 13** foram isolados a partir do fracionamento por GPC da fração *n*-BuOH e identificados também por RMN.

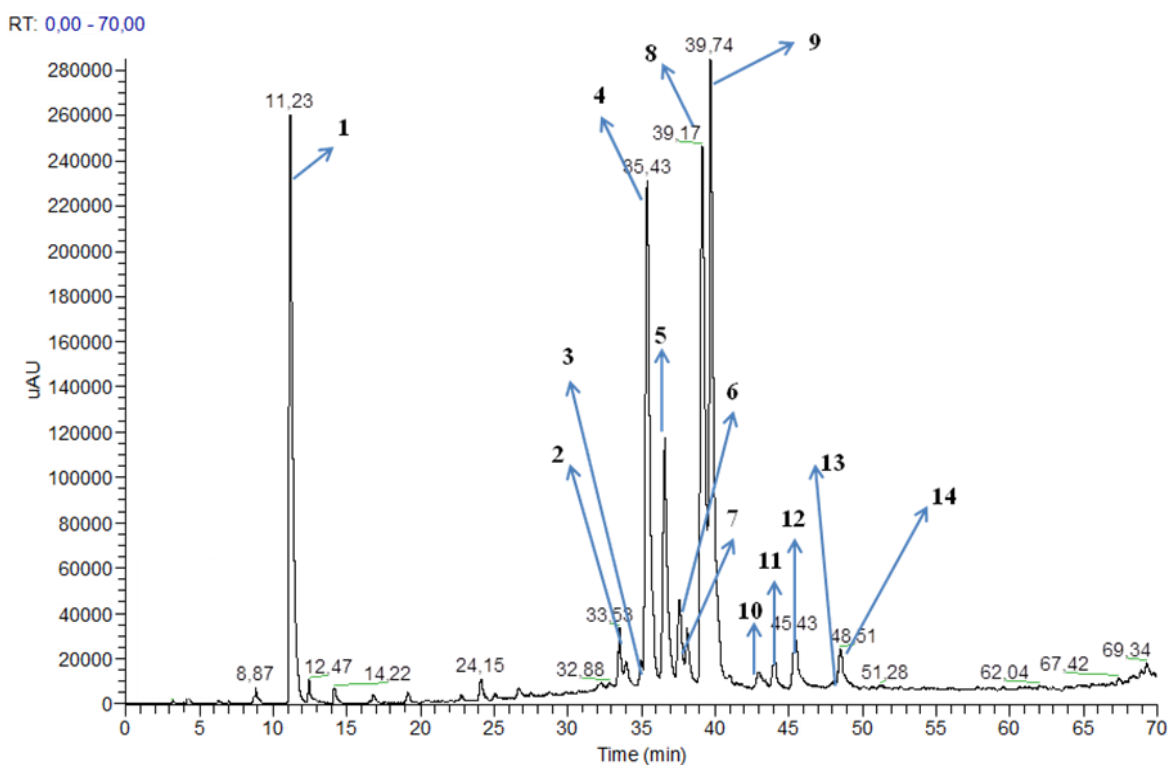


Figura 5.1. HPLC-ESI-IT-MS da fração *n*-BuOH de *B. holophylla*. (Coluna Phenomenex® Luna C₁₈, 250 x 4,6 mm i.d., 5µm; fase móvel: água ultra pura + ácido acético 0,1% (**A**) e MeOH + ácido acético 0,1% (**B**); gradiente: 25% to 100% de **B** em **A** em 70 minutos; volume de injeção: 20,0 µL; fluxo: 0,8 mL.min⁻¹, λ=254nm).

Tablela 5.2. Compostos identificados da fração *n*-BuOH das folhas de *B. holophylla* por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-EIS-IT-MS/MSⁿ.

Pico	Composto	R _t (min)	UV _{max}	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	Fragmentos importantes MS/MS (<i>m/z</i>)
1	Lithoespermosídeo (Grifonina)	11,23	259/ 207	328,0	374,0/ 364,4/ 167,5
2	Miricetina- <i>O</i> -hexosídeo	33,53	358/ 308 ^{sh} /263	479,3	958/ 316,7
3	Miricetina- <i>O</i> -pentosídeo	35,08	363/268	449,1	898,5/ 316,9
4	Miricetina-3- <i>O</i> - α -L- rhamnopiranosídeo	35,43	354/ 256	463,8	317,5
5	Quercetina-3- <i>O</i> - β -D- galactopiranosídeo	36,60	354/ 303 ^{sh} / 255	463,8	301,2
6	Quercetina-3- <i>O</i> - β -D xilopiranosídeo	37,63	354/254	433,5	300,9
7	Quercetina- <i>O</i> - pentosídeo	38,09	354/ 255	433,3	300,9
8	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L- arabinofuranosídeo	39,17	354/256	433,6	300,4
9	Quercetina-3- <i>O</i> - α -L- rhamnopiranosídeo	39,74	352/256	447,0	300,6
10	Kaempferol- <i>O</i> - pentosídeo	42,94	361/263	417,2	285,2
11	Luteolina- <i>O</i> - deoxihexose	44,02	343/267	431,5	285,3
12	Quercetina	45,43	370/255	301,3	602,7
13	Luteolina	47,99	350/253	285,3	571,6
14	Isorhamnetina	48,51	366/264	315,4	630,6

O pico **1** (R_t = 11,23 min) apresentou sinal do íon precursor da molécula desprotonada [M-H]⁻ em *m/z* 328,0. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de *m/z* 328,0 gerou o íon produto *m/z* 316,7 [M-162-H]⁻, correspondente à perda de uma unidade de hexosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 259 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como lithoespermosídeo (grifonina) (Figura 5.2, substância **1**).

O pico **2** ($R_t = 33,53$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 479,3. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 479,3 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 316,7 $[M-162-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de hexosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 358 nm; Banda II – 263 nm) sugere a presença da miricetina-*O*-hexosídeo (Figura 5.2, substância **2**).

O pico **3** ($R_t = 35,08$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 449,1. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 449,1 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 316,9 $[M-132-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de pentosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 363 nm; Banda II – 268 nm) sugere a presença da miricetina-*O*-pentosídeo (Figura 5.2, substância **3**).

O pico **4** ($R_t = 35,43$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 463,8. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 463,8 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 317,5 $[M-146-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de deoxihexosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 354 nm; Banda II – 256 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como miricetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (Figura 5.2, substância **4**).

O pico **5** ($R_t = 36,60$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 463,8. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 463,8 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 301,2 $[M-162-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de hexosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 354 nm; Banda II – 255 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como quercetina-3-*O*- β -D-galactopiranosídeo (Figura 5.2, substância **5**).

O pico **6** ($R_t = 37,63$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 433,5. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 433,5 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 300,9 $[M-132-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de pentosídeo. Esse padrão

de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 354 nm; Banda II – 254 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como quercetina-3-*O*- β -D-xilopiranosídeo (Figura 5.2, substância **6**).

O pico **7** ($R_t = 38,09$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 433,3. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 433,3 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 301,2 $[M-132-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de pentosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 354 nm; Banda II – 255 nm) sugere a presença da quercetina-*O*-pentosídeo (Figura 5.3, substância **7**).

O pico **8** ($R_t = 39,17$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 433,6. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 433,6 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 301,2 $[M-132-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de pentosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 354 nm; Banda II – 256 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como quercetina-3-*O*- α -L-arabinofuranosídeo (Figura 5.3, substância **8**).

O pico **9** ($R_t = 39,74$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 447,0. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 447,0 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 300,6 $[M-146-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de deoxihexosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 352 nm; Banda II – 256 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo (Figura 5.3, substância **9**).

O pico **10** ($R_t = 42,94$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 417,2. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 417,2 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 285,2 $[M-132-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de pentosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 361 nm; Banda II – 263 nm) sugere a presença de kaempferol-*O*-pentosídeo (Figura 5.3, substância **10**).

O pico **11** ($R_t = 44,02$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 431,5. Fragmentação de segunda ordem do íon precursor de m/z 431,5 gerou o íon produto Y_0^- de m/z 285,3 $[M-146-H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de deoxihexosídeo. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 343 nm; Banda II – 267 nm) sugere a presença da luteolina-*O*-rhamnopiranosídeo (Figura 5.3, substância **11**).

O pico **12** ($R_t = 45,43$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 301,3 e um fragmento em m/z 602,7 $[2 \times M-H]^-$. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 370 nm; Banda II – 255 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como quercetina (Figura 5.3, substância **12**).

O pico **13** ($R_t = 47,99$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 285,3 e um fragmento em m/z 571,6 $[2 \times M-H]^-$. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 350 nm; Banda II – 253 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como luteolina (Figura 5.3, substância **13**).

