## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

# Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais



Leonardo Gobbo Neto

Ribeirão Preto 2007

### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais

Leonardo Gobbo Neto

Ribeirão Preto 2007

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais

> Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

> > Leonardo Gobbo Neto

**Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes** 

Ribeirão Preto

2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Gobbo-Neto, Leonardo

Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ercoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. Ribeirão Preto, 2007.

254 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências

Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Produtos

Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. *Lychnophora ericoides*. 2. Técnicas hifenadas. 3. Variações infra-específicas. 4. Variações populacionais. 5. Variações sazonais. 6. Variações circadianas.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

#### Leonardo Gobbo Neto

Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Assinatura:
Assinatura:

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇAO	9
1.1. Fatores de influência no metabolismo secundário	9
1.2. Implicações taxonômicas das variações do metabolismo secundário	21
<ol> <li>1.3. Implicações das variações do metabolismo secundário em plantas medicinais</li> </ol>	24
1.4. Técnicas hifenadas na análise de produtos naturais	26
1.5. A espécie Lychnophora ericoides Mart.	30
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1. Especificações de materiais e instrumentos	46
3.2. Demarcação, coleta e armazenamento de <i>L. ericoides</i>	47
3.3. Preparo, extração e análise das amostras	48
3.4. Validação da metodologia de extração e análise	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1. Método de extração	62
4.2. Método de análise	65
4.3. Curvas de calibração e validação da metodologia	67
4.4. Identificação dos picos cromatográficos	75
4.5. Variações no conteúdo de metabólitos secundários	114
5. CONCLUSÕES	168
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
APÊNDICE A	194
APÊNDICE B	201
APÊNDICE C	254

#### RESUMO

GOBBO-NETO, L. Emprego de técnicas hifenadas na identificação de metabólitos secundários de Lychnophora ericoides Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais. 254 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

A análise pelas técnicas hifenadas CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM de extratos foliares de Lychnophora ericoides Mart. levou à identificação de 34 metabólitos secundários diretamente a partir dos extratos vegetais. Destes, 19 foram relatados pela primeira vez na subtribo Lychnophorinae. Uma metodologia para extração e análise destes metabólitos por CLAE-DAD foi desenvolvida, validada e utilizada para determinação de suas variações populacionais e temporais. Perfis metabólicos bem semelhantes, com diferenças quantitativas, mas não qualitativas, foram observados entre os indivíduos de uma mesma população. Entre as cinco populações analisadas, foi observado um metabolismo secundário bem mais diversificado, caracterizado pela presença de lactonas sesquiterpênicas, nas plantas da população de Ibiraci-MG. As concentrações mais elevadas de ácidos cafeoilquínicos foram encontradas no período da seca no cerrado (inverno) e as menores quando a planta se encontrava florida. Os teores de flavonóides foram maiores durante o período de chuvas (verão) e os de C-glicosilflavonas e lactonas sesquiterpênicas se mantiveram estáveis. Variações circadianas significativas de flavonóides e ácidos cafeoilquínicos também foram observadas nas duas populações nas quais estes fatores foram estudados. Foi verificado que o envelhecimento das folhas resulta em uma pronunciada redução no conteúdo de todos os metabólitos secundários e concentrações menores dos metabólitos foram observadas nas folhas dos ramos floridos em relação aos ramos sem flores de um mesmo indivíduo. Finalmente, conclui-se que as variações temporais e populacionais observadas em L. ericoides podem ser determinantes para a intensidade da atividade antiinflamatória e/ou analgésica desta planta, utilizada popularmente para estes propósitos.

Palavras-chave: *Lychnophora ericoides*, técnicas hifenadas, variações infraespecíficas, variações populacionais, variações sazonais, variações circadianas.

#### ABSTRACT

GOBBO-NETO, L. Use of hyphenated techniques on the identification of secondary metabolites from *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) and determination of their populational and temporal variations. 254 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The analyses of Lychnophora ericoides Mart. leaves extracts by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS resulted in the identification of 34 secondary metabolites directly from the plant extracts. Nineteen of these metabolites are being reported for the first time in the Lychnophorinae subtribe. A method for the extraction and analyses of these metabolites by CLAE-DAD was developed, validated and employed for the determination of their populational and temporal variations. Very similar metabolic profiles, exhibiting quantitative but not qualitative differences, were found among each population individuals. Among the five studied populations, a more diversified secondary metabolism, characterized by sesquiterpene lactones presence, was observed for the plants collected at Ibiraci-MG. The highest concentrations of caffeoylquinic acids were found in the "cerrado" dry season (winter), and the lowest when the plants were blooming. The flavoinoid contents were higher during the rainy season (summer), while C-glucosylflavones and sesquiterpene lactones levels remained stable. Significant circadian variations were also detected regarding flavonoids and caffeoylquinic acids in the two populations analyzed on this respect. It was also found a pronounced reduction in the contents of all the secondary metabolites as the leaves get old. Lower levels of all the metabolites were also found for the flowery branches when compared to the non flowery ones in the same individual. Finally, it can be concluded that the temporal and populational variations detected in L. ericoides leaves could highly influence the intensity of the antiinflammatory and/or analgesic activities of this plant, used in popular medicines for these purposes.

Key words: *Lychnophora ericoides*, hyphenated techniques, infra-specific variations, populational variations, seasonal variations, circadian variations.

# 1. INTRODUÇÃO

Desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os carrascos gregos, por exemplo, coletavam suas amostras do veneno cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores (FAIRBAIRN; SUWAL 1961; ROBINSON, 1974).

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, interespécies e intra-espécies), e apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (BOWERS; STAMP, 1993; DARROW; BOWERS, 1997; HARTMANN, 1996; LINDROTH et al., 1987; WATERMAN; MOLE, 1989). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

#### 1.1. Fatores de influência no metabolismo secundário

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários foram recentemente revisados por Gobbo-Neto e Lopes (2007) e estão expostos a seguir. Deve ser enfatizado, porém, que os estudos sobre influência destes fatores na produção de metabólitos secundários geralmente têm se limitado a um restrito grupo de espécies, predominantemente ocorrentes em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente importantes e podem ter sofrido fortes pressões seletivas por humanos, visando certas características desejadas. Seu comportamento, portanto, nem sempre é representativo de plantas selvagens ou de outros tipos de habitat.

Também deve ser notado que, muitas vezes, as variações podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Isto pode levar a uma menor concentração destes metabólitos por diluição podendo, no entanto, resultar em uma maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa (HENDRIKS et al., 1997; SPRING; BIENERT, 1987). Além disso, alguns dos fatores considerados apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário, como por exemplo: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros.

#### 1.1.1. Sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento

A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade, e às vezes até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários: óleos essenciais (ANGELOPOULOU et al., 2002; LOPES et al., 1997; PALÁ-PAÚL et al., 2001; SCHWOB et al., 2004), lactonas sesquiterpênicas (SCHMIDT et al., 1998; ZIDORN; STUPPNER, 2001), ácidos fenólicos (GRACE et al. 1998; ZIDORN; STUPPNER, 2001), flavonóides (BROOKS; FEENY, 2004; LOBSTEIN et al., 1991; MENKOVIĆ et al., 2000; WILT; MILLER, 1992) cumarinas (WILT; MILLER, 1992), saponinas (KIM et al., 1981; NDAMBA et al., 1994), alcalóides (BANDOPADHYAY; DE, 1997; ROBINSON, 1974; ROCA-PÉREZ et al., 2004; WU et al., 1996), taninos (IASON et al. 1993; OSIER et al., 2000; SALMINEN et al., 2001), graxas epicuticulares (FAINI et al., 1999), iridóides (BOWERS et al.,

1992; HØGEDAL; MØLGAARD, 2000; MENKOVIĆ et al., 2000), glucosinolatos (AGERBIRK et al., 2001), glicosídeos cianogênicos (KAPLAN et al., 1983).

Os casos mais freqüentemente relatados envolvem plantas e/ou metabólitos empregados na terapêutica, como os exemplos a seguir: as folhas de Digitalis obscura apresentam as menores concentrações de cardenolidos na primavera e uma fase de rápida acumulação no verão, seguida por uma fase de decréscimo no outono (ROCA-PÉREZ et al., 2004). As concentrações de hipericina e pseudohipericina na erva de São-João (Hypericum perforatum, utilizada no tratamento de depressões leves a moderadas) aumentam de cerca de 100ppm no inverno para mais de 3000ppm no verão (SOUTHWELL; BOURKE, 2001). Nas folhas de Ginkgo biloba as concentrações de glicosil-flavonóis (considerados, assim como os terpenóides ginkgolídeos, constituintes ativos dos extratos usados para tratamento de desordens vasculares periféricas e cerebrais) também apresentam marcantes variações sazonais (LOBSTEIN et al., 1991); por outro lado, não há consenso quanto às variações no conteúdo dos ginkgolídeos devido à existência de resultados contraditórios na literatura (BEEK et al., 1998). Nas raízes de Panax ginseng foi detectado um grande aumento na concentração de damarano-saponinas bioativas no verão (KIM et al., 1981). No inverno, o ruibarbo (Rhei rhizoma) não contém antraguinonas, as guais comecam a se formar com a chegada da estação guente a partir da oxidação de antranóis (EVANS, 1996). Em estudos que visam determinar a sazonalidade de taxóides, tendo como alvo principal o paclitaxel (utilizado na terapêutica de câncer de ovário, entre outros) nota-se alterações no decorrer do ano na concentração destes compostos em Taxus brevifolia e T. baccata; porém não é possível determinar um padrão de variação, devido a resultados conflitantes na

literatura (ELSOHLY et al., 1997; GLOWNIAK et al., 1999; HOOK et al., 1999; VANCE et al., 1994; VESELÁ et al., 1999; WHEELER et al., 1992).

Existem, também, cada vez mais estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta também pode variar apreciavelmente durante o ciclo dia/noite, tendo sido descritas, por exemplo, variações circadianas nas concentrações de óleos voláteis (ANGELOPOULOU et al., 2002; LOPES et al., 1997; LOUGHRIN et al., 1993; SILVA et al., 1999), iridóides (HØGEDAL; MØLGAARD, 2000), alcalóides (FAIRBAIRN; WASSEL, 1964; ITENOV et al., 1999; ROBINSON, 1974; SPORER et al. 1993), glucosinolatos (ROSA et al., 1994), glicosídeos cianogênicos e tiocianatos (OKOLIE; OBASI, 1993).

Foi notada, por exemplo, uma variação de mais de 80% na concentração de eugenol no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o qual atinge um máximo em torno do meio-dia, horário em que é responsável por 98% do conteúdo do óleo essencial, em contraste com uma concentração de 11% em torno de 17:00h (SILVA et al., 1999). Os níveis de alcalóides em *Datura stramonium* (FAIRBAIRN; WASSEL, 1964) e de coniina em *Conium maculatum* (FAIRBAIRN; SUWAL, 1961) são maiores quando as coletas são efetuadas pela manhã do que no entardecer. O conteúdo total de taxóides em *Taxus media* se mostrou menor pela manhã e aumenta durante o dia, atingindo um máximo na madrugada (4:00 h) (ELSOHLY et al., 1997). Também é interessante notar que a variação circadiana dos alcalóides majoritários de *Papaver somniferum*, que era atribuída a um rápido *turnover* destes metabólitos, é na verdade causada por uma variação diária no conteúdo de água no látex da planta, o que leva a alterações na concentração, mas não no conteúdo total, de morfina, codeína e noscapina (FAIRBAIRN; WASSEL, 1964; ITENOV et al., 1999).

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também é de considerável importância e pode influenciar não somente a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (BOWERS; STAMP, 1993; BUTA; SPAULDING, 1997; DOAN et al., 2004; EVANS, 1996; GORALKA et al., 1996; HENDRIKS et al., 1997; HÖFT, et al., 1998; JENKS et al., 1996; NDAMBA, et al., 1994; SCORA et al., 1984; SLIMESTAD 1998; VOGT; GÜLZ, 1994; WILLIAMS; ELLIS, 1989; WISDOM; RODRIGUEZ, 1983). É o caso, por exemplo, das lactonas sesquiterpênicas produzidas em Arnica montana, consideradas os principais princípios ativos desta planta utilizada como antiinflamatório: enquanto plantas jovens acumulam majoritariamente derivados da helenalina, a concentração destes compostos é reduzida para praticamente zero após aproximadamente seis semanas contadas a partir da formação das folhas; por outro lado, os níveis de compostos do tipo diidrohelenalina aumentam muito e então se mantêm constantes por um longo período (SCHMIDT et al., 1998). Situação semelhante ocorre com os flavonóides de Gentiana lutea, cujas folhas são ricas em C-glicosídeos na fase de floração, enquanto O-glicosídeos são acumulados principalmente antes do desenvolvimento de flores (MENKOVIĆ et al., 2000). Em um estudo com Papaver somniferum (papoula) o conteúdo de morfina aumentou de menos de 20 µg/g no 50° dia após a germinação para mais de 120 µg/g no 75° dia; já o conteúdo de codeína se manteve praticamente constante (WILLIAMS; ELLIS, 1989). No caso do Tanacetum parthenium, a porcentagem de partenolido (um dos principais constituintes bioativos desta planta utilizada na profilaxia da enxaqueca) é maior nos primeiros estágios de desenvolvimento da planta (antes do surgimento das hastes no ápice das quais surgirão as flores), porém a quantidade total obtida por planta aumenta de cerca de 10mg para 20mg durante o crescimento, devido ao surgimento de flores (as quais, ao contrário das hastes, contém mais de 1% de partenolido) e mais folhas (HENDRIKS et al., 1997). Em *Digitalis obscura* micropropagada foi observado que o conteúdo de lanatosídeo A (cardenolídeo predominante – cerca de 65%) e digitoxina aumentam consideravelmente com o desenvolvimento da planta (GAVIDIA; PÉREZ-BERMÚDEZ, 1997). Várias outras variações ontogenéticas envolvendo, por exemplo, óleos voláteis, diterpenos, alcalóides, glicosídeos cardíacos, taninos, cumarinas e saponinas foram relatadas por Evans (1996).

Convém notar que, especialmente em estudos de campo e com plantas anuais, os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle do processo de desenvolvimento internamente (hormonalmente) controlado pela planta, devendo assim ser considerados em conjunto.

Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem uma maior taxa biossintética de metabólitos (HARTMANN, 1996) tais como óleos essenciais (GERSHENZON et al., 1989; HALL; LANGENHEIN, 1986), lactonas sesquiterpênicas (SPRING; BIENERT, 1987), ácidos fenólicos (KOEPPE et al., 1970), flavonóides e estilbenos (SLIMESTAD, 1998) e alcalóides (HÖFT et al., 1998).

#### 1.1.2. Temperatura

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas freqüentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando portanto

a produção de metabólitos secundários (EVANS, 1996). No entanto, talvez pelo fato de a temperatura de maneira geral ser uma conseqüência de outros fatores como altitude e sazonalidade, não existem muitos estudos sobre sua influência isoladamente na produção de metabólitos secundários.

#### 1.1.3. Disponibilidade hídrica

Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e conseqüentemente levar a alterações no metabolismo secundário (BAZAAZ et al., 1987; HSIAO, 1973; SALISBURY; ROSS, 1991). Os efeitos dos índices pluviométricos na vegetação devem ser considerados em relação ao índice anual, sua distribuição pelo ano, seu efeito na umidade e seu efeito conjunto com a capacidade de absorção de água do solo (EVANS, 1996). Outro fator é que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação; sabe-se que isto se aplica a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis (EVANS, 1996; WATERMAN; MOLE, 1994).

#### 1.1.4. Radiação ultravioleta

As necessidades em relação à quantidade e intensidade de luz variam muito em plantas. Diferentes espécies estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade de incidência luminosa (EVANS, 1996; SALISBURY; ROSS, 1991; WATERMAN; MOLE, 1989). Além disso, existe uma crescente preocupação com os efeitos do aumento de radiação ultravioleta (UV-B, 280–320nm) decorrente da depleção da camada de ozônio. Existe uma correlação positiva bem estabelecida entre a intensidade de radiação solar e a produção de fenólicos (WATERMAN; MOLE, 1994), tais como flavonóides (CUADRA et al., 1997; TATTINI et al., 2004), taninos (DUDT; SHURE, 1994; DUSTIN; COOPER-DRIVER, 1992) e antocianinas (GRACE et al., 1998; JEONG et al., 2004). Isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra fotodestruição fornecida por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação pela radiação UV-B nos tecidos mais profundos (ÅLENIUS et al., 1995; DELUCIA et al., 1992; GRACE; LOGAN, 2000; WATERMAN; MOLE, 1994).

Estudos mostram que a intensidade de luz é um fator que também influencia a concentração e/ou composição de outras classes de metabólitos secundários (WATERMAN; MOLE, 1989), como terpenóides (JOHNSON et al., 1999; KAROUSOU et al., 1998; SPRING; BIENERT, 1987; YAMAURA et al., 1989), glicosídeos cianogênicos (BURNS et al., 2002) e alcalóides (HIRATA et al., 1993; HÖFT et al., 1996).

#### 1.1.5. Solo e nutrientes

Na agricultura, a adição de nutrientes, particularmente o nitrogênio, é geralmente empregada para aumentar a produção de biomassa. No entanto, os nutrientes afetam não somente o metabolismo primário, mas também influenciam a produção de diferentes metabólitos secundários, e o impacto de mudanças em sua disponibilidade na produção de metabólitos secundários foi revista por Gershenzon (1984). Estes efeitos, de certo modo, não são totalmente previsíveis; tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível criar regras sólidas e estáveis

17

(WATERMAN; MOLE, 1989). Por outro lado, apesar da reconhecida influência no desenvolvimento vegetal, poucos estudos mostram relações entre pH ou microorganismos do solo e o metabolismo secundário (EVANS, 1996).

De todos os nutrientes fornecidos às plantas pelo solo, somente os efeitos do nitrogênio têm sido relativamente bem estudados, apesar de existirem algumas informações disponíveis sobre enxofre, fósforo e alguns metais (GERSHENZON, 1984; WATERMAN; MOLE, 1989), e há muito pouca informação disponível sobre o impacto de micronutrientes na produção de metabólitos secundários em plantas.

#### 1.1.6. Altitude

Apesar dos poucos estudos neste sentido, a altitude também exerce efeitos sobre o desenvolvimento e produção de metabólitos secundários em plantas. A correlação positiva geralmente existente entre o conteúdo total de flavonóides e a altitude, por exemplo, é de particular interesse farmacêutico, uma vez que estes são constituintes ativos de um grande número de plantas medicinais (BACHEREAU et al., 1998; POLLE et al., 1992; VEIT et al., 1996; ZIDORN; STUPPNER, 2001). Esta correlação pode ser explicada, em parte, pela maior susceptibilidade à radiação UV em maiores altitudes, uma vez que, conforme já comentado anteriormente, flavonóides são reconhecidos por propiciar proteção à radiação e seus efeitos.

Metabólitos não fenólicos também podem ser influenciados pela altitude. Uma comparação entre coletas de *Plantago lanceolata* efetuadas em altas altitudes *versus* baixas altitudes revelou maiores concentrações do iridóide catolpol nas primeiras (DARROW; BOWERS, 1997). O aumento de altitude leva a um decréscimo no conteúdo dos alcalóides diterpênicos de *Aconitum napellus* e

piperidínicos de *Lobelia inflata* e no de óleos voláteis de tomilho e hortelã pimenta (EVANS, 1996).

#### 1.1.7. Composição atmosférica

Os poucos trabalhos sobre mudanças no metabolismo secundário decorrentes de poluição atmosférica são, de modo geral, bastante limitados e voltados principalmente para as conseqüências de níveis elevados de O<sub>3</sub> ou CO<sub>2</sub> no metabolismo de fenólicos.

Foi relatado, por exemplo, que *Digitalis lanata* cultivada em casas de vegetação com atmosfera enriquecida com CO<sub>2</sub> (1000ppm) produziu 3,5 vezes mais digoxina (um glicosídeo cardíaco utilizado na terapêutica) por hectare do que plantas cultivadas no campo (EVANS, 1996). Por outro lado, a planta *Plantago lanceolata*, quando cultivada em atmosfera com elevada concentração de CO<sub>2</sub> (700 $\mu$ L/L) apresenta concentrações similares ou menores de iridóides do que as cultivadas em condições ambientes (CO<sub>2</sub> = 350 $\mu$ L/L) (FAJER et al., 1992).

#### 1.1.8. Indução por estímulos mecânicos e/ou ataque de patógenos

Fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo meros estímulos causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, também podem influenciar a expressão do metabolismo secundário (BOWERS; STAMP, 1993; CIPOLLINI Jr, 1997; REYMOND et al., 2000; VÁZQUEZ-FLOTA et al., 2004).

Danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos freqüentemente levam a uma resposta bioquímica que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros (HEIL; BOSTOCK, 2002; WATERMAN; MOLE 1989). O mais claro exemplo disto é a

produção *de novo* de fitoalexinas (compostos geralmente derivados de fenilpropanóides, mas também de terpenóides ou poliacetilenos) em resposta à invasão de patógenos (HARBORNE, 1989a; HEIL; BOSTOCK, 2002; SALISBURY, 1991; WATERMAN; MOLE, 1989). Algumas plantas, como o tomate e a batata, em resposta à alimentação por insetos produzem rapidamente peptídeos inibidores de proteinase, o que pode diminuir significantemente a palatabilidade da planta ou parte dela (GRAHAM et al., 1986; HARBORNE, 1989b; HILDER et al., 1987; WATERMAN; MOLE, 1989)

Uma outra forma de defesa induzida, aparentemente bem distinta da anterior, é a resposta a curto ou longo prazo à danificação de tecidos vegetais, aumentando a produção e acúmulo de metabólitos secundários já existentes, levando à fuga dos herbívoros (HARBORNE, 1989b; WATERMAN; MOLE, 1989). Este acréscimo é, às vezes, uma resposta localizada somente no órgão danificado, e outras vezes uma resposta mais geral, podendo afetar a bioquímica vegetal como um todo (BALDWIN et al., 1997; JOHNSON; BRAIN, 1985; WATERMAN; MOLE, 1989). A danificação artificial em plântulas de *Catharanthus roseus* (vinca), por exemplo, resultou em um aumento de cerca de 100% no conteúdo dos alcalóides ajmalicina e vindolina 48h após o tratamento; em contraste, o conteúdo de catarantina não sofreu alterações significativas (VÁZQUEZ-FLOTA et al., 2004).

Sabe-se também que o nível de indução pode variar de acordo com o agente causador. De fato, algumas observações têm revelado que injúria causada por alimentação de insetos pode resultar em uma resposta fisiológica diferenciada, na qual a expressão gênica e/ou formação de metabólitos secundários é induzida especificamente ou mais rapidamente, devido a eliciadores presentes na saliva do

inseto (KORTH; DIXON, 1997; NEUVONEN et al., 1987; PARÉ; TUMLINSON, 1997; REYMOND et al., 2000).



Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (ilustração de C. A. Carollo; extraída de GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

#### 1.2. Implicações taxonômicas das variações do metabolismo secundário

As diferentes populações de praticamente todas as espécies de plantas apresentam alguma variação química em uma ou mais classes de constituintes. Em alguns casos, raças químicas bem definidas são relatadas, sendo sugerido que essas deveriam ser tratadas como taxa infra-específicos (MABRY, 1973).

As raças químicas ou quimiotipos são definidas como populações quimicamente distintas dentro de uma espécie que possuem fenótipos semelhantes e diferentes genótipos, e assim sendo, apesar de idênticas na aparência externa, diferem em seus constituintes químicos. Essas variações químicas geneticamente controladas têm importantes implicações para o desenvolvimento de drogas brutas de qualidade superior. O conceito de raça química, contudo, é distinto do polimorfismo local, o qual é resultante de variações induzidas por fatores externos (EVANS, 1996).

Os resultados de estudos de variações na produção de metabólitos secundários em determinada planta podem revelar se as substâncias estudadas são úteis como marcadores químicos e, portanto, se poderiam servir como um conjunto adicional de caracteres taxonômicos para a definição de taxa complexos e determinação de quimiotipos (MABRY, 1973; WILT et al., 1992). Flavonóides (EMERENCIANO et al., 2001; FIASSON et al., 1991), ácidos fenólicos (MAÑEZ et al., 1994) e lactonas sesquiterpênicas (SEAMAN, 1982; ZDERO; BOHLMANN, 1990), por exemplo, têm se demonstrado confiáveis caracteres quimiossistemáticos.

Os compostos fenólicos são potencialmente úteis como marcadores químicos em variados níveis taxonômicos. Os flavonóides em particular possuem ampla variedade bioquímica, a qual tem sido útil em muitos casos para a distinção entre taxas e quimiotipos (HARBORNE, 1975; SEIGLER, 1981; WILT; MILLER, 1992). Numerosos estudos utilizaram-se de flavonóides para obter uma classificação satisfatória entre gêneros quando a classificação morfológica e/ou anatômica é muito complicada, como realizado por exemplo com os gêneros *Attalea* (WILLIAMS et al., 1983, 1985), *Chondropetalum* (HARBORNE et al., 1985) e *Sideritis* (FERRERES et al., 1989). Além disso, trabalhos também relatam a determinação de raças químicas

baseadas na composição destes metabólitos em várias espécies, tais como *Centaurea montana* (GONNET, 1992) e *Cistus ladanifer* (CHAVES et al., 1997) entre outras.

Lactonas sesquiterpênicas também são consideradas valiosos marcadores quimiotaxonômicos, tanto no nível interespecífico quanto no infra-específico, com base nos seus diferentes esqueletos carbônicos e seus padrões de substituição (FEUERSTEIN et al., 1986; SEAMAN, 1982; ZDERO; BOHLMANN, 1990). Foram utilizadas, por exemplo, para o estabelecimento de quimiotipos em *Eremanthus seidelii* (SAKAMOTO et al., 2005), *Parthenium hysterophorus* (PICMAN; TOWERS, 1982), *Artemisia annua* (WALLAART et al., 2000) e em *Artemísia herba-alba* (neste caso, em conjunto com constituintes do óleo essencial) (SEGAL et al., 1987).

Também há relatos de quimiotipos definidos com base na composição de óleos essenciais como, por exemplo, em *Tanacetum vulgare* (KESKITALO et al., 2001), *Artemisia herba-alba* (neste caso, em conjunto com lactonas sesquiterpênicas) (SEGAL et al., 1987), e *Ocimum gratissimum* (VIEIRA et al., 2001).

Na maioria dos estudos quimiossistemáticos somente uma classe de compostos é analisada e os resultados são freqüentemente dados somente de uma maneira qualitativa ou semiquantitativa. Isto pode ser apropriado para estudos em grupos contendo uma ampla gama de variabilidade. Entretanto, padrões de metabólitos secundários similares, e às vezes idênticos, são encontrados em espécies fortemente correlatas ou entre populações de uma mesma espécie. Para estes grupos, estudos quimiossistemáticos quantitativos podem fornecer caracteres adicionais para a discriminação de taxas ou quimiotipos. Pré-requisitos para o uso de dados fitoquímicos para a distinção entre taxa são: 1- o grau de variação entre diferentes populações de um dado táxon; 2- a variação entre indivíduos dentro de

uma população 3- diferenças no conteúdo de uma dada substância durante o período de crescimento e no decorrer do ano; 4- variação entre populações crescendo em diferentes ambientes ecológicos (ZIDORN; STUPPNER, 2001).

O grau de variação da concentração de metabólitos secundários interplanta, intra-espécie e sazonal em um dado órgão afetará sua utilidade como marcador taxonômico. Taxa quimicamente definidos podem ser aceitos com base em diferenças quantitativas somente quando estas diferenças excedem essas flutuações e quando são estatisticamente significantes (SEIGLER, 1981; WILT; MILLER, 1992).

## 1.3. Implicações das variações do metabolismo secundário em plantas medicinais

Conforme visto, o metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores (Figura 1), sendo que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção. Por outro lado, estudo recente mostrou que os metabólitos secundários de uma espécie vegetal selvagem, amostrada diretamente em seu habitat em três diferentes populações, se mantiveram em concentrações constantes durante os dois anos do estudo, demonstrando, portanto, que em alguns casos o metabolismo secundário pode não se alterar em função de fatores climáticos, temporais ou ambientais (SAKAMOTO et al., 2005).

Os fatores expostos (**Figura 1**), bem como outros que podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais, tais como condições de coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade e conseqüentemente no valor terapêutico de preparados fitoterápicos

(CALIXTO, 2000; EVANS, 1996). O controle de qualidade e a padronização de fitoterápicos envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matériasprimas (planta medicinal) têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000).

O processo legal de regulamentação e legislação de preparados fitoterápicos, devido principalmente a aspectos culturais, é diferente em cada país. Muitos países da Europa utilizam plantas medicinais de forma ampla, como a Alemanha e a França, que detêm 39 e 29% do total de vendas da União Européia, respectivamente (SILANO et al., 2004; VEIGA Jr. et al., 2005). As legislações européias têm sido ampliadas por normas cada vez mais restritivas, exigindo testes que comprovem a eficácia, qualidade e segurança dos fitoterápicos (SILANO et al., 2004; VEIGA Jr. et al., 2005). Neste mesmo sentido, no Brasil, resoluções recentes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõem sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2004). A Resolução-RDC nº 48 de 16 de março de 2004 exige, com exceção para aqueles fitoterápicos enquadrados como "fitoterápicos tradicionais", a apresentação de uma série de relatórios que atestem, para o preparado fitoterápico a ser registrado, a segurança e a eficácia, bem como normas de produção e controle de qualidade visando reprodutibilidade e constância de princípios ativos e/ou marcadores característicos da espécie vegetal (ANVISA, 2004; VEIGA Jr. et al., 2005).

Assim, baseando-se nos relatos aqui apresentados, é evidente que existe a necessidade de uma análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico. Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos visando

detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos. Também se faz necessário um rigoroso controle de qualidade realizado por meio de técnicas analíticas modernas para garantir constância na composição de metabólitos secundários no preparado fitoterápico em escala industrial. Além disso, o reconhecimento e a compreensão dessas variações poderão, no futuro, auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com o seu ambiente.

#### 1.4. Técnicas hifenadas na análise de produtos naturais

O acoplamento de um sistema de separação cromatográfica a um detector espectroscópico ou espectrométrico visando a obtenção de informações estruturais de metabólitos de interesse diretamente a partir de misturas é, sem dúvida, vantajosa em relação ao processo clássico de isolamento e posterior elucidação estrutural. O termo "técnicas hifenadas" vem sendo utilizado para denominar estas técnicas acopladas (CROTTI et al., 2006a). Os mais importantes avanços na análise de misturas complexas foram inicialmente obtidos após o desenvolvimento do acoplamento da cromatografia gasosa (CG) a detectores de espectrometria de massas (CG-EM), a qual atualmente é utilizada rotineiramente em muitas áreas, por exemplo para a análise de óleos essenciais na indústria cosmética. Porém, esta técnica tem a grande limitação de somente permitir a análise de substâncias termicamente estáveis, que podem ser volatilizadas intactas. Na cromatografia líquida (CL) os primeiros sistemas hifenados ou de simples detecção foram o ultravioleta (UV), o infravermelho, o eletroquímico e a fluorescência. Nenhum destes exemplos pode ser considerado uma técnica universal, mas tornam possível a análise de matrizes complexas não voláteis, constituídas de componentes de maior peso molecular (CROTTI et al., 2006a).

Apesar do fator limitante da existência de um cromóforo para propiciar a detecção em ultravioleta, o desenvolvimento de detectores de arranjo de diodos (DAD – *diode array detector* ou PDA – *photo-diode array*) estimulou o desenvolvimento de análises de misturas mais complexas por CL hifenada. As principais razões para o sucesso inicial desta técnica foram: 1) vantagem da obtenção do espectro de UV de cada substância separada pelo sistema CL, o que fornece alguma informação estrutural, ainda que limitada; 2) o relativo baixo custo da técnica em relação a outras técnicas hifenadas. Entretanto, a necessidade de se obter mais informação estrutural para cada componente de uma mistura complexa levou ao desenvolvimento das técnicas hifenadas modernas hoje disponíveis, tais como o acoplamento de CL com espectrometria de massas (CL-EM) e ressonância magnética nuclear (CL-RMN) (CROTTI et al., 2006a).

Nas técnicas hifenadas envolvendo espectrometria de massas, conforme já comentado, o espectrômetro de massas é acoplado em linha com um método de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), CG, cromatografia de fluido supercrítico ou eletroforese capilar. Após o processo de separação, o eluente da coluna CLAE, por exemplo, é dividido por um *splitter* localizado no final da coluna cromatográfica, direcionando parte do fluxo para a fonte de ionização do espectrômetro de massas, sendo que a outra parte do eluente pode ser direcionada a outro tipo de detector. Assim, o acoplamento entre CLAE e os detectores de EM e DAD em paralelo resulta em uma das técnicas hifenadas mais utilizadas atualmente: CLAE-DAD-EM (CROTTI et al., 2006a).

Nos dias de hoje, uma das maiores aplicações das técnicas hifenadas na área de produtos naturais é na chamada derreplicação de misturas complexas, ou seja, a caracterização rápida dos constituintes de uma mistura para estabelecer quais já foram previamente identificados (CORDELL; SHIN, 1999; HOSTETTMANN et al., 2001). De fato, nas últimas duas décadas, as técnicas hifenadas têm se tornado a mais importante estratégia para a identificação e/ou confirmação da identidade de compostos guímicos desconhecidos. O screening guímico utilizando técnicas como CLAE-EM, CLAE-DAD-EM e CLAE-EM-RMN rapidamente fornece ampla informação estrutural, possibilitando, em muitos casos, a identificação inequívoca de compostos on-line e assim auxiliando na racionalização dos estudos fitoquímicos (WILSON; BRINKMAN, 2003). Com isso, fica claro que estas técnicas criaram possibilidades para o screening químico ou determinação do perfil metabólico dos componentes de extratos de produtos naturais, pois provêem um método rápido e confiável para a distinção entre compostos previamente identificados e novas moléculas, diretamente a partir de extratos vegetais brutos. Isso elimina, ou diminui muito, a necessidade do processo de isolamento e purificação de compostos já conhecidos, e direciona ao isolamento de constituintes apresentando características espectroscópicas novas, diferentes ou de interesse biológico (CORDELL; SHIN, 1999; HOSTETTMANN et al., 2001; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003).

