Augusto César de Barros Tomba

Composição flavonoídica e atividades
biológicas de *Dimorphandra mollis* Benth

Flavonoid composition and biological
activities of *Dimorphandra mollis* Benth

São Paulo

2015

Augusto César de Barros Tomba

Composição flavonoídica e atividades
biológicas de *Dimorphandra mollis* Benth

Flavonoid composition and biological
activities of *Dimorphandra mollis* Benth

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Doutor em Botânica, na Área de
Recursos Econômicos Vegetais.

Orientador(a): Antonio Salatino

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Tomba, Augusto

Composição flavonoídica e atividades
biológicas de *Dimorphandra mollis* Benth.

Número de páginas: 202.

Tese (Doutorado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo.
Departamento de Botânica.

1. *Dimorphandra mollis* 2.
flavonoides 3.atividade biológica.
Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Agradecimentos

Agradeço à Universidade de São Paulo, que, por meio do Instituto de Biociências e do Departamento de Botânica, me permitiu o aprimoramento de meus conhecimentos e de minhas competências.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Botânica do IB-USP e ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado e das mais adequadas condições para a execução de meus trabalhos.

Agradeço profundamente ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Salatino, por suas instruções, pela sua paciência, pela permissão do uso de seu grant, e principalmente, por suas notáveis aulas.

Agradeço à equipe do Laboratório de Fitoquímica do IB-USP, pelo pelas experiências compartilhadas.

Agradeço ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato pela imensa colaboração para a viabilização desse trabalho

Agradeço ao Prof. Dr. Octávio Nakano por todos os seus ensinamentos em entomologia econômica e entomologia experimental.

Agradeço à Profa. Clélia Ferreira e a toda equipe do Laboratório de Bioquímica de Insetos, pela colaboração nesse projeto, e pelos importantes ensinamentos em enzimologia de insetos.

Agradeço à Profa. Eny Floh, e a toda equipe do Laboratório de Biologia Celular de Plantas, pelo apoio e pelos ensinamentos em biotecnologia vegetal.

Agradeço especialmente à Dra. Lydia Yamaguishi, por seus ensinamentos e seu empenho, sem os quais, esse trabalho jamais teria se tornado possível.

Agradeço à Dra. Gina Negri por todos os ensinamentos sobre a técnica de espectrometria de massas.

Agradeço profundamente à minha companheira Glauce, por sua paciência, tolerância às minhas ausências, e por seu incansável apoio aos meus planos e objetivos.

Sumário

Introdução Geral	6
Referências bibliográficas.....	9
 Capítulo 1 – Composição flavonoídica de diferentes órgãos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth.	11
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Objetivos	33
Material e métodos.....	34
Resultados	12
Discussão	58
Referências bibliográficas.....	63
 Capítulo 2 – Atividades biológicas de extratos flavonoídicos de <i>Dimorphandra mollis</i> Benth sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepdoptera: Noctuidae) e <i>Sitophilus oryzae</i> (Coleoptera: Curculionidae)	71
Resumo	72
Abstract	73
Introdução	74
Objetivos	77
Material e métodos.....	78
Resultados	83
Discussão	104
Referências bibliográficas.....	107

Introdução Geral

Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae – Caesalpinioideae) é uma espécie dos Cerrados brasileiros, que apresenta amplo registro de ocorrência por toda a extensão deste bioma. É uma árvore de porte médio, que apresenta copa horizontal densa, folhas bipinadas pecioladas, flores amarelas dispostas em espigas densas, frutos do tipo legume, carnosos, indeiscentes, sementes elipsoides, achatadas, de coloração castanho escuro.

É uma espécie explorada economicamente no Brasil, para a extração do flavonoide rutina, um ramnosil-glucosídeo de quercetina (Lorenzi & Matos, 2002). Nos frutos são encontrados principalmente rutina e quercetina em concentração de 6% a 8% (Gomes, 1998; Lorenzi & Matos, 2002).

A rutina, largamente utilizada nas indústrias farmacêutica e cosmética, possui propriedades múltiplas, como proteção da degradação de ácido ascórbico (Crampton & Lloyd, 1949), característica explorada atualmente, na forma de suplementos nutricionais contendo ácido ascórbico combinado com rutina, atua na normalização da resistência e da permeabilidade das paredes dos vasos capilares, por meio do bloqueio da atividade do ácido araquidônico (Álvarez et al, 2000), apresenta atividades anti-inflamatória (Selloum et al, 2003), antioxidante (Rice-Evans et al, 1996), imunomodulatória (Middleton-Junior et al, 2000) e a capacidade de reduzir os níveis de triglicerídeos e lipoproteínas em animais modelo (Oliveira et al, 2004; Kanashiro et al, 2009).

Os flavonoides (Figura 1) são substâncias sintetizadas via metabolismo secundário pela combinação de duas vias: acetato-malonato e ácido chiquímico. As chalconas são as primeiras substâncias a serem formadas; ao sofrerem isomerização, dão origem às flavanonas, já com a presença do anel central heterocíclico (C). A partir da desidrogenação do anel C das flavanonas são formadas as flavonas, enquanto os flavonóis são sintetizados a partir do precursor chalcona com a formação do intermediário dihidroflavonol (Dewick, 2009). As antocianinas, provavelmente o grupo mais conhecido e estudado de flavonóides, também são sintetizadas a partir do precursor dihidroflavonol (Cooper-Driver, 2001; Saito & Yamazaki, 2002).

Figura1. Estrutura geral dos flavonoides, onde R representa os diferentes sítios de substituição.

As substituições, como glicosilação, metilação, e prenilação, são fatores relevantes para a solubilidade, estabilidade, bioatividade e distribuição celular dos flavonoides (Springob et al., 2003). Cria-se, dessa forma, uma variedade de substâncias com diferentes propriedades em cada grupo de flavonoides.

Estudos com *D. mollis* são escassos, principalmente os relacionados à caracterização química de seus órgãos. Tomassini e Mors (1969) verificaram que os principais flavonóides presentes no fruto são rutina e quercetina. Martins et al (2007) analisaram a ocorrência de taninos, flavonóides e alcalóides em diferentes órgãos da planta, exceto o fruto.

Alguns trabalhos atestam que espécies do gênero *Dimorphandra* são tóxicas para o gado bovino, relatando casos de aborto e até mesmo óbito de animais, devido à ingestão de seus frutos (Tomassini e Mors, 1966; Tokarnia e Döbereiner, 1967; Murad et al, 1968; Campelo, 1969; Santos et al, 1974; Santos et al, 1975). Féres et al (2006), trabalhando com ratos Wistar e camundongos suíços, consideraram intoxicação aguda para as doses 3500 e 5000 mg/kg, porém com efeitos reversíveis. Os mesmos autores reportam que, a intoxicação crônica com 1000 e 2000 mg/kg, não provocou alterações significativas na massa corporal, assim como no consumo de água e alimento, dos animais submetidos ao experimento.

Cintra et al (2002) reportam a detecção de propriedades tóxicas de extratos metanólicos de flores de *D. mollis* sobre operárias de *Apis mellifera*, e atribuem a toxicidade ao dihidroflavonol astilbina (3-β-O-rhamnosideo de 5,7,3',4'-tetraidroxi-2,3-diidroflavonol). Seus resultados indicam que a astilbina reduziu a sobrevivência média das abelhas tratadas. Pereira et al. (2002) também atribuem a astilbina atividade

inibidora sobre o desenvolvimento de larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepdoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepdoptara: Noctuidae), tendo observado redução do peso corporal durante a fase larval e, prolongamento, tanto da fase larval quanto da fase pupal, para as duas espécies de lepidópteros, consideram a possibilidade de uso deste flavonoide como um biopesticida.

Este trabalho será constituído de dois capítulos, onde serão abordados os dados mais atuais da literatura pertinente, as metodologias empregadas nos estudos, seus resultados e respectivas discussões.

Referências bibliográficas

- Álvarez, L., Gil, A. G., Ezpeleta, O., Jalón-García, J. A., Cerain, L. 2004. Immunotoxic effects of Chratoxin A in Wistar rats after oral administration. *Food and Chemical Toxicology* 42, 825-834.
- Campelo, C.R. 1969. Estudo sobre algumas plantas tóxicas do Brasil. *Anais da Sociedade Botânica do Brasil*. 20º Congresso Nacional de Botânica, Goiânia, 80-81.
- Cintra, P., Malaspina, O., Petacci, F., Fernandes, J.B., Bueno, D.C., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. 2002. Toxicity of *Dimorphandra mollis* to workers of *Apis mellifera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13(1), 115-118.
- Cooper-Driver, G.A. 2001. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* 56, 229-236.
- Dewick, P.M. 2009. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Chichester, p. 512.
- Féres, C.A.O., Madalosso, R.C., Leite, J.P.V., Guimarães, T.M.D.P, Toledo, V.P.P., Tagliati, C.A. 2006. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 450-456.
- Gomes, L. J., Gomes, M. A. O. 2000. Extrativismo e biodiversidade: o caso da fava-d'anta. *Ciência Hoje* 161, 66-69.
- Kanashiro, A., Andrade, D. C. O., Kabeya, L. M., Turato, W. M., Faccioli, L. H., Uyemura, S.A., Lucisano-Valim, Y. M. 2009. Modulatory effects of rutin on biochemical and hematological parameters in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81(1), 67-72.
- Lorenzi H. & Matos F. J. A.; 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. p. 281-282.
- Martins, L. V., Matins G. T., Oliveira, D. A., Pimenta, M. A. S. 2007. Prospecção fitoquímica preliminar de *Dimorphandra mollis* Benth. (Fabaceae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biociências* 5, supl. 2, 828-830.
- Middleton – Junior, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. 2000. The effects of plant flavonoids in mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Review* 52, 673-751.

Murad, J.E., Gazzinelli, N.C. 1971. Estudo químico de *Dimorphandra mollis* Benth. Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Minas Gerais 2(2), 50-61.

Oliveira, T. T., Nagen, T. J., Lopes, R. M., Moraes, G. H. K., Ferreira Junior, D. B., Silva, R. R., Maia, J. R. S. 2004. Efeito de diferentes doses de rutina sobre lipídeos no soro de coelhos machos e fêmeas. Revista Brasileira de Análises Clínicas 36(4), 213-215.

Pereira, L.G.B., Petacci, F., Fernandes, J.B., Corrêa, A.G., Vieira, P.C., da Silva, M.F.G.F., Malaspina, O. 2002. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda*. Pest Management Science 58, 503-507.

Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine 20, 933-956.

Saito, K. & Yamazaki, M. 2002. Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. New Phytologist 155, 9-23.

Santos, F.C.C., Edalmo, S.C., dos Santos, H.L.S. 1974. Intoxicação experimental de bovinos pela “faveira” *D. mollis*. Arquivos da Escola de Veterinária. UFMG 26(3), 319-330.

Santos, F.C.C., Fisher, P., Fichtner, S.S., dos Santos, E.E., Veiga, L.S. 1975. Efeitos experimentais negativos da fava da “faveira” *Dimorphandra mollis* Benth, como causa de aborto em bovinos. Anais da Escola Agrícola e Veterinária. UFGO 1, 58-61.

Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., Boudouka, C. 2003. Anti-inflammatory effects of rutin on rat paw oedema, and neutrophils chemotaxins and degranulation. Experimental and Toxicological Pathology 54, 313-318.

Silva, M. F. 1986. Monography 44 - *Dimorphandra* (Caesalpinaceae). Flora Neotropica 44, 63-66.

Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., Saito, K. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. Natural Product Report 20, 288-303.

Tomassini, E. e Mors, W. 1966. *Dimorphandra mollis* Benth. e *Dimorphandra gardneriana* Tul. , novas e excepcionais fontes de rutina. Anais da Academia Brasileira de Ciência 38, 321-323, suplemento.

Tokarnia, C. H., Döbereiner, J. 1967. Intoxicação Experimental pelas favas da “faveira” *D. mollis* Benth. em bovinos. Pesquisa Agropecuária Brasileira 2, 3678-373.

Capítulo 1 – Composição flavonoídica de diferentes órgãos de
Dimorphandra mollis Benth.

Resumo

Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae – Caesalpinioideae), popularmente conhecida como faveiro, fava d'anta ou faveleiro, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, que apresenta registros de ocorrência por todo o Brasil Central. Sua principal importância econômica está associada às elevadas concentrações de rutina, um flavonóide alvo de muitos estudos farmacológicos e de largo emprego na indústria farmacêutica, sendo esta a segunda espécie mais utilizada como fonte de rutina no mercado mundial. Apesar do amplo uso econômico, sua exploração não apresenta características agrícolas, sendo realizada por vias extrativistas. Além disso, há carência de informações sobre sua biologia, o que torna a exploração um fator de risco à conservação. Há poucos estudos relacionados à sua composição química de seus órgãos e tecidos, além disso, estudos de germinação *in vitro* para obtenção de calos, suspensões celulares e clones não apresentaram sucesso.

Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma detalhada investigação da composição flavonoídica de folhas, flores, frutos, madeira, cascas, plântulas, embriões, exsudados radiculares de plântulas, e calos originados da dediferenciação de diversos explantes pelo emprego da técnica de cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplado ao espectrômetro de massas, com o intuito de contribuir para uma maior compreensão da composição química de seus órgãos e tecidos, e assim, subsidiar novos estudos sobre a biossíntese de flavonoides, assim como, contribuir para a própria exploração racional dos recursos econômicos inerentes a essa espécie.

Os resultados obtidos levam à conclusão de que nos diversos órgãos e tecidos de *D. mollis* investigados, predominam estereoisômeros de astilbina, rutina e quercitrina. Os calos apresentaram perfil flavonoídico muito simples, contendo apenas pequenas quantidades de apigenina, não sendo viáveis à obtenção de flavonoides de interesse por meio de seu cultivo.

Abstract

Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae - Caesalpinioideae), popularly known as faveiro, fava d'anta or faveleiro, is a native species of the Brazilian Cerrado, which has records of occurrence throughout the Central Brazil. Its main economic importance is associated with high concentrations of rutin, a flavonoid target of many pharmacological studies and widespread use in the pharmaceutical industry. *D. mollis* is the second most commonly used plant species as a source of rutin in the global market.

Despite their broad economic use, their exploitation occurs in a very primitive way. In addition, there is no subsidiary information about their biology, which makes exploring this species a risk factor for its conservation. There are few studies that deals with the chemical composition of *D. mollis* organs and tissues, in addition, *in vitro* germination studies to obtain calluses, cell suspensions and clones showed no success.

This work aimed to develop a detailed research flavonoid composition of leaves, flowers, fruits, wood, bark, seedlings, embryos, seedlings root exudates, callus using high performance liquid chromatography with diode array detector coupled to a mass spectrometer in order to contribute to a greater understanding of the chemical composition of their organs and tissues, and thus support new studies on flavonoid biosynthesis, as well as contribute to the very rational exploitation the financial resources inherent in this species.

The principal constituents found were stereoisomers of astilbin, rutin and quercitrin. The callus culture presented a very simple flavonoid profile containing only small amounts of apigenin.

Introdução

Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae – Caesalpinioideae), habita no Domínio dos Cerrados, tendo registros de ocorrência nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, Bahia e Norte do Paraná. Trata-se de uma árvore de porte mediano (3-10 m de altura), com copa horizontal densa; folhas bipinadas, pecioladas, de 20-30(-35) cm de comprimento; foliólulos ovais ou oblongos, 1-1,5(-2) cm de comprimento, por 5-7(-8) mm de largura, alternos ou sub-opostos; inflorescência paniculado-corimbosa, 5-10 cm de comprimento, longo-pedunculada; flores amarelas em espigas densas; frutos do tipo legume, espesso, carnoso, comprimido, indeiscente, 10-15(-18) cm de comprimento por 2,5-3,8(-4,5) cm de largura; sementes 10-13(-20), transversais (Silva, 1986). As sementes são elipsoides - achatadas, 8-13 mm de comprimento por 4-6 mm de largura, avermelhadas, superfície lisa, circundada lateralmente por faixa escura, com endosperma (Rizzini, 1971). A casca da árvore é rica em substâncias tânicas e por isso foi muito utilizada na indústria de curtumes (Pio Corrêa, 1926; Hoehne, 1939). Tem como característica marcante os frutos, que, da extremidade dos ramos, se orientam rigidamente para cima. É conhecida popularmente como faveiro, faveleiro, falso-barbatimão, fava d'anta ou então farinheiro (Brandão, 1971).

Flavonoides são metabólitos secundários de baixo peso molecular que apresentam grande diversidade estrutural e amplo espectro de atividades biológicas. A denominação “flavonoides” compreende uma ampla coleção de produtos naturais, estimada em mais de 9000 estruturas descritas (Williams e Grayer, 2004) que apresentam um esqueleto carbônico C6-C3-C6 (fenilbenzopirano). Dependendo posição da ligação do anel aromático ao benzopirano, esses compostos podem ser classificados em três categorias: flavonoides (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides (3-benzopiranos) e neoflavonoides (4-benzopiranos). Os três grupos apresentam chalcona como precursor comum, sendo, por isso, estrutural e biossinteticamente relacionados.

1.1 Categorias de flavonoides

Em todas as três categorias de flavonoides, dois anéis benzênicos estão ligados entre si por um grupo de três carbonos (C3). O arranjo do grupo C3 determina a classificação desses compostos.

1. Flavonoide (2-benzopirano)

2. Isoflavonoide (3-benzopirano)

2. Neoflavonoide (4-benzopirano)

1.1.1 Classificação dos flavonoides (2-benzopiranos)

A partir do grau de oxidação e da saturação presentes no anel heterocíclico C, os flavonoides podem ser divididos nos seguintes grupos: flavanas, flavanonas, flavonas, flavonóis, dihidroflavonóis, flavan-3-óis, flavan-4-óis e flavan-3,4-dióis.

Flavanona

Flavona

Flavonol

Dihidroflavonol

Flavana

Flavan-3-ol

Flavan-4-ol

Flavan-3,4-diol

1.1.2 Classificação dos isoflavonoides (3-benzopiranos)

A partir do grau de oxidação e da saturação presentes no anel heterocíclico C, os isoflavonoides podem ser divididos em: isoflavanos, isoflavanonas, isoflavanonas, isoflavan-3-enas e isoflavanóis.