O pico **14** ($R_t = 48,51$ min) apresentou sinal da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 315,4 e um fragmento em m/z 630,6 $[2 \times M-H]^-$. Esse padrão de fragmentação e as absorvâncias obtidas na região do UV (Banda I – 366 nm; Banda II – 264 nm) confirmam a presença do composto previamente isolado e identificado como isorhamnetina (Figura 5.3, substância **14**).

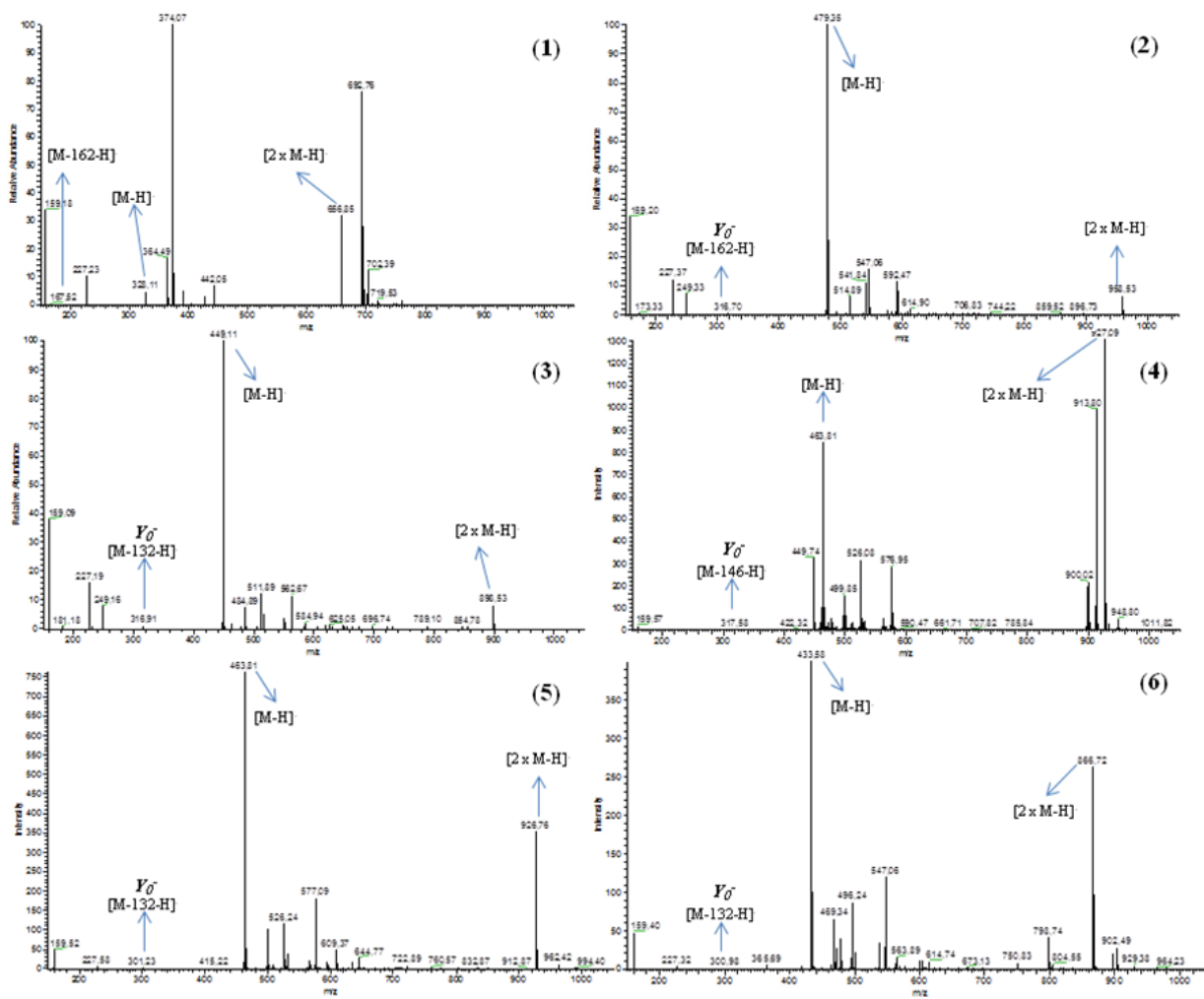


Figura 5.2. Espectros de massas de segunda ordem da Fr. *n*-BuOH de *B. holophylla*, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos). Legenda: () número referente ao pico no cromatograma obtido por HPLC-ESI-IT-MS.

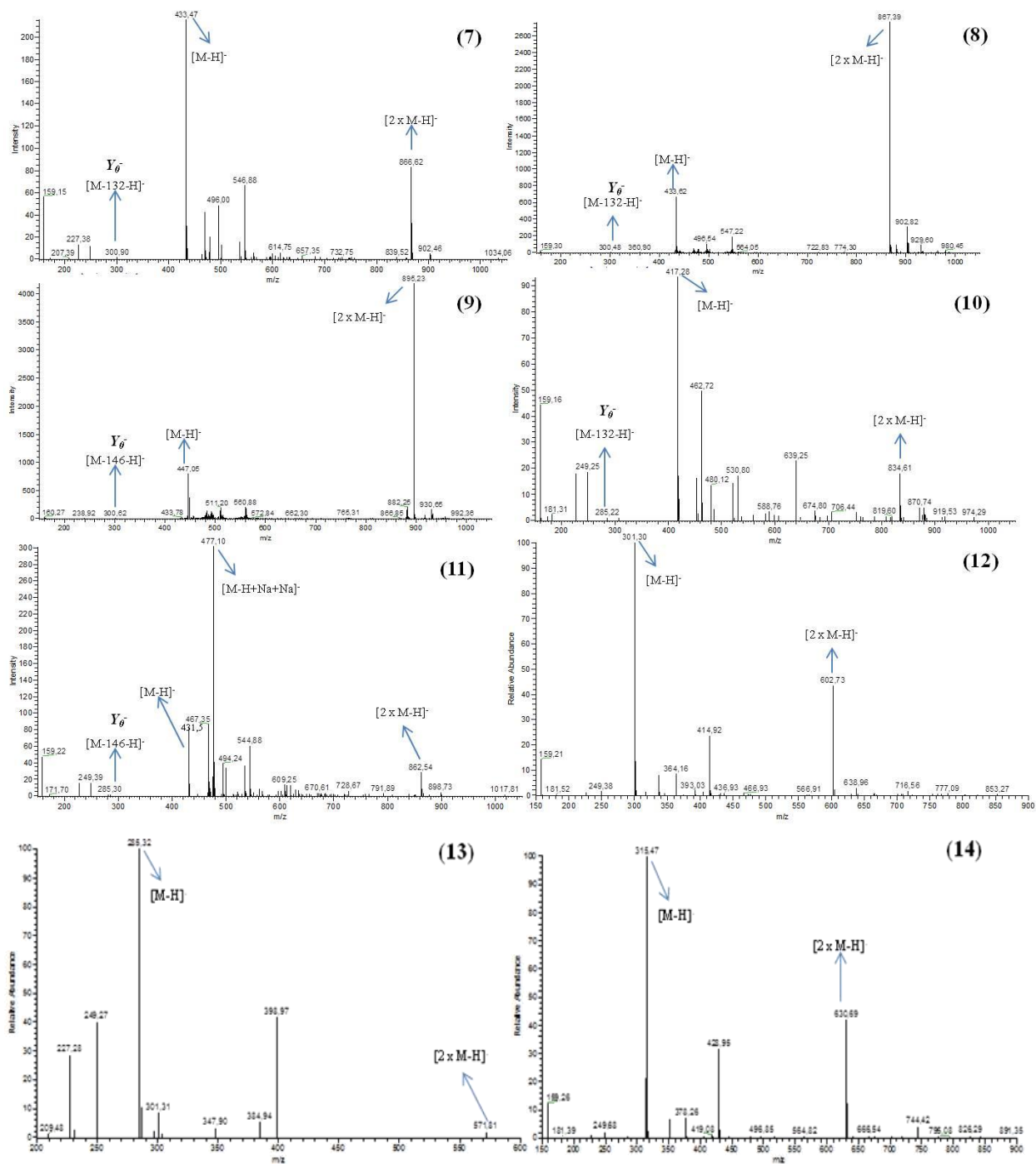


Figura 5.3. Espectros de massas de segunda ordem da Fr. *n*-BuOH de *B. holophylla*, analisado em modo negativo. Condições (ver material e métodos). Legenda: () número referente ao pico no cromatograma obtido por HPLC-ESI-IT-MS.

A figura 5.4 mostra as moléculas propostas no estudo da fração *n*-BuOH das folhas de *B. holophylla* por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS.