A técnica mais associada com o processo de derreplicação usualmente consiste de um sistema CLAE-EM ou CLAE-DAD-EM, apesar de muitos estudos já utilizarem CLAE-RMN e, até mesmo, CLAE-EM-RMN (HOSTETTMANN et al., 2001). Na derreplicação de produtos naturais por CLAE-DAD-EM, os espectros de UV e dados de EM, como massas moleculares (acuradas no caso de analisadores que permitam alta resolução) e espectros de íons produto (no caso dos espectrômetros

que permitam a fragmentação em célula de colisão e a realização de EM/EM) são usualmente utilizados em conjunto com informações quimiossistemáticas da espécie analisada e bancos de dados de compostos naturais, como o NAPRALERT ou SciFinder (CORDELL; SHIN, 1999; CROTTI et al., 2006a NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003;).

Entre as técnicas de ionização, a mais utilizada para acoplamento com CLAE, devido à sua versatilidade, é a ESI (ionização por *electrospray*). ESI é o processo pelo qual, à pressão atmosférica, um campo elétrico intenso dispersa uma amostra líquida em um gás, na forma de um fino spray de gotas carregadas que, por evaporação, resultam em íons na fase gasosa (CROTTI et al., 2006b; FENN, 2003). Em ESI, a ionização ocorre principalmente por reações ácido-base de Brönsted-Lowry, ou seja, pela protonação ou desprotonação de moléculas (CECH; ENKE, 2001; CROTTI et al., 2006b). Assim, substâncias que apresentam grupos funcionais básicos (principalmente aminas, amidas, lactamas, ésteres e lactonas) podem ser melhor analisadas no modo de ionização positiva, dada a maior facilidade com que estes grupos são potonados em solução. Inversamente, moléculas contendo funções acídicas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, podem ser melhor analisadas no modo de ionização negativa, no qual produzem as moléculas desprotonadas relativamente estáveis (CECH; ENKE, 2001; CROTTI et al., 2006b). ESI é um método muito brando, e pouca energia residual é retida pelo analito após a ionização, normalmente acarretando uma baixa fragmentação. Portanto, a reduzida transferência de energia para as moléculas é uma desvantagem desta técnica para estudos de elucidação estrutural. Para contornar essa desvantagem, foram desenvolvidos equipamentos de espectrometria de massas següencial (EM/EM ou EM<sup>n</sup>), na qual as moléculas podem ser fragmentadas.

Em uma análise EM/EM, um íon do primeiro estágio (chamado íon precursor) é selecionado e transferido para uma célula de colisão. A fragmentação do íon precursor se dá através de dissociação induzida por colisão (CID – *collision-induced dissociation*) utilizando um gás inerte (usualmente Ar, N<sub>2</sub> ou CO<sub>2</sub>). Os íons resultantes (íons produto ou de segunda geração) são, de modo geral, altamente indicativos da estrutura do íon precursor. A identificação de compostos desconhecidos, combinando dados de massas moleculares exatas com os espectros de íons produto obtidos se torna, então, possível. Isto se aplica especialmente para séries homólogas de compostos cuja relação estrutura-fragmentação é previamente conhecida (CROTTI et al., 2005; CROTTI et al., 2006b; NIESSEN, 2000). Assim, certos aspectos dos analisadores de massas, como a capacidade de realizar experimentos de EM<sup>n</sup> (múltiplos estágios de isolamento do íon precursor e fragmentação por CID) e a capacidade de fornecer espectros em alta resolução e medição de massas acuradas são críticos para estudos com CLAE-EM e CLAE-EM/EM.

#### 1.5. A espécie Lychnophora ericoides Mart.

Uma das maiores e mais fascinantes famílias dentre as chamadas plantas superiores (Angiospermae) é a Asteraceae, face ao número elevado de espécies, diversidade morfológica, riqueza de metabólitos secundários, atividade farmacológica de algumas plantas e de substâncias delas extraídas e utilidade para o ser humano (BREMER, 1994).

Esta família caracteriza-se quimicamente pela elevada capacidade de biossintetizar metabólitos secundários com grande diversidade estrutural, havendo predominância de poliacetilenos, flavonóides, cumarinas e terpenóides (HEYWOOD

et al., 1977; ZDERO; BOHLMANN, 1990). Dentre os últimos, devido às diferentes atividades biológicas, destacam-se as lactonas sesquiterpênicas (LST), substâncias presentes em quase todas as tribos (PICMAN, 1986; RODRIGUEZ et al., 1976; SCHMIDT, 1999).

Dentro de Asteraceae há um particular interesse fitoquímico pela tribo Vernonieae, pois o Brasil, onde é representada por cerca de 40 gêneros e 450 espécies, é reconhecido como um de seus principais centros de ocorrência (SEMIR, 1991).

Lychnophorinae, subtribo pertencente à tribo Vernonieae, destaca-se por sua distribuição restrita ao Brasil. Esta subtribo compreende 9 gêneros e 81 espécies, tendo como metabólitos secundários característicos LST do tipo furanoeliangolido (BORELLA et al., 1998; ROBINSON, 1999).

Espécies do gênero *Lychnophora*, classificadas nessa subtribo, destacam-se por estarem entre as plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina popular brasileira, ao lado da carqueja (*Baccharis trimera*), do guaco (*Mikania glomerata*) e do boldo brasileiro (*Vernonia condensata*), por exemplo.

Este gênero apresenta espécies com um microendemismo bastante pronunciado, ocorrendo em regiões elevadas e tendo distribuição restrita aos complexos rupestres de quartzito da Bahia, Goiás, Tocantins e Minas Gerais (ROBINSON, 1999; SEMIR, 1991). Desde a sua descrição por Martius em 1822 (publicado em 1873), o gênero vem sofrendo várias alterações, principalmente no que se refere ao número de espécies (COILE; JONES, 1981; ROBINSON, 1999; SEMIR, 1991). Observa-se, portanto, que a situação deste gênero em relação à taxonomia ainda é complexa, devendo-se salientar que estudos fitoquímicos envolvendo outras de suas espécies poderão contribuir para o estudo quimiotaxonômico do mesmo.

Entre as 14 espécies de *Lychnophora*, considerando-se as reduções por sinonímias estabelecidas por Robinson (1999), que foram objeto de algum tipo de estudo fitoquímico observou-se uma ampla ocorrência de LST, sendo considerados como metabólitos secundários característicos do gênero as do tipo furanoeliangolido (subdivididas entre goyazensolidos e eremantolidos) (BORELLA et al. 1998; SAKAMOTO et al., 2003; SARGENTI; VICHNEWSKI, 2000).

A literatura registra uma série de atividades biológicas de espécies de *Lychnophora*, tais como tripanocida [*L. granmogolense*, *L. passerina*, *L. vilosissima*, *L. pohlii*, *L. salicifolia*, *L. staavioides* (CHIARI et al., 1991; CHIARI et al., 1996; GRAEL et al., 2000; GRAEL et al., 2005; JORDÃO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 1996; TAKEARA et al., 2003)], antiinflamatória [*L. ericoides* (GOBBO-NETO et al., 2005)], analgésica [*L. ericoides* (CERQUEIRA et al., 1987; SANTOS et al., 2005)], antibacteriana e antifúngica [*L. salicifolia* (JORDÃO et al., 1997; MIGUEL et al., 1996)] e moluscida [*L. brunioides* (BAZON et al., 1997)]

Embora espécies do gênero *Lychnophora* não sejam utilizadas na produção de medicamentos, algumas delas são freqüentemente empregadas na medicina popular, conforme já mencionado. Destas, a espécie *L. ericoides* é a mais utilizada, sendo extraída em larga escala de seu habitat natural, o que, juntamente com a rápida destruição do cerrado, levou-a a constar na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (IBAMA 1992; Sociedade Botânica do Brasil, 1992). Hidrolatos (**Figura 2**) e o pó das folhas, bem como o pó das raízes de espécies de *Lychnophora*, conhecidas como "falsas arnicas", são utilizados, na medicina popular, como antiinflamatório, analgésico, antimicrobiano e cicatrizante (BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; CERQUEIRA et al., 1987;

SAKAMOTO et al., 2003). Neste sentido, a própria população que a utiliza relata diferenças na atividade do hidrolato obtido a partir de plantas coletadas em diferentes épocas do ano, indicando como melhor época para a coleta o período de florada. Além disso, em várias regiões de ocorrência, esta planta é utilizada como aromatizante para cachaça, sendo que para esta finalidade ramos da planta são colocados para macerar no interior das garrafas da bebida (**Figura 2**).



**Figura 2.** Hidrolato (foto cedida por N.P. Lopes) e cachaça aromatizada com ramos de *Lychnophora sp.*, utilizados popularmente.

*L. ericoides* (**Figura 3**) possui grande polimorfismo, podendo ser facilmente confundida com outras espécies do mesmo gênero, principalmente *L. pinaster* e *L. pseudovilosissima*. Cresce em locais xéricos, como campos pedregosos a arenosos-graminosos, ou entre serrotes (SEMIR, 1991).

A investigação fitoquímica desta espécie foi direcionada principalmente para os constituintes de polaridade média. Estes estudos levaram ao isolamento de esteróides, triterpenos, flavonóides e LST das partes aéreas e lignanas das raízes (BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; SAKAMOTO et al., 2003; SARGENTI; VICHNEWSKI, 2000).



Figura 3. Indivíduo adulto de L. ericoides em seu habitat.

As LST goyazensolido (**Figura 4**; estrutura 5) e centraterina (**Figura 4**; estrutura 7), isoladas das folhas, apresentam atividade antiinflamatória *in vitro* através da inibição do mediador central da inflamação NF- $\kappa$ B (LYSS et al., 1998; RÜNGELER et al., 1999). Várias atividades bológicas têm sido atribuídas a esta classe de compostos (PICMAN, 1986; RODRIGUEZ et al., 1976; RÜNGELER et al., 1999; SCHMIDT, 1999). Algumas destas atividades, como a antiinflamatória, analgésica e citotóxica, têm sido relacionadas ao grupo funcional  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ , $\beta$ insaturado, que pode atuar como um grupo aceptor em reações de adição do tipo Michael com grupos sulfidrila de biomoléculas, levando à inativação inespecífica de enzimas funcionalmente essenciais (RÜNGELER et al., 1999). Um estudo mais detalhado empregando neutrófilos mostrou que as LST do tipo goyazensolido ligamse à glutationa, e por isso podem não estar disponíveis em quantidade suficiente para a ação antiinflamatória *in vivo*, resultando no aumento do processo oxidativo celular (BRIGADÃO, 2004).

Entre as substâncias de polaridade média das raízes foi verificada a atividade analgésica das lignanas cubebina e metil-cubebina, sendo que a primeira apresentou-se mais ativa (BORSATO et al., 2000).

Recente estudo fitoquímico realizado com folhas previamente lavadas para retirada de LST presentes na superfície foliar levou ao isolamento de ácidos cafeoilquínicos (**Figura 4**; estruturas 39 a 41), glicosídeos (**Figura 4**; estruturas 37 e 38) e flavonóides, entre os quais duas flavonas di-C-glicosiladas (**Figura 4**; estruturas 28 e 29) (GOBBO-NETO, 2002; GOBBO-NETO et al., 2005). Este estudo foi iniciado devido à ação antiinflamatória *in vivo* deste extrato, enquanto que o estudo realizado com a fração polar do extrato das raízes foi estimulado pela ação analgésica também *in vivo*. O fracionamento do extrato polar das raízes levou ao

isolamento de uma saponina e dos mesmos derivados cafeoilquínicos (SANTOS, 2002; SANTOS et al., 2005). Entre as substâncias isoladas nestes dois estudos, destacam-se os ácidos cafeoilquínicos, compostos amplamente estudados por suas atividades biológicas [antiinflamatória, analgésica e antioxidante, entre outras (BASNET et al., 1996; CAPASSO et al., 1998; MARUTA et al., 1995; PELUSO et al., 1995; RASTRELLI et al., 1998; SANTOS, 2002; SANTOS et al., 2005; SCHOLZ et al., 1993; VITURRO et al., 1999)] e a flavona di-*C*-glicosídica vicenina-2 (**Figura 4**; estrutura 28) que se mostrou ativa em ensaios de edema de pata em ratos (GOBBO-NETO, 2002; GOBBO-NETO et al., 2005).
**Tabela 1.** Metabólitos secundários isolados de *L. ericoides* e seus extratos de origem.

Substância	Tipo de esqueleto	Extrato de origem	Referência	Estrutura química (Figura 4)			
LACTONAS SESQ	LACTONAS SESQUITERPÊNICAS						
centraterina	furanoeliangolido	partes aéreas	1, 2	7			
goyazensolido	furanoeliangolido	cultura celular, lavagem foliar	2, 4	5			
lychnopholido	furanoeliangolido	partes aéreas, lavagem foliar	2, 3	8			
4,5-diidro-15β-desoxigoyazensolido	furanoeliangolido	lavagem foliar	2	2			
4,5-diidro-15 $\alpha$ -desoxigoyazensolido	furanoeliangolido	lavagem foliar	2	1			
15-desoxigoyazensolido	furanoeliangolido	partes aéreas	3	6			
2',3'-diidro-15-desoxigoyazensolido	furanoeliangolido	partes aéreas	3	9			
4,5-diidro-15 $\alpha$ -lychnopholido	furanoeliangolido	lavagem foliar	2	3			
1-oxo-3,10-epóxi-8-angeloiloxigermacra- 2-en-6(12)-olido	furanoeliangolido	lavagem foliar	2	4			
eremantolido A	eremantolido	partes aéreas, lavagem foliar	1, 2	17			
eremantolido C	eremantolido	lavagem foliar	2	16			

Substância	Tipo de esqueleto	Extrato de origem	Referência	Estrutura química (Figura 4)
4,5-diidro-15α-eremantolido A	eremantolido	partes aéreas	1, 3	10
$16\alpha$ -(1-metilprop-1Z-enil)-eremantolido	eremantolido	lavagem foliar	2	18
15-hidróxi-16α-(1-metilprop-1Z-enil)- eremantolido	eremantolido	lavagem foliar	2	19
4,5-diidro-15α-eremantolido C	eremantolido	partes aéreas, lavagem foliar	1, 2	12
4,5-diidro-15β-eremantolido C	eremantolido	partes aéreas, lavagem foliar	1, 2	11
4,5-diidro-15 $\alpha$ -[16 $\alpha$ -(1-metilprop-1Z-enil)]- eremantolido	eremantolido	lavagem foliar	2	13
4,5-diidro-15 $\beta$ -[16 $\alpha$ -(1-metilprop-1Z-enil)]- eremantolido	eremantolido	lavagem foliar	2	14
1-oxo-3(10),8(16)-diepóxi-16-metilprop-1Z-enil- 16-metoxigermacra-2-en-6(12)-olido	eremantolido	lavagem foliar	2	15

## TRITERPENOS

friedelina	lupano	partes aéreas	1	
friedelanol	lupano	partes aéreas	1	
lupeol	lupano	partes aéreas	1	

Substância	Tipo de esqueleto	Extrato de origem	Referência	Estrutura química (Figura 4)
chikusetsusaponina IV-A	saponina triterpênica	fração polar das raízes	fração polar das raízes 6	
ESTER	ÓIDE			
estigmasterol	estigmastano	partes aéreas	1	
FLAVON	ÓIDES			
galangina	flavonol	partes aéreas	3	22
quercetina	flavonol	partes aéreas 1		21
7,4'-diidroxiflavonol	flavonol	partes aéreas	3	20
5,7-diidróxi-3-metoxiflavonol	flavonol	partes aéreas	3	23
pinobanksina	diidroflavonol	partes aéreas, lavagem foliar	1, 2, 3, 9	32
7,4'-diidroxidiidroflavonol	diidroflavonol	partes aéreas	3	31
5,7,4'-triidroxidiidroflavonol	diidroflavonol	partes aéreas	3	30
pinocembrina	flavanona	lavagem foliar, folhas	2, 9	35
pinostrobina	flavanona	lavagem foliar, folhas	2, 9	36

Substância	Tipo de esqueleto	Extrato de origem	Referência	Estrutura química (Figura 4)
5,7-diidróxi-4'-hidroxiflavanona	flavanona	partes aéreas	3	33
7-hidróxi-4'-metoxiflavanona	flavanona	partes aéreas	3	34
acacetina	flavona	partes aéreas	3	27
apigenina	flavona	fração polar das folhas	9	26
luteolina	flavona	partes aéreas	1, 9	25
5,7-diidroxiflavona	flavona	partes aéreas	3	24
vicenina-2	di-C-glicosilflavona	fração polar das folhas	8	28
6,8-di-C-β-glicopiranosil-crisina	di-C-glicosilflavona	fração polar das folhas	8	29

### LIGNANAS

hinoquinina	dibenzilbutirolactona	raízes	7	
desoxipodorizina	dibenzilbutirolactona	raízes	7	
3,4-bis-(3,4,5-trimetoxifenil)- metiltetrohidrofuran-2-ona	dibenzilbutirolactona	raízes	7	
α-cubebina	dibenzilbutirolactol	raízes	7	
β-cubebina	dibenzilbutirolactol	raízes	7	

Substância	Tipo de esqueleto	Extrato de origem	Referência	Estrutura química (Figura 4)
α-metilcubebina	dibenzilbutirolactol	raízes	7	
β-metilcubebina	dibenzilbutirolactol	raízes	7	
α-metilclusina	dibenzilbutirolactol	raízes	7	
β-metilclusina	dibenzilbutirolactol	raízes	7	
diidrocubebina	dibenzilbutanol	raízes	7	

## ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	fração polar das raízes, fração polar das folhas	5, 9	39
ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquínico	fração polar das raízes, fração polar das folhas	5, 9	40
ácido 3,4,5-tri-O-E-cafeoilquínico	fração polar das raízes, fração polar das folhas	5, 9	41

### OUTROS GLICOSÍDEOS

icarisídeo F2	fração polar das folhas	9	38
dendrantemosídeo A	fração polar das folhas	9	37

Referências: 1: Borella et al., 1998; 2: Sakamoto et al., 2003; 3: Sargenti; Vichnewski, 2000; 4: Santos et al., 2004; 5: Santos et al., 2005;

6: Santos, 2002; 7: Borsato et al., 2000; 8: Gobbo-Neto et al., 2005; 9: Gobbo-Neto, 2002.



**Figura 4.** Estruturas químicas das substâncias isoladas a partir de extratos de média e alta polaridade das partes aéreas de *L. ericoides*.

## 2.OBJETIVOS

Como objetivos deste estudo foram propostos:

- a identificação, por meio de CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM de metabólitos secundários de média a alta polaridade majoritários nas folhas de cinco populações de *L. ericoides*.
- o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica por CLAE-DAD para verificar a existência ou ausência de variações sazonal, circadiana, intrae interpopulacional nos teores dos metabólitos secundários majoritários.

# **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1. Especificações de materiais e instrumentos

#### 3.1.1. Solventes empregados

Como solventes para preparação das amostras e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), hexano e ácido acético (HAc) grau HPLC (todos da marca J.T. Baker), além de H<sub>2</sub>O deionizada (18m $\Omega$ ; Milli-Q, Millipore), todos filtrados e posteriormente degaseificados com auxílio de vácuo e banho de ultra-som.

#### 3.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O desenvolvimento/validação do método e as análises de variações metabólicas foram realizados em um sistema CLAE acoplado a um detector na região de UV com arranjo de diodos (sistema CLAE-DAD). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-6AD, equipado com um detector UV-DAD modelo SPD-M10Avp e injetor automático modelo SIL-10AF, controlados pelo software CLASS-VP 6.14.

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

Para ambos os sistemas foi utilizada uma mesma coluna Hypersil LC-18 (5μm, 4,6/250mm; Sigma-Aldrich), acoplada a uma pré-coluna de 1cm, de material equivalente.

#### 3.2. Demarcação, coleta e armazenamento de L. ericoides

Foram identificadas e demarcadas cinco populações de *L. ericoides*: uma localizada no município de Ibiraci – MG (população 1 - S 20°20,046' ; W 047°08,229' – 1090m altitude), uma no município de Delfinópolis - MG (população 2 - S 20°20,550' ; W 046°47,638' – 870m altitude), uma no município de São João Batista do Glória-MG (população 3 - S 20°37,540' ; W 046°19,391' – 900m altitude) e duas no município de Furnas-MG [(população 4 - S 20°42,107' ; W 046°17,336' – 1090m altitude) e (população 5 - S 20°38,316' ; W 046°15,318' – 1010m altitude)]. Em cada população foram escolhidos aleatoriamente dez indivíduos adultos; cada indivíduo recebeu um código composto pelo número da população seguido por um número de I a X e foi devidamente marcado com placa de alumínio.

De cada planta marcada, pelo período de dois anos (04/2000 a 04/2002), foi coletado mensalmente, em torno das 12:00 horas (±30 min), um ramo que foi acondicionado em saco de papel, o qual foi devidamente marcado com o código do indivíduo (bem como com a data e horário da coleta) e levado ao laboratório para secagem e armazenamento. Em intervalos de 3 meses, para o estudo de variação circadiana, também foram coletados ramos dos indivíduos das populações 2 e 3 nos seguintes horários: 12:00, 16.00, 21:00, 2:00 e 7:00 horas. No decorrer das coletas, a época de florada de cada indivíduo e possíveis alterações físicas verificadas nas folhas foram anotadas. As amostras coletadas foram secas em estufas de ar circulante a 45°C por 48h e estocados em freezer até o momento do processamento para análise.

Para análise de variações intra-individuais ocasionalmente ramos com flores e alguns ramos adicionais foram coletados juntamente com as coletas padrões de um ramo por indivíduo. Posteriormente, alguns destes ramos com flores e ramos adicionais (para análise de variações entre os ramos de um mesmo indivíduo) foram selecionados aleatoriamente para análises comparativas. Visando detectar se haveriam variações em relação às amostras que foram submetidas a este procedimento padrão de coleta (coletadas e secas somente quando trazidas ao laboratório), foi também realizada a coleta de amostras que foram submetidas a congelamento imediato, utilizando-se gelo seco, para depois serem trazidas ao laboratório, secas e submetidas ao procedimento padrão de análise.

#### 3.3. Preparo, extração e análise das amostras

Todos os procedimentos e testes para desenvolvimento das metodologias de extração e análise foram conduzidos e otimizados no sistema CLAE-DAD, utilizandose 3 diferentes amostras que apresentaram perfis cromatográficos distintos entre si nas análises prévias, provenientes dos indivíduos X da população 1 (código 1-X), I da população 4 (código 4-I) e VI da população 5 (código 5-VI).

#### 3.3.1. Preparo e extração

O material a ser analisado foi retirado do freezer, seco novamente em estufa a 40°C por 24h e então as folhas foram retiradas e processadas em moinho analítico. Em frascos de vidro foram então pesada alíquotas de 20mg das folhas moídas e a este material vegetal foram adicionados 3mL de MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 contendo o padrão interno cumarina na concentração de 15µg/mL. O solvente extrator foi preparado a partir da diluição, com MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1, de uma solução estoque de cumarina a 0,9mg/mL em MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1, a qual foi mantida em freezer.

Os frascos de vidro foram então tampados e o material foi extraído em banho de ultra-som por 10 minutos. Alíquotas de  $500 \mu$ L dos extratos assim obtidos foram

retiradas com auxílio de uma seringa e acondicionadas em frascos do tipo eppendorf (1,5mL), onde também foram adicionados igual volume de hexano. Estes frascos então foram agitados em agitador de tubos do tipo vortex por alguns segundos e depois centrifugados a 6000rpm em microcentrífuga por 10 minutos.

Alíquotas de  $300\mu$ L da fase hidro-alcoólica foram então retiradas com auxílio de uma seringa e filtradas através de membrana de acetato de celulose (0,45 $\mu$ m) diretamente para frascos do auto-injetor do sistema de CLAE-DAD, os quais foram então tampados com septo faceado com teflon.

#### 3.3.2. Análises por CLAE-DAD

Alíquotas de  $20\mu$ L das amostras foram injetadas, via auto-injetor, na coluna cromatográfica utilizando-se fluxo de 1,6mL/min e como fase-móvel ACN/MeOH/HAc 88:10:2 (bomba B) e H<sub>2</sub>O/HAc 98:2 (bomba A), no seguinte gradiente descrito na **Tabela 2**. Os cromatogramas foram registrados em dois comprimentos de onda: 270 e 325nm.

Tempo (min)	Porcentagem de B (ACN/MeOH/HAc 88:10:2)
0,01	8
35	20
65	28
95	37
135	55
145	100
150	100
155	8
160	8

Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado para as análises por CLAE.

#### 3.3.3. Análises por CLAE-DAD-EM e CLAE DAD-EM/EM

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, isto é, gerando espectros de íons produto a partir da fragmentação de íons precursores selecionados induzida em célula de colisão) foram realizadas utilizando-se as mesmas condições cromatográficas que para CLAE-DAD. As amostras a serem analisadas também foram preparadas do mesmo modo, porém as extrações foram realizadas partindo-se de uma alíquota de 50mg de folhas pulverizadas e mesmo volume de solvente extrator (3mL).

O eluente da coluna foi dividido por um *spliter* em uma proporção de 3:1, sendo o fluxo maior direcionado ao DAD e o restante ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas na região de UV gerados pelo DAD foram registrados em 270 e 325nm. Os cromatogramas gerados por EM foram registrados na região entre *m/z* 50 e *m/z* 1000 e os parâmetros do espectrômetro de massas listados a seguir foram mantidos os mesmos em todas as análises: 1000 *scans* por segundo; intervalo entre espectros: 2 segundos; fluxo do gás de secagem: 5,0L/min; temperatura do gás de secagem: 180°C; pressão do gás de nebulização: 4 bar. Para a obtenção de massas moleculares acuradas em alta resolução, ao final das análises cromatográficas foi injetada uma solução a 20mM de NaOH. Os espectros de massas obtidos foram então calibrados pelas massas moleculares exatas calculadas dos íons *clusters* do acetato de sódio formado entre o Na e o ácido acético da fase móvel.

Após as análises de CLAE-DAD-EM, os tempos de retenção e m/z obtidos para cada pico dos cromatogramas gerados foram utilizados para determinar os parâmetros para a posterior análise por CLAE-DAD-EM/EM. Ou seja, para a obtenção de espectros de íons produto (EM/EM) a partir dos íons precursores desejados foi informado ao software do espectrômetro de massas o m/z de cada íon precursor que deveria ser fragmentado na célula de colisão e seu respectivo tempo de retenção. A dissociação induzida por colisão (fragmentação) foi realizada utilizando-se N<sub>2</sub> como gás de colisão, e a energia de colisão variou entre 8 e 25eV.

#### 3.3.4. Identificação dos picos cromatográficos

Os picos cromatográficos foram identificados com base em seus espectros no UV, massa acurada obtida para os íons precursores (molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> e/ou molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup>) em alta resolução, espectros de íons produto gerados por dissociação induzida por colisão em modo EM/EM e tempos de retenção no sistema utilizado. Estes dados foram gerados a partir de análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, tanto no modo de ionização positiva quanto

negativa, para amostras de *L. ericoides* obtidas de um indivíduo proveniente de cada uma das cinco populações estudadas (1-III, 2-IV, 3-VI, 4-I e 5-VIII).

A utilização de cada um dos tipos de dados obtidos e o procedimento para a identificação dos picos ocorreu conforme a necessidade, as informações disponíveis na literatura e a disponibilidade de padrões no laboratório, e foi conduzida principalmente com base nos resultados de estudos fitoquímicos anteriores de *L. ericoides* e outras espécies do gênero *Lychnophora*.

Deste modo, alguns picos foram identificados simplesmente por comparação de tempos de retenção e espectros de UV com os de padrões, e posterior confirmação pelas massas moleculares acuradas obtidas. Outros só puderam ter sua identidade definida após análise e comparação dos padrões de fragmentação observados nos espectros de íons produto com aqueles já relatados na literatura ou obtidos para os picos já identificados.

Assim, as vias/mecanismos de fragmentação utilizadas como ferramenta para a identificação e/ou confirmação dos picos cromatográficos com base nos espectros de íons produto obtidos foram os seguintes: para ácidos clorogênicos aqueles descritos por Clifford et al. (2003, 2005, 2006); para flavonóides os descritos por Becchi e Fraisse (1989), Caristi et al. (2003), Cuyckens e Claeys (2004), Cuyckens et al. (2000), Fabre et al. (2001), Gattuso et al. (2006), Stevens et al. (1999) e Zhang e Brodbelt (2003); e para as LST do tipo goyazensolido os dados de Crotti et al., (2005). Para as LST do tipo eremantolido, devido à inexistência de estudos, quando necessário os espectros de íons produto foram comparados com espectros obtidos para padrões disponíveis no laboratório.

Já a identificação e/ou confirmação de classes de metabólitos secundários através dos espectros obtidos na região do UV foi realizada principalmente por

52

comparação com espectros de padrões ou daquelas substâncias já identificadas nos próprios extratos. No caso dos flavonóides, em que os espectros podem revelar o tipo de flavonóide (por exemplo: flavona, flavonol, flavanona, diidroflavonol, chalcona) e às vezes até dar indícios sobre o padrão de substituição, também foram utilizados os dados e discussões publicados por Gattuso et al. (2006), Markham (1982) e Markham e Mabry (1975).

#### 3.3.5. Substâncias padrões utilizadas

As substâncias padrões utilizadas foram obtidas a partir das seguintes fontes:

- ácido 5-O-E-cafeoilquínico: comprada da empresa Acros.
- ácidos 3,5- e 4,5-O-E-dicafeoilquínico e 3,4,5-tri-O-E-cafeoilquínico: isoladas a partir de *L. ericoides* por Gobbo-Neto (2002).
- pinocembrina; pinostrobina; pinobanksina; vicenina-2 (6,8-di-*C*-β-glicosilapigenina) e 6,8-di-*C*-β-glicosilcrisina: isoladas a partir de *L. ericoides* por Gobbo-Neto (2002).
- 3-O-acetilpinobanksina e 3-O-metilquercetina: isoladas a partir de *L. staavioides* por Takeara et al. (2003).
- tilirosídeo [3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)-β-glicosilkaempferol]: isolada a partir de L.
   passerina por Chicaro et al. (2004).
- 3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)-β-glicosilisoramnetina: isolada a partir de L.pohlii por Grael et al. (2005).
- 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido; 4,5-diidrolychnopholido; tiglato de zexbrevanolido; lychnopholido; 15-hidróxi-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)- eremantolido; 4,5-diidroeremantolido C; 4,5-diidro-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-

eremantolido e 16 $\alpha$ -(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido: isoladas a partir de *L. ericoides* por Sakamoto et al. (2003).

• 15-hidroxieremantolido C: isolada a partir de *L. rupestris* por Cunha et al. (1995).

#### 3.3.6. Análise das amostras

Visto que seria inviável a construção de curvas de calibração para todos os picos, todas as comparações entre conteúdos de metabólitos secundários foram realizadas com base nas áreas relativas (área do pico / área do p.i.) obtidas para cada pico, as quais são reflexo das respectivas concentrações.

Para as análises populacionais, amostras de cada indivíduo coletadas no mês de janeiro de 2002 foram analisadas pelo método desenvolvido. Foi então construída uma planilha com as áreas relativas obtidas para cada metabólito de cada indivíduo. Finalmente, os dados da planilha obtida foram utilizados na construção de gráficos com as médias populacionais de cada metabólito, ou seja, as médias aritméticas obtidas a partir da somatória das áreas relativas de um dado metabólito em todos os indivíduos pertencentes a uma determinada população.

Para proceder as análises estatísticas de agrupamento por semelhança (HCA - Hyerarchical Cluster Analysis), foi realizada uma padronização dos valores desta mesma planilha, visando padronizar e dar peso igual a todos os metabólitos. Assim, para um pico ausente atribuiu-se o valor 0, para picos majoritários atribuiu-se 10 e para picos observados como traços o valor 5. Esta nova tabela foi então submetida a um agrupamento dos casos (indivíduos de *L. ericoides*) em função das variáveis (concentração dos metabólitos) utilizando o método de Ward como método de ligação e como medida de distância de ligação a distância euclideana quadrada. As análises foram conduzidas no software Statistica 7.0.

Para análise da sazonalidade na concentração de metabólitos, amostras mensais coletadas dos indivíduos 1-III, 2-IV, 3-VI, 4-I e 5-VIII pelo período de 24 meses e dos indivíduos 1-X e 2-I por 15 meses foram analisadas pelo método desenvolvido em CLAE-DAD. Gráficos de variação mensal das áreas relativas dos metabólitos majoritários, agrupados por classe (flavonóides, ácidos cafeoilquínicos e LST), bem como com as somatórias das áreas relativas dos metabólitos de cada classe, foram construídos para cada indivíduo. Na somatória dos flavonóides foram incluídas somente as agliconas, sendo que as *C*-glicosilflavonas e cumaroilglicosil-flavonóis foram considerados como dois outros grupos.

Similarmente, para análise dos ritmos circadianos na concentração de metabólitos, amostras trimestrais coletadas dos indivíduos 2-IV e 3-VI pelo período de 15 meses, conforme descrito no tópico 3.2., foram analisadas pelo método desenvolvido em CLAE-DAD. Foram construídos, para cada indivíduo, gráficos da variação circadiana (cinco horários/dia) dos metabólitos majoritários agrupados por classe (flavonóides, ácidos cafeoilquínicos e LST), bem como das somatórias dos metabólitos de cada classe, a cada período de três meses.

Para as variações intra-individuais foram construídos gráficos das variações médias (média aritmética entre todos os indíviduos analisados) e máxima observadas para cada metabólito entre as duas situações em comparação, ou seja, entre folhas novas e folhas velhas; ramos com flores e ramos sem flores; e dois ramos de um mesmo indivíduo coletados no mesmo momento.