Isoflavona

Isoflavana

Isoflavan-4-ona

Trans-Isoflavan-4-ol

Cis-Isotripten-4-ol

3-Isotripteno

2-Isotripten-4-ol

2-Isotripteno

1.1.3 Classificação dos neoflavonoides (4-benzopiranos)

Os neoflavonoides são relacionados estrutural e biossinteticamente aos flavonoides e isotriptenoides. Também podem ser classificados de acordo com o grau de oxidação e saturação do anel heterocíclico C em: 4-arilcumarinas, 3,4-dihidro-4-arilcumarinas e neoflavenos.

4-Arylcoumarin

3,4-dihidro-4-arilcumarina

Neoflaveno

1.1.4 Flavonoides minoritários

Chalconas e auronas também apresentam o esqueleto carbônico C6-C3-C6 e são considerados flavonoides minoritários por sua rara ocorrência, comparados aos demais. São classificadas em: 2'-OH-hidroxichalconas, 2'-OH-dihidroxichalconas, 2'-OH-retrochalconas, auronas e auronóis

2'-OH-Chalcona

2'-OH-Dihidrochalcona

2'-OH-retro-chalcona

Aurona

Auronol

1.2 Metodologias analíticas empregadas nos estudos de flavonoides

As diversas classes de flavonoides absorvem energia UV em comprimentos de onda específicos. Flavonóis apresentam duas bandas de absorção entre 260 (banda II) e 370 (banda I) nm, enquanto flavonas apresentam a banda I entre 330 e 250 nm, e a banda II entre 254 e 272 nm. Os dihidroflavonóis apresentam apenas uma banda de absorção (banda I) com absorção máxima entre 280 e 290 nm (Abad-Garcia et al, 2009). Essa característica dos flavonoides torna o espectro de absorção no UV uma informação valiosa para sua elucidação estrutural, mesmo que tentativa.

A espectrometria de Massas (EM) é uma técnica analítica de grande sensibilidade, que vem sendo extensivamente empregada na identificação de flavonoides, ou na sua caracterização estrutural parcial (Stobiecky, 2000; Cuyckens e Claeys, 2004).

O acoplamento de um sistema cromatográfico a um detector espectroscópico, ou ainda, a um detector espectrométrico, como estratégia para a obtenção de informações estruturais de compostos químicos partindo de misturas complexas, como extratos vegetais, tem sido o principal modo de estudo de flavonoides (Stobiecki e Kachlicki, 2006).

Apesar da condição limitante da exigência de cromóforos para que exista a detecção em ultravioleta, o desenvolvimento de detectores de arranjo de fotodiodos (DAD – diode array detector, ou PDA – photo-diode array) permitiu o desenvolvimento de análises de misturas complexas por técnicas cromatográficas hífenadas a técnicas espectroscópicas, tendo por principais vantagens: (1) a obtenção do espectro no UV de substâncias separadas pelo sistema de cromatografia líquida; (2) seu baixo custo, comparado a outros procedimentos de separação e obtenção de informações espectroscópicas; (3) rapidez na obtenção de resultados. Porém, a

necessidade de obtenção de mais informações estruturais, fundamentais a uma proposição de elucidação estrutural, para componentes de uma mistura complexa, proporcionou o desenvolvimento de técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (Crotti et al, 2006a).

Na técnica de CLAE-EM, o espectrômetro de massas é acoplado em linha com um cromatógrafo líquido. Assim, depois do processo de separação cromatográfica, o eluente é dividido por um fracionador (splitter), localizado após a coluna cromatográfica, que direciona parte do eluente em fluxo para a fonte de ionização do espectrômetro de massas, sendo que a outra parte do eluente pode ser direcionada para outro tipo de detector, como um detector DAD, sendo essa uma das técnicas hífenadas mais utilizada atualmente, conhecida como CLAE-DAD-EM (Crotti et al, 2006a).

No processo de acoplamento das técnicas de CLAE e EM se faz necessário um processo de ionização. A técnica de ionização mais utilizada na atualidade é conhecida como ionização por “electrospray” (ESI), devido a sua versatilidade. A técnica consiste num processo pelo qual, sob pressão atmosférica, um campo elétrico de elevada intensidade dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de uma fina suspensão de gotas eletricamente carregadas, as quais, por evaporação, geram íons na fase gasosa (Fenn, 2003). Na ionização por ESI, a formação de íons ocorre, principalmente, por reações do tipo ácido-base de Brönsted-Lowry, ou pela protonação e desprotonação de moléculas. Desse modo, substâncias que apresentam grupos funcionais básicos, como aminas, amidas e ésteres, podem ser analisadas preferencialmente no modo de ionização positiva, devido a maior facilidade com que esses grupos funcionais são protonados, quando em solução. Ao contrário, moléculas que contêm grupos funcionais ácidos, como ácidos carboxílicos e fenóis, podem ser analisadas preferencialmente no modo de ionização negativa, por meio do qual são produzidas moléculas desprotonadas relativamente estáveis (Crotti et al, 2006b).

Devido ao processo de ionização por “electrospray” ser muito brando, pouca energia residual é retida pelo analito após sua ionização, o que, geralmente, acarreta numa reduzida quantidade de fragmentos. Para contornar a desvantagem da reduzida transferência de energia para as moléculas, foram desenvolvidos espectrômetros de massas que promovem ionização sequencial (EM/EM ou EMⁿ), onde a quantidade de fragmentos é significativamente aumentada, permitindo maior quantidade de informações para estudos de elucidação estrutural (Crotti et al, 2006b).

Numa análise do tipo EM/EM, um íon precursor é selecionado, e posteriormente transferido para uma célula de colisão. A fragmentação do íon precursor ocorre através da dissociação induzida por colisão (em inglês, CID – collision-induced dissociation) pelo uso de um gás inerte (geralmente Ar, N₂ ou CO₂). Os íons de segunda geração são, geralmente, altamente informativos sobre a estrutura do íon precursor (Crotti et al, 2006b).

A técnica de CLAE-DAD-EM/EM tem sido extensivamente empregada no estudo de flavonoides em extratos de plantas e fruídos biológicos, e devido a sua versatilidade e velocidade de produção de resultados, tende a ser a técnica de primeira escolha para investigações de composição química de plantas (Stobiecki e Kachlicki, 2006).

1.3 A biossíntese dos flavonoides

A via de síntese dos flavonoides é parte da via biossintética dos fenilpropanoides, e se inicia com a condensação de uma unidade de *p*-cumaroil-CoA com três unidades de malonil-CoA, produzindo uma chalcona (4', 2', 4', 6'-tetrahidroxichalcona), sob ação catalítica da enzima chalcona sintase (CHS). O passo seguinte consiste na isomerização da chalcona em flavona pela enzima chalcona isomerase (CHI). Desse passo em diante, ramificações da via produzem todas as demais classes de flavonoides: auronas, dihidrochalconas, flavanonóis (dihidroflavonóis) isoflavonas, flavonóis, leucoantocianidinas, antocianinas e proantocianidinas.

A via de biossíntese de flavonoides é praticamente conhecida (Figura 2). Os genes estruturais, que participam diretamente na formação dos flavonóides, e alguns genes regulatórios, que controlam a expressão dos genes estruturais já foram identificados e isolados em plantas modelo como *Antirrhinum*, *Nicotiana*, *Petunia*, *Solanum* e *Arabidopsis* (Holton & Cornisch, 1995; Schijlen, 2007).

Em frutos de tomate, flavonóis, principalmente rutina e canferol rutinosídeo, são acumulados quase que exclusivamente no epicarpo de frutos em processo de amadurecimento. Análises de expressão dos genes responsáveis pela síntese de chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavona 3-hidroxilase (F3H) e flavonol sintase (FLS) revelaram que CHS, F3H e FLS são expressos no epicarpo durante todos os estágios de amadurecimento e com picos de expressão em estágios específicos. Em contrapartida, a transcrição de CHI permaneceu em níveis não detectáveis (Muir et al,

2001). Em *Petunia*, a expressão ectópica de CHI resultou em aumento de flavonóis no epicarpo. Esse aumento ocorreu, principalmente, pelo acúmulo de rutina, quercitrina e pequenas quantidades de canferol glicosilado, indicando que o controle da produção de flavonóis está no nível do gene CHI (Schijlen, 2007).

Figura 1 – Esquema da via biossintética de flavonóides e antocianinas e enzimas: responsáveis: ACCase, acetil CoA carboxilase; PAL, fenilalanina amônia-liase; C4H, cinamato 4-hidroxilase; 4CL, 4-cumarato:CoA ligase . CHS, chalcona isomerase; CHKR, chalcona quetídeo redutase; FSI, flavona sintase I; FSII, flavona sintase II; CHI, chalcona isomerase FS, flavona sintase; IFS, isoflavona sintase; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase; F3'5'H, flavonoide 3'5'-hidroxilase; FLS, flavonol sintase; DFR, diidroflavonol 4-redutase; LAR,

leucoantocianidina redutase; ANS, antocianina sintase; GT, glucosil-transferase; ACT, antocianina acil-transferase; MAT, malonil-transferase (modificado de Springob et al., 2003).

Em estudos com plantas transgênicas, a biossíntese de flavonóis no pericarpo e columela do fruto de tomate é ativada por CHS e FLS, enquanto CHI parece ter um papel chave no acúmulo de flavonóis no epicarpo (Colliver, 2002; Verhoeven, 2002). Dessa forma, pode ser concluído que, na parte interna do tomate a expressão de CHI e F3H não é requerida na produção de flavonóis. Possivelmente, isso se deve à presença suficiente da enzima chalcona isomerase (CHI) ou a conversão espontânea de naringenina chalcona em naringenina (Martens et al, 2003; Lukain et al, 2003).

1.4 Atividades biológicas dos flavonoides

Em oposição às interpretações do passado, os flavonoides, assim como todos os demais metabólitos secundários, não são resíduos de processos evolutivos isentos de função biológica (Hartmann, 2007). Ao contrário, atualmente são reconhecidos por uma grande diversidade de atividades biológicas, sendo também benéficos às próprias plantas que os sintetizam, apresentando ações fisiológicas como proteção contra estresses ambientais, atração de polinizadores e dispersores, ou ainda inibidores de herbivoria e resistência a patógenos.

1.3.1 Flavonoides como fontes de proteção contra estresses promovidos pelo ambiente.

Segundo Mouradov e Spangenberg (2014), existem duas principais hipóteses sobre a função primordial dos flavonoides em plantas: (i) flavonoides seriam barreiras de proteção contra a radiação ultravioleta (UV), proposta por Markham (1988) e (ii) flavonoides seriam reguladores do desenvolvimento, mediando o transporte e o catabolismo de auxina, como foi proposto por Stafford (1991).

Flavonoides são reconhecidos por proteger plantas de possíveis injúrias provocadas por radiação UV. Essa informação é suportada pelo fato de flavonoides absorverem radiação ultravioleta, agindo como fotoprotetores (Sisa et al 2010), também por estarem frequentemente presentes em tecidos expostos à luz UV, como epiderme de folhas e meristemas apicais e grãos de pólen (Wilnkel-Shirley, 2002), o que foi

reforçado por evidências experimentais de que a exposição de plantas à radiação UV induz o acúmulo de flavonoides, como apresentado por Ryan et al. (2001) em mutantes de *Arabidopsis*, e posteriormente, em folhas de *Petunia* (Ryan et al, 2002), havendo resultados semelhantes em experimento conduzido com folhas de mirtilo (Jaakola et al., 2004).

Auxinas são importantes hormônios vegetais, que atuam sobre diversos processos, do desenvolvimento da raiz à divisão celular e transcrição gênica. As respostas das células vegetais a esse hormônio estão relacionadas a receptores específicos, mas a integração entre a auxina e cascatas de sinalização molecular demanda um conector. A primeira evidência da relação entre flavonoides e a inibição do transporte de auxinas foi apresentada por Jacobs e Rubery (1988), que observaram que flavonoides competem por esses receptores de auxina com o ácido 1-naftilftalâmico (NPA), um inibidor sintético de auxina, em experimento *in vitro*, sugerindo que flavonoides se ligam a proteínas que interagem com NPA. Em estudos recentes, os flavonoides quercetina, canferol e apigenina foram relacionados à divisão celular regulada por auxina, na condição de sinais moleculares (Peer e Murphy, 2007; Buer e Djordjevic, 2009; Kuhn et al, 2011; Lewis et al, 2011). Num estudo em que se buscou a relação entre a auxina, o acúmulo de flavonoides mediado por radiação UV, e a indução de processos morfogenéticos, Hectors et al., (2012) mostraram que, ativada pela incidência de luz, a auxina poderia regular padrões de glicosilação de diversos flavonoides em resposta à radiação UV-B, contribuindo significativamente para a ocorrência de respostas morfogenéticas induzidas por essa fonte de estresse.

A função protetora dos flavonoides contra os efeitos adversos da radiação UV apresenta relações com o sequestro de espécies reativas de oxigênio (EROS), produzidos durante a exposição de plantas a excesso de luz. Para que uma molécula seja considerada antioxidante, ela deve (1) apresentar a capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio, (2) produzir um radical derivado capaz de se ligar eficientemente a elétrons ou átomos de hidrogênio, (3) ter suas concentrações correlacionadas a eventos de estresse oxidativo *in vivo* (Hernández et al, 2009). O potencial antioxidativo dos flavonoides é atribuído às hidroxilas fenólicas do anel B, as quais apresentam a capacidade de doar elétrons, de modo que compostos com maior número de hidroxilas no anel B têm maior potencial antioxidativo (Pannala et al, 2001). São atribuídas aos flavonoides funções fisiológicas como aclimação (Bohm e Stuessy, 1991) e resistência ao calor e a estiagens (Moore et al., 2004; Feucht et al, 2013) devido a sua presença em

membranas e na parede celular. Tattini et al., (2004) sugeriram que flavonoides, por meio de sua capacidade antioxidante, promoveriam função protetora contra o estresse hídrico. Agati et al. (2012) teorizam que, essa capacidade antioxidante dos flavonoides seria o fator que os relaciona funções biológicas tão diversas quanto desenvolvimento e fotoproteção.

Flavonoides teriam ainda, devido a sua capacidade de se complexar com metais, a possível função de auxiliar plantas na ocupação de solos ricos em metais tóxicos, como o alumínio (Barceló e Poschenrieder, 2002). Em experimento de cultivo de *Rumex acetosa* sob diferentes concentrações de alumínio, Tolrà et al. (2005) observaram que, sob elevadas concentrações de alumínio, os caules apresentaram acúmulo de rutina e catequina. Resultados que corroboram com essa hipótese foram obtidos em experimento semelhante em cultura de raízes de milho in vitro, onde foi encontrada correlação positiva entre a produção de exsudados radiculares contendo catequina e quercetina e elevadas concentrações de alumínio na composição do substrato (Kidd et al, 2001).

1.3.2 Flavonoides, a coloração de órgãos vegetais e suas funções ecológicas.

A maior fonte de coloração em flores e frutos é advinda de antocianinas. Cores como vermelho, púrpura e azul são predominantemente conferidas por antocianinas, de ocorrência majoritária na forma de glicosídeos, e complexadas com metais. Porém, outros flavonoides podem estar associados à coloração em flores e frutos, como flavonas e flavonóis, conferindo cores de tonalidades branca, amarelo pálido e amarelo escuro. Alguns flavonoides podem ainda servir de co-pigmentos, conferindo uma grande diversidade de cores a flores e frutos (Miller et al, 2011).

Muitos estudos ecológicos associam cores em flores e frutos a processos de polinização e dispersão. Ram e Mathur (1984) observaram a interferência de antocianinas na polinização de *Lantana camara* por tisanópteros. Segundo os autores, as flores atraem esses insetos, seus polinizadores predominantes, quando apresentam a cor alaranjada, proporcionadas por betacaroteno. Após a polinização, as flores apresentam tonalidade magenta, proporcionada por um monoglucosídeo de delphinidina, que apresentam ação inibitória sobre esses insetos.

Segundo hipóteses ecológicas, o modo de reconhecimento de frutos por animais frugívoros, não seria muito diferente do modo de reconhecimento de flores por

polinizadores (Stiles, 1982). Assim, o reconhecimento de frutos aptos ao forrageio, e a consequente dispersão de sementes, teria significativa participação de pigmentos vegetais, como flavonoides e carotenoides (Willson e Whelan, 1990).

1.3.3 Atividades fitotóxicas e alelopáticas de flavonoides.

O efeito direto ou indireto de compostos secundários produzidos por uma planta sobre outra é denominado alelopatia. Esse tipo de interação é frequentemente classificado como uma interação defensiva para a planta produtora e negativa para plantas receptoras, mas a alelopatia pode ser descrita também como uma interação de benefícios mútuos (Rice, 1984). Na literatura sobre o tema, existe um grande número de registros do envolvimento de flavonoides em interações alelopáticas (Weston e Mathesius, 2013).

Os flavonoides apigenina, apigenina-7-O-triglicosídeo, lucenina-2, lucenina-7-O-neohesperidosídeo, saponarina e vitexina e o biflavonoide bartramiaflavona, isolados de cinco espécies de musgos por Basile et al. (2003), e foram investigados quanto a sua ação sobre a germinação de esporos e o crescimento do musgo *Tortula muralis*, assim como sobre a germinação e o crescimento de plântulas de *Raphanus sativus*. Os autores observaram em *T. muralis* a reduzida germinação de esporos, considerável redução do crescimento e alterações na morfologia celular. Todos os resultados apresentaram relação dose-dependente. Em *R. sativus*, a porcentagem de sementes germinadas foi significativamente reduzida, a elongação da radícula e o crescimento de pelos radiculares foram inibidos, havendo também uma relação dose-dependente, onde o flavonoide saponarina apresentou os resultados mais expressivos.