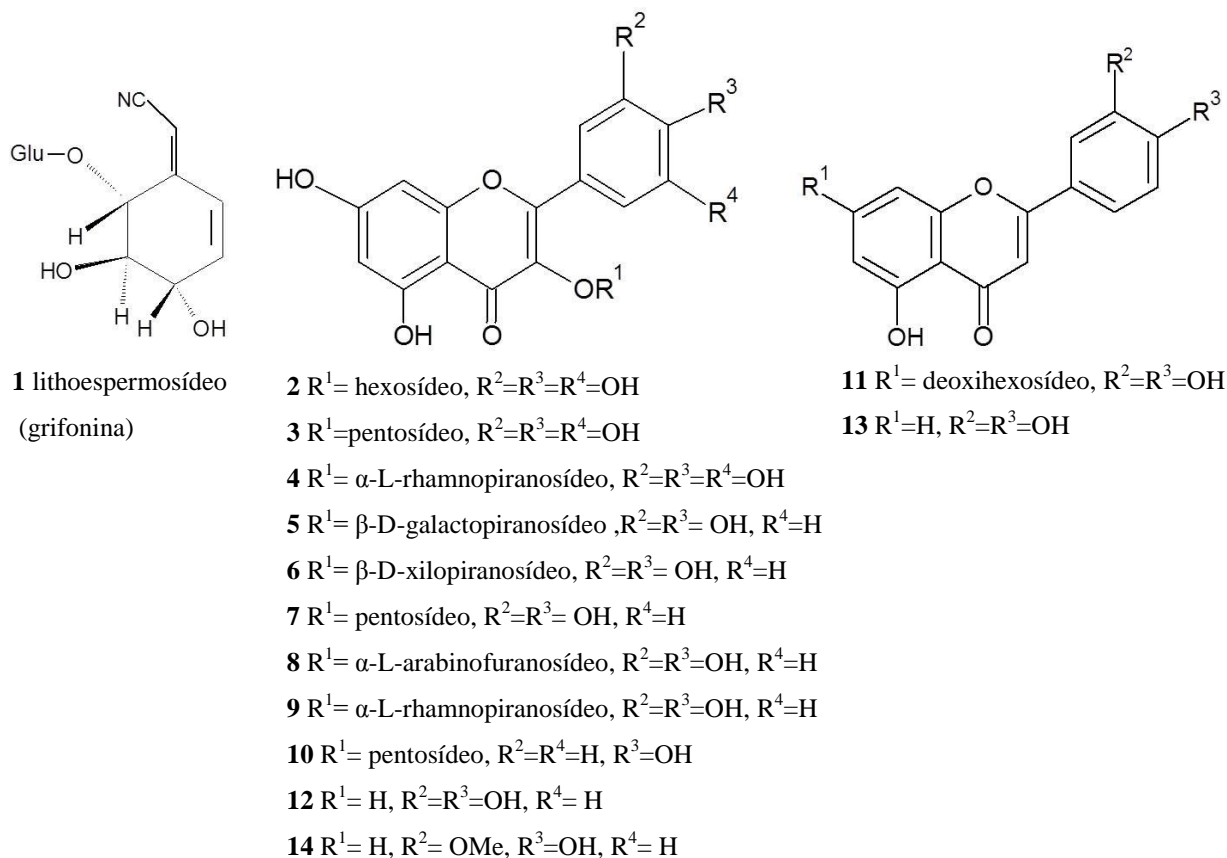


Figura 5.4. Moléculas propostas no estudo da fração *n*-BuOH das folhas de *B. holophylla* por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS.

6. Ensaios químicos e biológicos

Quantificação de fenóis totais

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes. São substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir e apresentar alto potencial terapêutico no tratamento de doenças causadas por radicais livres, tais como: artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, envelhecimento e câncer (NOGUCHI & NIKKI, 2000). Os radicais livres de oxigênio ou mais genericamente espécies reativas de oxigênio (EROs) são produtos do metabolismo normal das células, os quais estão associados a processos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular,

sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídeos de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSSAIN et al., 1987). Por isso, a quantificação de fenóis totais se faz necessária, como forma de buscar subsídios para o esclarecimento da atividade antioxidante, que por sua vez está diretamente ligada com a proteção de patologias maléficas para os seres humanos (JOVANOVIC et al, 1998).

A quantificação de fenóis totais presentes nos extratos foi realizada através do método colorimétrico de Follin-Ciocalteau (WATERMAN & MOLE, 1994). O método baseia-se na produção de complexos de coloração azul, que podem ser medidos em espectrofotômetro a 760 nm.

A curva de calibração (Figura 6.1) foi obtida utilizando 5 diluições (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) das soluções de ácido gálico, substância utilizada como padrão de fenol. As soluções de padrão foram submetidas ao mesmo procedimento abaixo descrito. As leituras foram determinadas em triplicata através de absorbância registrada a 760 nm em função da concentração do padrão fenólico.

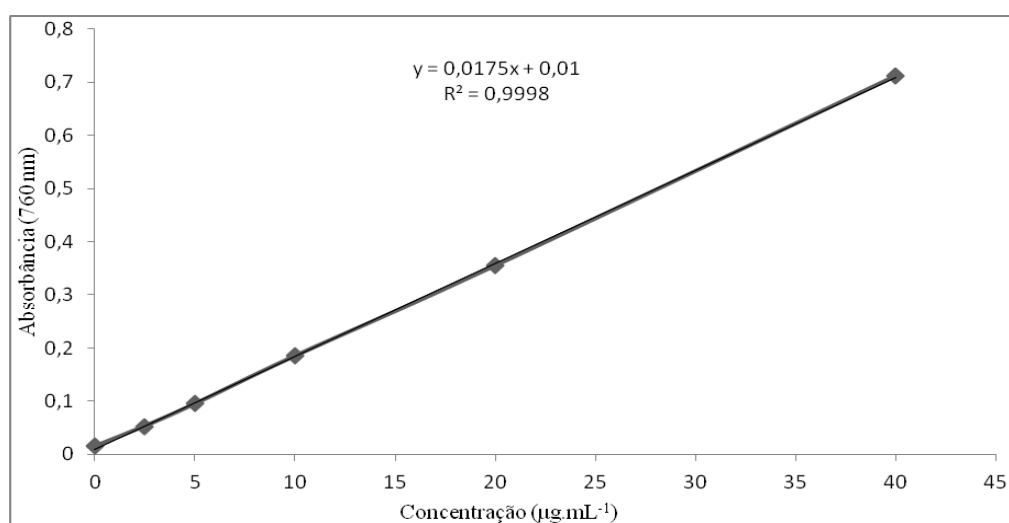


Figura 6.1. Curva de calibração de ácido gálico obtida pelo método de Follin-Ciocalteau. R^2 = correlação linear.

Uma alíquota do extrato, das frações e do ácido gálico ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi misturada a uma solução de $150 \mu\text{L}$ do reagente Follin-Ciocalteau (previamente diluído em H_2O $0,667 \text{ mL}:9,333 \text{ mL}; \text{v}:\text{v}$) e a $50 \mu\text{L}$ de uma solução saturada ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) de Na_2CO_3 . As misturas foram agitadas e deixadas em repouso em temperatura ambiente. Após 120 minutos, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm (Figura 6.2). As amostras contendo o extrato foram avaliadas numa concentração final de $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. As soluções resultantes foram lidas em triplicata e o teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

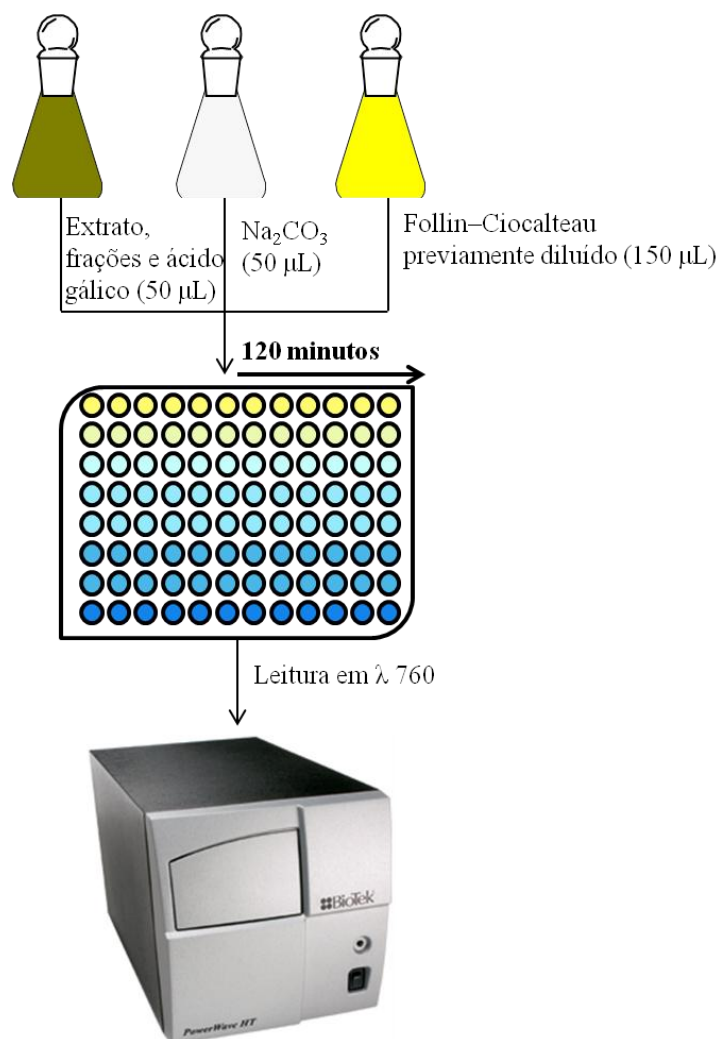


Figura 6.2. Esquema do método usado na quantificação de fenóis totais.