#### 3.4. Validação da metodologia de extração e análise

Para validação da metodologia de extração e análise foram levados em conta os parâmetros, métodos e definições apontados por Causon (1997), Leite (2002), Ribani et al. (2004) e pela ANVISA (ANVISA, 2003).

#### 3.4.1. Curvas de calibração

Inicialmente, de acordo com a disponibilidade de padrões, foram construídas curvas de calibração para 11 das substâncias identificadas nas amostras de *L. ericoides*: vicenina-2, 6,8-di-*C*- $\beta$ -glicosilcrisina, ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico, centraterina, 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido, 4,5-diidroeremantolido C, 4,5-diidrolychnopholido, 16 $\alpha$ -(1'-metilprop-1'*Z*-enil)-eremantolido, lychnopholido, pinocembrina e pinostrobina.

O comprimento de onda para a construção de cada curva foi decidido com base nos espectros de absorção no UV. Assim, as curvas para as substâncias vicenina-2 e ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico foram construídas com base nas áreas dos respectivos picos a 325nm, e as demais substâncias a 270nm.

Para a construção das curvas de calibração, procedeu-se da seguinte forma: 5mg de cada padrão foram pesados em um balão volumétrico de 5mL. O volume foi completado com MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 contendo o p.i. cumarina a  $15\mu$ g/mL, obtendo-se uma solução 1mg/mL de padrões das substâncias adicionadas de p.i. A partir desta solução, com auxílio de pipetadores automáticos, foram realizadas diluições seriadas com solução MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 contendo o p.i. cumarina a  $15\mu$ g/mL, obtendo-se assim soluções nas concentrações de 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 e 0,2 $\mu$ g/mL, além da solução original a 1mg/mL. Cada amostra foi acondicionada em um frasco do auto-injetor, o qual foi então tampado com septo faceado com teflon, e analisada em triplicata pela metodologia descrita.

Os cromatogramas obtidos foram analisados, integrados e a partir dos dados foram calculadas, para cada concentração injetada, as médias das razões entre as áreas de cada substância e a área do p.i. Estes dados foram inicialmente utilizados para a determinação do intervalo de linearidade de resposta do detector. Para isso, foram construídos gráficos das respostas relativas [isto é, as respostas obtidas (área da substância / área do p.i.) divididas pelas respectivas concentrações]) *versus* as concentrações em escala logarítmica. A resposta do método foi considerada linear em um intervalo de variação de ±5% da linha média obtida pela construção do gráfico. As concentrações dentro da faixa de linearidade obtidas para cada substância foram então utilizadas para a construção das curvas de calibração (área do analito / área do p.i. *versus* concentrações do analito) e equações de regressão linear das retas.

#### 3.4.2. Sensibilidade do método analítico

Como parâmetros para determinar a sensibilidade do método foram utilizados os limites de detecção e quantificação. Para isso, foram utilizados os mesmos dados obtidos quando das análises em diferentes concentrações para construção das curvas de linearidade e calibração (tópico *3.4.1.*). O limite de detecção mínimo foi considerado como a menor concentração das substâncias com resposta igual a pelo menos 3 vezes o ruído da linha de base, e o máximo foi determinado em função da capacidade máxima de resposta do detector. O limite de quantificação mínimo foi estabelecido como a menor concentração das substâncias que poderia ser quantificada com erro inferior a 10%, e o máximo como a maior concentração da amostra que não ultrapassasse o limite máximo de detecção e que estivesse na faixa de linearidade de resposta da substância.

#### 3.4.3. Precisão e exatidão

Para determinar a repetibilidade/precisão do método (isto é, a concordância entre replicatas) foram calculados, para cada substância padrão, os coeficientes de variação percentual (relação percentual da estimativa do desvio padrão com a média dos valores obtidos, isto é: desvio padrão x 100 / concentração média nas replicatas) para 3 análises consecutivas (precisão intra-ensaio) e para 5 análises em dias diferentes (a cada 7 dias; precisão interensaio) de uma mesma amostra: uma mistura dos padrões a  $20\mu$ g/mL. Para evitar uma possível alteração das substâncias a solução de padrões foi mantida em freezer entre as injeções.

Para o cálculo da exatidão (concordância entre a média dos valores obtidos em 3 análises e o real, expresso em porcentagem), foram utilizados os mesmos dados já obtidos para o cálculo da precisão intra-ensaio. Os valores medidos deveriam, idealmente, estar na faixa entre ±15% do valor real.

#### 3.4.4. Extração

Amostras provenientes do mesmo material vegetal que foi utilizado para desenvolver e otimizar a metodologia (indivíduos 1-X, 4-I e 5-VI) foram submetidas a quatro extrações consecutivas utilizando o método de extração descrito. Entre cada extração o material era filtrado através de papel de filtro para remoção de todo extrato obtido. Os extratos obtidos foram analisados na metodologia descrita em duplicata e as áreas médias dos picos das substâncias majoritárias foram utilizadas para determinar a contribuição de cada extração individual em relação ao total

(somatória das 4 extrações). Este procedimento também foi realizado com diferentes proporções de solvente extrator, com material do indivíduo 1-X, para determinação da melhor mistura de solventes para extração.

#### 3.4.5. Fator de recuperação

Para a determinação dos fatores de recuperação global foram utilizadas, como matriz, folhas de L. ericoides pulverizadas. Este material foi submetido a extração exaustiva (três extrações com MeOH 100% seguidas por três extrações com MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1, todas por 5min em banho de ultra-som) para ficar completamente livre de metabólitos secundários. O material vegetal então foi seco em estufa a 40°C e alíquotas de 20mg foram pesadas em quatro frascos de vidro. Em três dos frascos foram adicionadas massas conhecidas (30, 150 e  $300\mu g$ ) dos mesmos padrões utilizados para construção de curvas de calibração, sendo o material do quarto frasco utilizado como controle. Isto foi realizado através da adição de diferentes volumes de uma solução metanólica de uma mistura dos padrões. O material vegetal adicionado das substâncias foi então seco em estufa a 40°C por 24h e, depois de frio, submetido ao procedimento de extração e análise (em triplicata) descrito. As médias das razões entre as áreas dos picos das substâncias e área do p.i. foram utilizadas para calcular a porcentagem de recuperação global para cada padrão em cada concentração, por meio da comparação com as respostas (área substância / área p.i.) obtidas para uma solução dos padrões nas mesmas concentrações em que foram adicionadas a matriz.

#### 3.4.6. Estabilidade das amostras

Para a determinação da estabilidade dos constituintes das amostras após o preparo, foram comparados os dados de oito amostras (1-III, 1-X, 2-IV, 2-VI, 3-VI, L4-I, L4-III, 5-VIII) analisadas imediatamente após o preparo e após 15, 30, 45, 60, 75 e 250h. As médias das variações da área relativa observadas para cada pico foram utilizadas para a construção de gráficos de porcentagem de variação em função do tempo.

Para verificar a estabilidade das amostras vegetais armazenadas em freezer, as mesmas amostras vegetais acima foram novamente analisadas após 18 meses de estocagem.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1. Método de extração

O método de extração foi desenvolvido visando uma elevada taxa de extração de metabólitos secundários de polaridade média a alta, paralelamente ao método de análise para avaliar melhor esta capacidade de extração. Visando a determinação de uma metodologia que pudesse ser empregada na análise de todos os indivíduos, levando-se em conta a possível variabilidade química entre eles, ambos os métodos (extração e análise) foram desenvolvidos e otimizados utilizando-se 3 diferentes amostras que apresentaram perfis cromatográficos distintos entre si nas análises prévias, provenientes dos indivíduos X da população 1 (código 1-X), I da população 4 (código 4-I) e VI da população 5 (código 5-VI).

O solvente extrator foi definido como MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1, depois de testadas também as proporções de 7:3, 8:2 e MeOH 100%. Tendo em vista que o desejável é um método com uma só etapa de extração, esta escolha foi definida com base nas proporções relativas entre os picos detectados nos cromatogramas obtidos após quatro extrações consecutivas do mesmo material. As amostras extraídas com MeOH/H<sub>2</sub>O 8:2 e 7:3 não extraiam, na primeira extração, os metabólitos polares (como flavonóides glicosilados) e metabólitos mais apolares (como flavonóides e algumas lactonas sesquiterpênicas) na mesma proporção. A extração deficiente de metabólitos mais apolares proporcionada pelas misturas mais polares deve ser resultado de uma menor solubilidade, ou mesmo de uma possível precipitação parcial destes. Por outro lado, na extração com MeOH 100% ocorre o inverso, havendo uma maior extração de metabólitos mais apolares. Além disso, o uso de MeOH 100% dificulta o procedimento de limpeza da amostra para a injeção, a qual é realizada em parte pela partição líquido/líquido com hexano.

Também foram testadas várias proporções entre massa das folhas pulverizadas e volume de solvente extrator (10mg / 2mL; 15mg / 2mL; 30mg / 2mL; 20mg / 3mL), sendo que a melhor porcentagem de extração na primeira de quatro extrações consecutivas foi obtida com a proporção de 20mg de folhas pulverizadas extraídos com 3mL de MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1. Para exemplificar, a **Figura 5** mostra os cromatogramas obtidos em 270nm para as duas primeiras das quatro extrações consecutivas na proporção escolhida (20mg / 3mL) a partir de material do indivíduo 1-X.

Após o processo de preparação das amostras (extração e posterior limpeza do extrato por partição líquido/líquido com hexano), o método desenvolvido revelou uma porcentagem de extração em torno de 90%, na primeira extração, para todos os metabólitos analisados, não havendo diferenças marcantes entre a porcentagem de metabólitos polares ou apolares extraídos, conforme pode ser visto na **Tabela 3**. A porcentagem de extração obtida e, principalmente, a semelhança dos valores entre todos os metabólitos foram consideradas ótimas para os propósitos deste estudo.



Figura 5. Cromatogramas obtidos para as 2 primeiras extrações consecutivas das folhas pulverizadas do indivíduo 1-X, de acordo com a metodologia desenvolvida.

Tabela 3. Porcentagens de extração dos principais metabólitos majoritários obtidas na primeira de quatro extrações consecutivas do indivíduo 1-X de *L. ericoides*, utilizando a metodologia desenvolvida.

Número do pico	Comprimento de onda	Porcentagem relativa
cromatograneo		
4	325	86,3
7	325	90,1
9	270	91,2
11	325	89,7
21	270	91,5
32	270	89,1
34	270	90,9
35	270	88,8
36	270	87,8
37	270	89,2
39	270	89,1
40	325	91,0
42	270	92,4
45	325	93,5
47	270	92,1

\* a identificação dos picos cromatográficos consta no tópico 4.4.

#### 4.2. Método de análise

Para o desenvolvimento da metodologia analítica foram analisadas variações de vários fatores como colunas cromatográficas, fases-móveis, gradientes de eluição e fluxos da fase-móvel. Novamente, amostras provenientes dos indivíduos 1-X, 4-I e 5-VI foram utilizadas para o desenvolvimento e otimização.

Testes preliminares foram realizados com as colunas Spherisorb ODS 2 (Sigma-Aldrich), Supelcosil LC18 (Supelco) e Hypersil (Sigma-Aldrich). As colunas Spherisorb ODS 2 e Hypersil apresentaram perfis cromatográficos com resolução bem semelhantes nas condições analisadas, e foi então escolhida a coluna Hypersil para desenvolvimento do método.

Foram testadas fases-móveis compostas de ACN/H<sub>2</sub>O, MeOH/H<sub>2</sub>O, adicionadas ou não de HAc. Após muitos testes, conseguiu-se chegar a um gradiente de eluição utilizando ACN/2%HAc (bomba B) / H<sub>2</sub>O/2%HAc (bomba A), o qual resolvia grande parte dos picos. Este gradiente foi então otimizado através de rampas de gradientes de eluição intercaladas com intervalos de eluição isocrática e alterando-se o fluxo da fase-móvel. Foram testados fluxos de 0,8, 1,0, 1,2 e 1,6mL/min, sendo escolhido o último, porque, conforme esperado, resultava em melhor separação e picos mais estreitos. Finalmente, foi analisada a influência da adição de MeOH à fase-móvel, tendo sido testadas a adição de 5, 10, 20 e 30% de MeOH à fase B (ACN/2%HAc). Verificou-se que a adição de 10% MeOH melhorava a separação entre os picos de substâncias mais apolares, principalmente de LST, sem alterar a separação das substâncias mais polares. Assim, o melhor método de separação encontrado foi aquele descrito na metodologia (tópico 3.3.2.).

A adição de padrão interno (p.i.) se faz necessária para a correção de erros inerentes às etapas de preparo/extração da amostra, além de permitir correção nos tempos de retenção (t.r.) dos analitos. A utilização da razão entre a área do pico analisado possíveis erros е а área do p.i. corrige provenientes do processamento/análise da amostra, uma vez que o p.i. é adicionado no início do processo, juntamente com o solvente extrator. Do mesmo modo, utilizando a relação entre os t.r. do analito e do p.i. pode-se corrigir eventuais desvios dos t.r., o que é relativamente comum em sistemas de eluição com gradiente em análises longas.

A escolha do p.i. foi realizada com base em características como: estabilidade, simetria de seu pico no cromatograma, concentração necessária nos

comprimentos de onda utilizados (o que depende se sua absorção nestes comprimentos de onda), disponibilidade e a região do cromatograma onde seu pico elui, a qual deve ter uma linha de base bem linear e não apresentar outros picos muito próximos. Várias substâncias foram testadas para uso como p.i., e a que melhor atingiu as características desejáveis foi a cumarina. As outras substâncias testadas foram: metilnaftaleno, antraceno, ácido salicílico, benzofenona, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, rutina, vanilina, naftol, acetanilida, piperonal e lapachol.

A concentração do p.i. foi definida em 15µg/mL com base em sua absorção nos comprimentos de onda a serem utilizados e na intensidade dos picos majoritários nos cromatogramas obtidos para as amostras utilizadas no desenvolvimento do método, empregando o procedimento de extração e análise desenvolvidos.

#### 4.3. Curvas de calibração e validação da metodologia

A curva de calibração (ou curva analítica) é utilizada para a obtenção de uma relação entre a área do pico e a concentração do respectivo analito, permitindo sua quantificação. Curvas de calibração foram construídas para algumas das substâncias majoritárias identificadas, visando representar toda a variedade de classes de metabólitos secundários presentes em *L. ericoides* e, assim, garantindo que os resultados obtidos na validação para estas substâncias possam ser representativos do extrato como um todo. Conforme a metodologia descrita no tópico 3.4., foram construídas curvas de linearidade e calibração para duas flavonas di-*C*-glicosídicas (vicenina-2 e 6,8-di-*C*- $\beta$ -glicosilcrisina), um ácido clorogênico (ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico), seis lactonas sesquiterpênicas [centraterina, 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido, 4,5-diidroeremantolido C, 4,5-diidrolychnopholido, 16 $\alpha$ -(1'-

metilprop-1'*Z*-enil)-eremantolido e lychnopholido] e duas flavanonas (pinocembrina e pinostrobina). Todas as curvas foram construídas utilizando-se as respostas obtidas nas concentrações entre 2 e 200µg/mL, que foi intervalo de linearidade de resposta obtido pelos gráficos de linearidade. Os gráficos de linearidade e calibração obtidos, bem como as equações de regressão linear constam do **APÊNDICE A**.

Curvas de calibração para outros metabólitos podem ser adicionadas ao método posteriormente. Porém, deve-se salientar que a construção de curvas de calibração e a validação do método analítico para todos os metabólitos de interesse seria inviável, pois demandaria muito tempo de máguina, além de uma guantidade significativa de padrões puros destas substâncias. Por outro lado, é possível correlacionar a resposta de uma substância conhecida, ainda sem curva de calibração, com a de uma estruturalmente correlata com curva de calibração construída, o que permite estimar uma concentração média para a primeira. Este procedimento não fornece resultados precisos, mas pode levar a uma boa estimativa da concentração de substâncias cujas curvas de calibração não podem ser construídas devido à falta de padrões. Isto é útil para expressar resultados quantitativos de vários metabólitos com base em um com estrutura química básica bem semelhante; por exemplo: ácidos cafeoilquínicos totais expressos como concentração de ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico, furanoeliangolidos totais expressos como 4,5-diidrolychnopholido. Contudo, deve-se ressaltar que tais inferências não são precisas e só podem ser empregadas com substâncias de estruturas químicas conhecidas e bem correlatas (por exemplo com pequenas diferenças somente no padrão de substituição) e, principalmente, cujos cromóforos e absorção no UV, no comprimento de onda a ser utilizado, sejam os mesmos.

Quanto à sensibilidade do método, foram determinados limites de detecção e quantificação para cada padrão, de acordo com os parâmetros estabelecidos no tópico 3.4.2. (**Tabela 4**) Deve ser notado que na menor concentração analisada  $(0,2\mu g/mL)$  todas as substâncias foram detectadas com boa diferença em relação à linha de base. Os limites de quantificação encontram-se todos no intervalo entre 2 e  $500\mu g/mL$ , sendo alguns da ordem de  $0,5\mu g/mL$ . Estes dados foram considerados adequados aos propósitos deste estudo e indicam uma boa sensibilidade do método para os metabólitos secundários de *L. ericoides*.

Tabela 4. Limites de detecção mínimos (LDMin) e máximos (LDMax) e limites de quantificação mínimos (LQMin) e máximos (LQMax) obtidos para as substâncias padrões analisadas.

Substância padrão	LDMin ( <i>µ</i> g/mL)	LDMax ( <i>µ</i> g /mL)	LQMin ( <i>µ</i> g /mL)	LQMax ( <i>µ</i> g /mL)
vicenina-2	0,2	1000	1	500
6,8-di-C-β-glicosilcrisina	0,2	1000	2	500
ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	0,2	1000	2	1000
centraterina	0,2	1000	1	500
4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	0,2	1000	1	500
4,5-diidroeremantolido C	0,2	1000	0,5	500
4,5-diidrolychnopholido	0,2	1000	0,5	500
16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido	0,2	1000	1	500
lychnopholido	0,2	1000	1	500
pinocembrina	0,2	1000	1	500
pinostrobina	0,2	1000	1	1000

No que diz respeito à precisão do método, boa repetibilidade foi encontrada tanto nas análises consecutivas (intra-ensaio) quanto nas semanais (interensaio) (**Tabela 5**). Deve-se notar que, conforme o esperado, os coeficientes de variação interensaio foram ligeiramente maiores, uma vez que análises realizadas a intervalos de tempo longos tendem a perder a precisão, o que neste caso pode ter sido proporcionado por uma alteração na estrutura química dos padrões. Este fato é particularmente pronunciado no caso da pinostrobina, e talvez possa ser explicado por uma isomerização desta substância, conforme será discutido adiante.

A exatidão das análises também se mostrou satisfatória para os propósitos do estudo, sendo que o maior desvio entre os valores obtidos e os reais foi de 7,1%, conforme também consta na **Tabela 5**.

Tabela 5. Coeficientes de variação (C.V.) intra- e interensaio e exatidões obtidos para as substâncias padrões analisadas, mostrando a repetibilidade do método.

Substância padrão	C.V. intra-ensaio (%)	C.V. interensaio (%)	Exatidão (%)
vicenina-2	2,1	3,1	4,8
6,8-di-C-β-glicosilcrisina	2,3	2,9	4,5
ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	2,2	3,7	5,8
centraterina	1,9	3,0	3,8
4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	2,1	3,4	3,6
4,5-diidroeremantolido C	2,0	2,9	4,1
4,5-diidrolychnopholido	1,8	2,8	3,9
16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido	1,7	3,2	4,0
lychnopholido	2,2	3,0	3,8
pinocembrina	1,8	3,9	5,9
pinostrobina	2,0	4,2	7,1

Já os fatores de recuperação absoluta obtidos conforme o tópico 3.4.5 mostram que os processos de extração e limpeza da amostra são adequados e proporcionam uma recuperação, a uma concentração de 150µg/mL, em torno de 90% para todos os metabólitos (**Tabela 6**). Mesmo a uma concentração de 300µg/mL, a qual é bem superior à esperada nas amostras vegetais, a recuperação obtida foi considerada muito boa para os propósitos deste estudo. Além disso, comparando-se os diversos metabólitos analisados, os fatores de recuperação se mostram muito próximos entre si, confirmando que o método pode ser aplicado satisfatoriamente para todos estes metabólitos, independentemente da natureza de

sua estrutura molecular. O único metabólito que apresentou fatores de recuperação um pouco menores, mas ainda assim satisfatórios, foi a pinostrobina, o que pode ser reflexo de sua natureza apolar, conforme já discutido anteriormente.

Tabela 6. Fatores de recuperação para o processo global de extração das substâncias padrões, adicionadas à matriz nas concentrações de 30, 150 e 300µg/mL (análise em triplicata).

Substância nadrão	Fator de recuperação (%)		
	30µg/mL	150 <i>µ</i> g/mL	300 <i>µ</i> g/mL
vicenina-2	96,3	91,2	84,0
6,8-di-C-β-glicosilcrisina	95,6	89,8	82,7
ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	97,5	92,4	86,4
centraterina	97,7	91,4	86,2
4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	97,6	91,6	84,4
4,5-diidroeremantolido C	96,9	91,5	83,9
4,5-diidrolychnopholido	97,6	90,5	83,3
16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido	96,8	90,3	83,0
lychnopholido	96,4	90,0	83,2
pinocembrina	95,7	89,3	79,4
pinostrobina	92,0	86,1	77,3

Finalmente, após comparação de amostras analisadas imediatamente após o preparo e após vários períodos de estocagem, conforme descrito no tópico *3.4.6.*, não foram verificadas alterações significativas (foi considerado como significativo ±5%) nas áreas relativas dos picos até o tempo de 30h, o que mostra que as análises devem ser efetuadas no máximo até este tempo após a extração para evitar
erros devido à estocagem. Após este tempo, variações significativas foram observadas especialmente para algumas LST e flavonóides, conforme pode ser observado nos gráficos que mostram a variação das áreas de cada metabólito em função do tempo após o preparo da amostra (**Figuras 6** a **8**). Estas variações observadas são especialmente interessantes no caso das flavanonas pinocembrina e pinostrobina e das chalconas 2',4',6'-triidroxichalcona e 2',6'-diidróxi-4'- metoxichalcona, pois enquanto aumentam as quantidades de chalconas, as das flavanonas diminuem aproximadamente no mesmo ritmo. Isto sugere uma isomerização em solução das flavanonas nas respectivas chalconas, através da abertura do anel C das primeiras.



**Figura 6.** Gráfico das áreas relativas dos ácidos cafeoilquínicos de *L. ericoides* em função do tempo após o preparo das amostras conforme o método de extração desenvolvido, mostrando a estabilidade destes metabólitos. A identificação dos picos cromatográficos consta no tópico 4.4.



Figura 7. Gráfico das áreas relativas dos flavonóides de *L. ericoides* em função do tempo após o preparo das amostras conforme o método de extração desenvolvido, mostrando a estabilidade destes metabólitos. A identificação dos picos cromatográficos consta no tópico 4.4.



Figura 8. Gráfico das áreas relativas das lactonas sesquiterpênicas de *L. ericoides* em função do tempo após o preparo das amostras conforme o método de extração desenvolvido, mostrando a estabilidade destes metabólitos. A identificação dos picos cromatográficos consta no tópico 4.4.

Com relação à estabilidade das amostras vegetais após a coleta e durante a estocagem, análises realizadas com uma mesma amostra de folhas após 18 meses de estocagem em freezer mostraram que não ocorrem variações significativas (±5%) no conteúdo de seus metabólitos. Também não foram observadas variações significativas (±5%) para as áreas relativas dos metabólitos de folhas congeladas em gelo seco imediatamente após a coleta e as folhas do mesmo ramo submetidas ao processo padrão de coleta e secagem.

## 4.4. Identificação dos picos cromatográficos

Após a definição, otimização e validação do método de extração e análise, uma amostra de cada indivíduo demarcado (todos provenientes da mesma coleta em janeiro de 2002) foi então submetida a esta metodologia para a obtenção de um perfil cromatográfico nas mesmas condições para cada indivíduo, o que permitiu sua comparação efetiva.

Foram definidos os picos ocorrentes em cada indivíduo e, para facilitar a posterior manipulação dos dados, estes picos foram numerados consecutivamente de acordo com a ordem de eluição, não importando em qual indivíduo estavam presentes ou não. Foram considerados neste processo não somente os picos que apareciam com boa intensidade nas amostras, mas também aqueles pouco intensos que foram identificados conforme exposto adiante neste mesmo tópico. A **Figura 9** mostra exemplos de cromatogramas obtidos por CLAE-DAD em 3 dimensões, isto é, exibindo dados de comprimento de onda *versus* intensidade de absorção *versus* tempo de retenção. Ou seja, estes cromatogramas mostram os espectros de UV gerados no decorrer do tempo de análise e, portanto, permitem a obtenção de espectros de UV relativos a cada pico observado. Neste sentido, os comprimentos

de onda em que são calculadas as áreas relativas (razão entre área do analito / área do p.i.) para cada pico foram escolhidos com base em seu máximo de absorção no UV. Assim, somente os dados referentes aos picos dos ácidos clorogênicos, chalconas e da *C*-glicosilflavona vicenina-2 foram coletados a 325nm, sendo os dados dos demais picos coletados a 270nm.

As **Figuras 10** e **11** mostram, nos dois comprimentos de onda utilizados para registro dos cromatogramas (270 e 325nm), a numeração dos picos em cromatogramas obtidos para um indivíduo proveniente de cada população.



Figura 9. Exemplos de cromatogramas em 3 dimensões (tempo de retenção x comprimento de onda x intensidade da absorção) obtidos para o indivíduo 1-III por CLAE-DAD com a metodologia analítica desenvolvida.

λ=270nm				
1-III	- and	5 9 2 2 8 6 d	E ≌?R ⊼ 8 88 88 88	V V V V V V V V V V V V V V V V V V
2-IV	4			
3-VI	J.		 MM	
4-I			 	

78



Figura 10. Cromatogramas, registrados a 270nm, obtidos através da metodologia desenvolvida para os indivíduos 1-III, 2-IV, 3-VI,

4-I e 5-VIII, coletados em janeiro de 2002, e a numeração dos picos cromatográficos.

λ=325nm					
1-III	9 K	. <u>1</u>	2, 555, 888, 69 5, 88 53 5, 555, 888, 69 5, 58 53 5, 555, 888, 69 5, 58 53 8, 99	- A	45 447 448 489 489 489 480
2-IV					
3-VI		-/ _/			
4-I		Milman			



**Figura 11.** Cromatogramas, registrados a 325nm, obtidos através da metodologia desenvolvida para os indivíduos 1-III, 2-IV, 3-VI, 4-I e 5-VIII, coletados em janeiro de 2002, e a numeração dos picos cromatográficos.

Para a identificação dos picos cromatográficos foram utilizados os dados gerados a partir de análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, tanto no modo de ionização positiva quanto negativa, para amostras de L. ericoides obtidas a partir de indivíduos provenientes de cada uma das cinco populações estudadas (os mesmos utilizados como exemplo nos cromatogramas das Figuras 10 e 11: 1-III, 2-IV, 3-VI, 4-I e 5-VIII). A análise destes cinco indivíduos foi necessária para a detecção de todos os picos, uma vez que alguns deles só estão presentes em quantidades suficientes para detecção e fragmentação pelo espectrômetro de massas em alguns indivíduos. Além disso, a obtenção de espectros de massas para indivíduos representando todas as populações estudadas é mais um dado para confirmar a seletividade do método desenvolvido para análise das amostras por CLAE-DAD, levando à confirmação de que cada um dos picos com mesmo tempo de retenção e espectro UV ocorrentes nos cromatogramas provenientes de plantas das diferentes populações realmente são referentes à mesma substância. Todos os dados que serão discutidos a seguir na identificação das substâncias referentes a cada pico cromatográfico estão expostos em maior detalhe na Tabela 7, onde constam todos os dados de UV e espectrometria de massas que foram obtidos através dos experimentos de CLAE-UV-EM e CLAE-UV-EM/EM. Além disso, os espectros de íons produto (EM/EM) e de UV obtidos, bem como as estruturas das substâncias, constam do APÊNDICE B.

## 4.4.1. Ácidos clorogênicos

Ácidos clorogênicos é uma denominação geral para a classe de metabólitos secundários resultantes de esterificações de um ou mais tipos de ácidos *trans*-cinâmicos (cinâmico, cumárico, cafeico, ferúlico e dimetoxicinâmico) com uma ou

mais das quatro hidroxilas do ácido quínico. Isto gera séries de isômeros de posição, ou seja, subgrupos de substâncias com um mesmo número de ácidos *trans*cinâmicos esterificados em posições diferentes no ácido quínico; por exemplo, a série de seis isômeros de posição possíveis para os ácidos di-cafeoilquínicos (duas unidades de ácido cafeico esterificados em um ácido quínico). De modo geral, em uma planta não é encontrado um só composto de uma série isomérica, e sim toda a série de um determinado número de cada substituinte (mesmo número de cada tipo de ácido *trans*-cinâmico), com exceção dos derivados com esterificação na posição 1 do ácido quínico, os quais são de ocorrência relativamente rara (CLIFFORD, 1999, 2000; CLIFFORD et al. 2003, 2006; MOLGARD; RAVN, 1988). De fato, muitas plantas produzem somente derivados com esterificações nas posições 3, 4 e 5 (CLIFFORD et al., 2005). Este tipo de compostos são metabólitos secundários de ampla ocorrência nas plantas vasculares, especialmente os ácidos cafeoilquínicos, os quais já foram isolados das folhas e raízes de *L. ericoides* (GOBBO-NETO, 2002; SANTOS et al., 2005).

Assim, alguns dos ácidos clorogênicos ocorrentes nos extratos de *L. ericoides* analisados, especialmente aqueles majoritários, puderam ter seus picos cromatográficos identificados por comparação com padrões isolados da mesma planta em estudos fitoquímicos anteriores. Porém, no caso dos derivados clorogênicos minoritários, a identificação foi realizada baseada em espectrometria de massas, principalmente nos espectros de íons produto obtidos por CLAE-DAD-EM/EM.

Os espectros de íons produto (EM/EM) no modo de ionização positiva não são muito informativos para a diferenciação do isômeros posicionais do ácidos clorogênicos e, assim sendo, a identificação de tais compostos foi baseada principalmente em seus espectros de íons produtos no modo de ionização negativa, bem como nos dados de massas acuradas obtidos para os íons precursores [M - H]<sup>-</sup> em alta resolução, tempos de retenção relativos em coluna C18 e espectros de UV.

A facilidade de perda de uma unidade de ácido cafeico (ou outro ácido *trans*cinâmico) esterificada em uma posição específica do ácido quínico na fragmentação (e por conseqüência a intensidade relativa do íon produto gerado por esta perda no espectro de íons produto) é determinada principalmente pela sua proximidade espacial com a carboxila ou hidroxila no carbono 1 do ácido quínico, as quais têm papel fundamental no mecanismo de fragmentação dos ácidos clorogênicos. Ou seja, no caso dos derivados 5-acil, um H da carboxila do ácido quínico é abstraído para a eliminação da porção cafeica; no caso dos derivados 3-acil, é abstraído um H da OH em 1, e no caso dos 4-acil, como não há proximidade espacial com a carboxila ou hidroxila em 1, é necessária uma eliminação de H<sub>2</sub>O a partir de uma das hidroxilas vizinhas (nas posições 3 ou 5 do ácido quínico) antes da eliminação da unidade de ácido cafeico. Estas diferenças na fragmentação levam a marcantes diferenças na intensidade, e às vezes na natureza, dos íons produtos nos espectros de segunda geração (EM/EM), possibilitando a diferenciação entre isômeros posicionais (CLIFFORD et al., 2003, 2005, 2006).

Os picos cromatográficos 1, 3 e 4 apresentaram o íon m/z 353 como o pico base nos espectros de massas em modo de ionização negativa e espectros de UV característicos de ácidos cafeoilquínicos (UV max: ~ 299 e 325nm) o que, em conjunto, são dados indicativos de ácidos quínicos esterificados com uma única unidade de ácido cafeico (**Figuras 1**, 3 e 4 do **APÊNDICE B**; **Tabela 7**). Os espectros de íons produto obtidos para os íons precursores m/z 353 diferem entre si, e a comparação com os dados das chaves para identificação de ácidos cafeoilquínicos (ACQ) por CLAE-EM/EM publicados por Clifford et al. (2003, 2005, 2006) levou à individualização dos três isômeros. O espectro de íons produto (CLAE-UV-EM/EM) do pico **3** (**Figura 3** do **APÊNDICE B**) apresentou *m/z* 173 (referente à unidade de ácido quínico desidratada) como pico base, *m/z* 191 (referente a perda da unidade cafeoil) e *m/z* 179 (referente a perda da unidade quínica). Como *m/z* 173 só ocorre em ACQ que possuem uma unidade de ácido cafeico esterificada na posição 4 do ácido quínico, este pico foi atribuído ao ácido 4-*O*-*E*-cafeoilquínico (**Figura 3** do **APÊNDICE B**).

A fragmentação do pico **1** originou *m/z* 191 como pico base e *m/z* 179 com intensidade relativa de 51% (**Figura 1** do **APÊNDICE B**); já a do pico **4** produziu *m/z* 191 como pico base e *m/z* 179 com intensidade relativa bem menor, em torno de 5% (**Figura 4** do **APÊNDICE B**). A maior intensidade relativa de *m/z* 179 no espectro de íons produto do pico **1**, assim como a informação de que o ácido 3-*O*-*E*cafeoilquínico deve eluir mais rapidamente que os ácidos 4- e 5-*O*-*E*-cafeoilquínicos em colunas C-18 (CLIFFORD et al. 2003, 2005, 2006) possibilitaram a identificação do pico **1** como ácido 3-*O*-*E*-cafeoilquínico (**Figura 1** do **APÊNDICE B**) e do pico **4** como ácido 5-*O*-*E*-cafeoilquínico (**Figura 4** do **APÊNDICE B**). Além disso, o pico **4** também teve seu tempo de retenção comparado com um padrão de ácido 5-*O*-*E*cafeoilquínico. As massas moleculares acuradas obtidas para as moléculas protonadas e desprotonadas (**Tabela 7**) também estão de acordo com as massas exatas calculadas para um ácido cafeoilquínico (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>): [M-H]<sup>-</sup> 353,0873 e [M+H]<sup>\*</sup> 355,1029.