Fazendo uso de um delineamento experimental compatível ao do estudo acima citado, Nandakumar e Rangaswamy (1985), não observaram quaisquer efeitos associados aos flavonoides isovitexina e leucocyanidina, isolados de folhas de *Rhynchosia minima* sobre a germinação de sementes de *Rhynchosia minima*, *Brassica campestris* e *Lens esculenta*. Porém os dois flavonoides em estudo apresentaram efeitos positivos sobre o crescimento de raízes de *B. campestris* e *L. esculenta*, havendo efeitos mais pronunciados associados à vitexina. O mesmo flavonoide promoveu o enraizamento de bulbos de cebola. Todos os resultados positivos apresentaram relação dose-dependente.

1.3.4 Flavonoides e a germinação do grão de pólen.

Em espécies tão distintas quanto *Pinus* e *Ipomea* existem registros de ocorrência de grãos de pólen despigmentados, sendo a coloração, quando ocorre, conferida por flavonoides como quercetina e canferol, no caso de grãos de pólen amarelos, e antocianinas em grãos de pólen vermelhos, como os de milho (Taylor e Grotewold, 2005). Coe et al., (1981) apresentaram uma correlação entre a despigmentação dos grãos de pólen e a infertilidade em milho. Análises posteriores em mutantes do gene CHS, responsável pela síntese da enzima chalcona sintase, em milho e petúnia, revelaram que, apesar de viáveis, grãos de pólen deficientes em flavonoides não produziam tubos polínicos funcionais. Porém, a sua funcionalidade era restaurada após a aplicação de flavonoides em cultura in vitro ou diretamente no estigma da flor no ato da polinização (Mo et al., 1992).

1.3.5 Flavonoides como mediadores de interações entre plantas e microrganismos.

A maioria das plantas vive em contato com microrganismos, por muitas vezes simbioses, que proporcionam a elas nutrientes, auxiliando na ocupação de solos oligotróficos. As raízes de muitas plantas, com predomínio para leguminosas, são colonizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio mineral, benéficas para as plantas. Muitos flavonoides são exsudados pelas raízes de plantas, e agem como sinais indutores da transcrição de genes *nod* bacterianos, que produzem proteínas necessárias ao processo de invasão dos tecidos vegetais.

Segundo Mierziak et al., (2014), solos com baixas concentrações de nitrogênio levam as plantas a acumularem flavonoides, que estimulam a colonização das raízes por bactérias diazotróficas, resultando no transporte de formas reduzidas de nitrogênio para o interior das células vegetais, e no acesso a derivados da fotossíntese pelas bactérias.

Webster et al., (1998) obtiveram resultados experimentais que concluíram que a flavanona naringenina apresentou efeito estimulante sobre a colonização de raízes de trigo por *Azorhizobium caulinodans* e *Azorhizobium brasilense*, estimulando a transcrição de genes *nod*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hartwig et al., (1990) que encontraram associação entre a colonização de radículas de alfafa por *Azorhizobium meliloti* à indução de genes *nod* pelos flavonoides 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona, 4',7-dihidroflavona, 4'-7-dihidroflavanona, crisoeriol, luteolina e 3'-metoxiluteolina.

Flavonoides podem influenciar tanto positiva quanto negativamente o nível de expressão dos genes *nod* bacterianos, que controlam a formação dos nódulos radiculares, relacionados à fixação de nitrogênio. As isoflavonas daidzeína e genisteína induzem a expressão de genes *nod* em *Bradyrhizobium japonicum*, porém inibem a expressão desses genes em *Sinorhizobium meliloti*. De modo semelhante, naringenina estimula a formação de nódulos radiculares em *Rhizobium leguminosarum*, enquanto o flavonol quercetina inibe sua formação (Cooper, 2004).

Existem evidências de que flavonoides tem participação na formação de associações entre raízes de plantas e fungos micorrízicos. Os meios pelos quais os flavonoides participam da formação de micorrizas ainda são pouco conhecidos. Aparentemente, eles podem efeitos positivos e negativos sobre essa formação simbiótica (Mierziak et al, 2014).

Elevações das concentrações de flavonoides apresentaram correlação positiva com a formação de endomicorrizas em *Trifolium repens* (Siqueira et al., 1991; Nair et al., 1991; Ponce et al., 2004). Tsai et al. (1991) reportaram efeitos positivos dos flavonóis quercetina, quercetina galactosídeo e canferol sobre o crescimento de hifas e a germinação de esporos de *Glomus sp.* In vitro. O efeito positivo de flavonoides também foi observado sobre o crescimento de fungos ectomicorrízicos, havendo o estímulo do crescimento de hifas de *Pisolithus sp.* pela rutina exsudada das raízes de *Eucalyptus globulus spp. bicostata* (Lagrenge et al., 2001).

1.3.6 Flavonoides como promotores de resistência a patógenos

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é extensamente conhecida. Muitos flavonoides apresentam essa atividade biológica, conferindo a plantas resistência constitutiva ou como fitoalexinas, tendo sua biossíntese induzida a partir de invasões de seus tecidos por agentes patogênicos (Harborne e Williams, 2000).

Um estudo conduzido com sementes de mutantes de cevada deficientes na presença de flavonoides demonstrou que a ausência proantocianidinas e dihidroquercetina, tornava-os menos resistentes a invasões promovidas por quatro

diferentes espécies patogênicas de *Fusarium* em comparação com sementes selvagens (Skadhauge et al, 1997). Os mecanismos de ação envolvidos na resistência constitutiva a patógenos associados a flavonoides podem compreender a ligações cruzadas com enzimas relacionadas à degradação de tecidos vegetais, inibição de celulases, xilanases e pectinases microbianas, quelação de metais necessários à ativação dessas enzimas, ou ainda, a formação de estruturas rígidas ou cristalinas, que impedem a invasão pelo patógeno (Treutter, 2005).

A biossíntese de flavonoides induzida por infestação fúngica, que permite classificar alguns desses compostos como fitoalexinas, foi apresentada inicialmente em estudo conduzido por Lo et al. (1999) com plântulas de sorgo (*Sorghum bicolor*), e hoje consiste no modelo biológico mais completo sobre a produção de flavonoides induzida pela atividade patogênica de diversas espécies de *Cochliobolus*, responsáveis pela antraquinose. Porém o modo de ação ainda necessita de estudos para a sua melhor compreensão (Aguero et al., 2002; Du et al., 2010).

1.3.7 O uso de biotecnologias para o estudo da biossíntese de flavonoides e obtenção de compostos de interesse

A produção de calos e suspensões celulares a partir da dediferenciação de tecidos vegetais com fins biotecnológicos é um tema repleto de desafios na literatura sobre tanto investigações biossintéticas quanto a busca por metabólitos de interesse econômico (Liu e Saxena, 2009). Por meio da indução e proliferação de calos é possível obter uma matriz biológica mais simples do que órgãos e tecidos vegetais, podendo ainda, a partir desses calos, serem geradas culturas de células, que se prestam à investigações de processos enzimáticos e regulatórios envolvidos na biossíntese metabólitos de baixa concentração em plantas, ou de interesse por suas atividades biológicas, como a glicosilação de tocoferol (Shimoda et al, 2007) ou daidzeína (Shimoda et al, 2008) em culturas de células de eucalipto.

1.3.8 Atividades medicinais e farmacológicas de flavonoides

Estudos epidemiológicos demonstram que dietas com elevados teores de polifenóis, flavonoides inclusos, promovem a redução da ocorrência de doenças cardiovasculares (Mursu, et al, 2008; Holt et al, 2009). Além disso, resultados

experimentais em humanos e animais modelo, demonstram que essas mesmas substâncias promovem redução dos quadros de (1) dislipidemia e arteriosclerose, (2) disfunção endotelial e hipertensão, (3) ativação de plaquetas e do risco de trombose, (4) processos inflamatórios associados com a indução e perpetuação de doenças cardiovasculares (Fraga et al, 2010).

A atividade antitumoral de flavonoides é ainda um ponto de discussão na literatura científica. Teoricamente, flavonoides podem inibir processos cancerígenos por sua atividade antioxidante. Experimentos in vitro com diversas linhagens de células tumorais apresentam resultados positivos, porém um número insuficiente de estudos in vivo está disponível para comparações e confirmações (Nijveldt et al, 2001).

A ação antimicrobiana de diversos flavonoides é amplamente reportada na literatura científica. Diversos flavonoides são reportados como inibidores da proliferação de colônias de *Candida albicans* (Wachter et al, 1999), além de inibirem a germinação de esporos do fungo patogênico *Penicillium expansum* (Valsaraj et al, 1997). Até mesmo a ação inibidora de enzimas do vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi observada, em experimentos in vitro (Li et al, 1993; Li et al, 2000).

Os principais mecanismos propostos para explicar as ações farmacológicas dos flavonoides são: (1) ação antioxidante e o sequestro de metais, (2) interações com fatores de transcrição, (3) interações com enzimas e (4) interações diretas com receptores de membrana plasmática (Havsteen, 2002).

Objetivos

O objetivo do trabalho apresentado neste capítulo foi obter perfis qualitativos da composição flavonoídica de diferentes órgãos e calos originados de diversos explantes de *Dimorphandra mollis* Benth para fins comparativos.

Material e Métodos

2.1 Procedimentos de demarcação, coleta e armazenamento de amostras de *D. mollis*.

Foram identificados e marcados dez indivíduos da espécie *D. mollis* no município de Pirassununga (SP). Esses indivíduos foram alvo de amostragens para estudo da composição de flavonoides de folhas, flores frutos, cascas, madeira, raízes, sementes, além de estudo da possibilidade de variação da composição de flavonoides ao longo de três estágios do desenvolvimento de folhas, flores e frutos, por um ciclo fenológico, que apresenta a duração média de 14 meses.

As amostras foram obtidas a partir de secções com tesoura de alta poda, acondicionadas em sacos de papel, cadastradas e levadas para o Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para secagem e armazenamento.

As amostras foram secas em estufa a 50°C até apresentarem sinais de ausência de umidade, pulverizadas em moinho de bolas e submetidos à tamisação com peneira metálica de malha de 0,120 µm. Os produtos da tamisação, com granulometria homogênea, foram armazenados em potes de plástico, com batoque, identificados, e armazenados em câmara escura, com controle de umidade para posterior procedimento de extração de flavonoides.

2.2 Procedimentos de extração de flavonoides de amostras de folhas, flores, frutos, cascas, madeira e sementes de *D. mollis*.

Para a extração dos flavonoides, de cada amostra, uma alíquota de 100 mg foi pesada em balança analítica, acondicionada em tubo eppendorf com 2 mL de capacidade. Ao material pulverizado, foi adicionado o volume de 1,5 mL de metanol (MeOH) 80% em água deionizada (18 mΩ, Milli-Q, Millipore) . Cada procedimento de extração a frio teve 60 minutos de duração, sendo repetido por mais duas vezes, gerando um volume final de 4,5 mL. Os extratos brutos, com volume de 4,5 mL foram acondicionados em tubos de vidro de 10 mL de capacidade, e submetidos a secagem sob fluxo de nitrogênio gasoso. Após a completa secagem dos extratos, eles foram

ressuspendidos em 1, mL de MeOH 50% em água deionizada (18 mΩ, Milli-Q, Millipore), e procedeu-se com a partição líquido-líquido, com a adição de 1 mL de tolueno. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. As alíquotas da fração metanólica foram secas, novamente, sob fluxo de nitrogênio gasoso, armazenadas em dessecador a vácuo, com sílica gel, para análises de cromatográficas e de espectrometria de massas.

2.3 Procedimentos para germinação de sementes e indução de calos de explantes de *D. mollis*

Devido à ausência de informações sobre a possibilidade do cultivo in vitro de *D. mollis*, procedeu-se com um ensaio inicial de germinação in vitro para a futura obtenção de calos, com a finalidade de investigar seu perfil flavonoídico. As sementes foram obtidas a partir de frutos senescentes de indivíduos provenientes de Pirassununga (SP) em coleta executada em setembro de 2011. Os procedimentos descritos abaixo foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Celular de Plantas do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Eny Floh.

2.4 Procedimento de esterilização das sementes

A esterilização das superfícies das sementes foi desenvolvida por imersão em solução de etanol 70% por dez minutos, seguido da de imersão em solução de hipoclorito de sódio 5% com a adição de 10 µL de solução detergente por dez minutos, com agitação constante feita por agitador mecânico. Posteriormente, as sementes passaram por três lavagens com água destilada, para a remoção do hipoclorito de sódio e de resíduos de detergente. Em seguida, foram submetidas a tratamentos de quebra de dormência.

2.5 Procedimento de quebra de dormência

As sementes de *D. mollis* apresentam um tegumento rígido e aparentemente impermeável à água. Foi feito um teste de embebição de sementes com água, no qual elas permaneceram por dez dias sem nenhum sinal de saturação do tegumento. Um estudo conduzido por Pacheco et al. (2011) informa que as sementes de *D. mollis*

necessitam de quebra de dormência para a germinação, e concluíram que a escarificação mecânica é o método mais eficaz.

As sementes foram esterilizadas conforme descrito anteriormente, e a região oposta à micrópila foi escarificada com lixa de madeira P 220, até que o cotilédono fosse alcançado. Posteriormente, o procedimento de esterilização das superfícies das sementes foi repetido.

2.6 Meios de cultura e processo de germinação

O meio de cultura empregado para a germinação *in vitro* foi o meio MS (Murashige e Skoog, 1962). O pH do meio de cultura foi ajustado para $5,8 \pm 0,1$ antes da autoclavagem. O agente solidificante empregado foi phitigel na concentração de 2,5 g/L.

As sementes escarificadas e esterilizadas foram inoculadas, em câmara de fluxo laminar, em frascos de vidro com tampa, com capacidade para 250 mL, contendo 25 mL de meio de cultura solidificado. Foram alocadas quatro sementes para cada frasco. Os frascos foram mantidos em sala de cultivo sob temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2$, sob fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, com intensidade luminosa de $35 \mu\text{M}\cdot\text{M}^2\cdot\text{S}^{-1}$.

Devido a observação de que as plântulas de *D. mollis* exsudavam compostos que poderiam comprometer o crescimento das plântulas, novos experimentos de germinação *in vitro* foram empreendidos com a adição de carvão ativado, na concentração de 2,5 g/L, como recomendado por Thomas (2008).

2.7 Obtenção de embriões, plântulas exsudados de raízes e calos de *D. mollis*

Após quatro dias da inoculação das sementes em meio de cultura, elas se apresentaram totalmente túrgidas. De um lote de 300 sementes, 100 foram coletadas, para a remoção dos seus embriões. Os embriões foram removidos pela abertura das sementes túrgidas com auxílio de bisturi, imersos em nitrogênio líquido e triturados, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó muito fino e homogêneo. Uma alíquota de 1 g embriões pulverizados foi pesada em balança analítica e submetida ao procedimento de extração de flavonoides descrito na seção 2.2.

Após 40 dias da inoculação das sementes, 100 plântulas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido, e trituradas, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó muito fino e homogêneo. Uma alíquota de 1 g plântulas pulverizados foi pesada em balança analítica e submetida ao procedimento de extração de flavonoides descrito na seção 2.2

Das sementes inoculadas em meio MS livre de carvão ativado, 300 plântulas de 60 dias após inoculação foram utilizadas como fontes de explantes para a indução de calos. Devido à coloração marrom escuro dos meios de cultura, uma aparência característica da presença de compostos fenólicos exsudados de raízes, eles foram coletados, secos em estufa a 50°C, posteriormente pulverizados com auxílio de almofariz e pistilo, até que um pó fino e homogêneo foi obtido. O material pulverizado, pesando aproximadamente 200 g, foi submetido ao procedimento de extração de flavonoides. Para os 200 g de sólido pulverizado, foram adicionados em erlenmeyer de capacidade de 500 mL, 300 mL de MeOH 50% em água deionizada, e submetido a extração por 24h. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, e o volume final de 900 mL foi concentrado em evaporador rotatório, com banho-maria a 60°C até a redução do volume para 12 mL. O volume final foi submetido à completa secagem sob fluxo de nitrogênio gasoso. O sólido obtido, foi ressuspensos em 2 mL de MeOH 50% em água deionizada, e procedeu-se com a partição líquido-líquido, adicionando 2 mL de tolueno. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, e o volume final de 6 mL da fração metanólica foi submetido a secagem sob fluxo de nitrogênio gasoso. O sólido obtido foi armazenado em dessecador a vácuo, com sílica gel, para posteriores análises cromatográficas e de espectrometria de massas.

Para a obtenção dos calos, os seguintes explantes: cotilédones, epicótilos e hipocótilos, foram inoculados em meio de cultivo MS contendo 50 μ M de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) e 50 μ M de ácido naftalenoacético (ANA) e o antioxidante vinil pirrolidona (PVP) na concentração de 1 g/L. Após quatro séries de repicagem e proliferação, os calos obtidos foram coletados, imersos em nitrogênio líquido, pulverizados, com auxílio de almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó muito fino e homogêneo, sendo posteriormente submetidos ao procedimento de extração de flavonoides.

2.8 Análises por CLAE-DAD

Alíquotas de 20 uL das amostras foram injetadas, via auto-injetor m na coluna cromatográfica Luna C18 100A 250 X 3,00 mm 5 micron. O sistema de solventes empregado foi: A: H₂O/Ácido fórmico 0,1%; B: Metanol/Ácido fórmico 0,1%. O gradiente empregado aquele apresentado na Tabela 1. A coluna cromatográfica foi mantida sob temperatura constante de 40°C, em forno. O detector de UV foi regulado para o registro dos comprimentos de onda de 280nm e 352 nm.

Tabela 1. Gradiente de eluição utilizado para as análises por CLAE.