Com esses resultados (Figura 6.3) verificou-se que a fração *n*-BuOH apresentou maior teor de compostos fenólicos com $29,276 \pm 2,045$ mg de EAG/ g extrato, seguida do extrato EtOH 70%, com $17,668 \pm 0,836$ mg de EAG/ g extrato. A fração DCM apresentou atividade intermediária ($11,562 \pm 0,723$ mg de EAG/ g extrato), enquanto que as frações hexânica e aquosa (Fr. H₂O) demonstraram a menor atividade ($4,133 \pm 0,201$ mg de EAG/ g extrato e $3,276 \pm 0,201$ mg de EAG/ g extrato, respectivamente).

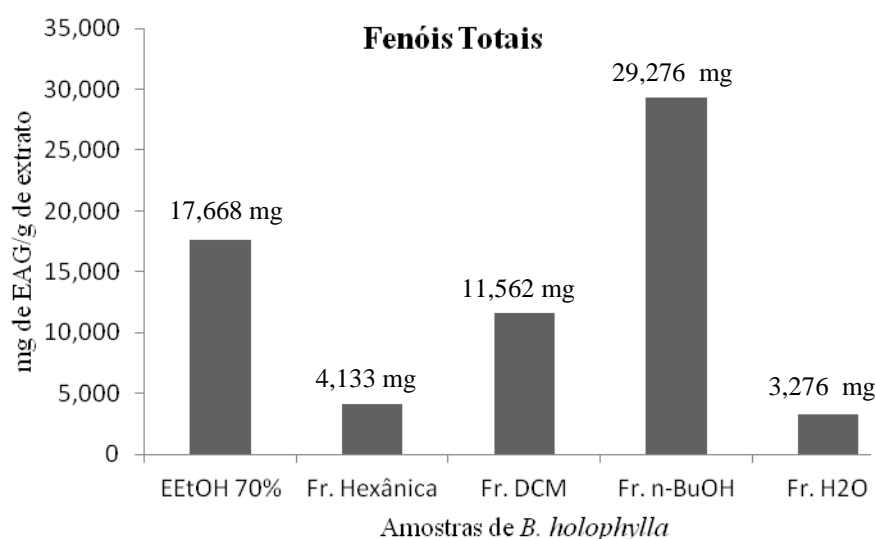


Figura 6.3. Concentração de fenóis totais do EEtOH 70% e das frações obtidas de *B. holophylla*.

Ensaio antioxidante com DPPH

O princípio do ensaio do DPPH é a redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, o qual apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm. Ao abstrair um radical hidrogênio do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância e da coloração. O radical DPPH é estável, de coloração violeta, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela (Figura 6.4). O método está baseado na capacidade do DPPH em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H⁺ sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível. O ensaio é iniciado pela adição do DPPH à amostra, em solução. A

adicionados a 200 μL da solução de DPPH foram usados como controle positivo. A CE_{50} (concentração eficiente capaz de reduzir o DPPH em 50%) foi calculada utilizando o programa estatístico Origin[®] 8.1. Desta forma, quanto menor o valor de CE_{50} , maior a atividade antioxidante da amostra. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

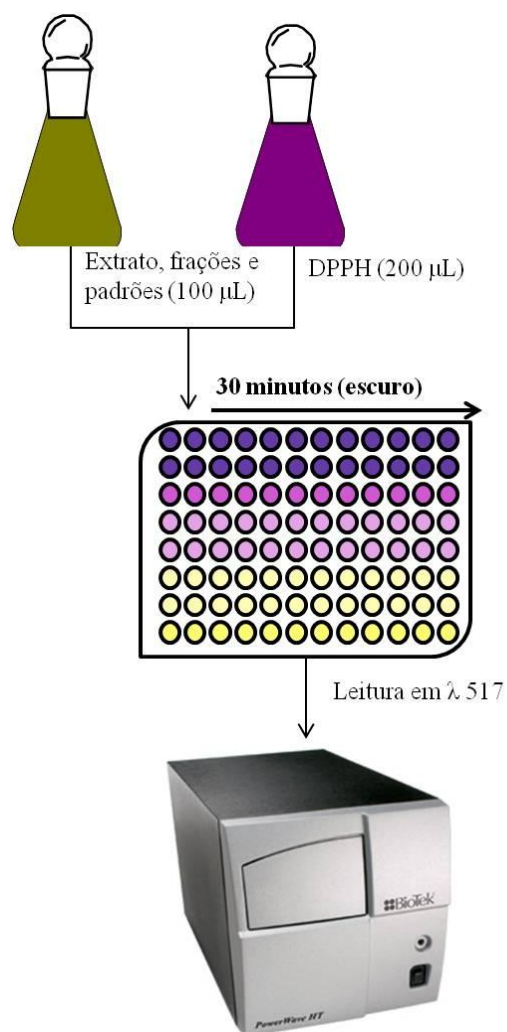


Figura 6.5. Esquema do método usado na determinação da atividade antioxidante usando o reagente de DPPH.

Tabela 6.1. Atividade antioxidante (CE_{50}) do extrato EtOH 70% e da fração *n*-BuOH de *B. holophylla*.

Amostra	CE_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Extrato EtOH 70%	24,717
Fração <i>n</i> -BuOH	4,495
Padrão (rutina)	2,475
Padrão (quercetina)	2,288
Padrão (ácido gálico)	0,729

CE_{50} = Concentração eficiente em $\mu\text{g}/\text{mL}$ capaz de reduzir o DPPH em 50%.

A tabela 6.1 mostra que a maior atividade antioxidante foi observada para a fração *n*-BuOH quando comparada com o extrato EtOH 70% e com os padrões utilizados.

Considerando a atividade antioxidante e o teor de fenóis totais, diversos são os relatos que justificam que a alta atividade biológica esteja relacionada à presença de compostos fenólicos (BASILE et al., 2005). Entre as substâncias mais conhecidas por seus efeitos antioxidantes estão os polifenóis e os galatos (STALIKAS, 2010). Os flavonoides pertencem ao grupo dos polifenóis e, geralmente, são encontrados na forma heterosídica. A capacidade dos flavonoides em atuar como agentes antioxidantes nos sistemas biológicos é, talvez, sua atividade mais importante e a mais estudada nos últimos anos. Diversos estudos epidemiológicos demonstraram o efeito que exerce uma dieta rica em frutas frescas e vegetais contra o risco de contrair enfermidades cardiovasculares e certos cânceres. Estes efeitos benéficos foram atribuídos, em parte, à presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, os quais exerceriam seus efeitos como resultado de suas propriedades antioxidantes. As propriedades doadoras de elétrons dos flavonoides estão muito bem definidas e explicam a atividade antioxidante *in vitro* destes compostos (MUSCHIETTI, 2009).

Atividade alelopática

O bioensaio mais largamente utilizado para identificação das substâncias alelopáticas é o da germinação de sementes, que é efetuado em placas de Petri, utilizando papel de filtro como suporte, onde é avaliado o percentual de germinação para determinar a atividade inibidora dos extratos (MACÍAS et al., 1998). Neste ensaio biológico a atividade é avaliada monitorando-se a germinação das amostras teste em relação ao controle sem tratamento.

Na forma mais simples destes ensaios, as sementes da espécie-teste selecionada são colocadas em papel de filtro ou ágar, em placas de Petri ou caixa gerbox ou em placas pequenas vazadas para cultura de tecidos, e são tratadas com a solução do eventual aleloquímico em concentrações variadas. A taxa e a porcentagem de germinação, o tamanho das raízes, hipocótilos, massa fresca ou seca das plântulas, medidas da fronde, conteúdo de clorofila e antocianina são parâmetros que podem ser eventualmente avaliados em relação ao controle sem tratamento para avaliação dos efeitos dos aleloquímicos (FERREIRA & AQUILA, 2000; VYVYAN, 2002).