Os picos **10, 11** e **12** originaram espectros de UV idênticos aos ácidos cafeoilquínicos descritos acima e picos base em m/z 515 no espectro de massas no modo de ionização negativa (**Figuras 10, 11** e **12** do **APÊNDICE B**; **Tabela 7**), o que

indica isômeros posicionais de ácidos di-cafeoilquínicos. No modo de ionização positiva, o pico base encontrado para todos foi m/z 499, o que condiz com um ácido di-cafeoilquínico desidratado [M+H - 18]<sup>+</sup>; no entanto, [M+H]<sup>+</sup> 517 também está presente, bem como a molécula cationizada [M+Na]<sup>+</sup> 539. As massas moleculares acuradas obtidas (Tabela 7) também são coerentes com as calculadas para um ácido di-cafeoilquínico ( $C_{25}H_{27}O_{12}$ ): [M-H]<sup>-</sup> 515,1190 e [M+H]<sup>+</sup> 517,1346. Os picos **11** e 12 foram atribuídos, respectivamente, aos ácidos 3,5-di-O-E-cafeoilguínico (Figura 11 do APÊNDICE B) e 4,5-O-E-dicafeoilquínico (Figura 12 do APÊNDICE B), com base em comparações de tempos de retenção com padrões isolados anteriormente de L. ericoides. Sua identidade foi também confirmada pelos espectros de íons produtos obtidos pela fragmentação do íon precursor m/z 515 em modo negativo (CLIFFORD et al. 2003, 2005, 2006). Conforme já citado anteriormente, m/z 173, presente no espectro dos picos 10 e 12, é íon produto diagnóstico de uma unidade cafeica esterificada na posição 4 do ácido quínico. Além disso, nenhum dos íons produtos característicos do ácido 1,4-di-O-E-cafeoilquínico (m/z 299 e 203) estão presentes no espectro de íons produtos do pico 10, levando à identificação deste pico como o ácido 3,4-di-O-E-cafeoilquínico (Figura 10 do APÊNDICE B).

Utilizando-se a mesma estratégia de identificação acima, o pico **26** foi atribuído ao ácido 3,4,5-tri-*O*-*E*-cafeoilquínico (**Figura 4** do **APÊNDICE B**, **Tabela 7**). Suas massas acuradas obtidas são compatíveis com as massas moleculares calculadas para um ácido tri-cafeoilquínico ( $C_{34}H_{30}O_{15}$ ): [M-H]<sup>-</sup> 677,1506 e [M+H]<sup>+</sup> 679,1663 (**Tabela 7**). Comparação do tempo de retenção e co-injeção com um padrão do ácido 3,4,5-tri-*O*-*E*-cafeoilquínico, isolado anteriormente de *L. ericoides*, confirmou a identidade do pico.

Os dados obtidos por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM também permitiram a identificação de ácidos feruloilquínicos e feruloil-cafeoilquínicos nos extratos das folhas de L. ericoides. Os picos minoritários 2, 6 e 8 produziram como picos bases de seus espectros de massas no modo de ionização negativa íons 14 unidades de massa atômica (u.m.a.) maiores que os ácidos cafeoilquínicos, e coerentes com a massa molecular exata calculada para um ácido feruloilquínico (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>: [M-H]<sup>-</sup> 367,1029), bem como espectros de UV idênticos aos dos ácidos cafeoilquínicos descritos (Tabela 7). A fragmentação, em modo de ionização negativa, do íon precursor m/z 367 do pico 6 produziu m/z 173 como pico base no espectro de íons produto, o que é diagnóstico para acilação na posição 4 do ácido quínico e permitiu a identificação da substância como sendo o ácido 4-O-Eferuloilquínico (Figura 6 do APÊNDICE B). Por outro lado, m/z 193 e 191 foram produzidos como picos base nos espectros dos picos 2 (Figura 2 do APÊNDICE B) e 8 (Figura 8 do APÊNDICE B) respectivamente, levando a identificação destes como os ácidos 3- e 5-O-E-feruloilquínico, baseando-se na chave de identificação de ácidos clorogênicos de Clifford et al. (2003, 2005). Os tempos de retenção destes três ácidos feruloilquínicos repetem o padrão de eluição observado para os três ácidos cafeoilquínicos: os ácidos 3-acil-quínicos eluem primeiro, seguidos pelos 4acil- e depois os 5-acil-quínicos, o que também está de acordo com os resultados obtidos por Clifford et al. (2003).

Outros quatro picos minoritários **14**, **15**, **18** e **20** também apresentaram espectros de UV característicos de ácidos clorogênicos e picos base nos espectros de massas 14 u.m.a. maiores que os ácidos di-cafeoilquínicos, os quais estão de acordo com a massa exata calculada para um ácido feruloil-cafeoilquínico  $(C_{26}H_{26}O_{12}: [M-H]^{-} 529,1346)$  (**Tabela 7**). Espectros de íons produto no modo de

ionização negativa puderam ser adquiridos para estes quatro picos (**Figuras 14**, **15**, **18** e **20** do **APÊNDICE B**), os quais apresentaram íons produto característicos de ácidos feruloil-cafeoilquínicos (CLIFFORD et al., 2003, 2005). No entanto, para a individualização de cada isômero seriam necessários espectros de íons produto de terceira geração (MS<sup>3</sup>), o que não é possível com o tipo de analisador do espectrômetro de massas utilizado.

Visto que todos os possíveis isômeros posicionais, tanto dos ácidos cafeoilquanto dos feruloilquínicos, foram identificados (exceto aqueles com acilação na posição 1 do ácido quínico), também se esperava encontrar todos os seis isômeros possíveis (excluindo-se também a acilação em 1) para os ácidos feruloilcafeoilquínicos (CLIFFORD et al., 2003, 2005, 2006). Como estes picos ocorrem com intensidade relativamente baixa, os dois picos ausentes podem, na verdade, ter ficado abaixo do limite de detecção dos detectores. Assim sendo, foi realizada a extração de m/z 529 a partir dos cromatogramas gerados por detecção por espectrometria de massas no modo de ionização negativa, o que possibilitou a identificação de cada um dos seis picos cromatográficos com pico base m/z 529 no espectro de massas, referentes aos seis isômeros feruloil-cafeoilquínicos (Figura 12). Por outro lado, no modo de ionização positiva, foi possível detectar todos os seis picos, cujos espectros de massas apresentam pico base m/z 513, o gual se refere à molécula desidratada, e cujas massas moleculares acuradas obtidas estão de acordo com a calculada para estes íons:  $[M+H - H_2O]^+$  513,1397 (**Tabela 7**). Porém, conforme já mencionado anteriormente, espectros de íons produto de ácidos clorogênicos no modo de ionização positiva são muito similares para substâncias com mesmo tipo de substituintes, não sendo informativos sobre as posições do ácido quínico que se encontram esterificadas. No entanto, é possível confirmar a presença de uma unidade de ácido cafeico e uma unidade de ácido ferúlico pela presença nos espectros de íons produtos (**Figuras 13**, **14**, **15**, **16**, **18** e **20** do **APÊNDICE B**) dos íons *m*/*z* 163 e 177, os quais correspondem à fragmentação destas unidades pela quebra da ligação éster.

O pico **19**, por sua vez, pode ser atribuído a um ácido di-feruloilquínico, devido a seu espectro de UV e massa molecular obtida, condizente com a massa calculada para um ácido di-feruloilquínico ( $C_{27}H_{28}O_{12}$ ): [M-H]<sup>-</sup> 543,1502 (**Tabela 7**). Comparando-se o espectro de íons produto deste pico (**Figura 19** do **APÊNDICE B**) com os dados obtidos por Clifford et al. (2006), pode-se dizer que se trata do ácido 3,4-*O*-*E*-diferuloilquínico. Além disso, este espectro apresenta os íons produto *m/z* 193 e 173, característicos dos ácidos 3- e 4-*O*-*E*-feruloilquínico respectivamente, o que indica esterificação nas mesmas posições que estes dois compostos (posições 3 e 4 do ácido quínico). Em busca dos outros dois isômeros posicionais possíveis para os ácidos di-feruloilquínicos, foi realizada uma extração de *m/z* 543 a partir dos cromatogramas gerados pela detecção por espectrometria de massas no modo negativo de ionização, o que possibilitou a identificação de cada um dos três picos cromatográficos com pico base *m/z* 543, referentes aos três isômeros di-feruloilquínicos (**Figura 12**).

A **Figura 12** mostra os cromatogramas obtidos por extração dos picos com m/z equivalentes a [M-H]<sup>-</sup> de cada subgrupo de ácidos clorogênicos identificados, os quais foram utilizados para a localização e/ou confirmação dos picos referentes aos isômeros posicionais nos cromatogramas CLAE-DAD-EM, conforme discutido acima para os ácidos di-feruloilquínicos e feruloil-cafeoilquínicos. Cabe ressaltar que também foi realizada a extração dos íons referentes às massas das moléculas desprotonadas de outros derivados clorogênicos [ácidos cumaroilquínicos (m/z 337),

di-cumaroilquínicos (m/z 483), dimetoxicinamoilquínicos (m/z 381), didimetoxicinamoilquínicos (m/z 571) e outras possibilidades de esterificação do ácido quínico por ácidos *trans*-cinâmicos], porém nenhum deles foi observado nos cromatogramas gerados por detecção por espectrometria de massas.

Estes são os primeiros relatos da ocorrência dos ácidos 3- e 4-O-*E*cafeoilquínico, 3,4-di-*O*-*E*-cafeoilquínico e das séries de isômeros posicionais de ácidos feruloilquínicos, feruloil-cafeoilquínicos e di-feruloilquínicos na subtribo Lychnophorinae, na qual está classificada a espécie *L. ericoides*.



Figura 12. Cromatogramas obtidos por extração dos íons [M-H]<sup>-</sup> referentes aos grupos de ácidos clorogênicos, a partir do cromatograma em modo de ionização negativa obtido para extrato do indivíduo 5-VIII. Os números dos picos correspondem aos das Figuras 10 e 11.

## 4.4.2. Flavonóides

Os flavonóides, em sua maioria, foram identificados principalmente por comparação de tempos de retenção e espectros de UV com padrões. Aqueles que não puderam ser identificados pela comparação com os padrões disponíveis, tiveram sua identidade determinada por espectrometria de massas, especialmente pela comparação de espectros de íons produto com os obtidos para os flavonóides já identificados e pelas fórmulas moleculares calculadas para as massas moleculares acuradas obtidas.

No caso dos flavonóides agliconas, a ionização pelo modo negativo leva a fragmentações mais intensas e mais difíceis de racionalizar, sendo, portanto, menos usual para a determinação estrutural (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Já o modo de ionização positiva é relativamente mais bem estudado e usualmente utilizado para elucidação estrutural por produzir menos fragmentos. Neste modo de ionização, na maior parte dos flavonóides, os principais fragmentos produzidos são relativos a perdas de ésteres, perdas radicalares de metilas a partir de metiléters do anel A e a quebra de ligações do anel C, a qual resulta em íons produto informativos sobre a natureza dos anéis A e/ou B (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; CUYCKENS et al., 2000; STEVENS et al., 1999).

Já no caso das C-glicosilflavonas, o modo de ionização negativa é, sem dúvida, mais informativo para elucidação estrutural e resulta em uma fragmentação já bem definida na literatura, a qual gera informações a respeito tanto do tipo de açúcar quanto da natureza da aglicona. Ao contrário, no modo de ionização positiva, devido a uma grande fragmentação dos açúcares, pouca informação estrutural pode ser obtida (BECCHI; FRAISSE, 1989; CUYCKENS; CLAEYS, 2004).

## Flavonóides agliconas

Os picos 38 e 47 apresentaram nos espectros de UV (Figuras 38 e 47 do APÊNDICE B; Tabela 7) uma banda com absorção máxima em torno de 290nm e um ombro com máximo próximo a 325nm, sinais característicos, respectivamente, das bandas II e I de flavanonas ou diidroflavonóis (MARKHAM, 1982). A comparação de seus tempos de retenção e espectros de UV com padrões anteriormente isolados de L. ericoides permitiu a atribuição destes picos às substâncias pinocembrina (pico **38**) e pinostrobina (pico **47**). O sinal de ambas as substâncias nos cromatogramas detectados por espectrometria de massas no modo de ionização positiva se mostraram muito pouco intensos, o que indica uma capacidade de ionização relativamente baixa para elas e, assim, um espectro de íons produto só pode ser adquirido para o pico 47 (Figura 47 do APÊNDICE B). Por outro lado, no modo de ionização negativa um espectro de íons produto foi adquirido com sucesso para o pico 38 (Figura 38 do APÊNDICE B), enquanto o pico 47 não pôde ser observado no cromatograma por detecção pelo espectrômetro de massas. Os espectros de íons produto obtidos estão de acordo com as fragmentações de flavonóides descritas na literatura (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FABRE et al., 2001) e as massas acuradas obtidas (Tabela 7) são compatíveis com as massas moleculares calculadas para as substâncias pinocembrina (C15H12O4; [M-H]<sup>-</sup> 255.0657 e [M+H]<sup>+</sup> 257.0814) e pinostrobina ( $C_{16}H_{14}O_4$ ; [M+H]<sup>+</sup> 271.0970), confirmando a atribuição destas substâncias aos picos 38 e 47.

Dois outros picos cromatográficos, picos **40** e **45**, exibiram massas acuradas (**Tabela 7**) e padrões de fragmentação (**Figuras 40** e **45** do **APÊNDICE B**) praticamente idênticos aos da pinocembrina e pinostrobina, respectivamente. No entanto, os espectros de UV obtidos para estes dois picos são bem diferentes

daqueles obtidos para as flavanonas, pois apresentam um máximo de absorção acima de 340nm sendo, portanto, característicos de chalconas (Figuras 40 e 45 do APÊNDICE B) (MARKHAM, 1982). Sabe-se que, em fase gasosa, ocorre a isomerização de 2'-hidroxichalconas originando suas flavanonas correspondentes através da ciclização/formação do anel C, o que gera espectros de massas praticamente idênticos para estas duas formas isoméricas (ZHANG; BRODBELT, 2003). Portanto os picos 40 e 45 foram atribuídos às formas isoméricas das flavanonas pinocembrina e pinostrobina: as chalconas 2',4',6'-triidroxichalcona e 2',6'-diidroxi-4'-metoxichalcona. Assim como foi observado para as flavanonas, os sinais obtidos para ambas chalconas no modo de ionização positiva foram de baixa intensidade, mas, ainda assim, foi possível a obtenção de espectros de íons produtos para as duas substâncias. Já no modo de ionização negativa, ambas as substâncias exibiram sinais muito intensos, e os espectros de íons produto obtidos (Figuras 40 e 45 do APÊNDICE B) estão de acordo com os dados disponíveis na literatura (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; FABRE et al., 2001; ZHANG; BRODBELT, 2003).

O pico **21** originou um espectro de UV típico de diidroflavonol/flavanona (MARKHAM, 1982), com máximo de absorção em 291nm e um ombro com máximo em torno de 330nm. O tempo de retenção e espectro de UV deste pico são idênticos aos do padrão de pinobanksina, um diidroflavonol já isolado de *L ericoides*, e suas massas moleculares acuradas obtidas estão em conformidade com as massas exatas calculadas para a pinobanksina ( $C_{15}H_{12}O_5$ ;  $[M-H]^-$  271.0606 e  $[M+H]^+$  273.0763), confirmando a atribuição desta substância ao pico **21** (**Tabela 7**; **Figura 21** do **APÊNDICE B**).

Por sua vez, o pico 42 apresentou um espectro de UV quase idêntico ao da pinobanksina, e picos base 42 u.m.a maiores que aquela substância nos espectros de massas em ambos os modos de ionização, o que sugere uma unidade de acetato esterificada à pinobanksina (Tabela 7). No espectro de segunda geração no modo de ionização negativa, a uma energia de colisão de 15eV, somente dois íons produto são produzidos a partir do íon precursor m/z 313: perdas de moléculas neutras de ácido acético e C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, gerando *m*/z 253 e 271, respectivamente. Porém, utilizandose uma energia de colisão maior (25eV) ocorre uma fragmentação mais intensa, resultando em um espectro de íons produto (Figura 42 do APÊNDICE B) muito similar ao da pinobanksina. Já no modo de ionização positiva, o íon mais informativo produzido pela fragmentação do íon precursor m/z 315 é o íon produto m/z 153, o qual foi atribuído a um fragmento tipo <sup>1,3</sup>A (produzido pela fragmentação das ligações entre O1-C2 e C3-C4 do anel C, com retenção da carga pelo anel A) que confirma a massa molecular e, portanto, os substituintes propostos, do anel A (CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Além disso, a identidade do pico foi também confirmada pelas massas moleculares acuradas obtidas para este pico (Tabela 7), as quais estão em concordância com as calculadas para acetilpinobanksina  $(C_{17}H_{12}O_6; [M-H]^{-} 311,0556 e [M+H]^{+} 313,0712)$ , e pela comparação com o tempo de retenção e espectro de UV obtidos para um padrão de 3-O-acetilpinobanksina.

Visando confirmar se este composto realmente ocorre como tal nas folhas de *L. ericoides* e não seria apenas um artefato produzido por uma acetilação durante o processo de extração/análise, como muitas vezes é alegado por fitoquímicos, espectros de massas e de íons produto do íon precursor *m/z* 313 foram obtidos por infusão direta de extratos recém preparados na fonte de ionização. Como o extrato é preparado em MeOH:H<sub>2</sub>O e, portanto, sem uma fonte de acetato, a observação de *m*/z 313,0718 (em concordância com a massa exata calculada de [3-*O*-acetilpinobanksina - H]<sup>-</sup>) como um dos picos mais intensos no espectro de massas obtido no modo de ionização negativa e seu respectivo espectro de íons produtos, idêntico àquele obtido para o padrão de 3-*O*-acetilpinobanksina, confirmam a ocorrência desta substância nas folhas de *L. ericoides*.

O pico **48** também originou um espectro de UV característico de diidroflavonóis/flavanonas, apresentando *m/z* 329,1044 como pico base no espectro de massas por ionização no modo positivo (**Tabela 7**), o que sugere a fórmula molecular  $C_{18}H_{17}O_6$  para [M+H]<sup>+</sup>, sem nenhuma outra fórmula possível dentro de uma faixa de erro de ± 15ppm. Analisando-se o espectro de íons produto obtido em modo de ionização positiva para *m/z* 329 (**Figura 48** do **APÊNDICE B**), verifica-se um padrão de fragmentação idêntico ao observado para a 3-*O*-acetilpinobanksina (**Figura 42** do **APÊNDICE B**), com um acréscimo de 14 u.m.a. para todos os íons produto. Estabelecendo-se um paralelo com a elucidação descrita acima para aquela substância, pode-se afirmar que esta substância se trata da 3-*O*-acetilalpinona. A ausência do íon produto *m/z* 153, relativo ao um fragmento tipo <sup>1,3</sup>A encontrado na 3-*O*-acetilpinobanksina, bem como a presença de *m/z* 167, confirmam que o anel A possui o mesmo padrão de substituição da pinostrobina (OH em 5 e OMe em 7). Portanto, ao pico **48** foi atribuída a substância 3-*O*-acetilalpinona.

De maneira semelhante, o pico **46** também produziu um espectro de UV típico de diidroflavonóis/flavanonas (MARKHAM, 1982) e foi detectado pelo espectrômetro de massas somente no modo de ionização positiva, apresentando um pico base que aponta para a fórmula molecular  $C_{20}H_{22}O_5$  (**Tabela 7**), sem nenhuma outra fórmula possível dentro de uma faixa de erro de ± 15ppm. Já a análise do espectro de íons produto obtido para o íon precursor *m/z* 343 (**Figura 46** do **APÊNDICE B**), revelou

94

um padrão de fragmentação quase idêntico ao observado para 3-O-acetilalpinona (**Figura 48** do **APÊNDICE B**), porém com a perda de um fragmento de 74 u.m.a. a partir do íon precursor *m/z* 343, levando a um íon produto *m/z* 269 correspondente à aglicona, o que sugere a presença de um éster propionato em substituição ao acetato ocorrente em 3-O-acetilalpinona. Assim, sugere-se que o pico **46** deva ser atribuído à substância 3-O-propionilalpinona (**Figura 46** do **APÊNDICE B**). No entanto, para a confirmação inequívoca desta estrutura seria necessária sua purificação a partir do extrato e análises por outros métodos de identificação.

O pico 23, por sua vez, originou um espectro de UV característico de flavonas (MARKHAM, 1982), com bandas de absorção máxima em 295 e 355nm (Figura 23 do APÊNDICE B). A comparação deste espectro e do tempo de retenção com os obtidos para um padrão de 3-*O*-metilquercetina permitiu a atribuição deste pico a esta substância. As massas acuradas obtidas para o pico base do espectro de massas em ambos os modos de ionização (Tabela 7) confirmam a fórmula molecular  $C_{16}H_{12}O_7$ , e a fragmentação obtida no espectro de íons produto (Figura 23 do APÊNDICE B) está de acordo com a descrita por Ma et al. (1999).

### di-C-glicosilflavonas

Os picos cromatográficos **7** e **9** apresentaram espectros de UV característicos de flavonas (MARKHAM, 1982) e foram identificados por comparação de tempos de retenção e espectros de UV com padrões de di-*C*-glicosilflavonas isolados em estudo fitoquímico anterior de *L. ericoides*. Assim, o pico **7** foi identificado como a substância vicenina-2 (6,8-di-*C*- $\beta$ -glicosilapigenina) e o pico **9** como 6,8-di-*C*- $\beta$ -glicosilcrisina. Os espectros de íons produto obtidos para estes picos em ambos os modos de ionização também estão de acordo com o esperado para estas

substâncias (BECCHI; FRAISSE, 1989; CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Um exame destes espectros (**Figuras 7** e **9** do **APÊNDICE B**) revela padrões de fragmentação característicos de di-*C*-glicosilflavonas: perda de H<sub>2</sub>O [M-H - 18]<sup>-</sup> e fragmentação dos açúcares produzindo os íons [(M-H) - 90]<sup>-</sup>, [(M-H) - 120]<sup>-</sup>, [aglicona + 113]<sup>-</sup> e [aglicona + 83]<sup>-</sup> no modo de ionização negativa; e uma intensa fragmentação das unidades de açúcar no modo de ionização positiva, o que não é de grande utilidade para a determinação estrutural (BECCHI; FRAISSE, 1989; CUYCKENS; CLAEYS, 2004). Confirmando a identificação destes picos, as massas moleculares acuradas encontradas (**Tabela 7**) em ambos os modos de ionização estão de acordo com as calculadas para vicenina-2 (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>; [M+H]<sup>+</sup> 595,1663 e [M-H]<sup>-</sup> 593,1506) e 6,8-di-*C*-β-glicosilcrisina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>; [M+H]<sup>+</sup> 577,1557 e [M-H]<sup>-</sup> 579,1714).

Os espectros de massas obtidos em ambos os modos de ionização para o pico **5** (**Tabela 7**) apresentaram picos base 16 u.m.a. maiores que aquele da vicenina-2, sugerindo uma estrutura similar com uma hidroxila adicional. Esta hipótese foi confirmada pelas massas moleculares acuradas obtidas (**Tabela 7**), as quais sugerem a fórmula molecular  $C_{27}H_{30}O_{16}$  para esta substância. O espectro de íons produto obtido no modo de ionização negativa (**Figura 5** do **APÊNDICE B**) mostra exatamente o mesmo padrão de fragmentação observado para as duas outras di-C-glicosilflavonas identificadas (**Figuras 7** e **9** do **APÊNDICE B**), apresentando em relação aos espectros destas duas substâncias um aumento de 16 u.m.a. (um átomo de oxigênio, no caso da vicenina-2) ou 32 u.m.a. (dois átomos de oxigênio, no caso da 6,8-di-C- $\beta$ -glicosilcrisina) para todos os íons produtos observados. Neste espectro (**Figura 5** do **APÊNDICE B**), os íons produtos *m/z* 399 e 369 correspondem aos fragmentos [aglicona + 113]<sup>-</sup> e [aglicona + 83]<sup>-</sup>, confirmando uma aglicona com massa molecular 286, o que sugere a flavona luteolina. A

ausência de um íon produto [(M-H) - 60]<sup>-</sup>, o qual é diagnóstico para *C*-pentose em flavonóides, assim como a presença de [(M-H) - 90]<sup>-</sup> e [(M-H) - 120]<sup>-</sup>, confirmam que os açúcares substituintes são hexoses (BECCHI; FRAISSE, 1989; CARISTI et al., 2003; CUYCKENS; CLAEYS, 2004; GATTUSO et al., 2006). Este fato, juntamente com um deslocamento da banda II acima de 270nm no espectro de UV (em concordância com um anel A de flavona com o padrão de substituição proposto) confirmam a presença de duas hexoses nas posições 6 e 8 da aglicona, as quais são as posições mais comuns para *C*-glicosilações em flavonóides (CUYCKENS; CLAEYS, 2004; GATTUSO et al., 2006; MARKHAM, 1982). Além disso, um ombro em 290nm na banda II do espectro de UV, característico de sistemas tipo catecol no anel B de flavonas (3'4'-di-OH), confirma a presença de duas hidroxilas neste anel (MARKHAM, 1982). A análise de todos estes dados em conjunto e a comparação com os descritos na literatura (GATTUSO et al., 2006) levaram a atribuição do pico cromatográfico **5** à flavona 6,8-di-*C*-β-glicosilluteolina, também reconhecida na literatura como lucenina-2.

# cumaroilglicosil-flavonóis

Dois outros picos que ocorrem próximos um do outro e apresentam espectros de UV quase idênticos entre si foram atribuídos à cumaroilglicosil-flavonóis. Primeiramente, o pico **28** foi identificado pela coincidência de seu espectro de UV (**Figura 28** do **APÊNDICE B**) e tempo de retenção com um padrão da substância tilirosídeo, já isolada anteriormente de outra espécie do gênero *Lychnophora* (CHICARO et al., 2004). A massa molecular acurada obtida para este pico (**Tabela 7**) confirma a fórmula molecular do tilirosídeo: C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>. A presença de *m/z* 309 no espectro de íons produto no modo de ionização positiva (**Figura 28** do **APÊNDICE** 

97

**B**; **Tabela 7**) é essencial para a confirmação da presença de uma unidade cumaroilglicose. Como uma unidade cumaroilglicose possui a mesma massa molecular nominal (ou seja, 309 u.m.a.) de uma unidade rutinose (glicose + ramnose) e ambas são de ocorrência relativamente comum em flavonóides, a obtenção de um espectro de íons produto com massas moleculares acuradas foi necessária para a diferenciação entre estas duas possibilidades. Assim, a massa molecular acurada obtida para tal íon (*m/z* 309,0967; **Tabela 7**) confirmou a fórmula molecular de uma unidade cumaroilglicose:  $C_{15}H_{17}O_7$ , ao passo que uma unidade rutinose tem uma fórmula molecular  $C_{12}H_{21}O_9$  e massa molecular exata de 309,1186. Similarmente, a massa acurada obtida para o íon produto *m/z* 147,0434 (**Tabela 7**) confirmou a presença de uma unidade cumaroil ( $C_9H_7O_2$ ), enquanto uma unidade ramnose ( $C_6H_{11}O_4$ ) tem uma massa exata calculada de 147,0657. O pico base *m/z* 287 no espectro de íons produto no modo de ionização positiva (**Figura 28** do **APÊNDICE B**) corresponde à aglicona kaempferol protonada.

Já o pico **29** produziu no espectro de massas, em ambos os modos de ionização, picos base 30 u.m.a. maiores que os obtidos para o tilirosídeo. As massas moleculares acuradas obtidas para este pico (**Tabela 7**) indicam a fórmula molecular  $C_{31}H_{26}O_{14}$ , sugerindo, portanto, que a molécula se trata do tilirosídeo com uma hidroxila e uma metila como substituintes adicionais. A presença de uma unidade cumaroilglicose é novamente confirmada pela fragmentação no modo de ionização positiva (**Figura 29** do **APÊNDICE B**) e pelas massas moleculares acuradas obtidas para os íons produto m/z 309 e 147 (**Figura 7**). A confirmação deste grupo leva a conclusão de que a hidroxila e a metila adicionais em relação ao tilirosídeo são obrigatoriamente substituintes da aglicona, o que é confirmado pelo íon produto m/z317, isto é: assim como o íon m/z 287 corresponde à aglicona protonada no espectro do tilirosídeo, o íon *m/z* 317 no espectro desta substância confirma a massa molecular da aglicona como 316 u.m.a. A análise conjunta dos dados e finalmente a comparação de tempos de retenção e espectros de UV com uma substância padrão levou a atribuição do pico **29** à substância 3-*O*-(6"-*O*-*E*-*p*-cumaroil)-β-glicosilisoramnetina (**Figura 27** do **APÊNDICE B**), a qual já foi isolada a partir de outra espécie do gênero *Lychnophora* (GRAEL et al., 2005).

### flavonóides não identificados

Quatro outros picos cromatográficos foram atribuídos a flavonóides, mas não puderam ter sua identidade totalmente elucidada através dos dados gerados pelas análises de CLAE-DAD-EM e -EM/EM.

O pico **33** apresentou um espectro de UV (**Figura 33** do **APÊNDICE B**) característico de flavanonas ou diidroflavonóis, ou seja, banda II em torno de 285nm e banda I como um ombro, em torno de 325nm (MARKHAM, 1982). As massas moleculares acuradas obtidas para os picos base nos espectros de massas em ambos os modos de ionização (**Tabela 7**) apontam para uma fórmula molecular  $C_{16}H_{14}O_4$ , sem nenhuma outra fórmula possível dentro de uma faixa de erro de ± 15ppm. Porém, devido provavelmente à baixa concentração desta substância nos extratos de *L. ericoides*, não foi possível a aquisição de espectros de íons produtos. Os dados de fórmula molecular, aliado ao espectro de UV, são coerentes com uma única substância dentre as já isoladas em todo o gênero *Lychnophora*: 7-hidróxi-4'-metoxiflavanona, já isolada a partir da própria espécie *L ericoides*. No entanto, devido à indisponibilidade de um padrão desta substância não foi possível confirmar esta atribuição.

Os espectros de massas obtidos em ambos os modos de ionização para o pico **44** (**Tabela 7**) indicam uma fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>, sem nenhuma outra fórmula possível dentro de uma faixa de erro de ± 15ppm. Similarmente ao pico **33**, também não foi possível obter espectros de íons produto para esta substância. Uma pesquisa criteriosa na ferramenta de buscas SciFinder mostrou que as únicas substâncias com esta fórmula molecular identificadas em espécies da família Asteraceae são lactonas sesquiterpênicas do tipo guaianolido (SCHORR et al., 2002) e trimetóxi-chalconas. Porém, nenhuma destas duas classes de compostos pode ter um espectro de UV como aquele produzido pelo pico **44** (**Figura 44** do **APÊNDICE B**), o qual parece ser relativo a um diidroflavonol ou flavanona. Portanto, esta substância continua sem identificação, conhecendo-se apenas sua fórmula molecular.

O pico **31** também produziu um espectro de UV (**Figura 31** do **APÊNDICE B**) característico de uma flavanona ou diidroflavonol, com absorção máxima em 287nm e um ombro em torno de 330nm. Porém, nenhum dado pôde ser obtido por espectrometria de massas, provavelmente devido a um baixo potencial de ionização em ambos os modos de ionização, aliada a baixa concentração deste composto nos extratos. De maneira semelhante, somente espectros de UV foram obtidos para os picos **49** a **52** (**Figuras 49** e **52** do **APÊNDICE B**), visto que, aparentemente, estes picos têm potencial de ionização muito baixo em ambos os modos de ionização, no sistema utilizado.

Dentre os flavonóides aqui identificados nos extratos de *L. ericoides*, a maioria já havia sido isolada a partir de extratos desta ou de outras espécies do gênero. As substâncias 2',4',6'-triidroxichalcona, 2',6'-diidroxi-4'-metoxichalcona, 3-*O*-acetilalpinona, 3-*O*-propionilalpinona e 6,8-di-*C*-β-glicosilluteolina estão sendo reportadas pela primeira vez na subtribo Lychnophorinae. As substâncias 3-*O*metilquercetina, tilirosídeo e 3-*O*-(6"-*O*-*E*-*p*-cumaroil)-β-glicosilisoramnetina já haviam sido isoladas a partir de outras espécies do gênero *Lychnophora* (CHICARO et al., 2004; GRAEL et al., 2005; TAKEARA et al., 2003), mas não de *L. ericoides*. Os demais flavonóides já haviam sido isolados a partir de própria espécie *L. ericoides* (BORELA et al., 1992; GOBBO-NETO et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2003; SARGENTI; VICHNEWSKI, 2000).

#### 4.4.3.Lactonas sesquiterpênicas

A grande maioria dos picos cromatográficos atribuídos a lactonas sesquiterpênicas (LST) foi identificado por comparação de tempos de retenção e espectros de UV com padrões isolados em estudo fitoquímico anterior de L. ericoides (SAKAMOTO et al., 2003) ou de outras espécies da subtribo Lychnophorinae. No modo de ionização positiva todas as LST produziram bons espectros de íons produtos. Porém, como estudos racionalizando as vias de fragmentação desta classe de substâncias ainda são raros e restritos às LST do tipo goyazensolido (CROTTI et al., 2005), fica difícil uma elucidação estrutural somente com base em tais espectros. Assim, as LST com esqueleto do tipo goyazensolido tiveram seus espectros de íons produto comparados com os padrões de fragmentação relatados por Crotti et al. (2005). Já no caso das LST com esqueleto do tipo eremantolido, devido à indisponibilidade de dados na literatura, os espectros de íons produtos obtidos foram comparados com espectros de padrões produzidos pela infusão direta na fonte de ionização e com os obtidos para aquelas LST que já estavam identificadas. Deve ser ressaltado que, embora muitas LST também tenham sido detectadas no modo de ionização negativa, os picos observados foram muito pouco intensos, o que indica uma baixa capacidade de ionização neste modo e, por isso, não foi possível a obtenção de espectros de massas de íons produto para estas substâncias neste modo de ionização.