Tempo (min.)	Porcentagem de B (Metanol/Ácido fórmico 0,1%)
0 -5	28% de B
5-40	80% de B
40-50	100% de B

2.9 Análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM

As análises de CLAE-DAD foram desenvolvidas em equipamento Shimadzu HPLC-LC 20 AD. As análises de CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM foram desenvolvidas em equipamento Shimadzu LC20AD acoplado a espectrômetro de massas Bruker microTOF-QII, ambos do Laboratório de Química de Produtos Naturais, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As análises por CLAE-DAD-EM (CLAE acoplada a DAD e a espectrometria de massas como detectores, em paralelo) e CLAE-DAD-EM/EM (CLAE acoplada a DAD e a espectrometria de massas operando no modo EM/EM, ou seja, gerando espectros de íons produto a partir da fragmentação de íons precursores selecionados induzida em célula de colisão, foram realizadas com o emprego das mesmas condições cromatográficas que aquelas empregadas nas análises de CLAE-DAD.

O eluente da coluna foi dividido por um splitter em na proporção de 3:1, sendo o maior fluxo dirigido para o DAD, e o restante direcionado ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas na região do UV, obtidos pelo DAD, foram registrados em 280 e 352 nm. Os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre m/z 100 e m/z 1000, e os parâmetros do instrumento apresentados a seguir foram mantidos

constantes em todas as análises: 1000 *scans* por segundo; intervalo entre espectros de 2 segundos; fluxo do gás de nebulização de 4 bar; voltagem capilar de 4500 V; gás de secagem N₂, com fluxo de 5,0 L/min, sob temperatura de 200° C. Para a obtenção de massas moleculares acuradas em alta resolução, uma solução a 20 mM de NaOH foi injetada ao final das sequências de análises, para que então, os espectros de massas obtidos pudessem ser calibrados pelas massas moleculares exatas calculadas dos íons aglomerados de formiato de sódio, produzidos entre o sódio e o ácido fórmico presente na fase móvel. Após as análises de CLAE-DAD-EM, os tempos de retenção e *m/z* obtidos para cada pico cromatográfico foram utilizados na determinação dos parâmetros para a posterior análise de CLAE-DAD-EM/EM. Assim, para a obtenção dos espectros de íons produto (EM/EM) em função dos íons precursores desejados, o *m/z* de cada íon precursor, para o qual sua fragmentação era desejada, foi informado ao software do espectrômetro de massas, para seu encaminhamento à célula de colisão. A dissociação induzida por colisão, ou fragmentação, foi desenvolvida com uso de N₂ como gás de colisão, e a energia de colisão foi de 12 eV.

Como solventes para preparação das amostras análises cromatográficas e espectroscópicas, foram utilizados metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), e ácido fórmico, todos com grau HPLC de pureza. Os padrões analíticos rotina e apigenina empregados no estudo foram proveniente do fabricante Sigma-Aldrich.

Resultados

Foram obtidos os perfis cromatográficos de extratos metanólicos de folhas (Figura 1 do Apêndice 1), flores (Figura 2 do Apêndice 1), frutos (Figura 3 do Apêndice 1), madeira (Figura 4 do Apêndice 1), casca (Figura 5 do Apêndice 1), embriões, plântulas (Figura 6 do Apêndice 1), exsudados radiculares (Figura 7 do Apêndice 1), e calos obtidos a partir de cotilédones (Figura 8 do Apêndice 1), epicótilos (Figura 9 do Apêndice 1) e hipocótilos (Figura 10 do Apêndice 1) de plântulas de *D. mollis*. A seguir, os resultados serão apresentados individualmente.

Para as amostras correspondentes aos extratos flavonoídicos de folhas, flores e frutos, submetidas às análises de CLAE-UV-EM/EM, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, houve uma variação de aproximadamente um minuto entre os tempos de retenção obtidos para os picos majoritários entre seus resultados. O motivo mais provável dessa alteração sistêmica nos tempos de retenção foi a necessidade de uma manutenção da bomba injetora do cromatógrafo acoplado ao espectrômetro de massas, ocorrida entre as análises para a obtenção dos fragmentos com os modos de ionização positiva e negativa, e não devido a um problema no método cromatográfico empregado. Essa hipótese é corroborada pelo fato de os espectros no UV se manterem coerentes.

3.1 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de folhas de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, do extrato flavonoídico de folhas apresentou sete picos majoritários, com os seguintes tempos de retenção: (1) 16,1; (2) 17,1; (3) 18,3; (4) 18,8; (5) 19,3; (6) 20,5 e (7) 21,3 minutos, com detecção em 280 nm e 352 nm de comprimento de onda (Figura 15 do Apêndice 1).

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo negativo apresentou os mesmos picos majoritários, com detecção, porém com tempos de retenção ligeiramente distintos, respectivamente: (1) 15,1; (2) 15,9; (3) 17,3; (4) 17,8; (5) 18,3; (6) 19,5 e (7) 20,5.

O pico **1** apresentou uma banda com absorbância máxima em 289 nm e um ombro com máximo 327 nm (Figura 16 do Apêndice 1), sinais característicos de astilbina (Figura 84 do Apêndice 1), um ramnosídeo de dihidroquercetina (Mabry et al, 1970), já isolada de flores de *D. mollis* (Pereira et al, 2002), ou ainda, um de seus estereoisômeros (Figura 85 do Apêndice 1), (Huang et al, 2014) .

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 17 do Apêndice 1) apresentou como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1035, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2151, de acordo com a fragmentação dos íons produto). O íon de m/z 305,0617, aparentemente, é produto da fragmentação do íon $[M+Na]^+$, porém a fragmentação do íon selecionado $[M+Na]^+$ não foi possível. Apesar disso, a presença do fragmento de m/z 305,0617 está coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 18 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1098, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2282. A fragmentação do íon m/z 449,1100, produziu os fragmentos m/z 303,0493 e m/z 151,0030, coerentes com a fragmentação de estereoisômeros de astilbina (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

O pico **2** apresentou uma banda com absorbância máxima em 290 nm e um ombro com absorbância máxima em 327 nm (Figura 19 do Apêndice 1), também coerente com as absorbâncias máximas da astilbina e seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo (Figura 20 do Apêndice 1) apresentou, também, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,11, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,21. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,06 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 21 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,10, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,22. A fragmentação dos íons

produto de m/z 449,10, produziu os íons de m/z 303,0493 e m/z 151,0030, coerentes com a fragmentação de astilbina e seus estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

O pico 3 apresentou duas bandas, com absorbâncias em regiões típicas de flavonóis, entre 240 e 400 nm (Mabry et al, 1970), tendo a banda I apresentado absorvância máxima em 355 nm e um ombro em com máxima absorção em 299 nm, e a banda II tendo apresentado absorvância máxima em 255 nm e um ombro com absorvância máxima em 265 (Figura 22 do Apêndice 1). Tanto as absorvâncias quanto o tempo de retenção foram coerentes com aqueles apresentados pelo padrão rotina (Figura 23 do Apêndice 1).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 23 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1407, e como pico base, o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0480, coerentes com a proposta de fragmentação da rotina apresentada por Barreca et al. (2013).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 23 do Apêndice 1), apresentou o íon $[M-H]^-$ de m/z 609,1469, e seus fragmentos característicos de m/z 463,0893 e m/z 301, 0333, coerentes com a fragmentação da rotina proposta na literatura (Barreca et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para a rotina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533 e $[M-H]^-$ 609,1469).

O pico 4 apresentou uma banda com absorvância máxima em 292, m nm e um ombro com absorvância máxima em 327 nm (Figura 24 do Apêndice 1), também coerente com as absorvâncias máximas da astilbina e seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo (Figura 25 do Apêndice 1) apresentou, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1038, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2156. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0621 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 26 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1099, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2276. A fragmentação dos íons produto de m/z 449,1099, produziu os íons de m/z 303,0493 e m/z 151,0030, coerentes com a fragmentação de astilbina e seus estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), $(C_{21}H_{22}O_{11}; [M+H]^+ 451,1249$ e $[M-H]^- 449,1092)$.

O pico **5** apresentou uma banda com absorvância máxima em 293 nm e um ombro com absorvância máxima em 327 nm (Figura 27 do Apêndice 1), também coerente com as absorvâncias máximas da astilbina e seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 28 do Apêndice 1) apresentou, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1038, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2156. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0621 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 29 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1099, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2276. A fragmentação dos íons produto de m/z 449,1099, produziu os íons de m/z 303,0493 e m/z 151,0030, coerentes com a fragmentação de astilbina e seus estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), $(C_{21}H_{22}O_{11}; [M+H]^+ 451,1249$ e $[M-H]^- 449,1092)$.

O pico **6** apresentou uma banda com absorvância máxima em 293 nm e um ombro com absorvância máxima em 330 nm (Figura 30 do Apêndice 1). Os resultados do espectro no UV para esse pico estão coerentes com aqueles apresentados para o ramnosídeo de canferol, denominado engeletina (Mabry et al, 1970; Zhang et al, 2013), ou seu estereoisômero isoengeletina (Zhang et al, 2013).

A análise de espectrometria de massas com detecção de no modo positivo para o pico **6** não foi possível, provavelmente devido a uma baixa capacidade de ionização

do composto. Por outro lado, a análise de espectrometria de massas com detecção no modo positivo foi desenvolvida com sucesso, apresentando como pico base o íon de $[M-H]^-$ de m/z 433,1152 (Figura 31 do Apêndice 1).

A fragmentação dos íons produto de m/z 433,1152, produziu os íons de m/z 269,0461 e m/z 178,9970, coerentes com a fragmentação da engeletina e da isoengeletina, seu esteroisômeros (Zhang et al, 2013).

A massa acurada obtida é compatível com a massa molecular calculada para os estereoisômeros engeletina e isoengeletina (Figura 86 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{10}$; $[M-H]^-$ 433,1140).

O pico 7 apresentou uma banda com absorbância máxima em 255 nm (banda II), um ombro com máxima absorbância em 265 nm, seguido de um ombro com absorbância máxima em 304, além de uma banda com máxima absorbância em 349 nm (banda I) (Figura 32 do Apêndice 1), coerentes com as absorbâncias apresentadas para quercitrina, um ramnosídeo de quercetina (Mabry et al, 1970; Abad-Garcia et al, 2009).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 33 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0466, além dos adutos com sódio $[2M+Na]^+$ de m/z 919,1830 e $[M+Na]^+$ de m/z 471,0897. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 303,466 é coerente com a fragmentação proposta para quercitrina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009). Não foi possível obter a fragmentação do aduto com sódio $[M+Na]^+$.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 34 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, o íon $[M-H]^-$ de m/z 447,0959. A fragmentação dos íons produto de m/z 447,0959 produziu o íon de m/z 301,0347, coerente com a fragmentação da quercitrina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para a quercitrina (Figura 87 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{20}O_{11}$; $[M+H]^+$ 449,1058 e $[M-H]^-$ 447,0938).

3.2 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de flores de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM/EM, com detecção de íons no modo positivo, do extrato flavonoídico de flores apresentou sete picos majoritários, com os seguintes tempos de retenção: (1) 16,1; (2) 17,1; (3) 18,3; (4) 18,8; (5) 19,3; (6) 20,5 e (7) 21,3

minutos, com detecção em 280 nm e 352 nm de comprimento de onda (Figura 35 do Apêndice 1).

A análise de CLAE-UV-EM/EM, com detecção de íons no modo negativo apresentou os mesmos picos majoritários, com detecção, porém com tempos de retenção ligeiramente distintos, respectivamente: (1) 15,1; (2) 15,9; (3) 17,3; (4) 17,8; (5) 18,3; (6) 19,5 e (7) 20,5 (Figura do Apêndice 1).

O pico 1 apresentou uma banda com absorvância máxima em 289 nm e um ombro com máximo 327 nm (Figura 36 do Apêndice 1), sinais característicos de astilbina (Figura), um ramnosídeo dihidroquercetina (Mabry et al, 1970), já isolada de flores de *D. mollis* (Pereira et al, 2002), ou ainda, um de seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 37 do Apêndice 1) apresentou como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1047, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2162, de acordo com a fragmentação dos íons produto (Figura do Apêndice1). O íon de m/z 305,0666, aparentemente, é produto da fragmentação do íon $[M+Na]^+$, porém a fragmentação do íon selecionado $[M+Na]^+$ não foi possível. Apesar disso, a presença do fragmento de m/z 305,0666 está coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 38 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1089, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2257. A fragmentação do íon m/z 449,1075, produziu os fragmentos m/z 303,0483 e m/z 151,0009, coerentes com a fragmentação de estereoisômeros de astilbina (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

O pico 2 apresentou uma banda com absorvância máxima em 290 nm e um ombro com absorvância máxima em 327 nm (Figura 39 do Apêndice 1), também coerente com as absorvâncias máximas da astilbina e seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo (Figura 40 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, um aduto com sódio, $[M+Na]^+$,

correspondente ao m/z 473,1037, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2152. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0662 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 41 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1100, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2267. A fragmentação dos íons produto de m/z 449,1071, produziu os íons de m/z 303,0491 e m/z 151,0003, coerentes com a fragmentação de astilbina e seus estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

O pico **3** apresentou duas bandas, com absorbâncias em regiões típicas de flavonóis, entre 240 e 400 nm (Mabry et al, 1970), tendo a banda I apresentado absorbância máxima em 355 nm e um ombro em com máxima absorção em 299 nm, e a banda II tendo apresentado absorbância máxima em 255 nm e um ombro com absorbância máxima em 265 nm (Figura do Apêndice 1). Tanto as absorbâncias quanto o tempo de retenção foram coerentes com aqueles apresentados pelo padrão rutina (Figura 42 do Apêndice 1).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 43 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1422, assim como o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0481, coerentes com a proposta de fragmentação da rutina apresentada por Barreca et al. (2013).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 43 do Apêndice 1), apresentou o íon $[M-H]^-$ de m/z 609,1469, e seus fragmentos característicos de m/z 463,0872 e m/z 301, 0339, coerentes com a fragmentação da rutina proposta na literatura (Barreca et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para a rutina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533 e $[M-H]^-$ 609,1469).

O pico **4** apresentou uma banda com absorbância máxima em 293, nm e um ombro com absorbância máxima em 325 nm (Figura 44 do Apêndice 1), também coerente com as absorbâncias máximas da astilbina e seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo (Figura 45 do Apêndice 1) apresentou, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1035, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2158. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0654 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 46 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1097, o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2261. A fragmentação dos íons produto de m/z 449,1080, produziu os íons de m/z 303,0492 e m/z 151,0011, coerentes com a fragmentação de astilbina e seus estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

O pico **5** apresentou uma banda com absorbância máxima em 293 nm e um ombro com absorbância máxima em 325 nm (Figura 47 do Apêndice 1), também coerente com as absorbâncias máximas da astilbina e seus estereoisômeros (Huang et al, 2014).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 48 do Apêndice 1) apresentou, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1036, o qual é produto do íon $[2M+Na]^+$, de m/z 923,2149. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305, mesmo que em baixa intensidade, é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 49 do Apêndice 1) teve como pico base o fragmento $[M-H]^-$ de m/z 449,1090 o qual deve ser resultante do fragmento $[2M-H]^-$, de m/z 899,2259. A fragmentação dos íons produto de m/z 449,1084, produziu os íons de m/z 303,0486 e m/z 151,0010, coerentes com a fragmentação de astilbina e seus estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

O pico **6** apresentou uma banda com absorvância máxima em 294 nm e um ombro com absorvância máxima em 327 nm (Figura 50 do Apêndice 1). Os resultados do espectro no UV para esse pico estão coerentes com aqueles apresentados para o ramnosídeo de canferol, denominado engeletina (Mabry et al, 1970; Zhang et al, 2013), ou seu estereoisômero isoengeletina (Zhang et al, 2013).

A análise de espectrometria de massas com detecção de no modo positivo para o pico **6** não foi possível, assim como para o experimento relativo ao extrato flavonoídico de flores, provavelmente devido a uma baixa capacidade de ionização do composto. Por outro lado, a análise de espectrometria de massas com detecção no modo negativo foi desenvolvida com sucesso, apresentando como pico base o íon de $[M-H]^-$ de m/z 433,1144 (Figura 51 do Apêndice 1).

A fragmentação dos íons produto de m/z 433,1133, produziu os íons de m/z 269,0436 e m/z 178,9974, coerentes com a fragmentação da engeletina e da isoengeletina estereoisômeros (Zhang et al, 2013).

A massa acurada obtida é compatível com a massa molecular calculada para os estereoisômeros engeletina e isoengeletina (Figura 86 do Apêndice 1) ($C_{21}H_{22}O_{10}$; $[M-H]^-$ 433,1140).

O pico **7** apresentou uma banda com absorvância máxima em 255 nm (banda II), um ombro com máxima absorvância em 265 nm, seguido de um ombro com absorvância máxima em 307, além de uma banda com máxima absorvância em 349 nm (banda I) (Figura 52 do Apêndice 1), coerentes com as absorvâncias apresentadas para quercitrina, um ramnosídeo de quercetina (Mabry et al, 1970; Abad-Garcia et al, 2009).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 53 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0505, além dos adutos com sódio $[2M+Na]^+$ de m/z 919,1831 e $[M+Na]^+$ de m/z 471,0877. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0505 é coerente com a fragmentação proposta para quercitrina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009). Assim como no experimento relativo ao extrato flavonoídico de folhas, não foi possível obter a fragmentação do aduto com sódio $[M+Na]^+$.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 54 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, o íon $[M-H]^-$ de m/z 447,0930. A fragmentação dos íons produto de m/z 447,0928 produziu o íon de m/z 301,0326, coerente com a fragmentação da quercitrina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para a quercitrina (Figura 87 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{20}O_{11}$; $[M+H]^+$ 449,1058 e $[M-H]^-$ 447,0938).

3.3 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de frutos de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, do extrato flavonoídico de frutos apresentou dois picos majoritários, com os seguintes tempos de retenção: **(3)** 18,3; e **(8)** 21,3 minutos, com detecção em 280 nm e 352 nm de comprimento de onda (Figura 55 do Apêndice 1).

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo negativo apresentou os mesmos picos majoritários, com detecção, porém com tempos de retenção ligeiramente distintos, respectivamente: **(3)** 17,3 e **(8)** 20,6 (Figura 56 do Apêndice 1).