Os testes de germinação são simples a serem realizados, no entanto, vários cuidados devem ser tomados para se ter respostas reprodutíveis. Os testes podem ser realizados em laboratório a temperatura ambiente, porém, como a temperatura influi sobre a germinação, o controle desta é desejável. O uso da temperatura entre 22 e 28 ° C é o procedimento mais comum. Outro cuidado é que as placas não sequem (FERREIRA & AQUILA, 2000).

A germinação é menos sensível aos aleloquímicos que o crescimento da plântula. Porém, a quantificação experimental é muito mais simples, pois para cada semente, o fenômeno é discreto: germina ou não germina. Nesse contexto, substâncias alelopáticas podem induzir o aparecimento de plântulas anormais, sendo a necrose da radícula um dos sintomas mais comuns. Assim, a avaliação da normalidade das plântulas é um instrumento valioso (FERREIRA & AQUILA, 2000).

Na segunda etapa dos testes, avalia-se o crescimento dos brotos para determinação da atividade inibidora dos extratos através do monitoramento do crescimento de suas raízes e hipocótilos (MACÍAS et al., 1998). Estes parâmetros são aceitos como medidas indiretas de processos fisiológicos que são afetados pelas interações químicas.

Contudo, alguns possíveis problemas dos bioensaios são apontados, entre os quais espécies receptoras que variam em sensibilidade para um aleloquímico específico, sensibilidade diferentes nas diferentes fases de crescimento da planta, diversidade dos mecanismos de ação dos aleloquímicos e quantidade limitada de material vegetal disponível para os testes (EINHELLIG et al., 1985).

Preparo do bioensaio

As espécies selecionadas como plantas testes para o estudo alelopático foram pepino (*Cucumis sativus* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.). As sementes foram colocadas para germinar em câmara BOD a 25°C em condição de luz constante (4 lâmpadas fluorescentes de 20 Watts) em placa de Petri, sobre uma folha de papel de filtro umedecido com 8mL de solução aquosa do extrato EtOH 70%.

As sementes de cada espécie estudada foram colocadas, em cinco repetições, em placas de Petri de vidro com 9 cm de diâmetro, tendo como substrato papel de filtro umedecido com solução aquosa dos extratos em diferentes concentrações e lacradas com papel filme PVC (PEREZ, 1990) (Figura 6.6). A avaliação da germinação das sementes de pepino e cevada foi feita diariamente, durante cinco dias, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de raiz, aproximadamente (REHMAN et al., 1996). Os parâmetros analisados foram porcentagem final de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e crescimento inicial de raiz (MAGUIRE, 1962).

As concentrações testadas foram feitas de acordo com Almeida et al. (2008) avaliando-se as médias comparadas em regressões matemáticas para avaliar a dose-reposta de cada concentração. Foram testadas seis concentrações, além do grupo controle (GC). Foram elas: 10 mg.L⁻¹ (G1); 20 mg.L⁻¹ (G2); 40 mg.L⁻¹ (G3); 80 mg.L⁻¹ (G4); 160 mg.L⁻¹ (G5) e 320 mg.L⁻¹ (G6).

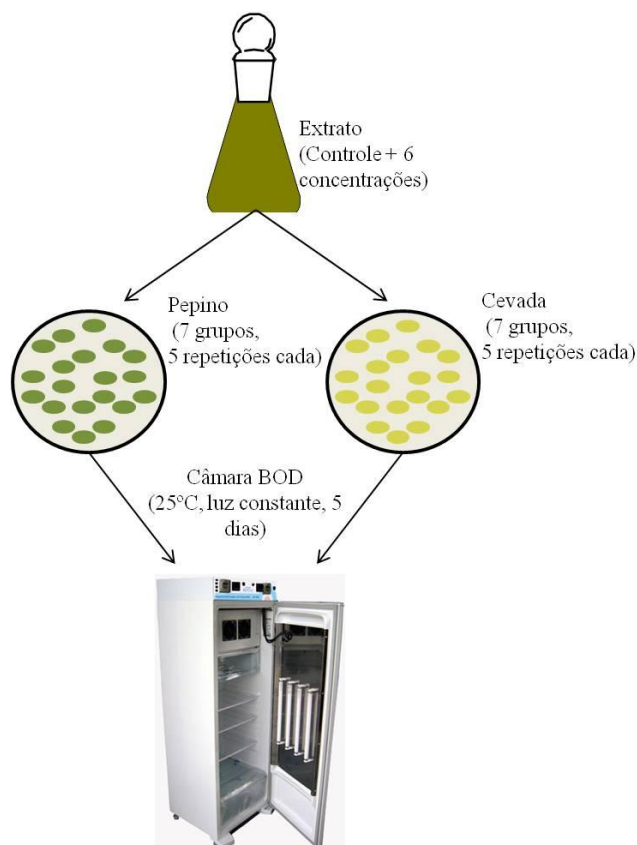


Figura 6.6. Esquema do método usado na determinação da atividade alelopática do extrato EtOH 70%.

Os resultados indicaram que o extrato EtOH 70% das folhas de *B. holophylla* reduziu de forma marcante a germinação das sementes de *Hordeum vulgare*, porém não afetou o processo germinativo de *Cucumis sativus*. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi afetado com maior intensidade em G1 para *C. sativus* e em G3 e G4 para *H. vulgare*. Por outro lado, o crescimento inicial das raízes de *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare* foi afetado em todas as concentrações utilizadas, porém mais acentuado nas concentrações mais altas (G4, G5 e G6) (Tabela 6.2).

Tabela 6.2. Porcentagem final de germinação, índice de velocidade de germinação (IVG) e crescimento inicial de raiz (mm) de sementes de pepino (*Cucumis sativus*) e cevada (*Hordeum vulgare*) sob efeito do extrato EtOH 70% de *Bauhinia holophylla* durante cinco dias.

Doses do extrato	Germinação (%)	IVG (%)	Raiz (%)
<i>Cucumis sativus</i>			
G1	1,00	-38,56	-34,49
G2	1,00	1,87	12,49
G3	0	-26,27	-15,82
G4	1,00	-6,31	-2,72
G5	0	-11,60	-16,89
G6	1,00	1,36	-27,22
<i>Hordeum vulgare</i>			
G1	-52,63	-61,07	-37,94
G2	-19,73	-29,34	13,03
G3	-65,78	-74,25	-28,15
G4	-63,15	-72,85	-50,47
G5	-48,68	-64,07	-37,28
G6	-64,47	-64,07	-52,19

Os resultados foram analisados e o valor obtido para cada concentração nos diferentes parâmetros analisados foi interpolado em função da concentração usando regressão linear utilizando o programa de análises estatísticas Origin 8.1[®]. As figuras discutidas abaixo representam a dose-resposta obtida para cada concentração.

As análises dos dados obtidos da germinação de sementes de *C. sativus* (Figura 6.7), sugerem que não houve efeito por nenhum dos tratamentos utilizados, não diferindo estatisticamente em relação ao grupo controle. Sendo assim, sugere-se que o extrato não exerceu atividade inibitória no processo de germinação de sementes de *C. sativus*.

A análise dos dados obtidos no cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *C. sativus* (Figura 6.8) mostra que o extrato afetou o IVG nas concentrações de G1, G3, G4 e G5 quando comparado com o GC, porém, mais acentuado em G1 e G3. Em G1 o IVG apresentou uma redução de 38,56% e em G3 redução de 26,27%.

Os dados obtidos para o comprimento inicial de raiz de *C. sativus* (Figura 6.9) sugerem uma redução no tamanho médio quando comparado com o GC. Em G2, G3 e G4 o comprimento médio das raízes equiparou-se ao GC, com redução de 12,49%, 15,82% e 2,72%, respectivamente. G1 apresentou a maior porcentagem de redução no tamanho médio de raiz, com 34,49%.