Conforme já esperado pelo histórico fitoquímico do gênero *Lychnophora*, todas as LST identificadas são do tipo furanoeliangolido, dos subtipos goyazensolido ou eremantolido. Para estes tipos de LST, os espectros de UV apresentam uma única banda de absorção com máximo entre 260 e 270nm, o que facilita a identificação dos picos cromatográficos que correspondem a LST.

#### LST com esqueleto do tipo goyazensolido

O pico **27** foi atribuído à LST centraterina por comparação de seu tempo de retenção com o de um padrão desta substância já isolada anteriormente de *L. ericoides* (SAKAMOTO et al., 2003). As massas moleculares acuradas obtidas em ambos os modos de ionização (**Tabela 7**) estão de acordo com aquelas calculadas para a centraterina (C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>; [M+H]<sup>+</sup> 375,1444 e [M-H]<sup>-</sup> 373,1287) e o espectro de íons produto obtido (**Figura 27** do **APÊNDICE B**) é igual ao relatado por Crotti et al. (2005), confirmando esta atribuição. Deve ser ressaltado que esta substância tem tempo de retenção muito próximo ao do ácido 3,4,5-tri-*O-E*-cafeoilquínico (pico **26**), no entanto estas substâncias são facilmente diferenciadas por meio dos espectros de UV, ou mesmo da absorção relativa nos dois comprimentos de onda utilizados nas análises CLAE-DAD, pois as LST não absorvem a 325nm, o comprimento de absorção máxima dos derivados clorogênicos.

O pico **32** foi atribuído à LST 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido também pela comparação de seu tempo de retenção com um padrão desta substância. A massa molecular acurada obtida para este pico (**Tabela 7**) está de acordo com a calculada

para [4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido + H]<sup>+</sup> 347,1495 e seu espectro de íons produto (**Figura 32** do **APÊNDICE B**) apresenta o mesmo padrão de fragmentação relatado para esta LST (CROTTI et al., 2005).

Também pela comparação com substâncias padrões, os picos 36 e 37 foram atribuídos, respectivamente, às LST 4,5-diidrolychnopholido e tiglato de zexbrevanolido (Figuras 36 e 37 do APÊNDICE B), ambas já isoladas da própria espécie L. ericoides. Estas duas substâncias possuem esqueletos de LST idênticos, diferindo apenas na estereoquímica do éster ligado ao carbono 8 do esqueleto LST: um angelato (dupla ligação trans) no caso do 4,5-diidrolychnopholido e um tiglato (dupla ligação cis) no caso do tiglato de zexbrevanolido. Possuem, portanto, a mesma fórmula molecular ( $C_{20}H_{24}O_6$ ), a qual foi confirmada para os dois picos pelas massas moleculares acuradas obtidas (Tabela 7). Já os espectros de íons produto obtidos para as duas substâncias (Figuras 36 e 37 do APÊNDICE B) são praticamente idênticos (o que mostra que a estereoquímica da dupla ligação do éster não tem influência na fragmentação destas moléculas) e estão de acordo com os relatados para o 4,5-diidrolychnopholido (CROTTI et al., 2005). Deve ser ressaltado que o pico cromatográfico 37 (tiglato de zexbrevanolido) tem tempo de retenção muito próximo ao da flavanona pinocembrina, co-eluindo com esta quando ambas estão presentes no extrato analisado. Estas substâncias podem ser, no entanto, facilmente individualizadas pelos espectros de UV ou simplesmente pela absorção relativa nos comprimentos de onda utilizados nas análises de CLAE-DAD (somente a pinocembrina absorve em 325nm). Além disso, dentre as cinco populações de L. ericoides analisadas, o tiglato de zexbrevanolido só ocorre em indivíduos de uma delas, conforme será discutido adiante.

De maneira semelhante, o pico **43** foi atribuído à LST lychnopholido pela comparação de seu tempo de retenção com o de um padrão desta substância. A massa molecular acurada obtida (**Tabela 7**) é coerente com a massa molecular exata calculada para a molécula protonada do lychnopholido: [M+H]<sup>+</sup> 359,1495. O espectro de íons produto obtido para o íon precursor [M+H]<sup>+</sup> (**Figuras 43** do **APÊNDICE B**) também está de acordo com o descrito na literatura (CROTTI et al., 2005), confirmando a atribuição do pico **43** à LST lychnopholido.

# LST com esqueleto do tipo eremantolido

Inicialmente, o pico 24 foi atribuído à LST 15-hidróxi-16α-(1'-metilprop-1'Zenil)-eremantolido (Figura 24 do APÊNDICE B) por comparação de seu tempo de retenção com um padrão desta substância, isolado anteriormente da própria espécie L. ericoides (SAKAMOTO et al., 2003). No espectro de massas obtido para este pico cromatográfico, dois íons são observados: m/z 359 e m/z 377, o primeiro ocorrendo como pico base e o segundo com uma baixa intensidade relativa (Tabela 7). A massa molecular acurada obtida para m/z 377 (**Tabela 7**) confirma a fórmula molecular correspondente a [15-hidróxi-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido + H]  $(C_{20}H_{25}O_7)$ , levando a conclusão que o pico base m/z 359 corresponde ao íon originado pela dissociação na fonte de ionização de uma molécula neutra de água (18 u.m.a.), a partir da LST protonada. O espectro de íons produto obtido a partir do íon precursor m/z 377 confirma esta fragmentação (m/z 377  $\rightarrow$  359) (Figura 24 do **APENDICE B**). O espectro de íons produto obtido a partir do íon precursor *m/z* 359 (Figura 24 do APÊNDICE B) é idêntico ao obtido para o padrão de 15-hidróxi-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido, confirmando a atribuição do pico 24 à esta substância.

104

Para o pico 17 também foram observados dois íons no espectro de massas, os quais, devido a uma diferença de -14 u.m.a. em relação aos íons do pico 24, sugerem uma molécula com a mesma estrutura básica que a substância anterior com a subtração de uma metila (Tabela 7). Esta proposta é confirmada pela fórmula molecular calcula para m/z 363,1447: C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>7</sub>, sem nenhuma outra fórmula possível em um intervalo de ± 15ppm. Uma análise na literatura mostra que somente uma substância com esta fórmula molecular foi relatada para as plantas da subtribo Lychnoporinae: o 15-hidroxieremantolido C, o qual já foi isolado a partir de L. rupestris (CUNHA et al., 1995), Eremanthus goyazensis (VICHNEWSKI et al., 1989) e E. glomerulatus (BARROS al., 1985). Além disso, os íons produto gerados pela fragmentação deste pico (Figura 17 do APÊNDICE B) mostram um padrão bem semelhante ao anterior (Figura 24 do APÊNDICE B), com diferenças de 14 u.m.a. para os íons na região de massas moleculares mais elevadas, ou seja, nas primeiras fragmentações. A atribuição da LST 15-hidroxieremantolido C ao pico 17 foi finalmente confirmada pela comparação com o tempo de retenção de um padrão desta substância. Finalmente, o íon produto m/z 203, ocorrente também no 15hidróxi-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido, é mais um indício de um mesmo esqueleto para ambas as estruturas, também indicando que a diferença entre as substâncias está realmente na cadeia lateral.

Os picos **34** e **35** foram também caracterizados por comparação de tempos de retenção com padrões e, assim, atribuídos respectivamente às LST 4,5diidroeremantolido C e 4,5-diidro-16 $\alpha$ -(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido, também já isoladas anteriormente de *L. ericoides* (SAKAMOTO et al., 2003). As massas moleculares acuradas obtidas para estes dois picos (**Tabela 7**) dão suporte a esta atribuição, sendo coerentes com as massas exatas calculadas para as moléculas protonadas das LST 4,5-diidroeremantolido C ( $C_{19}H_{24}O_6$ ;  $[M+H]^+$  349,1651) e 4,5diidro-16 $\alpha$ -(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido ( $C_{20}H_{26}O_6$ ;  $[M+H]^+$  363,1808). Além disso, espectros de íons produto obtidos por infusão direta para os íons precursores  $[M+H]^+$  e  $[MH-H_2O]^+$  de padrões destas duas substâncias se mostraram idênticos àqueles obtidos para os picos **34** e **35** (**Figuras 34** e **35** do **APÊNDICE B**).

De modo similar, o pico **41** também foi atribuído a uma LST do tipo eremantolido. A comparação de tempos de retenção e de espectros de íons produto deste pico (**Figura 41** do **APÊNDICE B**) com os obtidos para um padrão, bem como a análise das massas moleculares acuradas medidas (**Tabela 7**), permitem a atribuição deste pico à LST  $16\alpha$ -(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido. Similarmente ao que ocorre com a LST tiglato de zexbrevanolido, este pico cromatográfico tem tempo de retenção muito próximo ao do flavonóide 3-O-acetilpinobanksina, co-eluindo com esta quando ambas estão presentes no extrato analisado. Porém, novamente, seus sinais podem ser individualizados pelos espectros de UV ou pela absorção relativa nos comprimentos de onda utilizados, visto que somente a 3-O-acetilpinobanksina absorve em 325nm. Além disso, dentre as cinco populações de *L. ericoides* analisadas, o  $16\alpha$ -(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido só ocorre em indivíduos de uma delas, conforme será discutido adiante.

Deve ser ressaltado que nos espectros de massas obtidos pelas análises de CLAE-DAD-MS de todas as LST do tipo eremantolido aqui identificadas são observados dois íons: a molécula protonada ([M+H]<sup>+</sup>), em baixa intensidade relativa; e a molécula desidratada pela perda de uma molécula neutra de H<sub>2</sub>O por dissociação na fonte de ionização ([MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>). Deste modo, a observação de ambos os sinais em um espectro de massas de um pico cujo espectro de UV é característico de LST é um forte indício de que a LST seja um eremantolido, já que

esta dissociação de H<sub>2</sub>O na fonte de ionização não foi observada em nenhuma das LST do tipo goyazensolido descritas na literatura e/ou aqui identificadas (CROTTI et al., 2005).

Assim, por perderem uma molécula neutra de H<sub>2</sub>O por dissociação na fonte de ionização, conforme discutido acima, dois outros picos foram atribuídos a LST do tipo eremantolido. Os espectros de UV, o padrão de fragmentação observado nos espectros de íons produto, e as fórmulas moleculares obtidas para ambos também indicam que se tratam de LST. Deste modo, pico 39 produziu massas moleculares acuradas (**Tabela 7**) que sugerem a fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_6$ , sem nenhuma outra fórmula molecular possível dentro de uma faixa de 15ppm. Duas substâncias isoladas a partir de espécies da subtribo Lychnophorinae correspondem a esta fórmula molecular: eremantolido B [isolado a partir de *E. incanus* (HERZ et al., 1980) e E. elaeagnus (LE-QUESNE et al., 1978)] e 4,5-diidro-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)eremantolido, a qual já foi identificada como sendo o pico 35. Os espectros de íons produtos obtidos para os íons precursores [M+H]<sup>+</sup> e [MH-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (Figura 39 do **APÊNDICE B)** mostraram um perfil de fragmentação guase idêntico aos obtidos para o pico 35 [4,5-diidro-16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido] (Figura 35 do **APENDICE B**). Estabelecendo-se um paralelo com o observado para o par de isômeros cis-trans tiglato de zexbrevanolido (pico 37) e 4,5-diidrolychnopholido (pico 36), pode-se dizer que a substância em questão possui o mesmo esqueleto carbônico básico que a do pico 35, porém com a cadeia lateral em configuração cis, sugerindo, portanto, a LST 4,5-diidro-16 $\alpha$ -(1'-metilprop-1'*E*-enil)-eremantolido. Porém, para uma confirmação inequívoca desta substância seria necessário seu isolamento e a aplicação de outros métodos de análise para a determinação definitiva de sua estrutura.

O pico **30**, por sua vez, gerou massas moleculares acuradas (**Tabela 7**; **Figura 30** do **APÊNDICE B**) que indicam a fórmula molecular  $C_{19}H_{24}O_6$ , sem nenhuma outra fórmula possível dentro de uma faixa de erro de 15ppm. Dentre as substâncias já relatadas para o gênero *Lychnophora*, somente as LST 4,5diidroeremantolido C e eremantolido A possuem a fórmula molecular obtida, porém o tempo de retenção deste pico não coincide com os obtidos para padrões de nenhuma das duas substâncias e, assim, para a substância correspondente a este pico é possível atribuir somente a fórmula molecular.
Tabela 7. Identificação dos picos cromatográficos obtidos a partir dos extratos foliares de L. ericoides e dados de UV e espectrometria

de massas obtidos por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM. Os números dos picos se referem às Figuras 10 e 11.

Pico	t.r. (min)	Substâncias	ionização positiva íons precursores <sup>a</sup>	ionização positiva EM/EM <sup>b</sup>	ionização negativa íons precursores <sup>a</sup>	ionização negativa EM/EM <sup>b</sup>	UV max (nm)
1	5,6	ácido 3-O-E-cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 355,1037 <sup>p.b.</sup> [MH+Na] <sup>+</sup> 377 [MH-AQ] <sup>+</sup> 163	<u>15eV:</u> 355→163 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 353,0879 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 191	<u>15eV:</u> 353→191 <sup>p.b.</sup> ; 179	299; 324
2	10,6	ácido 3-O-E-feruloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 369,1195 [M+Na] <sup>+</sup> 391 [MH-AQ] <sup>+</sup> 177 <sup>p.b.</sup>		[M-H] <sup>-</sup> 367,1040 <sup>p.b.</sup> [FER-H] <sup>-</sup> 193	<u>15eV:</u> 367→193 <sup>p.b.</sup> ; 191	299; 325
3	10,9	ácido 4-O-E-cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 355,1038 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 377 [MH-AQ] <sup>+</sup> 163	<u>15eV</u> : 355→163 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 353,0881 <sup>p.b.</sup> [M-CAF-H <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> 173	<u>15eV:</u> 353→191; 179; 173 <sup>p.b.</sup>	300; 325
4	11,8	ácido 5-O-E-cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 355,1035 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 377 [MH-AQ] <sup>+</sup> 163	<u>15eV:</u> 355→163 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 353,0879 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 191	<u>15eV:</u> 353→191 <sup>p.b.</sup> ; 179	299; 325
5	17,4	lucenina-2 (6,8-di-C-β-glicosilluteolina)	[M+H] <sup>+</sup> 611,1615 <sup>p.b.</sup> [MH-H₂O] <sup>+</sup> 593	<u>15eV:</u> 611→593; 575; 557; 545; 539; 527; 497; 491; 473 <sup>p.b.</sup> ; 443; 425	[M-H] <sup>-</sup> 609,1450 <sup>p.b.</sup>	<u>25eV:</u> 609→591; 519; 489 <sup>p.b.</sup> ; 399; 369	271; 290sh; 339
6	18,8	ácido 4-O-E-feruloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 369,1195 [M+Na] <sup>+</sup> 391 [MH-AQ] <sup>+</sup> 177 <sup>p.b.</sup>		[M-H] <sup>-</sup> 367,1037 <sup>p.b.</sup> [M-FER] <sup>-</sup> 191 [M-FER-H₂O] <sup>-</sup> 173	<u>15eV:</u> 367→173 <sup>p.b.</sup> ; 191	300; 324
7	20,7	vicenina-2 (6,8-di-C-β-glicosilapigenina)	[M+H] <sup>+</sup> 595,1655 <sup>p.b.</sup> [MH-H₂O] <sup>+</sup> 577	<u>15eV:</u> 595→577; 559; 541; 529; 523; 511; 481; 475; 457 <sup>p.b.</sup> ; 427; 409	[M-H] <sup>-</sup> 593,1518 <sup>p.b.</sup>	<u>25eV:</u> 593→575; 503; 473 <sup>p.b.</sup> ; 383; 353	271; 334
8	21,6	ácido 5-O-E-feruloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 369,1193 [M+Na] <sup>+</sup> 391 [MH-AQ] <sup>+</sup> 177 <sup>p.b.</sup>		[M-H] <sup>-</sup> 367,1039 <sup>p.b.</sup> [M-FER] <sup>-</sup> 191	<u>15eV:</u> 367→191 <sup>p.b.</sup> ; 173	299; 324
9	25,8	6,8-di-C-β-glicosilcrisina	[M+H] <sup>+</sup> 579,1708 <sup>p.b.</sup> [MH-H₂O] <sup>+</sup> 561	<u>15eV:</u> 579→561; 543; 525; 513; 507; 495; 465; 459; 441 <sup>p.b.</sup> ; 411; 393	[M-H] <sup>-</sup> 577,1570 <sup>p.b.</sup>	<u>25eV:</u> 577→559; 487; 457 <sup>p.b.</sup> ; 367; 337	272; 317
10	36,1	ácido 3,4-di-O-E-cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 517,1355 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 499 <sup>p.b.</sup> [MH-AQ] <sup>+</sup> 163	<u>15eV:</u> 499→319 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 515,1204 <sup>p.b.</sup>	<u>15eV:</u> 515→353 <sup>p.b.</sup> ; 335; 191; 179; 173	300; 325

Pico	t.r. (min)	Substâncias	ionização positiva íons precursores <sup>a</sup>	ionização positiva EM/EM <sup>b</sup>	ionização negativa íons precursores <sup>a</sup>	ionização negativa EM/EM <sup>b</sup>	UV max (nm)
11	38,9	ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico	$[M+H]^{+} 517,1354$ $[MH-H_{2}O]^{+} 499^{p.b.}$	<u>15eV:</u> 499→319 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 515,1207 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 353	<u>15eV:</u> 515→353 <sup>p.b.</sup> ; 191; 179	300; 325
12	44,5	ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 517,1357 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 499 <sup>p.b.</sup> [MH-AQ] <sup>+</sup> 163	<u>15eV:</u> 499→319 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 515,1206 <sup>p.b.</sup>	<u>15eV:</u> 515→353 <sup>p.b.</sup> ; 191; 179; 173	299; 325
13	45,3	ácido feruloil-cafeoilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 531,1510 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 513 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 553	<u>15eV:</u> 513→333; 319; 177 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 529,1360 <sup>p.b.</sup>		299; 324
14	46,1	ácido feruloil-cafeoilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 531,1510 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 513 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 553	<u>15eV:</u> 513→333; 319; 177 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 529,1358 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 367	<u>15eV:</u> 529→367 <sup>p.b.</sup> ; 335; 193; 173	300; 325
15	48,7	ácido feruloil-cafeoilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 531,1512 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 513 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 553	<u>15eV:</u> 513→333; 319; 177 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 529,1360 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 367	<u>15eV:</u> 529→367 <sup>p.b.</sup> ; 193	299; 324
16	49,6	ácido feruloil-cafeoilquínico*	[MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 513 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 553		[M-H] <sup>-</sup> 529,1361 <sup>p.b.</sup>		299; 324
17	50,9	15-hidroxieremantolido C	[M+H] <sup>+</sup> 363,1447 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 345 <sup>p.b.</sup>	<u>15eV:</u> 363→345; 301 <u>10eV:</u> 345→301; 283; 255 <sup>p.b.</sup> ; 203	[M-H] <sup>-</sup> 361,1297 <sup>p.b.</sup>		266
18	53,8	ácido feruloil-cafeoilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 531,1507 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 513 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 553	<u>15eV:</u> 513→333; 319; 177 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 529,1359 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 367	<u>15eV:</u> 529→367 <sup>p.b.</sup> ; 173	300; 324
19	55,0	ácido 3,4-di- <i>O-E-</i> feruloilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 545,1671 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 527 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 567	<u>15eV:</u> 527→333; 177 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 543,1514 <sup>p.b.</sup>	<u>20eV:</u> 543→367; 349 <sup>p.b.</sup> ; 193; 173	300; 325
20	55,7	ácido feruloil-cafeoilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 531,1513 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 513 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 553	<u>15eV:</u> 513→333; 319; 177 <sup>p.b.</sup> ; 163	[M-H] <sup>-</sup> 529,1359 <sup>p.b.</sup>	<u>15V:</u> 529→353; 191; 179; 173 <sup>p.b.</sup>	299; 324
21	58,3	pinobanksina	[M+H] <sup>+</sup> 273,0757 <sup>p.b.</sup>		[M-H] <sup>-</sup> 271,0614 <sup>p.b.</sup>	<u>23eV:</u> 271→253 <sup>p.b.</sup> ; 225; 209; 197; 185; 161	291; 335sh

Pico	t.r. (min)	Substâncias	ionização positiva íons precursores <sup>a</sup>	ionização positiva EM/EM <sup>b</sup>	ionização negativa íons precursores <sup>a</sup>	ionização negativa EM/EM <sup>b</sup>	UV max (nm)
22	60,1	ácido diferuloilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 545,1668 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 527 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 567	<u>15eV:</u> 527→333; 177 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 543,1519 <sup>p.b.</sup>		300; 325
23	63,4	3-O-metilquercetina	[M+H] <sup>+</sup> 317,0654 <sup>p.b.</sup>	<u>22eV:</u> 317→302 <sup>p.b.</sup> ; 301; 274; 273; 245; 229	[M-H] <sup>-</sup> 315,0495 <sup>p.b.</sup>	<u>17eV:</u> 315→300 <sup>p.b.</sup> ; 271; 255; 243	255; 268sh; 295; 355
24	64,2	15-hidróxi-16α-(1'-metilprop-1'Z- enil)- eremantolido	[M+H] <sup>+</sup> 377,1610 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 359 <sup>p.b.</sup>	<u>12eV:</u> 377→359; 315 <u>15eV:</u> 359→315; 297; 269; 241; 213; 203 <sup>p.b.</sup> ; 175	[M-H] <sup>-</sup> 375,1451 <sup>p.b.</sup>		268
25	65,8	ácido diferuloilquínico*	[M+H] <sup>+</sup> 545,1673 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 527 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 567		[M-H] <sup>-</sup> 543,1517 <sup>p.b.</sup>		300; 325
26	67,0	ácido 3,4,5-tri-O-E-cafeoilquínico	[M+H] <sup>+</sup> 679,1673 [MH-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 661 [MH-CAF-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 499 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 701	<u>15eV:</u> 679→661; 499; 163 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 677,1521 <sup>p.b.</sup> [M-CAF] <sup>-</sup> 515	<u>15eV:</u> 677→515 <sup>p.b.</sup> ; 353; 163	299; 325
27	67,6	centraterina	[M+H] <sup>+</sup> 375,1452 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 397	<u>15eV:</u> 375→275; 257; 239; 229 <sup>p.b.</sup> ; 211; 201; 183	[M-H] <sup>-</sup> 373,1272 <sup>p.b.</sup>		269
28	69,3	tilirosídeo [3- <i>O</i> -(6"- <i>O-E-p-</i> cumaroil)-β- glicosilkaempferol]	$[M+H]^{+} 595,1435^{p.b.}$ $[M+Na]^{+} 617$ $[cumaroilglicose]^{+} 309$ $[aglicona+H]^{+} 287$	<u>17eV:</u> 595→309,0967 291; 287 <sup>p.b.</sup> ; 165; 147,0448	[M-H] <sup>-</sup> 593,1269 <sup>p.b.</sup>	<u>20eV:</u> 593→447; 285 <sup>p.b.</sup>	267; 295sh; 315; 355sh
29	71,1	3- <i>O</i> -(6"- <i>O-E-p-</i> cumaroil)-β- glicosilisoramnetina	[M+H] <sup>+</sup> 625,1555 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 647 [aglicona+H] <sup>+</sup> 317 [cumaroilglicose] <sup>+</sup> 309	<u>17eV:</u> 625→317 <sup>p.b.</sup> ; 309,0969; 291; 165; 147,0434	[M-H] <sup>-</sup> 623,1375 <sup>p.b.</sup>	<u>20eV:</u> 623→477; 315 <sup>p.b.</sup>	267; 295sh; 315 355sh
30	72,9	<i>LST tipo eremantolido</i> C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup> 349,1659 [MH-H2O] <sup>+</sup> 331p.b.	<u>18eV:</u> 349→331; 241; 215; 189p.b.; 161 <u>15eV:</u> 331→ 241; 229; 189p.b.; 161			264

Pico	t.r. (min)	Substâncias	ionização positiva íons precursores <sup>a</sup>	ionização positiva EM/EM <sup>b</sup>	ionização negativa íons precursores <sup>a</sup>	ionização negativa EM/EM <sup>b</sup>	UV max (nm)
31	77,5	flavanona ou diidroflavonol					287; 330sh
32	78,9	4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido	[M+H] <sup>+</sup> 347,1501 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 369	<u>15eV:</u> 347→261; 243; 233; 215 <sup>p.b.</sup> ; 197; 187; 159			264
33	80,5	<i>flavanona</i> ou <i>diidroflavonol</i> C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup> 271,0977 <sup>p.b.</sup>		[M-H] <sup>-</sup> 269,0808 <sup>p.b.</sup>		283; 325sh
34	81,3	4,5-diidroeremantolido C	[M+H] <sup>+</sup> 349,1660 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 331 <sup>p.b.</sup>	$\begin{array}{c} \underline{12eV:}\\ 349 \rightarrow 331; \ 189^{\text{p.b.}}; \ 161\\ \underline{15eV:}\\ 331 \rightarrow 285; \ 257; \ 217;\\ 189^{\text{p.b.}}; \ 161 \end{array}$	[M-H] <sup>-</sup> 347,1497 <sup>p.b.</sup>		265
35	86,8	4,5-diidro-16α-(1'-metilprop-1'Z- enil)-eremantolido	[M+H] <sup>+</sup> 363,1816 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 345 <sup>p.b.</sup>	<u>15eV:</u> 363→345; 317; 203 <sup>p.b.</sup> ; 189; 161 <u>15eV:</u> 345→317; 219; 203; 189 <sup>p.b.</sup> ; 161	[M-H] <sup>-</sup> 361,1644 <sup>p.b.</sup>		265
36	88,3	4,5-diidrolychnopholido	[M+H] <sup>+</sup> 361,1644 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 383	<u>10eV:</u> 361→261; 243; 233; 215 <sup>p.b.</sup> ; 197; 187; 169			264
37	92,9	tiglato de zexbrevanolido	[M+H] <sup>+</sup> 361,1649 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 383	<u>10eV:</u> 361→261; 243; 233; 215 <sup>p.b.</sup> ; 197; 187; 169			264
38	93,3	pinocembrina	[M+H] <sup>+</sup> 257,0805 <sup>p.b.</sup>		[M-H] <sup>-</sup> 255,0650 <sup>p.b.</sup>	<u>20eV:</u> 255→213 <sup>p.b.</sup> ; 211; 185; 171; 169; 151	289; 326sh
39	94,7	4,5-diidro-16 $\alpha$ -(1'-metilprop-1' <i>E</i> - enil)-eremantolido <i>ou</i> C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup> 363.1815 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 345 <sup>p.b.</sup>	18eV:         363→345; 203; 189 <sup>p.b.</sup> 15eV:         345→317; 219; 203;         189 <sup>p.b.</sup> ; 161	[M-H] <sup>-</sup> 361,1645 <sup>p.b.</sup>		264
40	96,5	2',4',6'-triidroxichalcona	[M+H] <sup>+</sup> 257,0809 <sup>p.b.</sup>	<u>15eV:</u> 257→239; 215; 179; 173; 153 <sup>p.b.</sup>	[M-H] <sup>-</sup> 255,0651 <sup>p.b.</sup>	<u>20eV:</u> 255→213; 211 <sup>p.b.</sup> ; 185; 171; 169; 151	343

Pico	t.r. (min)	Substâncias	ionização positiva íons precursores <sup>a</sup>	ionização positiva EM/EM <sup>b</sup>	ionização negativa íons precursores <sup>a</sup>	ionização negativa EM/EM <sup>b</sup>	UV max (nm)
41	99,9	16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)- eremantolido	[M+H] <sup>+</sup> 361,1643 [MH-H₂O] <sup>+</sup> 343 <sup>p.b.</sup>	15eV:           361→343; 215; 187 <sup>p.b.</sup> 13eV:           343→299; 281; 269;           243; 215; 187 <sup>p.b.</sup> ; 159	[M-H] <sup>-</sup> 359,1502 <sup>p.b.</sup>		267
42	99,3	3-O-acetilpinobanksina	$[M+H]^{+} 315,0875^{p.b.}$ $[MH-C_{2}H_{2}O]^{+} 273$	<u>18eV:</u> 315→273; 255; 227 <sup>p.b.</sup> ; 199; 181; 153	[M-H] <sup>-</sup> 313,0715 <sup>p.b.</sup> [M-HAc] <sup>-</sup> 253	<u>25eV:</u> 313→271; 253 <sup>p.b.</sup> ; 225; 209; 197	292; 335sh
43	101,1	lychnopholido	[M+H] <sup>+</sup> 359,1489 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 381	<u>15eV:</u> 359→259; 241; 231; 213 <sup>p.b.</sup> ; 185			267
44	108,9	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup> 329,1379 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 351		[M-H] <sup>-</sup> 327,1236 <sup>p.b.</sup>	<u>15eV:</u> 327→312 <sup>p.b.</sup> ; 179; 164; 147	276
45	118,3	2',6'-diidróxi-4'-metoxichalcona	[M+H] <sup>+</sup> 271,0979 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 293	<u>15eV:</u> 271→167 <sup>p.b.</sup> ; 131	[M-H] <sup>-</sup> 269,0807 <sup>p.b.</sup>	<u>20eV:</u> 269→254 <sup>p.b.</sup> ; 253; 236; 226; 225; 191; 177; 165	341
46	121,2	3-O-propionilalpinona ou C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup> 343,1538 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 365	<u>10eV:</u> 343→329; 287 <sup>p.b.</sup> ; 269; 241; 213			274; 340sh
47	122,4	pinostrobina	[M+H] <sup>+</sup> 271,0977 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 293	<u>15eV:</u> 271→167 <sup>p.b.</sup> ; 131			290; 330sh
48	124,0	3-O-acetilalpinona	[M+H] <sup>+</sup> 329,1034 <sup>p.b.</sup> [M+Na] <sup>+</sup> 351	<u>18eV:</u> 329→287; 269; 241; 213 <sup>p.b.</sup> ; 195; 167			287; 330sh
49	126,8	flavanona ou diidroflavonol					276; 340sh
50	130,9	flavanona ou diidroflavonol					275; 340sh
51	131,8	flavanona ou diidroflavonol					276; 340sh
52	137,8	flavanona ou diidroflavonol					276; 340sh

**p.b.** = pico base ; AQ = ácido quínico ; CAF = cafeoil ; FER = feruloil **sh** = ombro no espectro de UV; \* = isômeros posicionais de ácidos clorogênicos que não puderam ser individualizados.

### 4.5. Variações no conteúdo de metabólitos secundários

Como o intuito deste estudo é verificar a existência ou não de variações no conteúdo de metabólitos secundários, e visto que é inviável a construção de curvas de calibração para todos os picos, conforme exposto anteriormente, todas as comparações entre conteúdos de metabólitos secundários foram realizadas com base nas áreas relativas (área do pico / área do p.i.) obtidas para cada pico. No entanto, para determinar a concentração de metabólitos em porcentagem por peso seco das folhas, as áreas relativas podem ser inseridas nas equações obtidas para as curvas de calibração, determinando-se assim a concentração da substância, em  $\mu$ g/mL, no extrato analisado. Esta concentração é então convertida em porcentagem por peso seco das folhas multiplicando-se a concentração por 0,3 (o extrato é preparado em 3mL) e dividindo-se o valor obtido por 20 (são utilizados 20mg de material vegetal para a extração), obtendo-se assim a porcentagem da substância por peso seco das folhas.

#### 4.5.1. Variações intra-individuais

Para garantir que a amostragem (coleta) realizada em um dado indivíduo seja representativa da situação metabólica das folhas da planta como um todo, naquele dado momento, algumas análises foram realizadas para detectar possíveis variações intra-individuais no conteúdo de metabólitos secundários, bem como a amplitude destas variações.

Primeiramente, oito indivíduos (1-III - 05/2000; 1-VIII - 02/2002; 1-X - 01/2002; 2-IV - 01/2002; 3-VI - 01/2002; 4-IV - 01/2002; 4-I -03/2002; 5-VIII - 01/2002) foram analisados para verificar possíveis variações nas concentrações de metabólitos secundários entre as folhas provenientes de diferentes ramos de um mesmo

indivíduo. A determinação deste tipo de variação metabólica é imprescindível para qualquer estudo de variações metabólicas temporais ou populacionais, por determinar até que ponto uma dada variação no conteúdo de um metabólito não é, na verdade, uma variação do acúmulo deste metabólito em diferentes ramos da mesma planta.

Assim, as folhas provenientes de dois ramos de cada um dos indivíduos selecionados foram submetidas ao método de análise desenvolvido e foram determinadas as porcentagens de variação de cada metabólito entre os ramos de cada planta. O gráfico da **Figura 13** mostra as variações máximas e médias (entre todos os indivíduos analisados) observadas para cada metabólito. Variações quantitativas, mas não qualitativas, foram observadas e, de modo geral, as médias das variações estão entre 10 e 15%, sendo que as maiores variações observadas foram em torno de 20%. Pode-se então assumir que, de modo geral, variações abaixo de 20% podem ser relacionadas a uma variação intra-individual no acúmulo do metabólito e devem ser desconsideradas. Inversamente, tem-se a certeza de que qualquer variação observada acima deste patamar é significativa.