O pico **3** apresentou duas bandas, com absorbâncias em regiões típicas de flavonóis, entre 240 e 400 nm (Mabry et al, 1970), tendo a banda I apresentado absorbância máxima em 355 nm e um ombro em com máxima absorção em 299 nm, e a banda II tendo apresentado absorbância máxima em 255 nm e um ombro com absorbância máxima em 265 nm (Figura 56 do Apêndice 1). Tanto as absorbâncias quanto o tempo de retenção foram coerentes com aqueles apresentados pelo padrão rutina (Figura 11 do Apêndice 1).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 57 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1422, assim como o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0478, coerentes com a proposta de fragmentação da rutina apresentada por Barreca et al. (2013).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 57 do Apêndice 1), apresentou o íon $[M-H]^-$ de m/z 609,1474, coerente com a fragmentação da rutina proposta na literatura (Barreca et al, 2013).

As massas acuradas obtidas, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, são compatíveis com as massas moleculares calculadas para a rutina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533 e $[M-H]^-$ 609,1469).

O pico **8** apresentou duas bandas, com absorbâncias em regiões típicas de flavonóis, entre 240 e 400 nm (Mabry et al, 1970), tendo a banda I apresentado absorbância máxima em 349 nm, e a banda II tendo apresentado absorbância máxima

em 264 (Figura 58 do Apêndice 1). Os dados do espectro no UV para esse composto não permitiram nenhuma proposição de identificação.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo (Figura 59 do Apêndice 1), apresentou um pico base de m/z 617,11597, e fragmentos abundantes de m/z 471,0992 e m/z 287,0606.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo negativo (Figura 59 do Apêndice 1), apresentou, como pico base, o de m/z 593,1528, e os fragmentos de m/z 447, 0953 e m/z 146,9616. A fórmula molecular proposta foi $C_{27}H_{30}O_{15}$, porém não foram encontradas, na literatura, informações coerentes, que permitam uma proposição de identificação para esse composto.

3.4 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de madeira de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, do extrato flavonoídico de madeira apresentou cinco picos majoritários, com os seguintes tempos de retenção: (1) 16,1; (2) 17,1; (3) 18,3; (4) 18,8 e (5) 19,3 minutos, com detecção em 280 nm e 352 nm de comprimento de onda (Figura 60 do Apêndice 1).

Nenhum dos picos cromatográficos apresentou resolução informativa sobre absorvância no UV, por isso foram desconsiderados nos procedimentos de identificação tentativa dos prováveis compostos apresentados no cromatograma.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico 1 (Figura 61 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1048 (Figura do Apêndice 1). Apesar de em baixa intensidade, o fragmento de m/z 305 está presente, estando coerente com a fragmentação proposta para astilbina presente pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida, no modo positivo, é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico 2 (Figura 62 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1042. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida no modo é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico **3** (Figura 63 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1408, assim como o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0478, coerentes com a proposta de fragmentação da rutina apresentada por Barreca et al. (2013).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a rutina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533).

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo do pico **4** (Figura 64 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1045. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305, mesmo que com baixa intensidade, é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico **5** (Figura 65 do Apêndice 1) apresentou, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1047. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0637 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

3.5 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de cascas de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, do extrato flavonoídico de cascas apresentou cinco picos, com os seguintes tempos de retenção: **(2)** 17,1; **(3)** 18,3; **(4)** 18,8 e **(5)** 19,3 minutos, com detecção em 280 nm e 352 nm de comprimento de onda (Figura 66 do Apêndice1). No cromatograma, surgiram alguns picos entre 40 e 50 minutos com baixíssima resolução, que não puderam ser identificados.

Nenhum dos picos cromatográficos apresentou resolução informativa sobre absorvância no UV, por isso foram desconsiderados nos procedimentos de identificação tentativa dos prováveis compostos apresentados no cromatograma.

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo do pico **2** (Figura 67 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1056. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0644 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida no modo é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico **3** (Figura 68 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1408, assim como o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0478, coerentes com a proposta de fragmentação da rutina apresentada por Barreca et al. (2013).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a rutina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533).

A análise de espectrometria de massas detecção de íons no modo positivo do pico **4** (Figura 69 do Apêndice 1) apresentou, como pico base, um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1051. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0686 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1), ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico **5** (Figura 70 do Apêndice 1) apresentou, como pico base um aduto com sódio, $[M+Na]^+$, correspondente ao m/z 473,1046. A presença do íon $[M+H]^+$ de m/z 305,0643 é coerente com a fragmentação proposta para astilbina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009b).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com as massas moleculares calculadas para astilbina e seus estereoisômeros (Figura 84 do Apêndice 1) ($C_{21}H_{22}O_{11}$; $[M+H]^+$ 451,1249 e $[M-H]^-$ 449,1092).

3.6 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de embriões de *D. mollis*

O extrato flavonoídico de embriões, obtidos a partir de sementes entumecidas de *D. mollis* não apresentou nenhum sinal da ocorrência de flavonoides (Figura 76 do Apêndice 1).

3.7 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de plântulas de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, do extrato flavonoídico de plântulas de *D. mollis* apresentou dois picos com os seguintes tempos de retenção: **(3)** 18,3 e **(7)** 21,3 minutos, com detecção em 280 nm e 352 nm de comprimento de onda (Figura 71 do Apêndice 1).

Nenhum dos picos cromatográficos apresentou resolução informativa sobre absorvância no UV, por isso foram desconsiderados nos procedimentos de identificação tentativa dos prováveis compostos apresentados no cromatograma. No cromatograma, surgiram alguns picos entre 40 e 50 minutos com baixíssima resolução, que não puderam ser identificados.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico **3** (Figura 72 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1416, além do íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0453 como pico base. Ambos coerentes com a proposta de fragmentação da rutina apresentada por Barreca et al. (2013).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a rutina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico **7** (Figura 73 do Apêndice 1) apresentou o íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0463, além do adutos com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 471,0884, sendo fragmentos coerentes com a fragmentação proposta para quercitrina apresentada pela literatura (Abad-Garcia et al, 2009).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a quercitrina (Figura 87 do apêndice 1), ($C_{21}H_{20}O_{11}$; $[M+H]^+$ 447,0932).

3.8 Composição flavonoídica de exsudados radiculares de plântulas de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, de exsudados radiculares de plântulas de *D. mollis* apresentou apenas o pico (3) 18,3 minutos, com uma fraca detecção em 352 nm (Figura 74 do Apêndice 1).

Devido à baixa intensidade do sinal, o pico cromatográfico não apresentou resolução informativa sobre absorbância no UV, sendo desconsiderado nos procedimentos de identificação tentativa do composto apresentado no cromatograma. Porém o tempo de retenção do pico 9 foi coerente com o do padrão apigenina submetido ao mesmo método cromatográfico empregado nesse estudo (Figura 11 do Apêndice 1).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico 3 (Figura 75 do Apêndice 1), apresentou o aduto com sódio $[M+Na]^+$ de m/z 633,1451, além do íon $[M+H]^+$ de m/z 303,0495 como pico base. Ambos coerentes com a proposta de fragmentação da rutina apresentada por Barreca et al. (2013).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a rutina (Figura 85 do Apêndice 1), ($C_{27}H_{30}O_{16}$; $[M+H]^+$ 610,1533).

3.9 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de calos obtidos a partir de epicótilos de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, de calos obtidos a partir da desdiferenciação de epicótilos de plântulas de *D. mollis* apresentou apenas o pico (9) 30,3 minutos (Figura 77 do Apêndice 1). O espectro no UV do pico 9 apresentou duas bandas pouco definidas (Figura 78 do Apêndice 1), provavelmente devido à baixa concentração do composto, porém com absorbâncias coerentes com aquelas apresentadas pelo padrão apigenina, tendo a banda I apresentado absorbância máxima em 336 nm, e a banda II tendo apresentado absorbância máxima em 266 nm. O tempo de retenção do composto 9 foi coerente com aquele apresentado pelo padrão apigenina (Figuras 13 e 14 do Apêndice 1).

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico 9 (Figura 79 do Apêndice 1), apresentou como pico base $[M+H]^+$ de m/z 271,0579, coerente com a proposta de fragmentação da apigenina apresentada por Casals et al. (2003).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a apigenina (Figura 88 do Apêndice 1), ($C_{15}H_{10}O_5$; $[M+H]^+$ 271,0605).

3.10 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de calos obtidos a partir de hipocótilos de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, de calos obtidos a partir da desdiferenciação de hipocótilos de plântulas de *D. mollis* apresentou apenas o pico (9) 30,3 minutos (Figura 80 do Apêndice1).

Devido à baixa intensidade do sinal, o pico cromatográfico não apresentou resolução informativa sobre absorbância no UV, sendo desconsiderado nos procedimentos de identificação tentativa do composto apresentado no cromatograma.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico 9 (Figura 81 do Apêndice 1), apresentou como pico base $[M+H]^+$ de m/z 271,058, coerente com a proposta de fragmentação da apigenina apresentada por Casals et al. (2003).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a apigenina (Figura 88 do Apêndice 1), ($C_{15}H_{10}O_5$; $[M+H]^+$ 271,0605).

3.11 Composição flavonoídica de extratos metanólicos de calos obtidos a partir de cotilédones de *D. mollis*

A análise de CLAE-UV-EM, com detecção de íons no modo positivo, de calos obtidos a partir da desdiferenciação de cotilédones de plântulas de *D. mollis* apresentou apenas o pico (9) 30,3 minutos (Figura 82 do Apêndice1).

Devido à baixa intensidade do sinal, o pico cromatográfico não apresentou resolução informativa sobre absorbância no UV, sendo desconsiderado nos procedimentos de identificação tentativa do composto apresentado no cromatograma.

A análise de espectrometria de massas com detecção de íons no modo positivo do pico 9 (Figura 83 do Apêndice 1), apresentou como pico base $[M+H]^+$ de m/z 271,0583, coerente com a proposta de fragmentação da apigenina apresentada por Casals et al. (2003).

A massa acurada obtida no modo positivo é compatível com a massa molecular calculada para a apigenina (Figura 88 do Apêndice1), ($C_{15}H_{10}O_5$; $[M+H]^+$ 271,0605).

A Tabela 2 apresenta uma sumarização dos resultados dos experimentos de CLAE-DAD-EM e CLAE-DADE-EM/EM com ionização no modo positivo e as identificações tentativas dos picos cromatográficos obtidos para os extratos flavonoídicos dos órgãos de *D. mollis* investigados.

A Tabela 3 apresenta uma sumarização dos resultados dos experimentos de CLAE-DAD-EM e CLAE-DADE-EM/EM com ionização no modo negativo e as identificações tentativas dos picos cromatográficos obtidos para os extratos flavonoídicos dos órgãos de *D. mollis* investigados.

Tabela 2 – Identificação tentativa dos picos cromatográficos obtidos a partir de extratos flavonoídicos de órgãos de *D. mollis*, resultados obtidos por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM com ionização no modo positivo.

Composto	Tempo de retenção (min)	Fragmentos Característicos	Massa Exata Obtida	Massa Molecular Teórica	Fórmula Molecular Proposta	Absorbância Máxima no UV (nm)	Identificação Tentativa	Órgão da Planta
1	16,1	473,10 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 305,06	451,1249 [M+H] ⁺ ; 923,2165 [2M+Na] ⁺	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	289	estereoisômero de astilbina	folhas, flores, madeira
2	17,1	473,10 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 305,06	451,1246 [M+H] ⁺ ; 923,2154 [2M+Na] ⁺	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	290	estereoisômero de astilbina	folhas, flores, madeira, casca
3	18,3	633,14 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 303,04	611,4586 [M+H] ⁺	610,1533	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	255, 355	rutina	folhas, flores, frutos, madeira, casca, exsudados, plântulas
4	18,8	473,10 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 305,06	451,1246 [M+H] ⁺ ; 923,2156 [2M+Na] ⁺	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	292	Estereoisômero de astilbina	folhas, flores, cascas, madeira
5	19,3	473,10 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 305,06	451,1249 [M+H] ⁺ ; 923,2151 [2M+Na] ⁺	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	293	Estereoisômero de astilbina	folhas, flores, madeira, casca
6	20,5	457,11 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 435,12	435,1259 [M+H] ⁺ ; 891,2247 [2M+Na] ⁺	433,1140	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	293	engeletina ou isoengeletina	folhas, flores
7	21,3	471,08 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 303,05	449,1058 [M+H] ⁺ ; 919,1830 [2M+Na] ⁺	447,0932	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	255, 349	quercitrina	folhas, flores, plântulas
8	21,3	617,15 [M+Na] ⁺ ; MS ² : 449,10; 303,04	595,1628 [M+H] ⁺	593,1511	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	264, 349	não identificado	frutos
9	30,3	271,06 [M+H] ⁺	271,0601 [M+H] ⁺	271,0605	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	267, 339	apigenina	Calos de epicótilo, hipocótilo e cotilédone

Tabela 3 – Identificação tentativa dos picos cromatográficos obtidos a partir de extratos flavonoídicos de órgãos de *D. mollis*, resultados obtidos por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM com ionização no modo negativo.

Composto	Tempo de retenção (min)	Fragmentos Característicos	Massa Exata Obtida	Massa Molecular Teórica	Fórmula Molecular Proposta	Absorbância Máxima no UV (nm)	Identificação Tentativa	Órgão da Planta
1	15,1	449,10 [M-H] ⁻ ; MS ² : 303,05; 151,00	449,1092 [M-H] ⁻ ; 899,2278 [2M-H] ⁻	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	289	estereoisômero de astilbina	folhas, flores, madeira
2	16,1	449,10 [M-H] ⁻ ; MS ² : 303,05; 151,00	449,1101 [M-H] ⁻ ; 899,2267 [2M-H] ⁻	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	290	estereoisômero de astilbina	folhas, flores, madeira, casca
3	17,3	609,16 [M-H] ⁻ ; MS ² : 463,09; 151,11	609,1469 [M-H] ⁻		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	255, 355	rutina	folhas, flores, frutos, madeira, casca, exsudados, plântulas
4	17,8	449,10 [M-H] ⁻ ; MS ² : 303,05; 151,00	449,1097 [M-H] ⁻ ; 899,2276 [2M-H] ⁻	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	292	Estereoisômero de astilbina	folhas, flores, cascas, madeira
5	18,3	449,10 [M-H] ⁻ ; MS ² : 303,05; 151,00	449,1091 [M-H] ⁻ ; 899,2282 [2M-H] ⁻	449,1089	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	293	Estereoisômero de astilbina	folhas, flores, madeira, casca
6	19,5	433,11 [M-H] ⁻ ; MS ² : 269,04	433,1152 [M-H] ⁻ ; 867,2317 [2M-H] ⁻	433,1140	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	293	engeletina ou isoengeletina	folhas, flores
7	20,4	447,09 [M-H] ⁻ ; MS ² : 301,03	447,0938 [M-H] ⁻ ; 899,2282 [2M-H] ⁻	447,0932	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	255, 349	quercitrina	folhas, flores, plântulas
8	20,6	593,15 [M-H] ⁻ ; MS ² : 447,09; 146,96	593,1528 [M-H] ⁻	593,1511	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	267, 339	apigenina	Calos de epicótilo, hipocótilo e cotilédone

Discussões

De acordo com a literatura, em Caesalpinioideae, a presença de *O*-glicosídeos de diidroflavonóis, flavonas e flavonóis é comum (Vecht, 2010). Essa informação é coerente com as identificações tentativas apresentadas nesse trabalho para os diferentes órgãos investigados de *D. mollis*.

De modo geral, nas partes investigadas da planta, há um predomínio de glicosídeos de quercetina, diidroquercetina e diidrocanferol.

A composição flavonoídica de folhas e flores de *D. mollis* se revelou bastante similar, havendo apenas diferenças quanto ao predomínio astilbina em flores, e de quercitrina em folhas. O predomínio de astilbina em flores de *D. mollis* está coerente com os resultados apresentados por Pereira et al. (2002), porém a sua ocorrência em folhas é uma informação inédita. A presença de engeletinina ou isoengeletinina em flores e folhas é uma informação inédita para a espécie.

Os frutos apresentaram uma composição bastante simples, contendo praticamente rutina, o que está de acordo com a literatura (Hubinger et al, 2009). Um composto minoritário, não identificado, também foi detectado, porém não foi possível garantir tratar-se de um flavonoide.

Na composição flavonoídica de madeiras, são comuns os registros de predomínio de metoxiflavonas e metoxiflavonóis, (Clark-Lewis e Porter, 1972; Humehara et al, 2009). Nenhum composto das categorias citadas foi encontrado nos extratos de madeira de *D. mollis*. O registro da ocorrência de astilbina e seus estereoisômeros e rutina em madeira é inédito para a espécie.

O extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis* apresentou concentrações muito baixas (inferidas das intensidades dos sinais apresentados nos espectros de massas e no UV) de estereoisômeros de astilbina e rutina. Nenhum registro prévio da ocorrência desses flavonoides em cascas de *D. mollis* foi encontrado, embora sua ocorrência tenha sido registrada para esse órgão em diversas espécies (Trousdale e Singleton, 1983).

Apenas um estudo sobre a ocorrência de flavonoides em plântulas de *D. mollis*, visando a relação entre sua biossíntese e estresses ambientais, onde o perfil flavonoídico encontrado foi bastante simples, tendo sido registrada a ocorrência de quercetina, rutina

e isoquercitrina (Lucci e Mazzafera, 2009). No presente estudo, a obtenção do perfil flavonoídico de plantas em estágio tão inicial de seu crescimento visou a busca de uma matriz biológica para futuros estudos de regulação da via biossintética dos flavonoides. As plântulas de *D. mollis* se revelaram um modelo promissor para tal finalidade, pois apresentaram elevada porcentagem de germinação (mais de 80%), facilidade de germinação e manutenção *in vitro*, e um perfil de flavonoides bastante simples, contendo apenas rutina e quercitrina, coerente com aquele observado por Lucci e Mazzafera (2009). Esse resultado poderá subsidiar estudos futuros da regulação da glicosilação do flavonol quercetina.