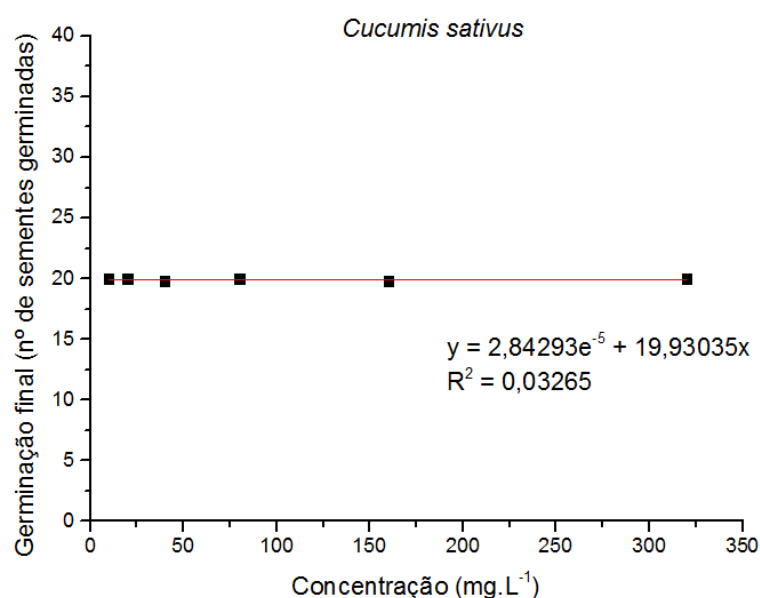


Figura 6.7. Germinação final de *Cucumis sativus*, em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

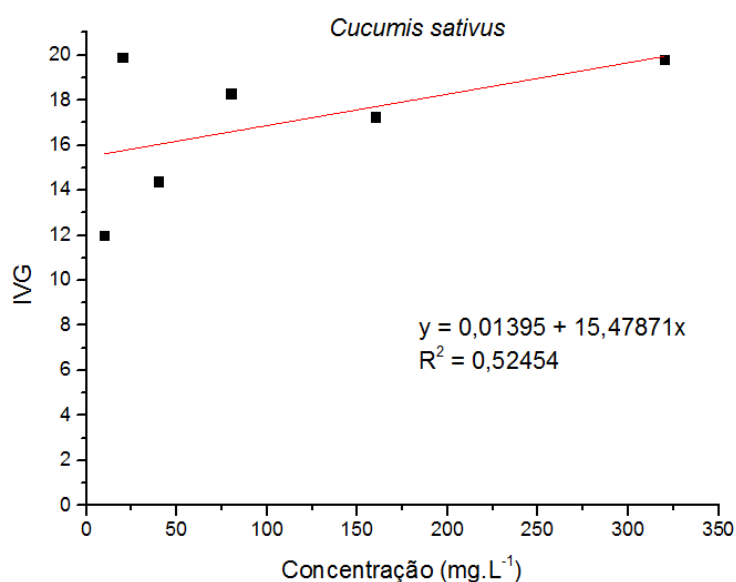


Figura 6.8. Índice de velocidade de germinação (IVG) de *Cucumis sativus*, em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

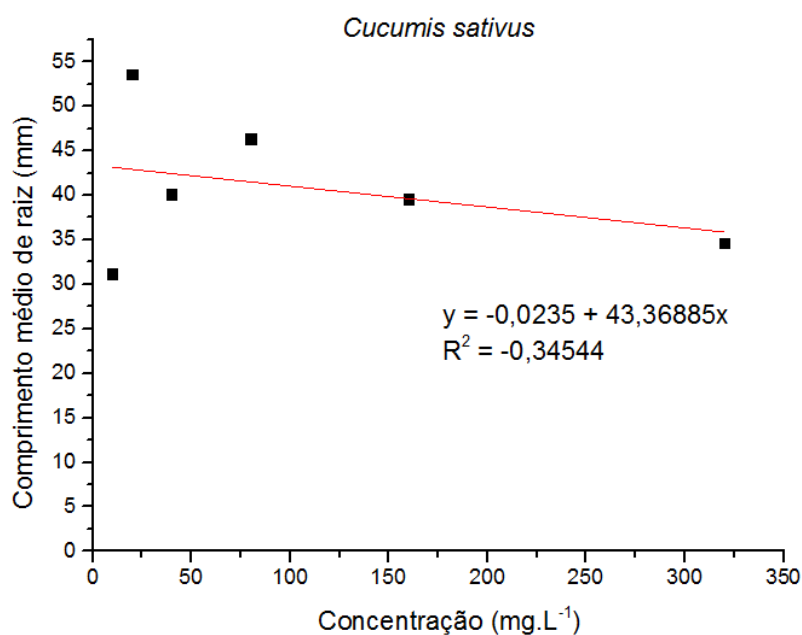


Figura 6.9. Crescimento inicial de raiz de *Cucumis sativus*, em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

As análises dos dados obtidos da germinação de sementes de *H. vulgare* (Figura 6.10), sugerem a redução na porcentagem de germinação em todas as concentrações. Porém, os resultados mostraram que houve uma pequena atividade inibitória em G1 (52,63%) e em seguida, atividade estimulatória em G2 (19,73%), mostrando um ponto de estímulo de crescimento. A maior porcentagem de inibição da germinação foi observada em G3 com 65,78%.

A análise dos dados obtidos no cálculo do IVG de sementes de *H. vulgare* (Figura 6.11) mostrou que houve uma pequena atividade inibitória em G1 (61,07%) e em seguida, atividade estimulatória em G2 (29,34%). Em G3, G4, G5 e G6 houve novamente uma atividade inibitória, sendo mais acentuado em G3, com uma redução de 74,25%.

Os dados obtidos para o comprimento inicial de raiz de *H. vulgare* (Figura 6.12) sugerem uma redução no tamanho médio quando comparado com o GC. Em G2 e G3 o comprimento médio das raízes equiparou-se ao GC, com redução de 13,03% e 28,15%, respectivamente. G6 apresentou a maior porcentagem de redução no tamanho médio de raiz, com 52,19%.

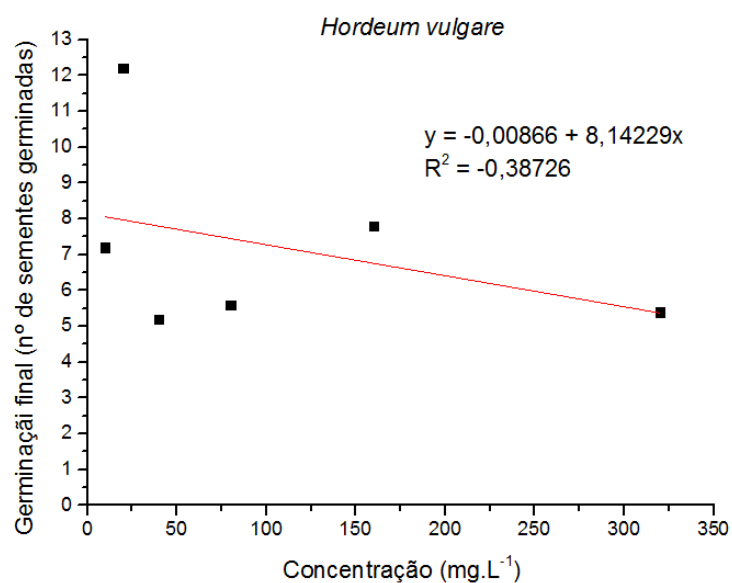


Figura 6.10. Germinação final de *Hordeum vulgare*, em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

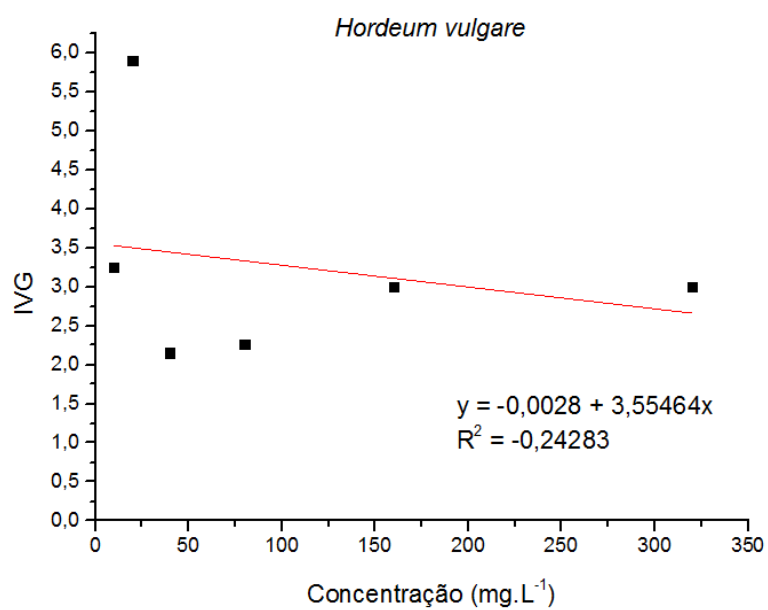


Figura 6.11. Índice de velocidade de germinação (IVG) de *Hordeum vulgare*, em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

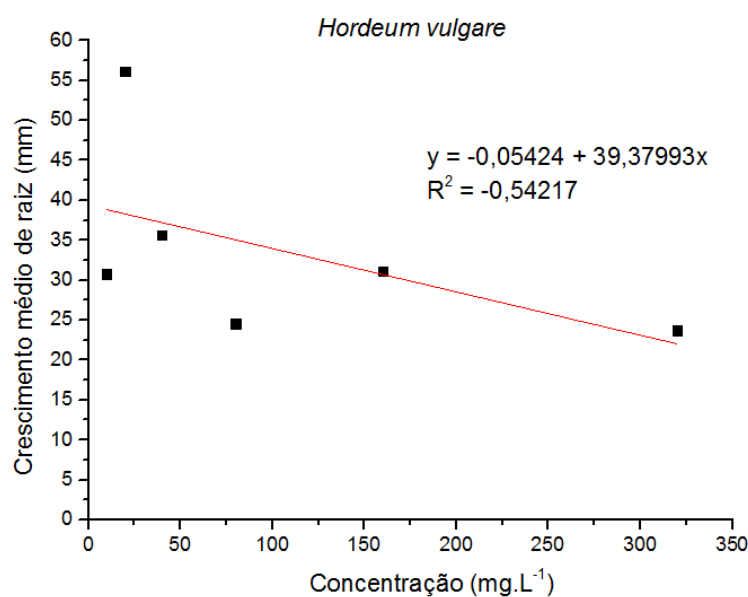


Figura 6.12. Crescimento inicial de raiz de *Hordeum vulgare*, em comparação ao GC, em diferentes concentrações de EEtOH 70% das folhas de *B. holophylla*.