**Figura 13.** Gráfico mostrando as variações médias (entre oito indivíduos analisados) e máximas de metabólitos secundários observadas entre os ramos de um mesmo indivíduo de *L.ericoides*.

Também são esperadas variações no conteúdo de metabólitos secundários em função da idade das folhas. Neste sentido, análises realizadas com folhas novas (apicais nos ramos de L. ericoides) e velhas (basais nos ramos) de um mesmo ramo mostraram que o envelhecimento das folhas resulta em uma pronunciada redução no conteúdo de todos os metabólitos secundários das folhas de L. ericoides, que está exemplificada pelos cromatogramas da Figura 14. A Figura 15 mostra um gráfico das variações médias e máximas encontradas para cada metabólito entre folhas jovens e velhas de um mesmo ramo nos indivíduos analisados (dois indivíduos por população: 1-III, 1-X, 2-I, 2-IV, 3-III, 3-VI, 4-I, 4-IV, 5-VII e 5-VIII; todos coletados em janeiro/2002). Este tipo de variação é bem documentada na literatura, e sua ocorrência já foi notada em uma ampla variedade de classes de metabólitos secundários (GERSHENZON et al., 1989; HALL; LANGENHEIN, 1986; HARTMANN, 1996), incluindo aquelas características de L. ericoides tais como LST (SPRING; BIENERT, 1987), flavonóides (SLIMESTAD, 1998) e ácidos fenólicos (KOEPPE et al., 1970). Tais variações podem estar relacionadas a uma maior taxa biossintética de tecidos mais jovens ou à reciclagem de metabólitos, conduzindo-os dos tecidos velhos, em processo de atrofiamento, em direção aos tecidos mais novos ou reaproveitando-os para a biossíntese de novos metabólitos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; HARTMANN, 1996).

Ainda de acordo com a **Figura 15**, deve ser notado que a redução mais intensa ocorre com os ácidos clorogênicos e flavonóides, cujas variações médias estão entre 60 e 85%, chegando a 100% de redução nas folhas velhas. Um decréscimo intermediário é observado no conteúdo das *C*-glicosilflavonas, em torno de 45%. Finalmente, as LST apresentaram a menor redução entre folhas jovens e velhas, entre 15 e 30%.

A maior taxa de redução do conteúdo de flavonóides e ácidos clorogênicos em relação às LST em folhas velhas pode ser, talvez, devido a uma maior alocação destes metabólitos para a reciclagem, visto que por protegerem a planta dos efeitos da radiação solar, estes metabólitos são mais necessários em folhas jovens do que em folhas já em processo de atrofia (ÅLENIUS et al., 1995; GRACE; LOGAN, 2000; HARTMANN, 1996; WATERMAN; MOLE, 1994).

Por outro lado, já foi relatado que, no gênero *Helianthus*, por exemplo, as LST são produzidas principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento das folhas, quando são encontradas, portanto, em altas concentrações. Posteriormente, como continuidade do processo de desenvolvimento natural, as folhas aumentam de tamanho, o que leva a uma "diluição" das LST (cujo conteúdo total se mantém), e finalmente entram em processo de atrofia (HENDRIKS et al., 1997; SPRING; BIENERT, 1987). Além disso, devido à sua citotoxicidade, as LST são encontradas somente no exterior das folhas, o que indica que dificilmente são recicladas pela planta. Assim, a menor taxa de redução das LST nas folhas velhas pode ser explicada pelos dois processos expostos acima, ou seja, há uma redução no seu conteúdo nas folhas velhas devido à "diluição", porém como não são reaproveitadas, esta redução não é tão pronunciada quanto a dos flavonóides e ácidos clorogênicos.

Finalmente, deve-se ressaltar que tais diferenças quantitativas entre folhas jovens e velhas não têm influência significativa nos resultados de variações temporais deste estudo, tendo em vista que para o preparo das amostras todas as folhas de um ramo são moídas conjuntamente, o que leva a uma amostragem do ramo como um todo. Além disso, a proposta deste estudo é a determinação de variações entre indivíduos como um todo, uma vez que quando da coleta do vegetal para seu uso, é impraticável a escolha somente de folhas jovens em detrimento das velhas.



Figura 14. Cromatogramas (270 nm) exemplificando a variação quantitativa entre o metabolismo secundário de folhas novas (A) e velhas (B) provenientes de um mesmo ramo do indivíduo 2-IV.



**Figura 15.** Gráfico mostrando as variações médias (entre dez indivíduos analisados) e máximas de metabólitos secundários observadas entre folhas novas e velhas de um mesmo ramo de *L.ericoides*.

Em L. ericoides, as inflorescências surgem no ápice de vários ramos (mas raramente de todos) em cada planta, o que ocorre principalmente no verão, entre os meses de dezembro e março, período chuvoso no cerrado. Nestes períodos, alguns dos indivíduos marcados tiveram ramos com e sem flores coletados visando determinar possíveis variações (1-V - 01/2002; 2-VI - 01/2002; 3-VI - 02/2002; 4-I -02/2001; 5-VIII - 02/2001). Neste sentido, conforme pode ser visto no gráfico da Figura 16, foram observadas concentrações menores de todos os metabólitos nas folhas dos ramos com flores. As variações médias observadas estão entre 23 e 50%, portanto não tão pronunciadas como as observadas entre folhas jovens e velhas. No entanto, todos os metabólitos apresentaram variações acima da variação máxima detectada entre dois ramos de um mesmo indivíduo (Figura 13, discussão acima), o que mostra que realmente existe uma concentração menor de metabólitos secundários nos ramos com flores. Diferentemente do que ocorre entre folhas jovens e velhas, neste caso não existem diferenças marcantes entre as variações de cada tipo de metabólito, sendo observada uma diferença similar no conteúdo de cada metabólito entre folhas dos ramos com ou sem flores. A menor concentração de metabólitos secundários nos ramos com flores poderia ser explicada por uma alocação de recursos para proteção e desenvolvimento das inflorescências nestes ramos, em detrimento às folhas.



**Figura 16.** Gráfico mostrando as variações médias (entre cinco indivíduos analisados) e máximas de metabólitos secundários observadas entre folhas de ramos com e sem flores de um mesmo indivíduo de *L. ericoides*.

# 4.5.2. Variações intra-populacionais

Estando o método de extração devidamente desenvolvido e validado, os picos cromatográficos identificados e a ocorrência, bem como a magnitude das variações intra-individuais determinadas, finalmente foi possível comparar efetivamente os dados obtidos para todos os indivíduos das cinco populações. Para isso, foi construída uma planilha com as áreas relativas (área metabólito / área p.i.) obtidas para cada metabólito de cada indivíduo (**APÊNDICE C**).

Em termos de variação intra-populacional, foi observado que, de modo geral, o perfil cromatográfico é bem semelhante entre todos os indivíduos amostrados em cada população, existindo algumas pequenas diferenças quantitativas, mas não qualitativas entre os indivíduos de uma mesma população. As únicas exceções observadas foram: o indivíduo VII da população 1, no qual não foram detectadas cinco das LST identificadas nos outros indivíduos desta população; e os indivíduos I, II e III da população 4, os quais apresentaram quantidades apreciáveis (até 0,20% de peso seco das folhas) da LST centraterina (pico **27**) que, além destes, só foi encontrada em alguns indivíduos da população 1 e, mesmo assim, em pequenas quantidades (no máximo 0,025% de peso seco das folhas).

#### 4.5.3. Variações interpopulacionais

Por outro lado, diferenças qualitativas marcantes foram observadas entre indivíduos pertencentes a populações diferentes, o que mostra a existência de variações interpopulacionais no metabolismo secundário, conforme já havia sido observado pelas **Figuras 10 e 11**. A principal diferença observada entre as populações, e que é bem evidenciada nas **Figuras 10 e 11**, é a existência de um metabolismo secundário bem mais diversificado em indivíduos da população 1, os

quais apresentam muitos picos que estão ausentes em cromatogramas de plantas de outras populações. Em linhas gerais, praticamente todos os metabólitos identificados em *L. ericoides* (tópico 4.4.) foram observados nos indivíduos da população 1. Grandes semelhanças também existem entre os cromatogramas de cada população, sendo que a grande maioria dos metabólitos identificados, com exceção das LST, está presente, em maior ou menor intensidade, em todos os indivíduos.

Visto que as variações intra-populacionais são relativamente pequenas, e para uma melhor comparação dos resultados, os dados da planilha obtida no **APÊNDICE C** foram utilizados na construção de gráficos com as médias populacionais de cada metabólito, ou seja, as médias aritméticas obtidas a partir da somatória das áreas relativas de um dado metabólito em todos os indivíduos pertencentes a uma mesma população (**Figuras 17 a 19**).



Figura 17. Gráfico mostrando o conteúdo médio de ácidos clorogênicos por população de *L.ericoides*.



Figura 18. Gráfico mostrando o conteúdo médio de lactonas sesquiterpênicas por população de *L.ericoides*.



Figura 19. Gráfico mostrando o conteúdo médio de flavonóides por população de L.ericoides.

Uma primeira análise destes gráficos mostra que as principais diferenças interpopulacionais são com relação às LST. Conforme pode ser visto no gráfico da Figura 18, com exceção da centraterina na população 4, já discutida acima, as demais LST só foram detectadas na população 1. Com relação aos ácidos clorogênicos, todos os derivados foram encontrados, ao menos como traços, em todos os indivíduos. Porém, diferenças quantitativas marcantes foram encontradas, conforme pode ser analisado na Figura 17: o conteúdo destes metabólitos é maior na população 1, onde o ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico (pico 11), por exemplo, tem uma concentração média em torno de 1,0% do peso seco das folhas, seguido pelas populações 4 e 5. Já a população 3 apresenta valores intermediários de ácidos clorogênicos, e a população 2 as menores concentrações encontradas, com uma média em torno de 0,25% de peso seco para o ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico, ou seja, 1/4 do observado para a população 1. Finalmente, no caso dos flavonóides (Figura 19) não foram observadas diferenças muito significativas. O único flavonóide de ocorrência restrita foi o pico 52 (Tabela 7), o qual só foi encontrado nos indivíduos (todos os indivíduos) da população 2. A população 2 também foi a que mostrou maiores teores de 3-O-metilquercetina e pinobanksina, e a única em que não foram detectados cumaroilglicosil-flavonóis (picos 28 e 29). As C-glicosilflavonas (picos 5, 7 e 9), por sua vez, foram detectadas em maiores concentrações na população 1, na qual a concentração média observada para a vicenina-2, por exemplo, foi de 1,6% do peso seco das folhas, enquanto nas demais populações este valor está em torno de 0,35%. De fato, na população 1 as C-glicosilflavonas foram detectadas em concentrações entre 3 e 7 vezes maiores que nos indivíduos das outras populações.

Conforme já mencionado na introdução, os resultados de estudos de variações na produção de metabólitos secundários são essenciais para revelar quais metabólitos são potenciais marcadores quimiotaxonômicos para determinada espécie ou gênero, servindo como um conjunto adicional de caracteres para a definição de taxa complexos e determinação de quimiotipos. Neste sentido, flavonóides (EMERENCIANO et al., 2001; FIASSON et al., 1991), ácidos fenólicos (MAÑEZ et al., 1994) e lactonas sesquiterpênicas (SEAMAN, 1982; ZDERO; BOHLMANN, 1990), classes de metabólitos identificadas em *L. ericoides*, têm se demonstrado confiáveis caracteres quimiossistemáticos.

Até o momento, as LST do tipo furanoeliangolido vinham sendo consideradas como metabólitos característicos e marcadores quimiotaxonômicos da subtribo Lychnophorinae, devido ao seu isolamento a partir de plantas de alguns gêneros desta subtribo (BORELLA et al., 1998; ROBINSON, 1999; SAKAMOTO et al., 2005; ZDERO; BOHLMANN, 1990). Entretanto, como pode ser concluído pelos resultados expostos acima (**Figuras 10 e 18; APÊNDICE C**), ao menos para a espécie *L. ericoides* as LST não podem ser consideradas marcadores quimiotaxonômicos e sequer metabólitos característicos, pois só ocorrem em uma das populações estudadas. Poderiam, no entanto, ser consideradas características de um quimiotipo (ou raça química) dentro da espécie *L. ericoides*. Esta proposta pode ser reforçada pelo não isolamento de LST em estudos fitoquímicos com outras espécies do gênero *Lychnophora* (CHICARO et al., 2004)

Os ácidos clorogênicos, por outro lado, estão presentes (em maior ou menor quantidade) em todos os indivíduos de *L. ericoides* analisados (**Figura 17**; **APÊNDICE C**). Devem, portanto, ser considerados metabólitos característicos desta espécie. Entretanto, devido à sua ampla ocorrência na família Asteraceae

128

(CLIFFORD, 1999, 2000), sua utilização como marcador quimiotaxonômico fica limitada.

Apesar das variações interpopulacionais expostas acima, em todas as populações os flavonóides majoritários são os mesmos (vicenina-2 – pico 7; pinocembrina - pico 38; 2',4',6'-triidroxichalcona - pico 40; 3-O-acetilpinobanksina pico 42; 2',6'-diidróxi-4'-metoxichalcona – pico 45 e pinostrobina – pico 47) e ocorrem em concentrações semelhantes (com exceção da vicenina-2 na população 1 e pinobanksina na população 2) (Figura 19; APÊNDICE C). Estes metabólitos devem, portanto, ser considerados como os metabólitos secundários mais característicos de L. ericoides, juntamente com os ácidos clorogênicos. A ampla variedade de tipos de esqueleto e padrões de substituição em flavonóides têm sido úteis, em muitos casos, para a distinção entre taxas e quimiotipos sendo, portanto, valiosos marcadores quimiotaxonômicos (FERRERES et al., 1989; HARBORNE, 1975; HARBORNE et al., 1985; SEIGLER, 1981; WILLIAMS et al., 1983, 1985; WILT; MILLER, 1992). Em termos de variedade de flavonóides, nota-se em L. ericoides um predomínio marcante das flavanonas e seus respectivos isômeros 5hidróxi-chalconas e diidroflavonóis (substituídos ou não na posição 3). Também é notável a ausência de flavonas ou flavonóis agliconas, que são flavonóides de ocorrência muito comum na família Asteraceae, e a presença da di-C-glicosilflavona vicenina-2 em altas concentrações.

Assim, sugere-se como marcadores químicos para caracterizar a espécie *L. ericoides* a utilização conjunta dos seguintes fatores: a presença, como metabólitos majoritários, de derivados cafeoilquínicos, da di-*C*-glicosilflavona vicenina-2, do diidroflavonol 3-O-acetilpinobanksina e das flavanonas pinocembrina e pinostrobina e suas formas isoméricas, as chalconas 2',4',6'-triidroxichalcona e 2',6'-diidróxi-4'metoxichalcona.

Quanto à ocorrência de LST quase que exclusivamente na população 1, e em altas concentrações, uma teoria do Prof. Otto R. Gottlieb sobre a influência das fronteiras entre biomas no conteúdo de metabólitos secundários pode ser utilizada para tentar explicar o fato. De acordo com esta teoria, plantas ocorrendo na fronteira entre dois tipos de vegetação (e, consegüentemente, de fauna) poderiam ser estimuladas a amplificar a produção e armazenamento de metabólitos secundários defensivos, devido à maior pressão ambiental (maior número de influências ambientais, originadas pelos dois biomas) (GOTTLIEB et al., 1996). Entre os metabólitos secundários defensivos. encontram-se LST. substâncias as reconhecidamente citotóxicas e deterrentes e que, portanto, oferecerem proteção à planta contra o ataque de herbívoros e patógenos de modo geral (PICMAN, 1986; SANTOS, 2004; SCHMIDT, 1999). Neste sentido, deve ser ressaltado que somente a população 1, no município de Ibiraci - MG está localizada em uma área de transição entre dois biomas: o cerrado e a floresta semi-decídua de mata atlântica, sendo que as demais populações estão localizadas em áreas mais internas ao bioma cerrado, mais especificamente em regiões de campos rupestres. Portanto, as altas concentrações de LST observadas somente na população 1 poderiam ser explicadas por uma química secundária defensiva amplificada, devido à interação com fauna e flora provenientes de dois biomas diferentes.

A aceitação desta hipótese implica em que as diferenças encontradas entre as populações são devido a uma expressão gênica diferenciada das LST, o que significa que os indivíduos das outras populações têm condições genéticas para a produção de LST, porém, por não sofrerem as mesmas pressões ambientais que os da população 1, não biosintetizam estes metabólitos defensivos. Assim, neste caso, as plantas da população 1 não poderiam ser consideradas um quimiotipo de *L. ericoides* caracterizado pelas LST, pois, para se encaixar no conceito de quimiotipo, necessariamente deveria haver uma variação genotípica, conforme já comentado anteriormente na introdução (EVANS, 1996; MABRY, 1973). Este seria, então, um caso de polimorfismo local, o qual é resultante de variações induzidas por fatores externos (EVANS, 1996).

Para dar suporte às variações interpopulacionais observadas e discutidas acima, foi realizada uma análise estatística de agrupamento por semelhança (HCA -Hyerarchical Cluster Analysis) de todos os indivíduos analisados. Utilizou-se como base para isso a mesma planilha com as áreas relativas obtidas para os metabólitos de cada indivíduo (APÊNDICE C) já discutida acima. O gráfico de agrupamento obtido (Figura 20) conforme a metodologia descrita no tópico 3.3.6. evidencia dois grandes grupos de indivíduos que apresentam, entre si, um elevado grau de distanciamento de ligação (eixo x): um grupo formado exclusivamente pelos indivíduos da população 1 e outro composto pelos demais indivíduos. Isto pode ser explicado pela presença de LST quase que exclusivamente na população 1, já discutida acima. Já o segundo grande grupamento obtido, com uma distância de ligação menor, é subdividido em mais dois grupos: um composto exclusivamente pelos indivíduos da população 2 e outro pelos demais. Portanto, considerando-se esta distância de relação, pode-se afirmar que a população 2 forma um segundo grupo de indivíduos de *L. ericoides* caracterizado, conforme discutido anteriormente, principalmente pela ausência de cumaroilglicosil-flavonóis, pelos mais altos teores de 3-O-metilquercetina e pinobanksina e pela ocorrência restrita do flavonóide referente ao pico 52. Assim, o gráfico de agrupamento por semelhança também

131

evidencia e confirma a similaridade metabólica entre os indivíduos de uma mesma população e agrupa todos os indivíduos das populações 3, 4 e 5 em um último grupamento.

Finalmente, analisando todos os dados de variações intra- e interpopulacional discutidos acima, sugere-se que, com base em seu metabolismo secundário diferenciado, os três principais grupamentos de *L. ericoides* obtidos por HCA (grupo 1: população 1; grupo 2: população 2 e grupo 3: populações 3, 4 e 5) devam ser considerados para os estudos de sazonalidade adiante.



Agrupamento por semelhança dos indivíduos de L. ericoides por HCA (Hyerarchical Cluster Analysis)

Figura 20. Gráfico de agrupamento por semelhança obtido para os 50 indivíduos de L ericoides analisados, utilizando-se para as ligações o método de Ward e como distância de ligação a distância euclideana quadrada.

# 4.5.4. Variações sazonais

Para os estudos de variações sazonais, foram selecionados indivíduos para representar cada um dos grupos obtidos acima por HCA (tópico 4.5.3. Variações interpopulacionais). Inicialmente, as amostras coletadas no período de 24 meses dos indivíduos 1-III, 2-IV, 3-VI, 4-I e 5-VIII foram analisadas pelo método desenvolvido em CLAE-DAD, e os dados obtidos foram utilizados para a construção de gráficos de variação mensal dos conteúdos dos metabólitos majoritários. Devido às diferenças na magnitude dos metabólitos, e para evitar uma intensa sobreposição de linhas nos gráficos, os metabólitos foram agrupados por classes (flavonóides, LST e ácidos cafeoilquínicos). Também neste sentido, gráficos com as áreas relativas em escala logarítmica foram construídos para os flavonóides. Além disso, para melhor comparação entre as classes de metabólitos, gráficos com as somatórias dos metabólitos de cada classe também foram construídos. Deve ser ressaltado que, conforme já discutido, na análise destes gráficos só devem ser consideradas significativas as variações acima de 20%, que foi o nível máximo de variação encontrada entre os ramos de um mesmo indivíduo (tópico 4.5.1. Variações intraindividuais).

Iniciando-se a análise pelos gráficos obtidos para os metabólitos do indivíduo IV da população 2 (**Figuras 21** a **24**), nota-se que, de modo geral, todos os metabólitos de uma determinada classe apresentam comportamento temporal muito semelhante entre si, isto é, os aumentos ou diminuições de concentração dos metabólitos de uma determinada classe (flavonóide ou ácido cafeoilquínico) são concomitantes. Isto é observado tanto para os ácidos cafeoilquínicos (**Figura 22**) quanto para os flavonóides (**Figuras 23** e **24**). Assim, é possível realizar uma comparação dos metabólitos totais por classes, através do gráfico da **Figura 21**. Neste gráfico, observa-se claramente que, enquanto a concentração de *C*glicosilflavonas se manteve praticamente constante ao longo dos dois anos, a concentração de ácidos cafeoilquínicos e flavonóides apresentaram pronunciadas variações inversamente proporcionais entre si. Nos períodos entre maio e agosto/2000 e entre junho e setembro de 2001, as concentrações de ácidos cafeoilquínicos apresentaram os mais altos teores (em torno de 0,45% de peso das folhas, calculados com base na curva de 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico), ao passo em que nestes mesmos períodos foram observados os mais baixos teores de flavonóides. Inversamente, nos demais períodos do ano, os níveis de ácidos cafeoilquínicos caíram cerca de 75% e o de flavonóides agliconas se elevaram em até 80%. A repetição do padrão de variação nos dois anos de análise comprova que realmente existe uma sazonalidade expressiva no conteúdo destes metabólitos neste indivíduo.



Figura 21. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides.* 



**Figura 22.** Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides.* 



Figura 23. Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides*.



**Figura 24.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.

Um outro indivíduo desta mesma população (2-I) foi analisado pelo período de 15 meses. Apesar de apresentar níveis diferentes dos metabólitos em relação ao indivíduo 2-IV (menor teor de ácidos cafeoilquínicos e maior teor de flavonóides), o mesmo padrão de variação sazonal foi detectado, conforme pode ser observado nas **Figuras 25** a **28**, confirmando este padrão de variação.

Como tanto os flavonóides quanto os ácidos cafeoilquínicos têm a mesma origem biossintética, a variação inversamente proporcional entre teores de flavonóides e de ácidos cafeoilquínicos observada pode indicar um desvio dos intermediários da via fenilpropanoídica para a produção preferencial de ácidos clorogênicos, em detrimento aos flavonóides, no inverno. Correlacionando estas variações com as variações ambientais características do cerrado, fica evidente que os períodos de altos teores de ácidos cafeoilquínicos coincidem com a época de escassez de água e frio noturno (o inverno) na região do cerrado em que as plantas foram coletadas.



Figura 25. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo I da população 2 de *L. ericoides.* 



**Figura 26.** Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo I da população 2 de *L. ericoides.* 



**Figura 27.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo I da população 2 de *L. ericoides.* 



**Figura 28.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo I da população 2 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.

O indivíduo da população 3 analisado (3-VI) apresentou (Figuras 29 a 32), em linhas gerais, um comportamento semelhante ao observado para 2-VI e 2-1. Novamente, todos os metabólitos de uma mesma classe (ácidos cafeoilquínicos ou flavonóides) apresentaram um mesmo comportamento temporal. Neste indivíduo, porém, uma variação cíclica no conteúdo de ácidos cafeoilquínicos foi observada (Figura 30): os teores destes metabólitos se elevavam rapidamente nos meses de agosto atingindo um máximo em torno de 1% do peso das folhas (com base na curva de 3,5-di-O-E-cafeoilquínico); depois decresciam também rapidamente logo após o máximo e então se elevavam paulatinamente até níveis intermediários nos meses de março, reiniciando o ciclo. A repetição cíclica observada confirma a existência de sazonalidade nos teores dos ácidos cafeoilquínicos. Já os flavonóides (Figuras 31 e 32) apresentaram uma variação aparentemente mais aleatória que a observada para a população 2, mas, ainda assim, estão em concentrações mais elevadas nos períodos entre os picos de concentração máxima dos ácidos cafeoilquínicos. Tanto as C-glicosilflavonas como os cumaroilglicosil-flavonóis se mantiveram em concentrações praticamente constantes no período.



Figura 29. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides.* 



**Figura 30.** Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides.* 



Figura 31. Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides.* 



Figura 32. Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.

As variações observadas para os ácidos cafeoilquínicos nos indivíduos analisados das populações 4 e 5 (4-I - Figuras 33 e 34; e 5-VIII - Figuras 38 e 39) foram bem semelhantes às observadas para 3-VI (Figura 30). Embora os meses de concentração máxima destes metabólitos não sejam exatamente os mesmos, nestas três populações o máximo observado foi sempre entre os meses de junho e setembro. Nos períodos entre estes meses, variações intermediárias destes metabólitos podem ser observadas nas três populações e os teores mais baixos sempre ocorrem entre os meses de outubro a dezembro. Uma exceção a este padrão foi observada para o indivíduo 4-l entre os meses de novembro de 2001 a fevereiro de 2002 (Figura 34), quando a concentração de ácidos cafeoilquínicos atingiu valores muito elevados. No entanto, este aumento exacerbado pode ter ocorrido em função de outros fatores que não a sazonalidade. De fato, nos meses de novembro e dezembro de 2001 foi notado que as folhas deste indivíduo (4-I) estavam deterioradas e apresentavam manchas brancas em toda sua superfície. Isto sugere algum tipo de ataque de patógenos e/ou herbívoros, e por conseqüência, que as concentrações de ácidos cafeoilquínicos exacerbadas observadas, fora do padrão sazonal, podem ser um mecanismo de defesa da planta. Além disso, esta planta foi a única dentre as analisadas que não floriu no verão de 2001/2002, o que será discutido adiante.

Por outro lado, assim como nas populações 2 e 3, os flavonóides apresentaram variações intensas (4-I – **Figuras 33**, **35** e **36**; e 5-VIII – **Figuras 38**, **40** e **41**), porém sem um padrão sazonal bem definido, apesar das concentrações mais altas terem sido observadas geralmente no verão. Já os teores de *C*-glicosilflavonas e cumaroilglicosil-flavonóis se mantiveram praticamente estáveis durante os 24 meses de amostragem, seguindo o padrão observado para as outras

populações. Finalmente, a LST centraterina do indivíduo 4-l também não apresentou variações significativas (**Figuras 33** e **37**).



Figura 33. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo I da população 4 de *L. ericoides.*


**Figura 34.** Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo I da população 4 de *L. ericoides*.



**Figura 35.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo I da população 4 de *L. ericoides.* 



**Figura 36.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo I da população 4 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.



**Figura 37.** Gráfico de variação sazonal da lactona sesquiterpênica do indivíduo I da população 4 de *L. ericoides*.



Figura 38. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo VIII da população 5 de *L. ericoides.* 



**Figura 39.** Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo VIII da população 5 de *L. ericoides.* 



Figura 40. Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo VIII da população 5 de *L. ericoides*.



Figura 41. Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo VIII da população 4 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.

Com relação aos indivíduos das populações 2 a 5 analisados, deve ser notado que os teores de ácidos cafeoilquínicos dos indivíduos das populações 4 e 5 são muito mais elevados que os da população 2 e 3, principalmente nos períodos de concentração mais elevada, atingindo picos de até 3,7% de peso das folhas no indivíduo 5-VII. Entre máximos e mínimos de concentração, os teores de ácidos cafeoilquínicos totais dos indivíduos das populações 2 a 5 apresentaram variações sazonais entre 75% (5-VIII) e 90% (3-VI). Já as concentrações dos flavonóides totais apresentaram variações em torno de 50% nestas populações.

Além disso, deve ser ressaltado que, de acordo com anotações de campo realizadas durante as coletas, os períodos de concentração mínima de ácidos cafeoilquínicos em cada indivíduo analisado quase sempre coincidem, ou são muito próximos, ao período de florada desta planta (**Tabela 8**), com exceção dos indivíduos da população 1.

planta _(população – indivíduo)	período com inflorescências
1-111	dezembro/2000 a janeiro/2001; novembro a dezembro/2001
1-X	novembro a dezembro/2000; dezembro/2001 a janeiro/2002
2-1	janeiro a março/2001; janeiro a fevereiro/2002
2-IV	janeiro a fevereiro/2001; janeiro a fevereiro/2002
3-VI	dezembro/2000 a janeiro/2001; novembro a dezembro/2001
4-1	dezembro/2000 a janeiro/2001; não floriu no segundo ano de coleta
5-VIII	fevereiro e março/2001; março/2002

Tabela 8. Períodos de florada observados para cada indivíduo analisado quanto asazonalidade e/ou ritmo circadiano.

Finalmente, na população 1, a análise do indivíduo III não apresentou variações significativas (considerando-se a faixa de 20% como significativa) no teor de flavonóides totais (Figuras 42, 44 e 45). Entretanto, variações entre 40 e 50% foram observadas para os flavonóides majoritários deste indivíduo, especialmente para as chalconas (Figura 44). Assim como foi observado para as outras populações, as concentrações de C-glicosilflavonas se mantiveram constantes. Com relação aos ácidos cafeoilquínicos totais, uma variação entre teores máximo e mínimo em torno de 85% foi observada. Apesar de este valor ser similar ao observado para as outras populações, não é possível identificar um padrão cíclico (sazonal) para estas variações, sendo observados picos de concentração máxima e mínima nos mais diversos meses (Figuras 42 e 43). Isto sugere que, ao contrário das outras populações, a influência de outros fatores ambientais, em detrimento da sazonalidade, são predominantes para a determinação dos teores de metabólitos secundários nesta população. Este fato dá mais suporte à hipótese discutida anteriormente de que as plantas desta população sofrem maior pressão ambiental que os indivíduos de outras populações e têm seu metabolismo secundário alterado em função disso. Finalmente, algumas variações em torno de 40% podem ser observadas para algumas das LST (Figura 46), porém, assim como os flavonóides, os teores de LST totais (somatória das áreas relativas de todas as LST) se mantiveram constantes (Figura 42).

A análise do indivíduo X desta mesma população apresentou teores aproximadamente 100% maiores para todas as classes de metabólitos e, no entanto, o mesmo padrão aparentemente aleatório de variações discutido acima para o indivíduo III, conforme pode ser observado nas **Figuras 47** a **51**.



Figura 42. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo III da população 1 de *L. ericoides.* 



Figura 43. Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo III da população 1 de *L. ericoides.* 



**Figura 44.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo III da população 1 de *L. ericoides.* 



**Figura 45.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo III da população 1 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.



**Figura 46.** Gráfico de variação sazonal das lactonas sesquiterpênicas do indivíduo III da população 1 de *L. ericoides*.



Figura 47. Gráfico de variação sazonal das classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo X da população 1 de *L. ericoides.* 



**Figura 48.** Gráfico de variação sazonal dos ácidos cafeoilquínicos do indivíduo X da população 1 de *L. ericoides.* 



**Figura 49.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo X da população 1 de *L. ericoides.* 



**Figura 50.** Gráfico de variação sazonal dos flavonóides do indivíduo X da população 1 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.



**Figura 51.** Gráfico de variação sazonal das lactonas sesquiterpênicas do indivíduo X da população 1 de *L. ericoides*.

Tentando racionalizar as variações sazonais observadas e pensando-se no estabelecimento de épocas ideais de coleta para a obtenção de determinada classe de metabólito em maior ou menor concentração, pode-se afirmar que, apesar de cada população apresentar uma ou outra diferença de comportamento sazonal, devido provavelmente a diferenças ambientais, e até mesmo evolutivas, específicas de cada local, pode-se concluir que:

1) as concentrações mais elevadas de ácidos cafeoilquínicos são encontradas no inverno, sendo difícil, no entanto, precisar o mês correto para uma coleta visando os maiores conteúdos destes metabólitos; teores intermediários destes metabólitos podem ser encontrados em outras épocas do ano em algumas plantas, como foi observado para a população 3, por exemplo;

2) as menores concentrações de ácidos cafeoilquínicos são encontradas, de modo geral, quando a planta se encontra florida (mesmo nos ramos sem flores da mesma planta). Assim, se o objetivo for uma coleta com altos teores de ácidos cafeoilquínicos, e não sendo possível precisar o mês de concentração máxima no inverno, uma coleta realizada nos períodos entre floradas garante, ao menos, que a concentração destes metabólitos será de intermediária a alta;

 as concentrações de flavonóides, por sua vez, estão geralmente mais elevadas durante o período chuvoso no cerrado (verão);

 as concentrações tanto de C-glicosilflavonas quanto de LST se mantém estáveis durante o ano, portanto coletas visando estes metabólitos (nas populações cujas plantas os possuam) podem ser realizadas em qualquer época.

Conclui-se, portanto, que as variações sazonais observadas para os ácidos cafeoilquínicos e flavonóides podem ser relacionadas com os dois períodos climáticos típicos do cerrado: época da seca e época das chuvas. Assim,

provavelmente são respostas metabólicas à alternância entre a seca e o frio do inverno e a chuva, temperaturas mais elevadas e a floração de *L. ericoides* no verão. Obviamente, pelo já exposto anteriormente, excluem-se destas conclusões os indivíduos da população 1. Além disso, ainda a respeito da racionalização visando altos teores de determinado metabólito, devem ser sempre consideradas as variações interpopulacionais observadas e discutidas no tópico *4.5.3.* (*Variações interpopulacionais*).

Um aumento nas concentrações de ácidos clorogênicos, acompanhada de um aumento também na concentração de flavonóides, nas flores de *Hypericum perforatum* em condições de estresse hídrico foi relatado por Gray et al., 2003. Aumento dos teores de fenilpropanóides (tanto de ácidos clorogênicos quanto de flavonóides e antocianinas) e das enzimas chaves da biossíntese destes metabólitos [como a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a chalcona sintase] como resposta a baixas temperaturas também já foram relatadas, mas em geral para temperaturas mais baixas do que as observadas nos locais de coleta (CHRISTIE et al., 1994; GRACE et al., 1998; KOEPPE et al., 1970). Deste modo, para identificar quais dos fatores ambientais que variam entre o inverno e o verão nos locais de coleta e que, portanto, seriam determinantes para a sazonalidade observada nas concentrações de metabólitos secundários (especialmente ácidos cafeoilquínicos) nas folhas de *L. ericoides*, são necessários estudos adicionais com plantas cultivadas sob condições ambientais controladas.