A presença de flavonoides em epiderme e endosperma de sementes já foi registrada por um estudo comparativo entre *Arabidopsis thaliana* e *Pisum sativum* (Seyer et al, 2010). Nesses estudos flavonoides foram encontrados tanto na epiderme da semente quanto no embrião. Em *D. mollis*, não foi possível obter um perfil de flavonoides de sementes. Mas procedeu-se com o isolamento de embriões entumecidos, após 3 dias de inoculação para germinação *in vitro*, e nenhum flavonoide foi encontrado. Esse resultado é de grande utilidade para estudos de expressão gênica associada à biossíntese de flavonoides, pois os embriões poderiam se prestar como um controle negativo.

A germinação *in vitro* de sementes de *D. mollis* apresentou considerável liberação de compostos fenólicos no meio de cultura. A extração e análise de flavonoides desse meio de cultura revelou a ocorrência de baixa quantidade de rutina. É possível que, em condições naturais, a liberação da rutina pelas raízes dessa planta exerça alguma função nas suas interações com microrganismos fixadores de nitrogênio e fósforo, como *Rhizobium* e micorrizas. Um fenômeno razoavelmente bem estudado para outras espécies vegetais (Lagrange et al, 2001; Mierziak et al, 2014)

A obtenção de calos a partir de epicótilos, hipocótilos e cotilédones de *D. mollis* teve como objetivo a busca de uma matriz biológica mais simples para a obtenção de perfis flavonoídicos, assim como subsidiar estudos futuros de regulação da biossíntese de flavonoides. A obtenção de calos a partir de radículas de plântulas de *D. mollis* não se revelou possível, visto que não houve desdiferenciação de tecidos. Os calos dos três explantes viáveis apresentaram-se pouco produtivos quanto à biossíntese de flavonoides e um crescimento muito lento. Seus perfis flavonoídicos foram qualitativamente idênticos, contendo apenas apigenina. Em estudo semelhante, Lourenço (1995) relatou problemas semelhantes, porém com um perfil flavonoídico

distinto, tendo encontrado apenas rutina. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os calos de *D. mollis* não constituem uma matriz viável para estudos da biossíntese de flavonoides.

Referências Bibliográficas

Abad-Garcia, B., Berrueta, L. A., Garmon-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F. 2009. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal Chromatography A* 1216, 5398-5415.

Abad-Garcia, B., Garmón-Lobato, S., Barrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. 2009. A fragmentation study of dihydroquercetin using triple quadrupole mass spectrometry and its application for identification of dihydroflavonols in *Citrus* juices. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 2785-2792.

Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* 169, 67-76.

Aguero, M.E., Gevens, A., Nicholson, R.L. 2002. Interaction of *Colchiobolus heterostrophus* with phytoalexin inclusions in *Sorghum bicolor*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61, 267-271.

Barceló, J., Poschenrieder, C. (2002) Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanism of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48, 75-92.

Barreca, D., Bisignano, C., Ginestra, G., Bisignano, G., Bellocco, E., Leuzzi, U., Gattuso, G. 2013. Polymethoxylated C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* X *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidante properties. *Food Chemistry* 141: 1481-1488.

Basile, A., Sorbo, S., López-Sáez, J.A., Cobianchi, R.S. 2003. Effects of seven pure flavonoids from mosses on germination and growth of *Tortula muralis* HEDW (Bryophyta) and *Raphanus sativus* L. (Magnoliophyta). *Phytochemistry* 62, 1145-1151.

Brandão, M. F. 1971. As plantas tóxicas de Distrito Federal. *Cerrado* v.3 (14), p.26-30

Bohm, B.A., Stuessy, T.F. 1991. Flavonoid variation in *Melampodium*. *Biochemical Systematics and Ecology* 19, n.8, 677-679.

Buer, C.S., Djordjevic, M.A. 2009. Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 60, 751-763.

Casals, I., Andrés-Lacueva, C., Izquierdo-Pulido, M., Lamuela-Raventós, R. 2003. Journal of Mass Spectrometry 38: 35-42.

Clark-Lewis, J.W., Porter, L.J. 1972. Phytochemical survey of the heartwood flavonoids of Acacia species from arid zones of Australia. Australian Journal of Chemistry 25: 1943-1955.

Coe, E.H., McCormick, S.M., Modena, S.A. 1981. White pollen in maize. Journal of Heredity 72, 318-320.

Cooper, J.A. 2004. Multiple responses of Rhizobia to flavonoids during legume root infection. Advances in Botanical Research 41, 1-62.

Crotti, A.E.M.; Carolo, C.A.; Gobbo-Neto, L.; Santos, M.D.; Gates, P.J.; Lopes, N.P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low and high-molecular weight compounds. In: Taft, C.A. Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry. Kerala, Índia: Research Signpost, 2006a. p.99-141.

Crotti, A.E.M.; Vessechi, R.L.; Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P. 2006b. Espectrometria de massas com ionização por electrospray: processos químicos envolvidos na formação e íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Química Nova 29, 287-292.

Cuyckens, F.; Claeys, M. 2004. Mass spectrometry in structural analysis of flavonoids. Journal of Mass Spectrometry 39, 1-15.

Du, Y., Chu, H., Wong, M, Chu, I.K., Lo, C. 2010. Identification of flavone phytoalexins and pathogen-inducible flavone synthase II gene (*SbFNSII*) in sorghum. Journal of Experimental Botany 61 (4), 983-994.

Fenn, J.B. 2003. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel Lecture). Angewandte Chemie 42(33), 3871-3894.

Feucht, W., Treutter, D., Dithmar, H., Polster, J. 2013. Loss of nuclear flavanols during drought periods in *Taxus baccata*. Plant Biology 15, 462-470.

Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I. 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Molecular Aspects of Medicine 31, 435-445.

Harborne, J.B., Williams, C.A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry 55, 481-504.

Hartmann, Thomas. 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 68: 2831-2846.

Hartwig, U.A., Maxwell, C.A., Joseph, C.M., Phillips, D.A. 1990. Chrysoeriol and luteolin released from alfafa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology 92, 116-122.

Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacoloty & Therapeutics 96, 67-202.

Hectors, K., Van Oevelen, S., Guisez, Y., Prinsen, E., Jansen, M.A.K. 2012. The phytohormone auxin is a component of the regulatory system that controls UV-B mediated accumulation of flavonoids and UV-induced morphogenesis. Physiologia Plantarum 145, 594-603.

Hernández, I., Alegre, L., Van Breusegen, F., Munné-Bosch, S. 2009. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants. Trends in Plant Science 14(3), 125-132.

Hoehne, F. C. 1939. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Graphicars, São Paulo, p. 355.

Holt, E.M., Steffen, L.M., Moran, A., Basu, S., Stainberg, J., Ross, J.A., Hong, C.P., Sinaiko, A.R. 2009. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. Journal of the American Diet Society 109, 414-421.

Holton, T. A., Cornish, E.C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 7: 1071-1083.

Hubinger, S.Z., Salgado, H.R., Moreira, R.R.D. 2009. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth, Fabaceae. Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(3):690-696.

Huang, Z., Hao, Q., Li, R., Li, H. 2014. Chemical constituents of rhizomes of *Smilax china* Linn. Journal of the Kunming University of Science and Technology (Natural Sciences Edition) 3(1): 80-86.

Jaakola, L., Määtä-Riihinen, K., Kärenlampi, S., Hohtola, A. 2004. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. Planta 218, 721-728.

Kidd, P.S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Guinsé, E., Barceló, J. 2001. The role of exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). Journal of Experimental Botany 53, volume 352, 1339-1352.

Kuhn, B.M., Geisler, M., Bigler, L., Ringli, C. 2011. Flavonoids accumulate assymetrically and affect auxin transport in Arabidopsis. *Plant Physiology* 156, 585-595.

Lagrange, H., Jay-Allemande, C., Lapeyrie, F. 2001. Rutin, the phenolglycoside from eucalyptus exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist* 149, 349-355.

Lewis, D.R., Ramirez, M.V., Miller, N.D., Vallabhaneni, P., Ray, W.K., Helm, R.F., Winkel, B.S.J., Muday, G.K. 2011. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. *Plant Physiology* 156, 144-164.

Li, B.Q., Fu, T., Yan, Y.D., Baylor, N.W., Ruscetti, F.W., Kung, H.F. 1993. Inhibition of HIV infection by baicalin – a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell and Molecular Biology Research* 39, 119-124.

Li, B.Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J.A., Ruscetti, F.W., Wang, J.M. 2000. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 276, 534-538.

Liu, C.Z., Saxena, P. 2009. *Saussurea medusa* cell suspension cultures for flavonoid production. In: *Methodos in Molecular Biology, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolites Analysis of Aromatic and Medicinal Plants* Vol. 547. Humana Press.

Lourenço, M. V. Estudo da produção de flavonoides em cultura de tecidos de faveiro (*Dimorphandra mollis Benth*). Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 1995.

Lucci, N., Mazzafera, P. 2009. Distribution of rutin in fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) seedlings under stress. *Journal of Plant Interactions* 4(3): 203-208.

Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag. 1970. p. 40-225.

Markham, K.R. 1988. Distribution of flavonoids in the lower plants and its evolutionary significance, in *The Flavonoids*, ed. J. B. Harborne. New York. Springer. 427-468.

Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. 2014. Flavonoids as importante molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* 19, 16240-16262.

Miller, R., Owens, S.J., RØslett, B. 2011. Plants and colour: Flowers and pollination. *Optics and Lazer Technology* 43, 282-294.

Mo, Y., Nagel, C., Taylor, L.P. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonoids in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Science* 89, 7213-7217.

Moore, J.P., Westall, K.L., Ravenscroft, N., Farrant, J.M., Lindsey, G.G., Brandt, W.F. 2004. The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolius*, 3,4,5-tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical induced oxidation. *Polyphenols Communications*. Helsinki, 79.

Mouradov, A., Spangenberg, G. 2014. Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in Plant Science* 5, article 620.

Muir, S. R., Collins, G. J., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, S., De Vos, C. H., van Tunen, A. J., Verhoeven, M. E. 2001. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnology* 19:470-474.

Mursu, J., Voutilainen, S., Nurmi, T., Toumainem, T.P., Kurl, S., Salonen, J.T. 2008. Flavonoid intake and the risk of ischaemic stroke and CVD mortality in middle-aged Finnish men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *British Journal of Nutrition* 100, 890-895.

Nair, M.G., Safir, G.R., Siqueira, J.O. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 434-439.

Nandakumar, L., Rangaswamy, R.S. 1982. Effects of some flavonoids and phenolic acids on seed germination and rooting. *Journal of Experimental Botany* 36 (8), 1313-1319.

Nijveldt, R. Nood, E., Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Norren, K., Leeuwen, P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418-425.

Nuutila, A.M; Kammiovirta, K.; Oksman-Caldentey, K.M. 2002. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry* 76, 519-525.

Pacheco, M.V.; Mattei, V.L.; Matos, V.P.; Sena, L.H.M.; Sales, A.G.F.A. 2011. Dormência de sementes e produção de mudas de *Dimorphandra mollis* Benth. *Ciências Florestais* 21(4), 689-697.

Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Rice-Evans, C.A. 2001. Flavonoid B ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282, 1161-1168.

Peer, W.A., Murphy, A.S. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science* 12, 556-563.

Pereira, L.G.B., Petacci, F., Fernandes, J.B., Corrêa, A.G., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F., Malaspina, O. 2002. Biological activity of astilbina from *Dimorphandra mollis* against *Anticarsia gemmatilis* and *Spodoptera frugiperda*. *Pest Management Science* 58: 503-507.

Pio Corrêa, M. 1926. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro vol. III, 646 p.

Ponce, M.A., Scervino, J.M., Erra-Balsells, R., Ocampo, J.A., Godeas, A.M. 2004. Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry* 65, 1925-1930.

Ram, H.Y., Mathur, G. 1984. Flower colour changes in *Lantana camara*. *Journal of Experimental Botany* 35 (11), 1656-1662.

Rice, E.L. 1984. Allelopathy. Editor. Academic, Orlando.

Rizzini, C. T. 1971. Sobre as principais unidades de dispersão do cerrado. III Simpósio Sobre o Cerrado: 117-132.

Ryan, K.G., Swinny, E.E., Markham, K.R., Winefield, C. 2002. Flavonoid gene expression and UV protection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 59, 23-32.

Seyer, A., Einhorn, J., Brunelle, A., Laprévote, O. 2010. Localization of flavonoids in seeds by cluster Time-Of-Flight secondary ion mass spectrometry imaging. *Analytical Chemistry* 82: 2326-2333.

Schijlen, E. G. W. M. 2007. Genetic Engineering of Flavonoid Biosynthesis in Tomato. Tese de Doutorado. Universiteit van Amsterdam- Amsterdam.

Shimoda, K., Sato, N., Kobayashi, T., Hamada, H., Hamada, H. 2008. Glycosylation of daidzein by *Eucalyptus* cell cultures. *Phytochemistry* 69: 2303-2306.

Shimoda, K., Kondo, Y., Akagi, A., Abe, K., Hamada, H., Hamada, H. 2007. Glycosylation of tocoferol by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. *Phytochemistry* 68: 2678-2683.

- Siqueira, J.O., Safir, G.R., Nair, M.G. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist* 118, 87-93.
- Sisa, M., Bonnet, S.L., Ferreira, D., Westhuizen, J.H.V. 2010. Photochemistry of flavonoids. *Molecules* 15, 5196-5245.
- Skadhauge, B., Thomsen, K.K., Von Wettstein, D. 1997. The role of the barley testa layer and its flavonoids content in resistance to *Fusarium* infections. *Hereditas* 1126, 147-160.
- Stafford, H.A. 1991. Flavonoid evolution – an enzymatic approach . *Plant Physiology* 96, 680-685.
- Stiles, E. 1982. Fruit flags: Two hypothesis. *The American Naturalist* 120 (4), 500-509.
- Stobiecki, M. 2000. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54, 237-256.
- Stobiecki, M.; Kachlicki, P. Isolation and identification of flavonoids. In: Grotewold, E. (Ed.) *The Science of Flavonoids*. New York: Springer, 2006. p. 47-69.
- Taylor, L.P., Grotewold, E. 2005. Flavonoids as developmental regulators. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 317-323.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D., Agati, G. 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163, 547-561.
- Tsai, S.M., Phillips, D.A. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1485-1488.
- Tolrà, R.P., Poschenrieder, C., Luppi, B., Barceló, J. 2005. Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. *Environmental and Experimental Botany* 54, 231-238.
- Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26, 618-631.
- Treutter, D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology* 7, 581-591.
- Trousdale, E.K., Singleton, V.L. 1983. Astilbin and engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry* 22(2): 619-620.

Umehara, K., Nemoto, K., Matsushita, A., Terada, E., Monthakantirat, O., De-Eknamkul, W., Miyase, T., Warashina, T., Degawa, M., Nogushi, H. 2009. Flavonoids from the heartwood of the thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-responsive human breast cancer cells. *Journal of Natural Products* 72: 2163-2168.

Valsaraj, R., Pushpangadan, P., Smitt, U.W., Andersen, A., Christensen, S.B., Sittie, A., Nyman, U., Nielsen, C., Olsen, C.E. 1997. New anti HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *Journal of Natural Products* 60, 739-742.

Vecht, N.C. 2010. Flavonoid Chemistry of the Leguminosae. In: *Advances in Polyphenol Research, Volume 2*. Santos-Buelga, C., Escribano-Bailon, M.T., Lattanzio, V. Eds. Blackwell Publishing. p.23-58.

Wachter, G.A., Hoffmann, J.J., Furbacher, T., Blake, M.E., Timmermann, B.N. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52, 1469-1471.

Webster, G., Jain, V., Davey, M.R., Gough, C., Vasse, J., Dénarié, J., Cocking, E.C. 1998. *Plant Cell and Environment* 21, 373-383.

Weston, L.A., Mathesius, U. 2013. Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 39, 283-297.

Williams, C.A., Grayer, R.J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports* 21(4): 539-573.

Willson, M.F., Whelan, C.J. 1990. The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. *The American Naturalist* 136 (6), 760-809.

Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 218-223.

Zhang, Q.F., Guo, Y.X., Shangguan, X., Zheng, G., Wang, W.J. 2013. Identification and quantification of polyphenols in *Rhizoma smilacis chinae* by HPLC/DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques* 36: 2251-2260.

Capítulo 2 – Atividades biológicas de extratos flavonoídicos de
Dimorphandra mollis Benth sobre *Spodoptera frugiperda* Smith
(Lepidoptera: Noctuidae) e *Sitophilus oryzae* Linnaeus
(Coleoptera: Curculionidae)

Resumo

Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae – Caesalpinioideae), popularmente conhecida como faveiro, fava d'anta ou faveleiro, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, que apresenta registros de ocorrência por todo o Brasil Central. Sua principal importância econômica está associada às elevadas concentrações de rutina, um flavonóide alvo de muitos estudos farmacológicos e de largo emprego na indústria farmacêutica, sendo esta a segunda espécie mais utilizada como fonte de rutina no mercado mundial.

Alguns artigos acadêmicos reportam a detecção de propriedades tóxicas de extratos metanólicos de *D. mollis* sobre operárias de *Apis mellifera*, e atribuem a toxicidade ao flavonóide astilbina (3- β -O-rhamnosídeo de 5,7,3',4'-tetraidroxi-2,3-diidroflavonol) isolado dos pedúnculos e flores. Seus resultados indicam que a astilbina reduziu a sobrevivência média das abelhas tratadas. Também é atribuída a astilbina a atividade inibidora sobre o desenvolvimento de larvas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), relatando redução do peso corporal durante a fase larval e, prolongamento, tanto da fase larval quanto da fase pupal, para as duas espécies de lepidópteros, consideram a possibilidade de uso deste flavonóide como um biopesticida.

Neste estudo, foram testadas as interferências de extratos flavonoídicos de diversos órgãos de *D. mollis* sobre o forrageio e o ciclo de vida de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e de adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Nenhum resultado negativo estatisticamente significativo foi observado no forrageio das duas espécies em questão. Tal resultado pode ser devido a uma tolerância desses animais aos flavonoides majoritários encontrados nos extratos, astilbina, rutina e quercitrina, ou ainda a mecanismos de detoxificação.