Os resultados obtidos sugerem que as substâncias presentes no extrato EtOH 70%, majoritariamente flavonoides, interferiram nos processos fisiológicos de *C. sativus* e *Hordeum vulgare*, podendo atuar como aleloquímicos.

Sem dúvida, a atividade alelopática dos compostos fenólicos é a mais bem documentada na literatura científica. Diversos trabalhos atribuem a atividade alelopática de determinadas espécies sobre outras à presença dos compostos fenólicos, atividade esta evidenciada através de estudos laboratoriais e de campo (DIETZ & WINTERHALTER, 1996; CHON et al., 2003; BENINGER et al., 2004; CHUNG et al., 2002; DJURDJEVIC et al., 2004; WU et al., 1998; INDERJIT, 1996; IQBAL et al., 2003; SÁNCHEZ-MOREIRAS et al., 2004). Hall et al. (1982) descrevem que a quantidade total de compostos fenólicos em *Helianthus annuus* L. expressa em ácido clorogênico, aumentou proporcionalmente a falta de nutrientes, e teve efeito inibitório significativo sobre a germinação da espécie daninha *Amaranthus retroflexus* L.. No entanto, quando adicionado diretamente ao solo, o ácido clorogênico não foi capaz de inibir a germinação desta espécie.

Os resultados de Blum *et al.* (1993) indicam que as interações alelopáticas no solo podem ser atribuídas não a uma única substância, mas à interação de substâncias, podendo ser desde substâncias neutras (ex. glicose), promotoras (ex. nitrito) e/ou inibidoras (ex. ácido *p*-cumárico) envolvidas no crescimento vegetal. Muitos compostos fenólicos atuam a nível celular e a ação que estas substâncias têm sobre a membrana plasmática provoca a interrupção da maioria dos processos celulares (SAMPIETRO, 2006).

7. Conclusões

Não existem na literatura estudos químicos e biológicos relacionados à espécie *Bauhinia holophylla*. O estudo da composição química da fração *n*-BuOH do extrato EtOH 70% das folhas de *B. holophylla* possibilitou o isolamento e identificação de 10 diferentes substâncias, que são: um glicosídeo cianogênico, uma lactona, um heterocarboneto linear, quatro heterosídeos de quercetina, um heterosídeo de miricetina, uma aglicona de luteolina e uma aglicona de quercetina.

Os estudos por HPLC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS possibilitaram a detecção e identificação das substâncias isoladas, sem a necessidade de etapas de purificação, contribuindo significativamente para a busca de novos compostos bioativos. Além das substâncias isoladas, foi possível detectar e identificar mais 6 substâncias, que são: dois heterosídeos de miricetina, um heterosídeo de quercetina, um heterosídeo de kaempferol, um heterosídeo de luteolina e uma aglicona de isorhamnetina.

O alto teor de fenóis totais observado na fração *n*-butanólica e no extrato hidroalcoólico de *B. holophylla* está relacionado com melhores resultados nos testes de atividade antioxidante. Os resultados obtidos nos ensaios com atividade antioxidante demonstram que o extrato hidroalcoólico e a fração *n*-butanólica de *B. holophylla* apresentaram uma significativa atividade sequestradora de radicais livres.

Muitos estudos relacionados com o potencial antioxidante de compostos fenólicos concluem que é impossível prever o poder antioxidante de um determinado extrato estudando apenas um tipo de flavonoide ou outra classe de antioxidante presente na amostra. Em alguns casos, é possível a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos. A fração *n*-butanólica apresentou resultados significativos para a atividade antioxidante, sugerindo um efeito sinérgico, relacionado a seu alto conteúdo flavonoídico.

Os experimentos de germinação, IVG e crescimento inicial em raiz do extrato EtOH 70% demonstraram que a atividade alelopática, inicialmente, depende da concentração utilizada. O extrato EtOH 70% gerou um estresse alelopático, interferindo significativamente nos processos fisiológicos de *Cucumis sativus* e *Hordeum vulgare* inibindo o crescimento e desenvolvimento inicial de raízes. Embora as moléculas encontradas não sejam inéditas, é o primeiro relato da existência e atividade alelopática de folhas de *B. holophylla*. O efeito do extrato, composto majoritariamente por heterosídeos de flavonoides, pode ser devido ao efeito sinérgico destas substâncias.

B. holophylla, por estar amplamente distribuída no Cerrado brasileiro, pode ser um modelo de estudo para observações no âmbito ecológico, possibilitando a compreensão das interações químicas entre os vegetais.

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados apresentados neste trabalho demonstram que *B. holophylla* é uma espécie promissora na busca por compostos biologicamente ativos.

Referências bibliográficas

- ALMEIDA, F. S. de. **A alelopatia e as plantas**. Londrina: Fundação Instituto Agrônômico do Paraná, 1988.
- ALMEIDA, L. F. R. et al. In vitro allelopathic effect of extracts from *Leonurus sibiricus* leaves. **Journal of Plant Interactions**, v. 3, n. 1, p. 38-49, 2008.
- ALMEIDA, L. F. R. **Composição química e atividade alelopática dos extratos foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. 2006. 107p. Tese (Doutorado em Botânica). Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2006.
- ALVES, P.L.C.A. et al. Allelopathic potential of *Eucalyptus* spp. In: NARWAL, S. S. (Ed.) **Allelopathy Update**. Enfield: Science Pub., v.2, p.131-148, 1999.
- ANDERSEN, O. M; MARKHAM, K. R.; **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 1197 p.
- BARBOSA, D. C. A. Inibidores de germinação em folhas de *Wedelia paludosa* DC. (Compositae): Efeito no crescimento de plântula de *Lycopersicum esculentum* Mill. Universidade Federal de Pernambuco, IB, Série B: **Estudos e Pesquisas**, v.3, p.1-14, 1972.
- BASILE, A.C. et al. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.30, n.1, p.185-197, 1990.
- BATALHA, M.A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotrop.**, v. 11, n. 1, 2011.
- BENINGER, C.W. et al. A flavanone and two phenolic acids from *Chrysanthemum morifolium* with phytotoxic and insect growth regulating activity. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, n. 3, p. 589-606, 2004.
- BIANCO, E.M.; SANTOS, C.A.M. Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Caesalpinaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p.93-99, 2003.
- BLUM, U. et al. Modification of allelopathic effects of *p*-coumaric acid on morning-glory seedling biomass by glucose, methionine and nitrate. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 12, p. 2791-2811, 1993.
- BONDET, V. et al. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft Technol**, v. 30, p. 609-615, 1997.
- BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: BAILEY, R. (Ed.). **Global warming and other eco-myths**. Roseville, EUA: Competitive Enterprise Institute, p. 29-60, 2002.

CAVALCANTI, R.B. & JOLY, C.A. Biodiversity and conservation priorities in the cerrado region. In: OLIVEIRA, P. S. & MARQUIS, R. J. (Eds.). **The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press. 2002, p. 351-367.

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

CAVASSAN, O. O cerrado do estado de São Paulo. In: KLEIN, A.L. (Org.). **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. São Paulo: Editora UNESP, Imprensa Oficial do Estado, 2002. p. 93-106.

CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 1347–1354, 2009.

CHEN, C.C. et al. Bauhinin, a new nitrile glucoside from *Bauhinia championii*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 6, p. 933-937, 1985.

CHON, S. et al. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed Research**, v. 43, p. 444-450, 2003.

CHUNG, I.M. et al. Screening of allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*) and identification of potentially allelopathic compounds from rice (*Oryza sativa*) variety hull extracts. **Crop Protection**, v. 21, p. 913-920, 2002.

CLAPHAM Jr., W.B. **Natural ecosystems**. McMillan, New York, 1973.