Sabe-se que *L. ericoides* é utilizada popularmente principalmente pela sua atividade antiinflamatória, e para uma maior atividade dos hidrolatos, de acordo com raizeiros e populares que se utilizam da planta, a coleta deve ser efetuada na época de floração. Pelas variações na química secundária discutidas acima, nota-se que na

157

época de florada, que em L. ericoides ocorre principalmente entre dezembro e março, são encontrados os menores teores de ácidos cafeoilquínicos e geralmente os maiores teores de flavonóides agliconas. Sabe-se também que entre os metabólitos secundários majoritários de média a alta polaridade de L. ericoides, a Cglicosilflavona vicenina-2 e os ácidos cafeolquínicos são os únicos com pronunciada atividade antiinflamatória, além das LST que conforme já discutido não estão presentes na maioria das plantas desta espécie (GOBBO-NETO et al., 2005; PELUSO et al., 1995; RASTRELLI et al., 1998; SANTOS et al., 2005; SCHOLZ et al., 1993). Estabelecendo-se então uma correlação entre época de coleta e atividades biológicas dos metabólitos, ao contrário do preconizado popularmente, a melhor época para coleta seria no período em que a planta não se encontra florida, tendo em vista uma maior concentração de metabólitos com atividade antiinflamatória (ácidos cafeoilguínicos e vicenina-2, lembrando-se que a última se mantém em concentração constante). Por outro lado, a atividade antiinflamatória desejada pode ser também devido a outros metabólitos antiinflamatórios de baixa polaridade ainda não identificados em L. ericoides e não detectados neste estudo devido às limitações do método de preparo das amostras utilizado (solventes extratores de alta polaridade). Assim, a forma de coleta empregada popularmente não deve ser invalidada, e estudos adicionais em busca de metabólitos antiinflamatórios de baixa polaridade devem ser conduzidos.

## 4.5.5. Variações circadianas

Conforme descrito na metodologia, foram coletadas amostras circadianas somente de indivíduos das populações 2 e 3, devido a limitações de coleta como distância dos locais possíveis para estabelecimento de acampamento e tempo disponível. Assim, foram selecionadas para análise circadiana os mesmos indivíduos destas populações que foram utilizados para análise sazonal: indivíduos IV da população 2 e VI da população 3.

Pela análise dos gráficos obtidos para o indivíduo 2-IV (Figuras 52 a 55) notam-se marcantes variações circadianas tanto dos ácidos cafeoilquínicos quanto dos flavonóides agliconas. As C-glicosilflavonas, assim como foi observado com relação à sazonalidade, apresentaram concentração constante. Os teores de flavonóides (Figuras 52, 54 e 55) atingem um máximo entre 16:00 e 21:00 horas, dependendo do mês, e após este máximo diminuem (entre 30 e 50%) chegando a concentrações mínimas na madrugada, quando então começam a apresentar novamente um aumento em suas concentrações. Já os ácidos cafeoilquínicos (Figuras 52 e 53), diferentemente dos flavonóides, em geral são encontrados em concentrações máximas durante o período de luz solar intensa, entre 12:00 e 16:00 horas, decaindo cerca de 70% durante a noite e reiniciando o ciclo para novamente atingir um máximo durante os períodos de luz intensa. Esta relação de conteúdos inversos de flavonóides e ácidos cafeoilquínicos é semelhante à observada para a sazonalidade deste metabólitos neste mesmo indivíduo (tópico 4.5.4.; Figuras 21 a 24) e sugere que possa haver um desvio dos intermediários da via fenilpropanoídica para a produção preferencial de ácidos clorogênicos, em detrimento aos flavonóides, durante o período de luz solar intensa.



Figura 52. Gráfico das variações circadianas observadas para as classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides.* 



Figura 53. Gráfico das variações circadianas observadas para os ácidos cafeoilquínicos do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides*.



**Figura 54.** Gráfico das variações circadianas observadas para os flavonóides do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides.* 



**Figura 55.** Gráfico das variações circadianas observadas para os flavonóides do indivíduo IV da população 2 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.

A diminuição circadiana da relação flavonóides / ácidos cafeoilquínicos observada no indivíduo 2-IV de L. ericoides pode ser explicada pela natureza da estrutura química destes metabólitos: os flavonóides encontrados majoritariamente em L. ericoides são flavanonas e diidroflavonóis, os quais, além de não possuírem o sistema catecol no anel B, também não possuem dupla ligação no anel C, impossibilitando um sistema de conjugação extendida pelos anéis. Isso resulta em baixo poder antioxidante e baixa absorção de radiação UV-B e, em última análise, baixa proteção contra a foto-destruição ocasionada pela radiação solar nas folhas (GRACE; LOGAN, 2000; MARKHAM et al., 1998b). Por outro lado, sabe-se que os ácidos cafeoilquínicos possuem elevada capacidade antioxidante e são eficientes em dissipar a energia solar recebida (GRACE; LOGAN, 2000; SANTOS et al., 2005), o que explicaria seu acúmulo preferencial, observado no indivíduo 2-IV, durante os períodos de luz solar intensa. De fato, variações circadianas com maior acúmulo de flavonóides com alto potencial de proteção contra radiação UV-B nos períodos de luz solar intensa já foram relatadas (VEIT et al., 1996), e podem ser relacionadas ao maior acúmulo diurno de ácidos cafeoilquínicos observado neste indivíduo de L. ericoides. Além disso, aumentos na relação flavonóides / hidróxi-cinamatos por indução luminosa (ou seja, a relação inversa da aqui observada) foram relatados por Tattini et al. (2004); neste caso os hidróxi-cinamatos eram majoritariamente do tipo cumáricos e os flavonóides majoritariamente flavonas e flavonóis com sistema catecol no anel B, os quais estão entre os flavonóides com maiores potencial antioxidante e protetores contra a radiação solar (MARKHAM et al., 1998a, 1998b). É necessário ressaltar, no entanto, que os aumentos de fenilpropanóides como resposta a um aumento da radiação solar incidente descritos na literatura são geralmente observados a longo ou médio prazo (CUADRA et al., 1997; MARKHAM et al., 1998a; TATTINI et al., 2004).

Com relação ao indivíduo analisado da população 3 (3-VI), também foram observadas variações circadianas significativas para ácidos cafeoilquínicos e flavonóides, e novamente as concentrações de C-glicosilflavonas e cumaroilglicosilflavonóis não apresentaram alteração (Figuras 56 a 59). Porém, ao contrário do notado para o ritmo circadiano de ácidos cafeoilguínicos e flavonóides totais na população 2, neste indivíduo as variações de concentração destes metabólitos ocorrem de maneira concomitante. De modo geral, os teores de metabólitos destas duas classes aumentam durante o dia para atingir um máximo entre 21:00 e 02:00 horas, quando então sua concentração é reduzida de 20 a 50% no caso dos flavonóides e de 45 a 75% no caso dos ácidos cafeoilquínicos, dependendo do mês analisado. Finalmente, a concentração dos metabólitos começa a se elevar novamente com o amanhecer, reiniciando o ciclo. Em uma análise superficial destes dados pode-se propor que, ao contrário do sugerido para a população 2, neste indivíduo não haveria uma alternância entre as vias metabólicas que se seguem ao estímulo luminoso da enzima PAL (fenilalanina amônia-liase, enzima chave no início da rota biossintética de fenilpropanóides) levando a uma biossíntese preferencial de ácidos cafeoilquínicos ou flavonóides (BHARTI; KHURANA, 1997; CHAPPELL ; HAHLBROCK, 1984; LOGEMANN et al., 2000; ZUCKER, 1972).

Deve-se notar também que, conforme discutido anteriormente, existem relatos de aumento na produção de fenilpropanóides induzido pelo frio (CHRISTIE et al., 1994; GRACE et al., 1998; KOEPPE et al., 1970), o que poderia auxiliar em uma explicação para a maior produção de fenilpropanóides (ácidos cafeoilquínicos e flavonóides) observada durante a noite. Novamente, é necessário ressaltar que as

temperaturas mínimas atingidas durante a noite nos locais de coleta não são tão baixas quanto as utilizadas para induzir o aumento na concentração de fenilpropanóides nestes estudos. Além disso, os aumentos de fenilpropanóides como resposta a baixas temperaturas descritos na literatura são respostas a longo ou médio prazo, isto é, em nenhum destes estudos foi detectada uma variação tão rápida (circadiana, por exemplo) nas concentrações de fenilpropanóides (BHARTI; KHURANA, 1997; CHAPPELL; HAHLBROCK, 1984; CHRISTIE et al., 1994; GRACE et al., 1998; KOEPPE et al., 1970; LOGEMANN et al., 2000).



Figura 56. Gráfico das variações circadianas observadas para as classes de metabólitos secundários (somatória dos metabólitos de cada classe) do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides.* 



**Figura 57.** Gráfico das variações circadianas observadas para os ácidos cafeoilquínicos do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides.* 



**Figura 58.** Gráfico das variações circadianas observadas para os flavonóides do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides.* 



**Figura 59.** Gráfico das variações circadianas observadas para os flavonóides do indivíduo VI da população 3 de *L. ericoides*, utilizando escala logarítmica para as áreas relativas.

Analisando-se em conjunto os dados de ritmo circadiano obtidos para os indivíduos 2-IV e 3-VI, pode-se afirmar que, de modo geral, as maiores concentrações de flavonóides agliconas são encontradas no início da noite, quase sempre em torno das 21:00 horas. Já os ácidos cafeoilquínicos são encontrados em concentrações mais elevadas no decorrer da tarde (entre 12:00 e 16:00 horas) na população 2 e no início da noite na população 3 (seguindo o padrão dos flavonóides). Também é importante notar que as concentrações de *C*-glicosilflavonas e cumaroilglicosil-flavonóis não apresentaram variações temporais (tanto circadianas quanto sazonais) em nenhum dos indivíduos analisados.

É possível também avaliar a grande influência que os ritmos circadianos, assim como os sazonais, podem ter nas concentrações de metabólitos secundários. Analisando-se, por exemplo, a **Figura 52**, observa-se que, em um mesmo dia, a proporção relativa entre flavonóides agliconas totais e ácidos cafeoilquínicos pode ter uma pronunciada inversão dependendo da hora em que a coleta é realizada, o que pode ter influência pronunciada na atividade biológica das amostras coletadas.

## **5. CONCLUSÕES**

A metodologia desenvolvida para extração e análise por CLAE-DAD dos metabólitos secundários majoritários de média a alta polaridade de L. ericoides foi validada com base em curvas de calibração construídas para 11 das substâncias identificadas nas folhas de *L. ericoides*: vicenina-2, 6,8-di-C-β-glicosilcrisina, ácido 3,5-di-O-E-cafeoilquínico, centraterina, 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido, 4.5-4,5-diidrolychnopholido, diidroeremantolido C. 16α-(1'-metilprop-1'Z-enil)eremantolido, lychnopholido, pinocembrina e pinostrobina. Em todos os parâmetros analisados para a validação (linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, estabilidade, seletividade e recuperação) foram obtidos resultados considerados satisfatórios para os propósitos deste estudo.

As análises por CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM, em conjunto com a comparação de tempos de retenção com padrões, possibilitaram a identificação de 34 dos 52 picos observados nos extratos foliares provenientes de cinco populações de *L. ericoides*. Dos picos restantes, oito foram identificados como isômeros posicionais de ácidos clorogênicos que não puderam ter seu padrão de substituição definido, sendo eles os seis isômeros posicionais possíveis de ácidos feruloil-cafeoilquínico e dois isômeros posicionais de ácidos di-feruloilquínicos (o terceiro isômero possível pôde ter seu padrão de substituição definido). Dois picos tiveram possíveis substâncias correspondentes atribuídas e dependem da confirmação das estruturas propostas por outras técnicas. Ainda a respeito dos picos não totalmente identificados, um deles foi atribuído a uma LST do tipo eremantolido, cuja estrutura não pode ser determinada; um teve somente sua fórmula molecular determinada; e cinco picos, para os quais não foi possível a obtenção de espectros de massas, foram relacionados a flavonóides do tipo flavanona ou diidroflavonol.

169

CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM 0 emprego de possibilitou а identificação, diretamente a partir dos extratos vegetais, de várias substâncias minoritárias que estão sendo relatadas pela primeira vez na espécie L. ericoides, e algumas delas na tribo Lychnophorinae. Foram, portanto, identificadas pela primeira vez nesta subtribo as substâncias 2',4',6'-triidroxichalcona, 2',6'-diidroxi-4'metoxichalcona, 3-O-acetilalpinona, 6,8-di-C-β-glicosilluteolina, os ácidos 3- e 4-O-Ecafeoilquínico, 3,4-di-O-E-cafeoilquínico e as séries de isômeros posicionais de ácidos feruloilquínicos, feruloil-cafeoilquínicos e di-feruloilquínicos. As substâncias 3-O-metilquercetina, tilirosídeo e 3-O-(6"-O-E-p-cumaroil)-β-glicosilisoramnetina e 15hidroxieremantolido C já haviam sido isoladas a partir de outras espécies do gênero Lychnophora e foram identificadas pela primeira vez na espécie L. ericoides.

Assim, conclui-se que a utilização das técnicas hifenadas CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM para a identificação de metabólitos secundários diretamente nos extratos vegetais, sem a necessidade de seu isolamento, foi uma escolha adequada que permitiu rapidez e eficiência na atribuição de picos cromatográficos, inclusive daqueles de menor intensidade. Além disso, os espectros de UV e de massas de íons produto (EM/EM) podem ser utilizados para iniciar a construção de um banco de dados visando facilitar e agilizar o processo de identificação por estas técnicas em estudos futuros.

A ocorrência e magnitude de variações intra-individuais nas folhas de *L. ericoides* também foram determinadas. Assim, observou-se que, de modo geral, as médias das variações dos teores de metabólitos secundários entre dois ramos de uma mesma planta são da ordem de 10 a 15%, sendo que as maiores variações observadas estão em torno de 20%. Este último valor é então considerado limite para aceitação de uma variação observada como significativa e válida. Também foi notado que o envelhecimento das folhas resulta em uma pronunciada redução no conteúdo de todos os metabólitos secundários das folhas de *L. ericoides*, a qual é mais intensa para os ácidos clorogênicos e flavonóides (variações médias entre 60 e 85%, podendo atingir 100%), intermediária no caso das *C*-glicosilflavonas (em torno de 45%) e menos intensa para as LST (entre 15 e 30%). Além disso, foram observadas concentrações menores de todos os metabólitos nas folhas dos ramos floridos em relação aos ramos sem flores de um mesmo indivíduo e, neste caso, as variações médias observadas estão entre 23 e 50%, não existindo diferenças marcantes entre as variações de cada metabólito.

Em termos de variação intra-populacional, foram observados perfis metabólicos bem semelhantes entre os indivíduos de uma mesma população, existindo pequenas diferenças quantitativas, mas não qualitativas, com raras exceções.

A principal diferença interpopulacional observada foi a presença de um metabolismo secundário bem mais diversificado nos indivíduos da população 1, no entanto a maioria dos metabólitos identificados está presente, em maior ou menor concentração, em todos os indivíduos, com exceção das LST. As últimas só foram encontradas na população 1, com a exceção da LST centraterina encontrada em três indivíduos da população 4. Os ácidos clorogênicos, por outro lado, foram encontrados em todos os indivíduos, porém, o conteúdo destes metabólitos é maior nas populações 1, 4 e 5, onde o ácido 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico, por exemplo, pode chegar a concentrações em torno de 1,0% do peso seco das folhas. Quanto aos flavonóides, também não foram observadas diferenças quali- e quantitativas muito significativas entre as cinco populações de *L. ericoides*, especialmente para os flavonóides majoritários. Uma exceção é a C-glicosilflavona vicenina-2, cuja

concentração nos indivíduos da população 1 pode ser até sete vezes maior que nas demais populações, chegando a 1,6% do peso seco das folhas em alguns indivíduos desta população.

Até o momento, as LST do tipo furanoeliangolido vinham sendo consideradas como metabólitos característicos e marcadores quimiotaxonômicos da subtribo Lychnophorinae. Entretanto, pelas análises populacionais pode ser concluído que, ao menos para a espécie *L. ericoides*, as LST não devem ser consideradas marcadores quimiotaxonômicos e sequer metabólitos característicos do gênero, pois só ocorrem em uma das populações estudadas. Portanto, sugere-se como marcadores químicos para caracterizar a espécie *L. ericoides* a presença, como metabólitos majoritários, de derivados cafeoilquínicos, da di-*C*-glicosilflavona vicenina-2, do diidroflavonol 3-O-acetilpinobanksina e das flavanonas pinocembrina e pinostrobina e suas respectivas formas isoméricas, as chalconas 2',4',6'-triidroxichalcona e 2',6'-diidróxi-4'-metoxichalcona. Esta proposta pode ser reforçada pelo não isolamento de LST em estudos fitoquímicos com outras espécies do gênero

Apesar de cada população apresentar uma ou outra diferença de comportamento sazonal, devido provavelmente a diferenças ambientais e até mesmo evolutivas específicas de cada local, pode-se concluir que:

1) as concentrações mais elevadas de ácidos cafeoilquínicos são encontradas no período da seca no cerrado (inverno), sendo difícil, no entanto, precisar o mês correto para uma coleta visando os maiores teores destes metabólitos. As menores concentrações destes metabólitos são encontradas, de modo geral, quando a planta se encontra florida (mesmo nos ramos sem flores da mesma planta). Assim, uma coleta realizada nos períodos entre floradas garante, ao menos, que a concentração destes metabólitos será de intermediária a alta;

 as concentrações de flavonóides, por sua vez, são quase sempre maiores durante o período de chuvas no cerrado (verão);

 as concentrações de C-glicosilflavonas e LST se mantém estáveis durante o ano, portanto, coletas visando estes metabólitos podem ser realizadas em qualquer época.

As variações sazonais observadas para os ácidos cafeoilquínicos e flavonóides podem ser relacionadas com os dois períodos climáticos típicos do cerrado: época da seca e época das chuvas. Assim, provavelmente são respostas metabólicas à alternância entre a seca e o frio no inverno e a chuva, temperaturas mais elevadas e a floração de L. ericoides no verão. Excluem-se destas afirmações os indivíduos da população 1, cujas variações metabólicas não apresentaram um padrão sazonal. Estabelecendo-se uma correlação entre época de coleta e atividades biológicas dos metabólitos, ao contrário do preconizado popularmente, a melhor época para coleta seria no período em que a planta não se encontra florida, tendo em vista uma maior concentração de metabólitos com atividade antiinflamatória (ácidos cafeoilquínicos e vicenina-2, lembrando-se que a última se mantém em concentração constante). Por outro lado, a atividade antiinflamatória desejada pode ser também devido a outros metabólitos ativos de baixa polaridade ainda não identificados em L. ericoides e não detectados neste estudo. Assim, a forma de coleta empregada popularmente não deve ser invalidada, e estudos adicionais em busca de metabólitos bioativos de baixa polaridade devem ser conduzidos.

173

Com relação ao ritmo circadiano das concentrações de metabólitos secundários nas duas populações analisadas a este respeito, pode-se afirmar que, de modo geral, as maiores concentrações de flavonóides são encontradas no início da noite, quase sempre em torno das 21:00 horas. Já os ácidos cafeoilquínicos são encontrados em concentrações mais elevadas no decorrer da tarde (entre 12:00 e 16:00 horas) na população 2 e no início da noite na população 3 (seguindo o padrão dos flavonóides nesta população). Assim como foi observado para a sazonalidade, as concentrações de *C*-glicosilflavonas e cumaroilglicosil-flavonóis se mantiveram estáveis.

Finalmente, conclui-se que as variações temporais e populacionais observadas para os metabólitos secundários de *L. ericoides* podem resultar em pronunciadas variações quali- e quantitativas no material vegetal coletado, sendo, portanto, determinantes para uma maior ou menor atividade antiinflamatória e/ou analgésica dos preparados medicamentosos utilizados popularmente.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGERBIRK, N.; OLSEN, C.E.; NIELSEN, J.K. Seasonal variation in leaf glucosinolates and insect resistance in two types of *Barbarea vulgaris* ssp *arcuata*. **Phytochemistry**, v.58, n.1, p.91-100, 2001.
- ÅLENIUS, C.M.; VOGELMANN, T.C.; BORNMAN, J.F. A three-dimensional representation of the relationship between penetration of UV-B radiation and UVscreening pigments in leaves of *Brassica napus*. **New Phytol.**, v.131, p.297-302, 1995.
- ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.30, p.189-203, 2002.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 48, 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, 2004.
- BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effect of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. **Physiol. Plant.**, v.104, p.203-210, 1998.
- BALDWIN, I.T.; ZHANG, Z.P.; DIAB, N.; OHNMEISS, T.E.; McCLOUD, E.S.; LYNDS, G.Y.; SCHMELZ, E.A. Quantification, correlations and manipulations of woundinduced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. **Planta**, v.201, p.397-404, 1997.
- BANDOPADHYAY, J.; DE, B. Seasonal variation of strychnine and brucine in vegetative parts of *Strychnos nux-vomica*. **Int. J. Pharmacogn.**, v.35, n.5, p.349-353, 1997.
- BARROS, D.A.D.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J.N.C.; KULANTHAIVEL, P.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones in the molluscidal extract of *Eremanthus glomerulatus*. **Planta Med.**, v.1, p.38-39, 1985.
- BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four di-Ocaffeoylquinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury model. **Biol. Pharm. Bull.**, v.19, p.1479-1484, 1996.
- BAZAAZ, F.; CHIARIELLO, N.; COLEY, P.; PITELKA, L. Allocating resources to reproduction and defense. **Bioscience**, v.37, p.58-75, 1987.
- BAZON, J.N.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J.N.C. Constituents of *Lychnophora brunioides*. **Fitoterapia**, Milão, v. 68, n.1, p.92-93,1997.
- BECCHI, M.; FRAISSE, D. Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-

glycosidic flavonoids. **Biomed. Environ. Mass Spectrom.**, v.18, p.122-130, 1989.

- BEEK, T.A.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; PETERLONGO, F. *Ginkgo biloba* L. **Fitoterapia**, v.59, p.195, 1998.
- BHARTI, A.K.; KHURANA, J.P. Mutants of Arabidopsis as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochem. Photobiol.**, v.65, p.765-776, 1997.
- BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; LEITÃO-FILHO, H.F.; SEMIR, J.; DIAZ, J.G.; HERZ,
  W. Eudesmanolides and 15-desoxygoyazensolide from *Lychnophora pseudovillosissima*. Phytochemistry, v.31, p.692-695, 1992.
- BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from Lychnophora ericoides and Lychnophora pseudovilosissima. Biochem. Syst. Ecol., v.26, p.671-676,1998.
- BORSATO, M.L.C.; GRAEL, C.F.F.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v.55, p.809-813, 2000.
- BOWERS, M.D.; COLLINGE, S.K.; GAMBLE, S.E.; SCHMITT, J. Effects of genotype, habitat, and seasonal variation on iridoid glycoside content of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae) and the implications for insect herbivores. **Oecologia**, v. 91, p.201-207, 1992.
- BOWERS, M.D.; STAMP, N.E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. **Ecology**, v.74, n.6, p.1778-1791, 1993.
- BREMER, K. Asteraceae Cladistics & Classification. Portland: Timber Press, 752p., 1994.
- BRIGADÃO, M.P.L.; LOPES, N.P.; COLEPICOLO, P. Inhibitory mechanism of leukocyte respiratory burst by the sesquiterpene lacto lychnopholide through protein glutathionylation decrease. **Free Rad. Biol. Med.**, v.36, p.S57-S58, 2004.
- BROOKS, J.S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, p.769-782, 2004.
- BURNS, A.E.; GLEADOW, R.M.; WOODROW, I.E. Light alters the allocation of nitrogen to cyanogenic glycosides in *Eucalyptus cladocalix*. **Oecologia**, v.133, p.288-294, 2002.
- BUTA, J.G.; SPAULDING, D.W. Endogenous levels of phenolic in tomato fruit during growth and maturation. **J. Plant Growth Regul.**, v.16, p.43-46, 1997.

- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.179-189, 2000.
- CAPASSO, A.; BALDERRAMA, L.; SIVILA, S.C.; DE TOMMASI, N.; SORRENTINO, L.; PIZZA, C. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. **Planta Med.**, v.64, p.348-352, 1998.
- CARISTI, C.; BELLOCCO, E.; PANZERA, V.; TOSCANO, G.; VADALÀ, R.; LEUZZI, U. Flavonoids detection by HPLC-DAD-MS-MS in lemon juices from sicilian cultivars. J. Agric. Food Chem., v.51, p.3528-3534, 2003.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. J. Chromatogr. B, v.689, p.175-180, 1997.
- CECH, N.B. ENKE, C.G. Practical implications of some recent studies in eletrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrom. Rev.**, v.20, p.362-387, 2001.
- CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T.; AMADO JÚNIOR, R., R.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e das folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Cienc. Cult.**, v.39, p.551-553, 1987.
- CHAPPELL, J.; HAHLBROCK, K. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. **Nature**, v.311, p.76-78, 1984.
- CHAVES, N; ESCUDERO, J.C.; GUTIÉRREZ-MERINO, C. Quantitative variation of flavonoids among individuals of a *Cistus ladanifer* population. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.25, n.5, p.429-435, 1997.
- CHIARI, E.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; GRANDI, T.S.M.; STEHMANN, J.R.; ANJOS, A.M.G.; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytoter. Res.**, v.10, p.636-638, 1996.
- CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MESQUITA, A.L.; TAVARES, K.G. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.85, p.372-374, 1991.
- CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, p.239-243, 2004.
- CHRISTIE, P.J.; ALFENITO, M.R.; WALBOT, V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. **Planta**, v.194, p.541-549, 1994.
- CIPOLLINI JR, D.F. Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. **Oecologia**, v.111, p.84-90, 1997.

- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, ocurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J Sci. Food Agric.**, v.80, p.1033-1043, 2000.
- CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, ocurrence and dietary burden. J Sci. Food Agric., v.79, p.362-372, 1999.
- CLIFFORD, M.N.; JOHNSTON, K.L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.2900-2911, 2003.
- CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS<sup>n</sup>. J. Agric. Food Chem., v.53, p.3821-3832, 2005.
- CLIFFORD, M.N.; KNIGHT, S.; SURUCU, B.; KUHNERT, N. Characterization by LC-MS<sup>n</sup> of four new classes of chlorogenic acids in green coffee beans: dimethoxycinnamoylquinic acids, diferuloylquinic acids, caffeoyldimethoxycinnamoylquinic acids, and feruloyl-dimethoxycinnamoylquinic acids. J. Agric. Food Chem., v.54, p.1957-1969, 2006.
- CORDELL, G.A.; SHIN, Y.G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. **Pure Appl. Chem.**, v.71, p.1089-1094, 1999.
- COILE, N. C.; JONES, S. B. *Lychnophora* (Compositae : Vernonieae), a genus endemic to the Brazilian planalto. **Brittonia**, v.33, n.4, p.528-542, 1981.
- 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, India: Research Signpost, 2006a. p.99-141.
- CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, p.1030-1034, 2005.
- CROTTI, A.E.M.; VESSECHI, R.L.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por eletrospray: processos químicos envolvidos na formação e íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Quim. Nova, v.29, p.287-292, 2006b.
- CUADRA, P.; HARBORNE, J.B.; WATERMAN, P.G. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. **Phytochemistry**, v.45, n.7, p.1377-1383, 1997.
- CUNHA, W.R.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; DÍAZ, J.G.; HERZ, W. Eremantholides and a guaianolide from *Lychnophora rupestris*. **Phytochemistry**, v.39, p.387-389, 1995.

- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. J. Mass Spectrom., v.39, p.1-15, 2004.
- CUYCKENS, F.; MA Y.L.; POCSFALVI, G.; CLAEYS, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analusis**, v.28, p.888-895, 2000.
- DARROW, K.; BOWERS, M.D. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.25, n.1, p.1-11, 1997.
- DeLUCIA, E.H.; DAY, T.A.; VOGELMANN, T.C. Ultraviolet-B and visible light penetration into needles of two species of subalpine conifers during foliar development. **Plant Cell Environ.**, v.15, p.921-929, 1992.
- DOAN, A.T.; ERVIN, G.; FELTON, G. Temporal effects on jasmonate induction of anti-herbivore defense in *Physalis angulata*: seasonal and ontogenetic gradients. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, p.117-126, 2004.
- DUDT, J.F.; SHURE, D.J. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. **Ecology**, v.75, n.1, p.86-98, 1994.
- DUSTIN, C.D.; COOPER-DRIVER, G.A. Changes in phenolic production in the Hayscented Fern (*Dennstaedtia punctilobula*) in relation to resource availability. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.20, n.2, p.99-106, 1992.
- EDWARDS, E.; THOMAS-OATES, J. Hyphenating liquid phase separation techniques with mass spectrometry: on-line or off-line. **Analyst**, v.130, p.13-17, 2005.
- ELSOHLY, H.N.; CROOM, E.M.; KOPYCKI, W.J.; JOSHI, A.S.; McCHESNEY, J.D. Diurnal and seasonal effects on the taxane content of the clippings of certain *Taxus* cultivars. **Phytochem. Anal.**, v. 8, p.124-129, 1997.
- EMERENCIANO, V.P.; MILITÃO, J.S.L.T.; CAMPOS, C.C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M.A.C.; ZAMBON, M.; BRANT, A.J.C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.29, p.947-957, 2001.
- EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14 ed. London: WB Saunders Company, 612p., 1996.
- FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglicones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. J. Am. Soc. Mass Spectrom., v.12, p.707-715, 2001.
- FAINI, F.; LABBÉ, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. Biochem. Syst. Ecol., v.27, p.673-679, 1999.
- FAIRBAIRN, J.W.; SUWAL, P.N. The alkaloids of hemlock (*Conium maculatum* L.) II: evidence for a rapid turnover of the major alkaloids. **Phytochemistry**, v.1, p.38-46, 1961.
- FAIRBAIRN, J.W.; WASSEL, G. The alkaloids of *Papaver somniferum* L. I. Evidence for a rapid turnover of the major alkaloids. **Phytochemistry**, v.3, p.253-258, 1964.
- FAJER, E.D.; BOWERS, M.D.; BAZZAZ, F.A. The effect of nutrients and enriched CO<sub>2</sub> environments on production of carbon-based allelochemicals in *Plantago*: a test of the carbon/nutrient balance hypotesis. **Am. Nat.**, v.140, n.4, p.707-723, 1992.
- FENN, J.B. Eletrospray wings for molecular elephants. Nobel Lecture, December 8, 2002. **Prix Nobel (2003)**, p.154-184.
- FERRERES, F.; TOMÁS-LLORENTE, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; RIVERA, D.; OBON, C. Biochemical identification of *Sideritis serrata* x *S. bourgaeana* hybrids by HPLC analyses of flavonoids. **Z. Naturforsch.**, v.44c, p.568-572, 1989.
- FEUERSTEIN, I.; MÜLLER, D.; HOBERT, K.; DANIN, A.; SEGAL, R. The constitution of essential oils from *Artemisia herba alba* populations of Israel and Sinai. **Phytochemistry**, v.25, n.10, p.2343-2347, 1986.
- FIASSON, J.L.; GLUCHOFF-FIASSON, K.; MUGNIER, C.; BARGHI, N.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Flavonoid analysis of European species of the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.19, p.157-162, 1991.
- GATTUSO, G.; CARISTI, C.; GARGIULLI, C.; BELLOCCO, E.; TOSCANO, G.; LEUZZI, U. Flavonoid glycosides in bergamot juice (*Citrus bergamia* Risso). J. Agric. Food Chem., v.54, p.3929-3935, 2006.
- GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. Cardenolides of *Digitalis obscura*: the effect of phosphate and manganese on growth and productivity of shoot-tip cultures. **Phytochemistry**, v.45, p.81-85, 1997.
- GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Recent Adv. Phytochem.**, v.18, p. 273-320, 1984.
- GERSHENZON, J.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). **Plant Physiol.**, v.89, p.1351-1357, 1989.
- GLOWNIAK, K.; MROCZEK, T.; ZOBEL, A.M. Seasonal changes in the concentrations of four taxoids in *Taxus baccata* L. during the autumn-spring period. **Phytomedicine**, v.6, p.135-140, 1999.
- GOBBO-NETO, L. Estudo fitoquímico do extrato polar das folhas de Lychnophora ericoides Mart. e avaliação de sua atividade antiinflamatória.

Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 128p., 2002.

- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v.30, p.374-381, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, J.L.C.; ALMEIDA, M.C.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from Lychnophora ericoides (Asteraceae). Planta Med., v.71, p.3-6, 2005.
- GONNET, J.F. Flavonoid glycoside variation in wild specimens of *Centaurea montana* (Compositae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.20, n.2, p.149-161, 1992.
- GORALKA, R.J.L.; SCHUMAKER, M.A.; LANGENHEIM, J.H. Variation in chemical and physical properties during leaf development in california bay tree (*Umbellularia californica*): predictions regarding palatability for deer. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.24, p.93-103, 1996.
- GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; BORIN, M.R.M.B. **Biodiversidade: um** enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 267 p.,1996.
- GRACE, S.C.; LOGAN, B.A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, v.355, p.1499-1510, 2000.
- GRACE, S.C.; LOGAN, B.A.; ADAMS III, W.W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant Cell Environ.**, v.21, p.513-521, 1998.
- GRAEL, C.F.F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L.C. Chemical constituents of Lychnophora pohlii and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. Fitoterapia, v.76, p.73-82, 2005.
- GRAEL, C.F.F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W.R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. Phytother. Res., v.14, p.203-206, 2000.
- GRAHAM, J.S.; HALL, G.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. **Planta**, v.169, p.399-405, 1986.
- GRAY, D.E.; PALLARDY, S.G.; GARRETT, H,E.; ROTTINGHAUS, G.E. Effect of acute drought stress and time of harvest on phytochemistry and dry weight of st. John's wort leaves and flowers. **Planta Med.**, v.69, p.1024-1030, 2003.
- HALL, G.D.; LANGENHEIM, J.H. Temporal changes in the leaf monoterpenes of *Sequoia sempervirens*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.14, n.1, p.61-69, 1986.