Abstract

Dimorphanthera mollis Benth. (Fabaceae - Caesalpinioideae), popularly known as faveiro, fava d'anta or faveleiro, is a native species of the Brazilian Cerrado, which has occurrence records throughout the Central Brazil. Its main economic importance is associated with high concentrations of rutin, a flavonoid target of many pharmacological studies and widespread use in the pharmaceutical industry, which is the second species most commonly used as a source of rutin in the world market.

Some scientific papers report toxic activities of methanol extracts of *D. mollis* on *Apis mellifera* of workers, and attribute the toxicity astilbin flavonoid (3- β -O-rhamnoside of 5,7,3', 4'-tetrahydroxy-2,3-dihydroflavonol) isolated from the stems and flowers of this species. These results suggest that astilbin reduced the mean survival of the treated bees. Also is attributed to astilbin the inhibitory activity against the development of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), reporting body weight loss during the larval stage and extending both larval and pupal stage for the two Lepidopterans. These results suggests the use of astilbin as a biopesticide.

In the present study, was tested the interference of the flavonoid extracts from several *D. mollis* parts on the foraging and life cycle of both *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and adults of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). No statistically significant negative result was observed in foraging of both species concerned. This result may be due to a tolerance of these species to flavonoids majorly found in *D. mollis* extracts, astilbin, rutin and quercitrin, or due detoxification mechanisms.

Introdução

A maioria dos insetos fitófagos é monófaga ou oligófaga, forrageando sobre um restrito espectro de espécies vegetais. Essa limitação é imposta, em parte, pela complexidade química das plantas, que são selecionadas ou refutadas por conter estimulantes ou deterrente (Simmonds, 2001). A modulação do forrageio de insetos fitófagos por plantas torna o estudo de sua composição química um tema de grande contribuição para o controle de pragas agrícolas. A exemplo disso temos piretro e rotenona, que são substâncias inseticidas produzidas por plantas, que apresentam amplo espectro de ação e são mundialmente empregadas na agricultura e na jardinagem (Cantrell et al, 2012).

A ocorrência praticamente ubíqua de flavonoides em plantas superiores apresenta uma possível correlação entre o acúmulo de substâncias específicas pertencentes a essa grande grupo de produtos naturais em diversos tecidos vegetais e atividade inseticida ou deterrente sobre insetos fitófagos. Do mesmo modo, certas espécies de insetos herbívoros se beneficiam desses compostos, sequestrando-os nos tecidos cuticulares, conferindo proteção contra patógenos e predadores, ou ainda em suas asas, contribuindo para a coloração, que auxilia na atração de parceiros (Simmonds, 2003).

A ação tóxica de compostos fenólicos sobre a digestão de insetos pode ocorrer no interior de seu trato digestório, através de processos oxidativos, que resultam na formação de radicais superóxidos e outras espécies reativas de oxigênio (Barbehenn, 2002). Porém, esses mesmos compostos podem ser neutralizados por enzimas da família citocromo P450 monoxigenase e esterases, presentes no trato digestório de insetos, assim como o próprio pH do meio (Dowd et al, 1983; Rey et al., 2000).

Devido ao seu potencial emprego como biopesticida, plantas que apresentam elevada concentração de compostos fenólicos são alvos de estudos das relações entre composição química e atividades tóxicas principalmente sobre insetos fitófagos generalistas, auxiliando na compreensão de processos de inibição de herbivoria, ação inseticida e até mesmo procedimentos de detoxificação. Estudos prévios, tendo usado *S. frugiperda* como modelo experimental, indicam que glicosídeos de metabólitos

secundários produzidos por plantas e suas agliconas podem afetar a atividade de β -glicosidases e de trealases em Lepidoptera. (Ferreira et al., 1997; Silva et al., 2006).

Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae – Caesalpinioideae) é uma espécie arbórea que habita os Cerrados brasileiros. Seus frutos são ricos em rutina de 6% a 8% (Gomes, 1998; Lorenzi & Matos, 2002) o que a torna uma espécie explorada economicamente no Brasil, para a extração desses flavonoides, empregados em diversos produtos da indústria farmacêutica (Lorenzi & Matos, 2002).

Cintra et al. (2002) reportam a detecção de propriedades tóxicas de extratos metanólicos de flores de *D. mollis* sobre operárias de *Apis mellifera*, e atribuem a toxicidade ao dihidroflavonol astilbina (3- β -O-rhamnosideo de 5,7,3',4'-tetraidroxi-2,3-diidroflavonol). Seus resultados indicam que a astilbina reduziu a sobrevivência média das abelhas tratadas. Pereira et al. (2002) também atribuem a astilbina atividade inibidora sobre o desenvolvimento de larvas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), tendo observado redução do peso corporal durante a fase larval e, prolongamento, tanto da fase larval quanto da fase pupal, para as duas espécies de lepidópteros, consideram a possibilidade de uso deste flavonoide como um biopesticida.

Spodoptera frugiperda Smith (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga de gramíneas cultivadas em vários países do continente americano, como, Estados Unidos, México, Brasil e Argentina, ocasionando perdas significativas na produção, dependendo do estágio da cultura em que o ataque ocorre. Trata-se de um inseto fitófago generalista, que apresenta registros de danos econômicos em cultivos de sorgo, trigo, arroz, alfafa, feijão, amendoim, tomate, algodão, batata, espinafre, repolho e abóbora (Figueiredo et al., 2006). Apesar do controle dessa importante praga agrícola ser feito por meio de inseticidas sintéticos, o emprego de predadores naturais e de produtos naturais tem apresentado crescimento (Copping e Menn, 2000; Tavares et al., 2010).

O interesse por produtos naturais para o controle de pragas também é observado para aquelas que atacam produtos armazenados, como grãos para o consumo humano e para o preparo de rações para animais. No Brasil, as principais espécies causadoras de danos a grãos armazenados são *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae), *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), *Stotroga cerealella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Araecerus fasciculatus* (Coleoptera: Bruchidae), *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae), *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), havendo grande atenção

conferida às espécies *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae* e *Rhyzopertha dominica* (Fontes et al, 2003).

Não existem registros de estudos de atividade biológica de extratos ou compostos isolados de folhas, frutos ou os demais órgãos de *D. mollis* sobre qualquer espécie de inseto fitófago, especialista ou generalista que ataque grãos armazenados. Os resultados desses estudos seriam de grande valor para a literatura científica, podendo auxiliar na busca por meios alternativos de controle de pragas agrícolas.

Objetivos

Pelas razões acima apresentadas, o presente estudo teve por objetivo:

1. Testar a atividade biológica de extratos flavonoídicos de diversos órgãos de *D. mollis* sobre o forrageio de *Spodoptera frugiperda* e
2. Testar a atividade biológica de extratos flavonoídicos de diversos órgãos de *D. mollis* sobre o forrageio de *Sitophilus oryzae*.

Materiais e Métodos

5.1 Cultura de *Spodoptera frugiperda*.

Larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram criadas de acordo com o método de Parra (1986). As larvas foram acondicionadas individualmente em tubos de vidro contendo 20 mL de dieta artificial à base de feijão, germen de trigo, levedo e água. As larvas foram mantidas sob fotoregime natural (verão: 14 horas de luz e 10 horas de escuro; inverno com 10 horas de luz e 14 horas de escuro), a 25°C. Para os ensaios de forrageio foram utilizadas larvas do terceiro instar de ambos os sexos. Para os experimentos inibição da atividade enzimática de trealase e β -glicosidase intestinal, foram utilizadas larvas de ambos os sexos, do quinto instar, com o intestino repleto de alimento.

5.2 Extratos flavonóidicos de *Dimorphandra mollis* Benth.

Amostras de casca do caule, madeira, raízes, folhas, flores, frutos, e sementes foram secas em estufa a 60°C até que apresentassem sinais de reduzida umidade. Essas amostras foram trituradas em moinho de bolas até a completa pulverização. Os materiais pulverizados foram submetidos à tamisação com peneira metálica de malha de 0,120 μ m. Os produtos da tamisação, com granulometria homogênea, foram armazenados em potes de plástico, com batoque, identificados, e armazenados em câmara escura, com controle de umidade para posterior procedimento de extração de flavonoides.

Para a extração dos flavonoides, foram empregados tubos de ensaio de 25 mL de volume. Em cada tubo foi adicionada a massa de 1 g de material pulverizado proveniente dos órgãos da espécie em estudo, mais 5 mL de metanol 80% em água deionizada (18 m Ω , Milli-Q, Millipore). Cada procedimento de extração a frio teve 60 minutos de duração. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes e o volume final de 15 mL foi submetido a secagem por fluxo de nitrogênio gasoso. Após a completa secagem dos extratos, eles foram ressuspensos em 1,5 mL de metanol 50% em água deionizada (18 m Ω , Milli-Q, Millipore), e procedeu-se com a partição líquido-

líquido, com a adição de 1,5 mL de tolueno. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. As alíquotas da fração metanólica foram secas, novamente, sob fluxo de nitrogênio gasoso, e armazenado em refrigerador, para os posteriores ensaios de atividade biológica.

5.3 Ensaio de forrageio de *S. frugiperda* contendo extratos flavonoídicos de órgãos de *D. mollis*.

Para o ensaio de teste da interferência de extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. frugiperda* foram empregadas larvas do quarto instar. Cada unidade experimental foi constituída de um tubo de vidro, de 40 mL de capacidade, com 10 mL de dieta artificial contendo diferentes doses de extratos flavonoídicos de *D. mollis* diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO): água na proporção 1:1. O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado, contendo 12 tratamentos e 5 repetições para cada tratamento. A Tabela 4 apresenta o delineamento experimental empregado.

Tabela 4 - Delineamento experimental para teste de interferência de extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

Concentração	Folhas			Flores			Frutos		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
100 µg/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
200 µg/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
500 µg/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração	Casca			Madeira			Raízes		
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3
100 µg/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
200 µg/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
500 µg/mL	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração	Sementes			DMSO:H ₂ O					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 1	Dia 2	Dia 3			
100 µg/mL	5	5	5	5	5	5			
200 µg/mL	5	5	5	5	5	5			
500 µg/mL	5	5	5	5	5	5			

Foi avaliada a taxa de mortalidade das larvas correspondentes a cada tratamento entre 1, 2 e 3 dias de forrageio. Os resultados foram tratados estatisticamente para a obtenção dos parâmetros descritivos. As médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) com $\alpha = 0,005$. As comparações entre as médias foram feitas por Teste T, também com $\alpha = 0,005$.

5.4 Ensaios de forrageio de *Sitophilus oryzae*.

A cultura de *Sitophilus oryzae* foi obtida a partir da doação de uma fração da cultura do Prof. Dr. Octávio Nakano, do Laboratório de Entomologia Econômica, da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”. A confirmação de que se tratava de uma cultura pura foi feita pela identificação, a partir de dissecação dos aparelhos genitais de cerca de 50 animais, pelo Prof. Dr. Sérgio Vanin, do Departamento de Zoologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A cultura de *Sitophilus oryzae* é mantida em potes de plástico com tampa, com 200 g de grãos de milho, livres de tratamentos químicos para armazenamento, sob condições naturais de iluminação, temperatura média de 25°C, umidade relativa de 70-75%.

A avaliação da influência de extratos flavonoídicos de órgãos de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae* foi empregada por meio da aplicação de soluções desses extratos, em três diferentes concentrações, sobre uma quantidade padronizada de grãos de milho. A mensuração do dano provocado pelos insetos ao milho foi empregada como uma avaliação dos efeitos dos extratos vegetais sobre seu forrageio e ciclo de vida.

A proporção entre machos e fêmeas em *S. oryzae* não é conhecida na literatura. Além disso, a sexagem exige o sacrifício dos animais. Para contornar tal problema, ensaios prévios foram feitos e demonstraram que o número de 20 indivíduos permite a conclusão do ciclo de vida da espécie e a manutenção de uma população. A partir dessa informação o delineamento experimental foi elaborado.

Para cobrir os grãos de milho homogeneamente com extratos flavonoídicos, a massa de 200 g de grãos de milho era espalhada em fina camada sobre uma bandeja de plástico, e o volume de 200 mL de extrato era, então, espalhado com um aerógrafo, sobre eles. Os grãos eram submetidos a secagem em estufa a 45°C por 24 horas, e então eram acondicionados em potes de plástico com capacidade para 300 mL.

Cada unidade experimental foi constituída de um pote de plástico, com tampa, com capacidade para 300 mL, contendo 200 g de grãos de milho tratados com os extratos em estudo, onde foram introduzidos 20 indivíduos adultos da espécie *S. oryzae*. A Tabela 5 apresenta o delineamento experimental empregado.

Tabela 5 - Delineamento experimental para teste de interferência de extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S.oryzae*.

Concentração	Folhas	Flores	Frutos	Casca	Madeira	Raízes	Sementes	DMSO:H ₂ O
100 µg/mL	3	3	3	3	3	3	3	3
200 µg/mL	3	3	3	3	3	3	3	3
500 µg/mL	3	3	3	3	3	3	3	3

A avaliação da taxa de dano provocado pelos insetos aos grãos de milho seguiu a metodologia proposta por Gallo et al (2002), onde, para cada unidade experimental,

pesou-se 100 grãos íntegros. Posteriormente, pesou-se 100 grãos danificados, e a taxa de dano foi estimada a partir do cálculo da porcentagem de perda de massa, em gramas, dos grãos danificados em relação à massa, em gramas, registrado para os grãos íntegros. Foi avaliada a taxa de dano aos grãos de milho correspondente a três períodos: 10, 30 e 60 dias. Os resultados foram tratados estatisticamente para a obtenção das médias, que foram comparadas por análise de variância (ANOVA) com $\alpha = 0,005$. As comparações entre as médias foram feitas por Teste T, também com $\alpha = 0,005$.

Resultados

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de atividade de extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre o forrageio de *Spodoptera frugiperda* serão apresentados, seguidos dos resultados dos ensaios de atividade dos extratos sobre o forrageio de *Sitophilus oryzae*, e finalmente, dos resultados da atuação dos extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre as enzimas β -glucosidase e trealase do trato digestório de *S. frugiperda*.

6.1 Resultados obtidos a partir dos ensaios de avaliação da atividade de extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda* do 4º instar.

A Tabela 6 apresenta os resultados de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 6 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4º instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de folhas				Controle		
Concentração	Mortalidade / Tempo de forrageio			Mortalidade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 $\mu\text{g/mL}$	1	3	1	0	1	0
200 $\mu\text{g/mL}$	0	2	1	0	0	0
500 $\mu\text{g/mL}$	0	1	3	0	0	0

A Tabela 7 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 7 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	4,566	0,91	2,022**	1,951
Resíduos	84	20,556	0,24	P-valor	
Total	89	25,12		18,198%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada nula.

A Figura 89 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento, considerando $\alpha = 0,05$.

Figura 89 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A Tabela 8 apresenta os resultados de mortandade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 8 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4º instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de flores				Controle		
Concentração	Mortandade / Tempo de forrageio			Mortandade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 µg/mL	0	1	1	0	1	0
200 µg/mL	1	2	0	0	0	0
500 µg/mL	1	3	1	0	0	0

A Tabela 9 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 9 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de flores de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	2,983	0,60	2,393**	1,951
Resíduos	84	14,672	0,17	P-valor	
Total	89	17,66		8,883%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de flores de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada nula.

A Figura 90 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento, considerando $\alpha = 0,05$.

Figura 90 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A Tabela 10 apresenta os resultados de mortandade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 10 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4 instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de frutos				Controle		
Concentração	Mortandade / Tempo de forrageio			Mortandade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 µg/mL	3	0	1	0	1	0
200 µg/mL	2	1	1	0	0	0
500 µg/mL	1	1	1	0	0	0

A Tabela 11 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 11 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	4,067	0,81	2,341**	1,951
Resíduos	84	15,333	0,18	P-valor	
Total	89	19,40		9,939%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada nula.

A Figura 91 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento, considerando $\alpha = 0,05$.

Figura 91 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A Tabela 12 apresenta os resultados de mortandade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em dias, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 12 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4º instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de cascas				Controle		
Concentração	Mortandade / Tempo de forrageio			Mortandade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 µg/mL	3	1	1	0	1	0
200 µg/mL	2	2	1	0	0	0
500 µg/mL	1	3	1	0	0	0

A Tabela 13 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 13 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de cascas de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	5,599	1,12	1,888	1,951
Resíduos	84	23,556	0,28	P-valor	
Total	89	29,16		2,283%	

A análise de variância apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada válida. Procedeu-se, então, com o teste T para comparação entre as médias, com $\alpha = 0,05$. A única média considerada distinta foi aquela relativa à concentração 200 µg/mL de extrato flavonoídico de cascas. Esse resultado se deu por causa dos reduzidos desvios apresentados por esse tratamento.

A Figura 92 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 92 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A Tabela 14 apresenta os resultados de mortandade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em dias, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 14 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4 instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de madeira				Controle		
Concentração	Mortandade / Tempo de forrageio			Mortandade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 µg/mL	0	0	1	0	1	0
200 µg/mL	0	2	2	0	0	0
500 µg/mL	1	1	1	0	0	0

A Tabela 15 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 15 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	2,100	0,42	2,898**	1,951
Resíduos	84	10,000	0,12	P-valor	
Total	89	12,10		7,365%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada nula.

A Figura 93 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 93 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A Tabela 16 apresenta os resultados de mortandade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em dias, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 16 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4º instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de raízes				Controle		
Concentração	Mortandade / Tempo de forrageio			Mortandade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 µg/mL	3	1	1	0	1	0
200 µg/mL	2	2	1	0	0	0
500 µg/mL	1	3	1	0	0	0

A Tabela 17 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 17 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	2,868	0,57	2,644**	1,951
Resíduos	84	12,012	0,14	P-valor	
Total	89	14,81		5,671	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada nula.