COUTINHO, L. M. O bioma do cerrado. In: Klein, A.L. (Org.). **Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois**. Editora UNESP, Imprensa Oficial do Estado, São Paulo, p. 77-91, 2002.

COUTINHO, L.M. & HASHIMOTO, F. Sobre o efeito inibitório da germinação de sementes produzido por folhas de *Calea cuneifolia* D.C. **Ciência e Cultura**, v. 23, n. 6, p. 759-764, 1971.

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

COX, C.B. & MOORE, P.D. **Biogeografia: uma abordagem ecológica e evolucionária**. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 2009.

CRAWLEY, M.J. **Plant ecology**. Blackwell, Oxford, 1989.

CSEKE, L.J. et al. Natural products from plants. 2 ed. 2006, 569 p.

CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. Agrochemicals and Pharmaceuticals: The connection. In: CUTLER, H.G.; CUTLER, S.J. (Eds.). **Biologically active natural products: Agrochemicals**, Boca Raton, Florida: CRC Press, 1999. p.1-14.

CUYCKENS, F., CLAES, M. **Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids.**

Journal of Mass Spectrometry, v. 39, p. 1-15, 2004.

DAJOZ, R. **Ecologia geral.** Vozes, Rio de Janeiro, 1973.

DIAS, B.F.S. Conservação da natureza no cerrado brasileiro. In: PINTO, M. N. (Org.).

Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1990. p.583-640.

DIAS, J.F.G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus* Willd.** Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências

Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2005.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves.

Phytochemistry, v. 42, n. 4, p. 1005-1010, 1996.

DJURDJEVIC, L. et al. Allelopathic potential of *Allium ursinum* L. **Biochemical**

systematics and Ecology, v. 32, p. 533-544, 2004.

EINHELLIG, F. A. Allelopathy: current status and future goals. In: Inderjit, Dakshini, K. M.

M.; Einhellig, F. A. **Allelopathy: organisms, processes and applications.** Washington, p. 1-

24, 1995.

EITEN, G. Vegetação do cerrado. In: PINTO, M. N. (Org.). **Cerrado: caracterização,**

ocupação e perspectivas. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 1990, p. 9-65.

FARKAS, O.; JAKUS, J; HÉBERGER, K. Quantitative structure – antioxidant activity

relationships of flavonoid compounds. *Molecules*, v. 9, p. 1079-1088, 2004.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia.

Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 12, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia.

Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v. 12 (Edição Especial), p. 175-204, 2000.

FERRI, M.G. Ecologia dos cerrados. In: FERRI, M. G. (Coord.). **IV Simpósio sobre o**

cerrado: bases para utilização agropecuária. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia. 1977, p. 15-33.

FORT, D.M. et al. Lithospermoside from *Bauhinia fassoglensis* (Fabaceae). **Biochemical**

Systematics and Ecology, v. 29, p. 439-441, 2001.

GORLA, C. M.; PEREZ, S. C. J. G. A. Influência de extratos aquosos de folhas de *Miconia*

albicans Triana, *Lantana camara* L., *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit E *Drimys winteri*

Forst, na germinação e crescimento inicial de sementes de tomate e pepino. **Revista**

Brasileira de Sementes, v. 19, n. 2, p. 260-265, 1997.

HALL, A.B. et al. Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. debris on seed

germination. **Amer. J. Bot**, v. 69, p. 776- 783, 2002.

HAN, Q. et al. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoide*. **Fitoterapia**, v. 72, p.

86-88, 2001.

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

HUSSAIN, S.R. et al. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy. **The Botanical Review**, v. 62, p. 186-202, 1996.

IQBAL, Z. et al. Allelopathic activity of buckwheat: isolation and characterization of phenolics. **Weed science**, v. 51, p. 657-662, 2003.

JOVANOVIC, S.V. et al. Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals, In: RICE-EVANS, C. **Flavonoids in Health and Disease**, p. 137-161, 1998.

KUROSU, H. et al. Structural characterization of ¹³C-labeled n-tetracosane adsorbed on the surface of silica gel by high-resolution solid-state ¹³C NMR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 516, p. 177-184, 2000.

LEE, T.T. et al. Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 517-523, 1982.

MA, Y.L. et al. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, p. 1311-1357, 1997.

MABRY, T. J. et al. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer Verlag, 1970. 354 p.

MACÍAS, F. A. et al. Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. **Biological Sciences in Space**, v. 17, n. 1, p. 18-23, 2003.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-7, 1962.

MALHEIROS, A.; PERES, M. L. P. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinaias sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*; Chapecó: Argos. 2001, p. 505-509.

MATHELA, C.S. Allelochemicals in medicinal and aromatic plants. In: NARWAL, S. S.; TAURO, P. (Eds.) *Allelopathy in Agriculture and Forestry*. Jodhpur, India: Scientific Publishersp, 1991. p. 213-228. *Medicine*, v. 28, p. 1538-1546, 2000.

MERTENS-TALCOTT, S. U. et al. Ellagic Acid Potentiates the Effect of Quercetin on p21^{waf1/cip1}, p53, and MAP-Kinases without Affecting Intracellular Generation of Reactive Oxygen Species In Vitro. **Journal of Nutrition**, p. 609-614, 2004.

MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R. A.; FILHO, V. C. (Orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2 ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí. 2009, p. 189-218.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

NOGUCHI, C., & NIKKI, E. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1538–1546, 2000.

PAULETTI, P.M. et al. New Antioxidant C-Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samydoide*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1384-1387, 2003.

PEREZ, F.J. Allelopathic effect of hydroxamic acids from cereals on *Avena sativa* e *A. fatua*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 773-6, 1990.

PINHEIRO, M. H. O. **Levantamento florístico e fitossociológico da floresta estacional semidecidual do Jardim Botânico Municipal de Bauru**. 2000. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, SP, 2000.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonoides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

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.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 60, p. 57-109, 2003.

REHMAN, S. et al. The effects of sodium chloride on germination and the potassium and calcium contents of *Acacia* seeds. **Seed Science and Technology**, v. 25, p. 45-57, 1996.

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

ROYAL PHARMACEUTICAL SOCIETY OF GREAT BRITAIN. **Quercetin**. v. 12, n. 42, p. 272-275, 2007.

SALATINO, A. et al. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n.1, 1999.

SAMPIETRO, D.A. Alelopatía. **Hipertextos del área de la biología**. Página disponível na internet em: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/plantas/alelopatia.htm>. Acesso em março/2013.

SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.M. et al. Allelopathic evidence in the Poaceae. **The Botanical Review**, v. 69, n.3, p. 300- 319, 2004.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review : methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SHANG, X.Y. et al. Chemical constituents of *Bauhinia aurea*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 10, 2012.

SILVA, G. B. da et al. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Hoehnea**. v. 33, n. 3, p. 331-338, 2006.

SILVA, K. L. et al. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link. **Z. Naturforsch**, v. 55, p. 478–480, 2000.

SILVA, L. K. da, CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SILVERSTEIN, R.M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. 550 p., 2005.

SIMÕES, C.M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Editora da UFSC, Editora da UFRGS, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOSA, F.A. et al. Structure of a cyanoglucoside of *Lithospermum purpureo-caeruleum*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 707-709, 1977.

STALIKAS, C. D. Phenolic Acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods. In: UPPU, R. M. et al. (Eds.). **Methods in Molecular Biology: free radicals and antioxidant protocols**. 2010, v. 610, 2nd ed., 480 p.

VASCONCELOS, F. et al. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 385–392, 2004.

VAZ, A. M. S. da F.; TOZZI, A. M. G. A. *Bauhinia* ser. *Cansenia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil. **Rodriguésia**, v. 54, n. 83, p. 55-143, 2003.

VYVYAN, J. R. Allelochemicals for new herbicides and agrochemicals. **Tetrahedron**, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WAGNER, H. M.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography Atlas**. Berlin: Springer, 2nd ed., 384p., 1996.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. **Plant Drug Analysis**. Springer, Berlin. 1984. 320 p.

WALTER, H. **Vegetação e zonas climáticas**. EPU, São Paulo, 1986.

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

WELLUM, D.A.; KIRBY, W. High-performance liquid chromatographic assay for teaflavins. **Journal of Chromatography A**, v. 206, n. 2, p.400-4006, 1981.

WU, J.E.H. Lithospermoside and dasycarponin, cyanoglucosides from *Thalictrum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 3, p. 500-511, 1979.

WU, L. et al. Allelopathic effects of phenolic acids detected in buffalograss (*Buchloe dactyloides*) clippings on growth of annual bluegrass (*Poa annua*) and buffalograss seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 39, p. 159-167, 1998.

ZHOU, S.; HAMBURGER, M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural products analysis. Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 755, p. 189-204, 1996.