A Figura 3.8 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 94 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A Tabela 18 apresenta os resultados de mortandade de lagartas de *S. frugiperda* por tempo de forrageio, em dias, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de sementes de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 18 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de sementes de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas do 4 instar de *Spodoptera frugiperda*.

Extrato de sementes				Controle		
Concentração	Mortandade / Tempo de forrageio			Mortandade / Tempo de forrageio		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
100 µg/mL	0	0	0	0	1	0
200 µg/mL	0	1	1	0	0	0
500 µg/mL	0	0	2	0	0	0

A Tabela 19 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 19 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de sementes de *D. mollis* sobre o forrageio de lagartas de *S. frugiperda*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	0,723	0,14	3,742**	1,951
Resíduos	84	5,999	0,07	P-valor	
Total	89	6,72		22,341%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de sementes de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* do 4º instar foi considerada nula.

A Figura 95 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 95 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

3.2 Resultados obtidos a partir dos ensaios de avaliação da atividade de extratos flavonoídicos de *D. mollis* sobre o forrageio de *Sitophilus oryzae*.

A Tabela 20 apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 20 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Extrato de folhas				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	23,001	24,02	23,31	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	20,02	22,92	22,77	22,337	24,22	22
500 µg/mL	22,41	20,143	25,8	23,8	21,13	20,15

A Tabela 21 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 21 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	1526,262	305,25	0,10207**	2,422
Resíduos	48	4607,505	95,99	P-valor	
Total	53	6133,77		15,53%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de folhas de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 96 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 96 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

A Tabela 22 apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 22 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* sobre o forrageio *S. oryzae*.

Extrato de flores				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	18,601	21,78	25,3	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	21,22	20,55	25,03	22,337	24,22	22
500 µg/mL	21,45	18,4	23,01	23,8	21,13	20,15

A Tabela 23 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 23 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de flores de *D. mollis* sobre o forrageio de *S.oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	1660,735	332,15	0,107**	2,422
Resíduos	48	4227,624	88,08	P-valor	
Total	53	5888,36		15,53%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de flores de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 97 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 98 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

A Tabela 24 apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a

três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 24 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Extrato de frutos				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	18,601	21,78	25,3	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	21,22	20,55	25,03	22,337	24,22	22
500 µg/mL	21,45	18,4	23,01	23,8	21,13	20,15

A Tabela 25 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 25 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	1843,585	368,72	0,093	2,422
Resíduos	48	5495,650	114,49	P-valor	
Total	53	7339,23		16,54%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de frutos de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 99 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 99 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

A Tabela 26 apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 26 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Extrato de cascas				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	22,394	16,66	26,71	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	31,01	34,42	40,33	22,337	24,22	22
500 µg/mL	28,997	29,9	31,76	23,8	21,13	20,15

A Tabela 27 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 27 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de cascas de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	2228,437	445,69	0,087	2,422
Resíduos	48	6316,759	131,60	P-valor	
Total	53	8545,20		18,03%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de cascas de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 100 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 100 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de cascas de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

A Tabela 28 apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a

três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 28 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Extrato de madeira				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	23,997	22,22	25,26	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	22,4	28,33	21,74	22,337	24,22	22
500 µg/mL	21,6	23,01	21,35	23,8	21,13	20,15

A Tabela 29 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 29 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de *S.oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	1572,085	314,42	0,101	2,422
Resíduos	48	4747,225	98,90	P-valor	
Total	53	6319,31		80,03%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de madeira de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 101 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 101 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

A Tabela 40 - apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 40 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Extrato de raízes				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	20,805	22,65	20	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	19,19	33,04	31,21	22,337	24,22	22
500 µg/mL	21,433	22,09	21,16	23,8	21,13	20,15

A Tabela 41 - apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 41 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de *S.oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	1623,438	324,69	0,014	2,422
Resíduos	48	4908,828	4860,83	P-valor	
Total	53	6532,27		24,14%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de raízes de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 102 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 102 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de raízes de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

A Tabela 42 apresenta a taxa de dano provocado por *Sitophilus oryzae* sobre quantidades padronizadas de grãos de milho, após 60 dias de forrageio, em relação a

três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de sementes de *D. mollis*, em comparação ao experimento de controle.

Tabela 42 - Resultados do ensaio de atividade de três diferentes concentrações de extrato flavonoídico de sementes de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Extrato de sementes				Controle		
Concentração	% de grãos danificados			% de grãos danificados		
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
100 µg/mL	20,805	22,65	24,16	21,981	23,9	21,67
200 µg/mL	20,19	2904	31,21	22,337	24,22	22
500 µg/mL	21,433	22,09	21,16	23,8	21,13	20,15

A Tabela 43 apresenta os cálculos da análise de variância (ANOVA) dos resultados do experimento em questão.

Tabela 43 - Análise de variância dos resultados do ensaio de atividade de extratos flavonoídicos de sementes de *D. mollis* sobre o forrageio de *S.oryzae*.

ANOVA					
Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor de F	F tabelado
Tratamentos	5	1259130,00	251826,00	0,003	2,422
Resíduos	48	6982594,24	145470,71	P-valor	
Total	53	8241724,24		9,48%	

A análise de variância não apresentou diferença estatisticamente significativa para as médias comparadas, de modo que a hipótese de interferência de extratos flavonoídicos de sementes de *D. mollis* sobre o de *S. oryzae* foi considerada nula.

A Figura 103 apresenta um gráfico de box-plot com a estatística descritiva dos resultados do experimento.

Figura 103 - Gráfico de box-plot dos resultados da atividade do extrato flavonoídico de sementes de *D. mollis* sobre o forrageio de *S. oryzae*.

Discussão

As interações entre insetos e flavonoides são complexas, apresentam um grande espectro de ações, indo da inibição de herbivoria, ao estímulo da oviposição (Simmonds, 2001), ou até mesmo estímulo do crescimento de larvas (Beninger et al, 2004).

Embora um grande número de artigos apresente estudos sobre atividades inseticidas de extratos de plantas, poucos apresentam estruturas químicas isoladas (Tavares et al, 2010; Defagó et al, 2006; Isman, 2006), tornando impossível a atribuição de relações de causa e efeito entre compostos orgânicos únicos vegetais e atividades biológicas sobre insetos, ou ainda se essas relações são produtos de sinergismos entre misturas complexas.

Os extratos flavonoídicos de *D. mollis* empregados nos ensaios sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda* tiveram sua composição química tentativamente elucidada, e os resultados constam nas Tabelas 1 e 2 do Capítulo 1. Apesar de haver astilbina na maioria dos extratos flavonoídicos de *D. mollis* testados sobre o forrageio de *S. frugiperda*, nenhum experimento desenvolvido apresentou resultado estatisticamente significativo. O resultado negativo pode ser devido à tolerância das lagartas à concentração de astilbina presente nas diferentes doses do extrato. Porém a ocorrência de morte no lote de lagartas do controle experimental influenciou estatisticamente o resultado. Este experimento foi repetido por mais duas vezes, repetindo a ocorrência de morte no lote de lagartas correspondentes ao controle experimental.

Com os resultados obtidos, não se pode concluir que extratos flavonoídicos de *D. mollis* promovam qualquer alteração, positiva ou negativa, sobre o forrageio de larvas de *S. frugiperda*.

A literatura científica apresenta uma grande variedade de compostos voláteis produzidos por plantas que atuam como inibidores sobre o ciclo de vida ou o forrageio de coleópteros (Stefanazzi et al, 2011; Athanassiou et al, 2013). Porém, pouca informação sobre a ação de compostos fenólicos sobre esses organismos está disponível.

Em estudo conduzido buscando os efeitos de extratos orgânicos de *Tapiria guianensis*, *Gomphrena elegans*, *Tabebuia heptaphylla* e *Schinus terebinthifolius* sobre *Sitophilus zeamais* cultivado sobre grãos de trigo, Souza et al (2010) observaram pouca atividade dos extratos etanólicos de *G. elegans*, *T. guianensis* e *S. terebinthifolius* sobre o ciclo de vida de *S. zeamais*. Uma taxa de mortandade significativa de *S. zeamais* foi observada em relação ao extrato etanólico de *T. heptaphylla*. Apesar de ser possível inferir que os extratos etanólicos contêm compostos fenólicos, nenhuma descrição da composição química desses extratos foi apresentada no estudo.

Os extratos flavonoídicos de *D. mollis* inoculados em grãos de milho não apresentaram qualquer efeito deletério sobre o forrageio ou o ciclo de vida de *S. oryzae*. O mais provável motivo para tal resultado seria a capacidade de detoxificação de flavonoides e compostos relacionados por insetos, via imobilização, ou ainda oxidação, ou mesmo glicosilações ainda pouco conhecidas na literatura referente ao tema (Dowd et al, 1970).

Desses experimentos conclui-se que extratos flavonoídicos de *D. mollis* ricos em rutina, astilbina (e seus estereoisômeros), engeletina (e seu estereoisômeros) não apresentam qualquer atividade tóxica sobre *S. oryzae* nas concentrações aplicadas.

Referências Bibliográficas

Athanassiou, C.G.; Kavallieratos, N.C.; Evergetis, E.; Katsoula, A.M.; Haroutounian, S.A. Insecticidal efficacy of sílica gel with *Juniperus oxycedrus* spp. *Oxycedrus* (Pinales: Cupressaceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology 106(4): 1902-1910.

Barbehenn, R.V. 2002. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and gramnivorous grasshopper. Journal of Chemical Ecology 28, 1329-1347.

Beninger, C.W.; Abou-Zaid, M.M.; Kirstner, A.L.E.; Hallett, R.H.; Iqbal, M.J.; Grodzinski, B.; Hall, J.C. 2004. A flavanona and two phenolic acids from *Chrysanthemum morifolium* with phytotoxic and insect growth regulating activity. Journal of Chemical Ecology 30(3): 589-606.

Cantrell, C.L.; Dayan, F.E.; Duke, S.O. 2012. Natural products as sources for new pesticides. Journal of Natural Products 75(6), 1231-1242.

Céspedes, C.L.; Torres, P.; Marín, J.C.; Arciniegas, A.; Romo de Vivar, A.; Pérez-Castorena, A.L.; Aranda, E. 2004. Insect growth inhibition by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba-johannis*. Phytochemistry 65(1), 1963-1975.

Copping, L.G.; Menn, J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Management Science 56, 651-676.

Defagó, M; Valadares, G.; Banchio, E.; Carpinella, C.; Palacios, S. 2006. Insecticide and antifeedant activity of diferente plant parts of *Melia azedarach* on *Xanthogaleruca luteola*. Fitoterapia 77 (7-8): 500-505.

Dowd, P.F.; Smith, C.M.; Sparks, T. 1983. Detoxification of plant toxins by insects. Insect Biochemistry 17(5), 453-468.

Figueiredo, M.L.C., Dias, A.M.P.M., Cruz, I. 2006. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41, 1693-1698.

Fontes, L.S., Almeida Filho, A.J., Arthur, V. 2003. Danos causados por *Sitophilus oryzae* (Linnaé, 1763) e *Sitophilus zeamais* (Motschulky, 1855) (Coleoptera: Curculionidae) em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). Arquivos do Instituto Biológico 70 (3), 303-307.

Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Baptista, G.C.; Berti Filho, E., Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Vendramin, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. 2002. Entomologia Agrícola. FEALQ. Piracicaba, São Paulo – Brasil.

Isman, M.B. 2006. The role of botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasing regulated world. Annual Review of Entomology 51 (1): 51-66.

Simmonds, M.S.J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. Phytochemistry 56, 245-252.

Simmonds, M.S.J. 2003. Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. Phytochemistry 64, 21-30.

Rey, D., David, J.P., Cuany, A., Amichot, M., Meyran, J.C. 2000. Comparative ability to detoxify alder leaf litter in field larval mosquito strains. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 44, 1-8.

Pereira, L.B.; Petacci, F.; Fernandes, J.B.; Vieira, P.C.; Silva, M.F.G.F.; Malaspina, O.; Correa, A.G. 2002. Biological activity of astilbin from *Dimorphandra mollis* Benth. against *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (Smith). Pest Management Science 58(5) 503-507.

Stefanazzi, N.; Stadler, T.; Ferrero, A. 2011. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Pest Management Science 67(6): 639-648.

Tavares, W.S., Costa, M.A., Cruz, I., Silveira, R.D., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. 2010. Selective effects of natural and synthetic insecticides on mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its predator *Eriopis conexa* (Coleoptera: Coccinellidae). Journal of Environmental Sciences and Health Part B 45, 557-561.

Apêndice 1 – Imagens de *Dimorphandra mollis* Benth, cromatograma, espectros no UV, espectros de massas dos extratos flavonoídicos estudados e estruturas químicas propostas.

Figura 1 – Fotografia de exemplar de folhas compostas de *Dimorphandra mollis*.

Figura 2 – Fotografia de exemplar de inflorescências de *Dimorphandra mollis*.

Figura 3 – Fotografia de exemplares de frutos de *Dimorphandra mollis*.

Figura 4 – Fotografia de amostra de madeira de *Dimorphandra mollis*.

Figura 5 – Fotografia de casca de exemplar de *Dimorphandra mollis*.

Figura 6 – Fotografia de exemplar de plântula de *Dimorphandra mollis* após 35 dias de germinação.

Figura 7 – Plântulas de *D. mollis* em germinação *in vitro*. A coloração turva do meio de cultura constitui uma evidência da liberação de exsudados pelas radículas.

Figura 8 – Calos obtidos a partir da desdiferenciação de cotilédones de plântulas de *D. mollis*.

Figura 9 – Calos obtidos a partir da desdiferenciação de epicótilos de plântulas de *D. mollis*.

Figura 10 – Calos obtidos a partir da desdiferenciação de hipocótilos de plântulas de *D. mollis*.

Figura 11 - Cromatogramas em 360 e 280 nm do padrão analítico rotina obtidos por CLAE-DAD.

Figura 12 - Espectro no UV do padrão rotina, obitido por CLAE-DAD.

Figura 13 - Cromatogramas em 360 e 280 nm do padrão analítico apigenina obtidos por CLAE-DAD.

Figura 14 - Espectro no UV do padrão apigenina, obtido por CLAE-DAD.

Figura 15 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM/EM.

Figura 16 - Espectro no UV do pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 17 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 18 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 19 - Espectro no UV do pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 20 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 21 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 22 - Espectro no UV do pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 23 - Espectros de massas de íons produzido nos modos de ionização positiva (acima) e negativa (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 24 - Espectro no UV do pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 25 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 26 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 27 - Espectro no UV do pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 28 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 29 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 30 - Espectro no UV do pico cromatográfico 6 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 31 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 6 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 32 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 6 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 32 - Espectro no UV do pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 33 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 34 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de folhas de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 35 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM/EM.

Figura 36 - Espectro no UV do pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 37 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 38 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 39 - Espectro no UV do pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 40 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 41 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 42 - Espectro no UV do pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obitido por CLAE-DAD.

Figura 43 - Espectros de massas de íons produto nos modos de ionização positiva (acima) e negativa (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE-EM.

Figura 44 - Espectro no UV do pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 45 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 46 - Espectro no UV do pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 47 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 48 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 49 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 50- Espectro no UV do pico cromatográfico 6 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 51 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 6 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 52 - Espectro no UV do pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 53- Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 54 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM/EM.

Figura 55 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonóidico de frutos de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM/EM.

Figura 56 - Espectro no UV do pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 57 - Espectros de massas de íons produto nos modos de ionização positiva (acima) e negativa (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 58 - Espectro no UV do pico cromatográfico 8 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 59 - Espectros de massas de íons produto nos modos de ionização positiva (acima) e negativa (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 8 do extrato flavonoídico de frutos de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 60 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 61 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 1 do extrato flavonoídico de madeira de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 62 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 63 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 64 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 65 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de flores de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 66 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de casca de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 67 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 2 do extrato flavonoídico de casca de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 68 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de casca de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 69 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 4 do extrato flavonoídico de casca de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 70 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 5 do extrato flavonoídico de casca de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 71 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonóidico de plântulas de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 72 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de plântulas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 73 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 7 do extrato flavonoídico de plântulas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 74 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de exsudado de raízes de plântulas de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 75 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 3 do extrato flavonoídico de de exsudado de raízes de plântulas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 76 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de embriões de sementes de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 77 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de calos desenvolvidos a partir de epicótilos de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 78 - Espectro no UV do pico cromatográfico 9, presente no extrato flavonoídico calos oriundos de epicótilos de plântulas de *D. mollis*, obtido por CLAE-DAD.

Figura 79 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 9 do extrato flavonoídico de calos induzidos a partir de epicótilos de plântulas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 80 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de calos desenvolvidos a partir de hipocótilos de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 81 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 93 do extrato flavonoídico calos induzidos a partir de hipocótilos de plântulas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 82 - Cromatogramas em 352 e 280 nm de extrato flavonoídico de calos desenvolvidos a partir de cotilédones de *D. mollis* obtidos por CLAE-DAD-EM.

Figura 83 - Espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 9 do extrato flavonoídico de calos obtidos a partir de cotilédones de plântulas de *D. mollis* por CLAE- EM.

Figura 84 – Estruturas químicas propostas para os picos cromatográficos (1), (2), (4) e (5), de acordo com as informações espectroscópicas obtidas e a literatura consultada.

Rutina

Figura 85 – Estrutura química propostas para o pico cromatográfico (**3**), de acordo com as informações espectroscópicas obtidas e a literatura consultada.

Figura 86 – Estruturas químicas propostas para o pico cromatográfico (6), de acordo com as informações espectroscópicas obtidas e a literatura consultada.

Figura 87 – Estrutura química proposta para o pico cromatográfico (7), de acordo com as informações espectroscópicas obtidas e a literatura consultada.

Figura 88 – Estrutura química proposta para o pico cromatográfico (9), de acordo com as informações espectroscópicas obtidas e a literatura consultada.

Apêndice 1 – Imagens de *Spodoptera frugiperda* e *Sitophilus oryzae*

Figura 89 – Larvas de *Spodoptera frugiperda* do segundo (A) ao quinto (D) instares.

Figura 90 – Cultura pura de *Sitophilus oryzae* em grãos de milho.