- HARBORNE, J.B. Biochemical systematics of flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall Ltd., 1975. cap.19, p.1056-1095.
- HARBORNE, J.B. Higher plant-lower plant interactions: phytoalexins and phytotoxins. In: \_\_\_\_\_. Introduction to ecological biochemistry. 3ed. London: Academic Press Limited, 1989a. cap.10, p.302-340.
- HARBORNE, J.B. The coevolutionary arms race: plant defense and animal response. In:\_\_\_\_\_. Introduction to ecological biochemistry. 3ed. London: Academic Press Limited, 1989b. cap.7, p.214-239.
- HARBORNE, J.B.; BOARDLEY, M.; LINDER, H.P. Variations in flavonoid patterns within genus *Chondropetalum* (Restionaceae). **Phytochemistry**, v.24, n.2, p.273-278, 1985.
- HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Entomol. Exp. Appl.**, v.80, p.177-188, 1996.
- HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, v.89, v.503-512, 2002.
- HENDRIKS, H.; ANDERSON-WILDEBOER, Y.; ENGELS, G.; BOS, R.; WOERDENBAG, H.J. The content of parthenolide and its yeld per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Med.**, v.63, p.356-359, 1997.
- HERZ, W.; KUMAR, N.; VICHNEWSKI, W.; BLOUNT, J.F. Cytotoxic sesquiterpene lactones of *Eremanthus incanus* and *Heterocoma albida*. Crystal structure and stereochemistry of eregoyazin. J. Org. Chem., v.45, p.2503-2506, 1980.
- HEYWOOD, V. A., HARBONE, J. B., TURNER, B. L. The Biology and Chemistry of the Compositae. London: Acad. Press, Vol. I e II, 1977.
- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.160-163, 1987.
- HIRATA, K.; ASADA, M.; YATANI, E.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y. Effects of nearultraviolet light on alkaloid production in *Catharanthus roseus* plants. **Planta Med.**, v.59, p.46-50, 1993.
- HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. **Oecologia**, v.107, p.160-169, 1996.
- HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. **Planta Med.**, v.64, p.148-152, 1998.

- HØGEDAL, B.D.; MØLGAARD, P. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.28, p.949-962, 2000.
- HOOK, I.; POUPAT, C.; AHOND, A.; GUÉNARD, D.; GUÉRITTE, F.; ADELINE, M.T.; WANG, X.P.; DEMPSEY, D.; BREUILLET, S.; POTIER, P. Seasonal variation of neutral and basic taxoid contents in shoots of european Yew (*Taxus baccata*). Phytochemistry, v.52, p.1041-1045, 1999.
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J-L.; TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharm. Biol.**, v.39(Suppl.), p.18-32, 2001.
- HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. **Annu. Rev. Plant Phys.**, v.24, p.519-570, 1973.
- IASON, G.R.; HARTLEY, S.E.; DUNCAN, A.J. Chemical compsition of *Calluna vulgaris* (Ericaceae): do responses to fertilizer vary with phenological stage? Biochem. Syst. Ecol., v.21, p.315-321, 1993.
- IBAMA, Portaria n° 37-N de abril de 1992. Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção, 1992.
- ITENOV, K.; MØLGAARD, P.; NYMAN, U. Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day-night fluctuations of the latex water content. **Phytochemistry**, v.52, p.1229-1234, 1999.
- JENKS, M.A.; TUTTLE, H.A.; FELDMANN, K.A. Changes in epicuticular waxes on wildtype and *Eceriferum* mutants in *Arabidopsis* during development. **Phytochemistry**, v.42, p.29-34, 1996.
- JEONG, S.T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. **Plant Sci.**, v.167, p.247-252, 2004.
- JOHNSON, C.B.; KIRBY, J.; NAXAKIS, G.; PEARSON, S. Substantial UV-Bmediated induction of essential oil in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Phytochemistry**, v.51, p.507-510, 1999.
- JOHNSON, N.D.; BRAIN, S.A. The response of leaf resin to artificial herbivory in *Eridictyon californicum*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.13, p.5-9, 1985.
- JORDÃO, C.O.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Biological activity of the crude extracts and isolated substances from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Boll. Chim. Farm.**, v.136, p.56, 1997.
- JORDÃO, C.O.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L.C. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Phytother. Res.**, v.18, p.332-334, 2004.

- KAPLAN, M.A.C.; FIGUEIREDO, M.R.; GOTTLIEB, O.R. Variation on cyanogenesis in plants with season and insect pressure. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.11, p.367, 1983.
- KAROUSOU, R.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; LANARAS, T.; MANETAS, Y.; KOKKINI, S. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. **Phytochemistry**, v.49, p.2273-2277, 1998.
- KESKITALO, M.; PEHU, E.; SIMON, J.E. Variation in volatile compounds from tansy (*Tanacetum vulgare* L.) related to genetic and morphological differences of genotypes. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.29, p.267-285, 2001.
- KIM, S.K.; SAKAMOTO, I.; MORIMOTO, K.; SAKATA, M.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. Seasonal variation of saponins, sucurose and monosaccharides in cultivated *Ginseng* roots. **Planta Med.**, v.42, p.181-186, 1981.
- KOEPPE, D.E.; ROHRBAUGH, L.M.; RICE, E.L.; WENDER, S.H. The effect of age and chilling temperatures on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco. **Physiol. Plantarum**, v.23, p.258-266, 1970.
- KORTH, K.L.; DIXON, R.A. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from general wound response in leaves. Plant Physiol., v.115, p.1299-1305, 1997.
- KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiol.**, v.125, p.58-60, 2001.
- LEITE, F. Validação em análise química. 4ed. Campinas:Editora Átomo, 2002.
- LE-QUESNE, P.W.; LEVERY, S.B.; MENACHERY, M.D.; BRENNAN, T.F.; RAFFAUF, R.F. Antitumor plants. Part 6. Novel modified germacranolides and other constituents of Eremanthus elaeagnus Schultz-Bip (Compositae). J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, v.12, p.1572-1580, 1978.
- LINDROTH, R.L.; HSIA, M.T.S.; SCRIBER, J.M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.15, n.6, p.681-686, 1987.
- LOBSTEIN, A.; JAKO, L.R.; BERRURIER, M.H.; ANTON, R. Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. **Planta Med.**, v.57, p.430-433, 1991.
- LOGEMANN, E.; TAVERNARO, A.; SCHULZ, W.; SOMSSICH, I.E.; HAHLBROCK, K. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.1903-1907, 2000.
- LOPES; N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v.46, n.4, p.689-693, 1997.

- LOUGHRIN, J.H.; KEMP, T.R.H.; BURTON, H.R.; ANDERSEN, R.A. Effect of diurnal sampling on the headspace composition of detached *Nicotiana suaveolens* flowers. **Phytochemistry**, v.32, n.6, p.1417-1419, 1993.
- LYSS, G.; KNORR, A.; SCHMIDT, T.J.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. The antiinflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-KB. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.273, n.50, p.33508-33516, 1998.
- MA, Y.L.; HEUVEL, H.V.; CLAEYS, M. Characterization of 3-Methoxyflavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.13, p.1932-1942, 1999.
- MABRY, T.J. The chemistry of geographical races. **Pure Appl. Chem.**, v.34, p.377-400, 1973.
- MAÑEZ, S.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; SANZ, M.J. TERENCIO, M.C.; PERIS, J.B.; STUBING, G.; RIOS, J.L. A chemotaxonomic review of the subtribe *Crepidinae* based on its phenolic constituents. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.22, p.297-305, 1994.
- MARKHAM, K.R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In:\_\_\_\_\_. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press Inc., 1982. cap.3, 36-51.
- MARKHAM, K.R.; MABRY, T.J. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The flavonoids.** London: Chapman and Hall Ltd., 1975. cap.2, p.45-77.
- MARKHAM, K.R.; RYAN, K.G.; BLOOR, S.J.; MITCHELL, K.A. An increase in the luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. **Phytochemistry**, v.48, p.791-794,1998b.
- MARKHAM, K.R.; TANNER, G.J.; CAASI-LIT, M.; WHITECROSS, M.I.; NAYUDU, M.; MITCHELL, K.A. Possible protective role for 3',4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. **Phytochemistry**, v.49, p.1913-1919, 1998a.
- MARTIUS, C.F.P. Flora brasiliensis, v.VI, fasc. 62, 1873.
- MARUTA, Y.; KAWABATA, J.; NIKI, R. Antioxidative caffeoylquinic acid derivatives in the roots of burdock (*Arctium lappa* L.). J. Agric. Food Chem., v.43, p.2592-2595, 1995.
- MENKOVIĆ, N.; ŠAVIKIN-FODULOVIĆ, K.; SAVIN, K. Chemical composition and seasonal variations in the amount of secondary compounds in *Gentiana lutea* leaves and flowers. **Planta Med.**, v.66, p.178-180, 2000.
- MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; CRUZ, R.C.B.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituints isolated from *Lychnophora salicifolia*. **Phytother. Res.**, v.10, p.694-696, 1996.

- MOLGARD, P.; RAVN, H. Evolutionary aspects of caffeoyl ester distribution in dicotyledons. **Phytochemistry**, v.27, p.2411-2421, 1988.
- NDAMBA, J.; LEMMICH, E.; MØLGAARD, P. Investigation of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. **Phytochemistry**, v.35, n.1, p.95-99, 1994.
- NEUVONEN, S.; HAUKIOJA, E.; MOLARIUS, A. Delayed inducible resistance against a leaf-chewing insect in four deciduos tree species. **Oecologia**, v.74, p.363, 1987.
- NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. J. Chromatogr. A, v.1002, p.111-136, 2003.
- NIESSEN, W.M.A. LC-MS in quantitative analysis. **Rev. Anal. Chem.**, v.19, p.289-301, 2000.
- OKOLIE, P.N.; OBASI, B.N. Diurnal variation of cyanogenic glucosides, thiocyanate and rhodanese in cassava. **Phytochemistry**, v.33, p.775-778, 1993.
- OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytother. Res.**, v.10, p.292-295, 1996.
- OSIER, T.L.; HWANG, S.Y.; LINDROTH, R.L. Within- and between-year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.28, p.197-208, 2000.
- PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M.J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ-PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, Fco. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.29, p.663-672, 2001.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. *De novo* biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. **Plant Physiol.**, v.114, p.1161-1167, 1997.
- PELUSO, G.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BRESCIANO, E.; VUOTTO, M.L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. J. Nat. Prod., v.58, n.5, p.639-646, 1995.
- PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.14, n.3, p.255-281, 1986.
- PICMAN, A.K.; TOWERS, G.H.N. Sesquiterpene lactones in various populations of *Parthenium hysterophorus*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.10, n.2, p.145-153, 1982.
- POLLE, A.; MÖSSNANG, M.; SCHÖNBORN, A.; SLADKOVIC, R.; RENNENBERG, H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes: I. mineral, pigment and

soluble protein contents of needles as affected by climate and pollution. **New Phytol.**, v.121, p.89-99, 1992.

- RASTRELLI, L.; SARAVIA, A.; HERNANDEZ, M.; DE SIMONE, F. Anti-inflammatory activity-guided fractionation of *Gnaphalium stramineum*. **Pharm. Biol.**, v.36, n.5, p.315-319, 1998.
- REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E.E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.12, p.707-719, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, p.771-780, 2004.
- ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of american Vernonieae. **Smiths. Contrib. Bot.**, n.89, 116p., 1999.
- ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, v.184, p.430-435, 1974.
- ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. Seasonal cardenolide production and *Dop5βr* gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v.65, p.1869-1878, 2004.
- RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N.; MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v.15, p.1573-1580, 1976.
- ROSA, E.A.S.; HEANEY, R.K.; REGO, F.C.; FENWICK, G.R. The variation of glucosinolate concentration during a single day in young plants of *Brassica oleracea* var. *acephala* and *capitata*. **J. Sci. Food Agric.**, v.66, p.457-463, 1994.
- RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H.L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J. Inhibition of transcription factor NF-κB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorgan. Med. Chem.**, Oxford, v.7, p.2343, 1999.
- SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. J. Nat. **Prod.**, v.66, 693-695, 2003.
- SAKAMOTO, H.T., GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A.J.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). J. Braz. Chem. Soc., v.16, p.1396-1401, 2005.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant Physiol.**, 4ed., Wadsworth Publishing Co., Belmont California, 682p., 1991.
- SALMINEN, J.P.; OSSIPOV, V.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. **Phytochemistry**, v.57, p.15-22, 2001.

- SANTOS, M.D. Isolamento dos constituintes polares e avaliação da atividade antinociceptiva das raízes de Lychnophora ericoides Mart. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2002.
- SANTOS, P.A.; AMARANTE, M.F.C.; PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.; FRANÇA, S.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.O; LOTUFO, L.V.C.; PEREIRA, M.R.P.; LOPES, N.P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by Lychnophora ericoides cell culture. Chem. Pharm. Bull., v.52, p.1433-1435, 2004.
- SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **J. Ethnopharmacol.**, v.96, p.545-549, 2005.
- SARGENTI, S.R.; VICHNEWSKI, W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. **Phytochem. Anal.**, v.11, p.69-73, 2000.
- SCHMIDT, T.J.; BOMME, U.; ALFERMANN, A.W. Sesquiterpene lactone content in leaves of *in vitro* and field cultivated *Arnica montana*. **Planta Med.**, v.64, n.3, p.268-270, 1998.
- SCHMIDT, T.J. Toxic activities of sesquiterpeno lactones: structural and biochemical aspects. **Curr. Org. Chem.**, v.3, p.577-608, 1999.
- SCHOLZ, E.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. **Planta Med.**, v.60, p.360, 1993.
- SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES, A.J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I; COSTA, F.B. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF-κB. **Phytochemistry**, v.60, p.733-740, 2002.
- SCHWOB, I.; BESSIERE, J.M.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.32, p.735-745, 2004.
- SCORA, R.W., KUMAMOTO, J.; HORNER, P.F.; HOLLENBERG, J.L. Ontogenetic variation and diurnal study in the composition of essential oil in *Artemisia douglasiana*. J. Nat. Prod., v.47, p.279-284, 1984.
- SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in Asteraceae. **Bot. Rev.**, v.48, n.2, 1982.
- SEGAL, R.; FEUERSTEIN, I.; DANIN, A. Chemotypes of *Artemisia herba-alba* in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.15, n.4, p.411-416, 1987.

- SEIGLER, D.S. *In*: CONN, E.E., STUMPF, P.K. **The biochemistry of Plants A** comprehensive treatise. New York: Academic Press, 1981. v.7, cap.6, p.139.
- SEMIR, J. Revisão taxonômica de Lychnophora Mart. (Vernonieae, Compositae). Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 515p., 1991.
- SILANO, M.; VINCENZI, M.D.; VINCENZI, A.D.; SILANO, V. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia**, v.75, p.107-116, 2004.
- SILVA, M.G.V.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v.70, p.32-34, 1999.
- SLIMESTAD, R. Amount of flavonols and stilbenes during needle development of *Picea abies*; variations between provenances. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.26, p.225-238, 1998.
- Sociedade Botânica do Brasil. **Centuria plantarum brasiliensium exstintionis minitata.** Brasília, 176 p, 1992.
- SOUTHWELL, I.A.; BOURKE, C.A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, v.56, p.437-441, 2001.
- SPORER, F.; SAUERWEIN, M.; WINK, M. Diurnal and developmental variation of alkaloid accumulation in *Atropa belladonna*. **Acta Hortic.**, v.331, p.379-386, 1993.
- SPRING, O.; BIENERT, U. Capitate glandular hairs from sunflower leaves: development, distribution and sesquiterpene lactone content. **J. Plant Physiol.**, v.130, p.441-448, 1987.
- STEVENS, J.F.; WOLLENWEBER, E.; IVANCIC, M.; HSU, V.L.; SUNDBERG, S.; DEINZER, M.L. Leaf surface flavonoids of *Chrysothamnus*. **Phytochemistry**, v.51, p.771-780, 1999.
- TAKEARA, R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae). Phytomedicine, v.10, p.490-493, 2003.
- TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavaonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Lygustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytol.**, v.163, p.547-561, 2004.
- VANCE, N.C.; KELSEY, R.G.; SABIN, T.E. Seasonal and tissue variation in taxane concentrations of *Taxus brevifolia*. **Phytochemistry**, v.36, p.1241-1244, 1994.

- VÁZQUEZ-FLOTA, F.; CARRILO-PECH, M.; MINERO-GARCIA, Y.; MIRANDA-HAM, M.L. Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. **Plant Physiol. Biochem.**, v.42, p.263-628, 2004.
- VEIGA Jr.; V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v.28, p.519, 2005.
- VEIT, M.; BILGER, W.; MÜHLBAUER, T.; BRUMMET, W.; WINTER, K. Diurnal changes in flavonoids. J. Plant Physiol., v.148, p.478-482, 1996.
- VESELÁ, D.; ŠAMAN, D.; VALTEROVÁ, I.; VANĚK, T. Seasonal variations in the content of taxanes in the bark of *Taxus baccata* L. **Phytochem. Anal.**, v.10, p.319-321, 1999.
- VICHNEWSKI, W.; TAKAHASHI, A.M.; NASI, A.M.T.; GONÇALVES, D.C.R.G.; DIAS, D.A.; LOPES, J.N.C.; GOEDKEN, V.L.; GUTIÉRREZ, A.B.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Erememanthus seidelii*, *E. goyazensis* and *Vanillosmopsis erythropappa*. Phytochemistry, v.28, p.1441-1451, 1989.
- VIEIRA, R.F.; GRAYER, R.J.; PATON, A.; SIMON, J.E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.29, p.287-304, 2001.
- VITURRO, C.; MOLINA, A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). **Phytother. Res.**, v.13, p.422-424, 1999.
- VOGT, T.; GÜLZ, G. Accumulation of flavonoids during leaf development in *Cistus laurifolius*. **Phytochemistry**, v.36, p.591-597, 1994.
- WALLAART, T.E.; PRAS, N.; BEEKMAN, A.C.; QUAX, W.J. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. **Planta Med.**, v.66, p.57-62, 2000.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Extrinsic factors influencing production of secondary metabolites in plants. In: BERNAYS, E.A. **Insect-plant interactions**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1989. v.1, cap.4, p.107-134.
- WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Why are phenolic compounds so important?. In: WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. cap.3, p.44-65.
- WHEELER, N.C.; JECH, K.; MASTERS, S.; BROBST, S.W.; ALVARADO, A.B.; HOOVER, A.J.; SNADER, K.M. Effects of genetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. J. Nat. Prod., v.55, p.432-440, 1992.

- WILLIAMS, C.A.; DEMISSIE, A.; HARBORNE, J.B. Flavonoids as taxonomic markers in old-world *Lupinus* species. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.19, n.1, p.81-86, 1983.
- WILLIAMS, C.A.; HARBORNE, J.B.; GLASSMAN, S.F. Further flavonoid studies on *Attalea* specis and some related cocosoid palms. **Plant Syst. Evol.**, v.149, p.233-239, 1985.
- WILLIAMS, R.D.; ELLIS, B.E. Age and tissue distribution of alkaloids in *Papaver smniferum*. **Phytochemistry**, v.28, p.2085-2088, 1989.
- WILSON, I.D.; BRINKMAN, U.A.T. Hyphenation and hypernation. The practice and prospects of multiple hyphenation. **J. Cromatogr. A**, v.1000, p.325-356, 2003.
- WILT, F.M.; GEDDES, J.D.; TAMMA, R.V.; MILLER, G.C.; EVERETT, R.L. Interspecific variation of phenolic concentrations in persistent leaves among six taxa from subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.20, n.1, p.41-52, 1992.
- WILT, F.M.; MILLER, G.C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisisa tridentate* ssp. *wyomingensis* : Asteraceae). Biochem. Syst. Ecol., v.20, n.1, p.53-67, 1992.
- WISDOM, C.S.; RODRIGUEZ, E. Seasonal age-specific measurements of the sesquiterpene lactones and chromenes of *Encelia farinosa*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.11, p.345-352, 1983.
- WU, T.S.; WANG, M.L.; WU, P.L. Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*. **Phytochemistry**, v.43, n.4, p.785-789, 1996.
- YAMAURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. **Phytochemistry**, v.28, p.741-744, 1989.
- ZDERO, C.; BOHLMANN, F. Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. **Plant Syst. Evol.**, v.171, p.1-14, 1990.
- ZHANG, J.; BRODBELT, J.S. Structural characterization and isomer differentiation of chalcones by electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Mass Spectrom., v.38, p.555-572, 2003.
- ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v.50, p.115-133, 2001.

ZUCKER, M. Light and enzymes. Ann. Rev. Plant Physiol., v.23, p.133-156, 1972.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Gráficos de linearidade, curvas de calibração e equações de regressão linear obtidos para as substâncias utilizadas para validação da metodologia analítica desenvolvida.



Figura 1. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão vicenina-2.



**Figura 2.** Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão 6,8-di-*C*-β-glicosilcrisina.



**Figura 3.** Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão ácido 3,5-di-*O*-*E*-cafeoilquínico.



Figura 4. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão centraterina.



Figura 5. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão 4,5-diidro-15-desoxigoyazensolido.



**Figura 6.** Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão 4,5-diidroeremantolido C.



**Figura 7.** Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão 4,5-diidrolychnopholido.



Figura 8. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão 16α(1'-metilprop-1'Z-enil)-eremantolido.



Figura 9. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão lychnopholido.



Figura 10. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão pinocembrina.



Figura 11. Gráficos de linearidade nas concentrações analisadas (esquerda) e de calibração no intervalo da linearidade (direita) obtidos para a substância padrão pinostrobina.

## **APÊNDICE B**

Identificação dos picos cromatográficos, estruturas químicas e espectros de UV e massas de íons produto obtidos pelas análises por CLAE-DAD-EM/EM para os picos cromatográficos identificados. A numeração dos picos consta nas Figuras 10 e 11 do tópico 4.4. da seção Resultados e Discussão.



Figura 1. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 1 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 2.** Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 2 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 3. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 3 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 4. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 4 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 5. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 5 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 6.** Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 6 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 7. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 7 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 8.** Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 8 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 9. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 9 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 10. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 10 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 11. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 11 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 12. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 12 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 13. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 13 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 14. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 14 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 15. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 15 por CLAE-DAD-EM/EM.


Figura 16. Identificação, estrutura química e espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 16 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 17. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 17 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 18. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 18 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 19. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 19 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 20. Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 20 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 21.** Identificação, estrutura química, espectros de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 21 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 22. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 22 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 23. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 23 por CLAE-DAD-EM/EM.

225



Figura 24. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 24 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 25. Identificação, estrutura química e espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 25 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 26. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 26 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 27. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 27 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 28. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 28 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 29. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 29 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 30. Identificação, espectro de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 30 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 31. Identificação e espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 31 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 32. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 32 por CLAE-DAD-EM/EM.

pico cromatográfico 33:	
flavanona ou diidroflavonol	
(C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> )	0-
	300 350 nm

Figura 33. Identificação e espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 33 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 34.** Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 34 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 35. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 35 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 36. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 36 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 37. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 37 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 38. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 38 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 39. Identificação provável, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 39 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 40. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 40 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 41. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 41 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 42. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 42 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 43. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 43 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 44.** Fórmula molecular, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização negativa obtidos para o pico cromatográfico 44 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 45. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectros de massas de íons produto nos modos de ionização negativa (acima) e positiva (abaixo) obtidos para o pico cromatográfico 45 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 46. Identificação provável, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 46 por CLAE-DAD-EM/EM.



**Figura 47.** Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 47 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 48. Identificação, estrutura química, espectro de UV e espectro de massas de íons produto no modo de ionização positiva obtidos para o pico cromatográfico 48 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 49. Espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 49 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 50. Espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 50 por CLAE-DAD-EM/EM.



Figura 51. Espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 51 por CLAE-DAD-EM/EM.


Figura 52. Espectro de UV obtido para o pico cromatográfico 52 por CLAE-DAD-EM/EM.

nico	) (nm)	41	4.0	4 111	1 11/	1 V	4 1/1 4			/ 1 x	21	2 11	2 111	2 11/	24			2 12	2 Y	21	211		N/ 2	v   2 VI	2 \/II	2 \/III	2 17	2 Y		.	4 11/						51	5 11 5		5 V	5 VI	5 VII	5 VIII	
pico	λ (IIII)	1-1	1-11	1-111	1-14	1-4	1-41	-•11		· ···	2-1	2-11	2-111	2-14	2-0 2	2-11 2	2-11	2-17	2-7	J-1	5-11		-10 3-	v 3-vi	3-41	3-VIII	3-17	3-7	4-1 4-1	4-111	4-1V	4-V .			4-17	4-7	5-1	5-11 5-	II 3-IV	5-V	5-01	5-41	5-VIII -	J-IA J-A
2	325	0,10 tr	0,31 tr	0,24 tr	0,25	0,46 tr	tr C	),32 0	),33 tr	0,33	tr tr	0,11 tr	0,16 tr	0,14 tr	0,14 tr	tr (	0,09 0,09 tr tr	0,13 tr	0,14 tr	tr tr	0,10 C	,20 tr	tr ti tr ti	· 0,11	0,06 tr	0,09 tr	0,09 tr	0,10 tr	0,38 0,2	2 0,28 tr	0,31 tr	0,19 ( tr	0,26 0,2	5 0,28	0,10 tr	0,22 tr	0,10 tr	0,30 0,2	2 0,13	0,28	0,17	0,40 tr	0,19 ( tr	0,22 0,41
2	325	u tr	u 0.49	u 0 12	0.35	u 0.61	u tr C		u u ) 37 tr	0.40	0.09	u 0.21	0.26	u 0 24	0.09	tr (	u u 0.10 0.23	u 0.22	u 0.26	u 0.21	u 0 35 0	u 30_0	16 0 1	u 8 0 18	0.20	u 0.49	u 0 24	u 0 31	0.26 0.1	" 8 0 38	u 0 32	0.26 (	152 03	0 0 25	u 0.44	u 0.24	u 0 14	0.37 0.2	u 1 0 16	u 0.27	0.16	u 0.46	0 17 (	u u 1 24 0 54
4	325	0.25	1.89	1 22	1 48	2.28	0.61 1	134 1	140 0.29	3 1 89	0,03	0,21	0,20	0,24	0,03	tr (	0,10 0,23	0,22	0,20	0,21	0,55 0	86 0	23 0 2	0 0,10 5 0.57	0,20	0,43	0,24	0,81	1 23 1 1	5 1 44	1 19	0,20	26 1 2	5 1 13	0,44	0,24	0,14	1 89 1 4	3 0.58	1 14	1 44	1 94	0,17	0,04
5	270	tr	0.13	0.05	0.06	0.06	0.06 0	0.09 0	0.03 0.04	5 0.08										tr	tr (	02	tr t	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	0.02	0.02 0.0	)2 tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
6	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr t	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr t	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
7	325	2.15	3.40	2.70	1.97	2.64	2.71 4	1.20 2	2.65 3.99	3.54	0.98	0.46	0.51	0.39	0.66 (	).58 (	0.41 0.57	0.59	0.57	0.40	0.36 0	.62 0	.38 0.2	4 0.33	0.32	0.76	1.05	0.70	0.79 0.5	2 0.53	0.44	0.49 (	0.87 0.6	5 0.52	0.68	0.57	0.67	0.36 0.3	35 0.34	0.52	0.63	0.11	0.41 (	0.31 0.37
8	325	tr	0,44	0,19	0,31	0,31	tr C	),22 0	),33 tr	0,31	0,13	0,21	0,24	0,27	0,15	tr (	0,08 0,22	0,25	0,25	0,37	0,55 0	,41 0	,28 0,3	34 0,33	0,33	0,53	0,36	0,45	0,45 0,3	8 0,77	0,60	0,51 (	0,23 0,3	8 0,50	0,27	0,49	0,15	0,65 0,2	25 0,23	0,45	0,31	0,79	0.26 (	0,30 0,61
9	270	0,64	0,30	0,30	0,51	0,41	0,27 0	0,67 0	0,25 0,25	5 0,16	0,16	0,06	0,05	0,05	0,08 0	),05 (	0,05 0,09	0,10	0,07	0,11	0,16 0	,24 0	,21 0,0	0,19	0,13	0,17	0,18	0,23	0,11 0,04	4 0,05	0,16	0,10 (	0,05 0,4	3 0,09	0,08	0,12	0,21	0,08 0,0	0,23	0,12	0,13	0,08	0,09 (	0,12 0,07
10	325	0,36	1,59	1,86	1,74	1,62	0,63 1	1,63 1	1,39 0,67	7 1,39	tr	0,13	0,19	0,16	tr	tr (	0,10 0,12	0,19	0,14	0,32	0,35 0	,45 0	,36 0,3	35 0,25	0,27	0,76	0,54	0,65	1,39 1,6	6 1,34	1,33	1,20 (	,57 1,5	1 1,61	0,68	0,78	0,70	1,13 1,9	0 0,77	0,59	2,07	1,51	1,99	1,45 1,43
11	325	1,41	7,28	5,85	6,08	5,32	2,58 4	1,23 4	1,24 1,67	7 6,03	0,66	1,87	2,17	1,29	0,47 (	),35 (	0,39 1,23	1,71	1,66	1,02	1,82 2	.,42 0	,51 1,3	3 1,47	0,81	2,04	1,55	1,67	3,77 4,72	2 5,51	3,76	3,50 4	,83 3,7	4 2,94	1,94	4,04	2,45	3,02 4,0	07 1,56	3,39	4,60	6,53	2,94	1,77 6,13
12	325	0,27	2,35	2,61	2,26	2,68	0,91 2	2,33 2	2,18 0,1	5 2,06	0,09	0,44	0,52	0,35	tr	tr (	0,05 0,09	0,39	0,36	1,12	1,18 1	,20 1	,10 1,0	0,60	0,88	1,16	1,30	1,16	2,40 2,5	9 2,49	2,49	2,48 2	2,09 2,3	4 2,86	2,36	1,71	1,09	2,23 2,2	25 1,36	1,45	3,63	2,44	0,70	2,34 2,45
13	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	· tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
14	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	0,04	0,07	0,07	0,10	0,09	tr	tr 0,06	0,06	0,06	0,08	0,10 0	,09	tr 0,*	2 0,21	tr	0,23	0,19	0,17	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	0,20	0,26 0,0	0,10	0,30	0,25	0,38	0,28 (	0,23 0,31
15	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	· tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
16	325	tr	1,07	tr	0,85	tr	tr 1	1,04 1	l,21 tr	1,24	tr	tr	0,10	tr		(	0,05 0,05	0,09	tr	0,26	0,39 0	,67 0	,24 0,3	80 0,15	0,05	0,50	tr	0,53	0,33 0,3	8 0,62	0,41	0,55 0	0,60 0,4	9 0,44	0,72	0,49	0,27	0,46 0,7	3 0,16	0,56	0,32	0,86	0,31 (	0,29 0,56
17	270	0,07	0,24	0,12	0,23	0,29	C	0,32 0	0,26 0,07	7 tr														·															·					
18	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr t	· tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
19	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
20	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	• tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
21	270	0,06	0,09	0,09	0,07	0,11	0,16 0	0,12 0	0,09 0,08	5 0,07	0,25	0,49	0,42	0,63	0,50 0	),49 (	0,51 0,49	0,49	0,45	0,28	0,22 0	,09 0	,03 0,2	2 0,21	0,11	0,29	0,15	0,19	0,11 0,0	5 0,14	0,18	0,15 (	0,13 0,1	2 0,04	0,08	0,27	0,26	0,17 0,0	0,20	0,19	0,19	0,17	0,11 (	0,13 0,09
22	325	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	• tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
23	270	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	0,05	0,10	0,09	0,09	0,12 (	),07 (	0,06 0,10	0,11	0,06	tr	tr		ti	·		tr	0,05	0,01		tr	tr	tr (	),02 tr	0,02	tr	tr	0,03	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	0,02
24	270	0,19	0,16	0,22	0,33	0,85	(	),78 U	),38 0,20	0,15														·															·					
25	325	UT	U 0.25	tr 0.72	UT 1 74	т 2.12	U 0 61 1			U 1 65	tr tr	UT	U 0 11	tr tr	tr 0.16	tr (		tr 0.12	tr tr	tr tr	tr C	tr 122 0	u u		U 21	UT	tr 0.40	tr		U 1 0 56	τ 0.80	U 0.52 (	U U	U U 0 46	U U 20	UT 0.21	U 0 5 9	U U	tr 2 0 4 1	tr 0.27	1 22	U 0.25	tr 1 20 (	
20	270	0,12	0,35	0,73	1,74	2,12	0,01 1		1,01 1,03	5 1,05	u	0,15	0,11	u	0,10	u	0,05 0,09	0,12	u	u	u C	,22 0	,40 0,3	0,20	0,21	0,50	0,40	0,40	0,95 0,9	+ 0,50	0,80	0,55 (	0,24 0,0	9 0,40	0,39	0,31	0,56	0,30 0,7	2 0,41	0,37	1,23	0,35	1,29	5,00 0,40
21	270		tr	0,05	u 0.04			0.00		1 0.05											0.04 0		03 00	3 0.05	0.03	0.05	0.02		0,00 0,4	3 0,39	0.02		tr 0.0	1 0.03		0.04		0.02 0.0		0.04	0.03	0.02	0.02 (	
20	270	0,03	tr	0.04	0,04	0,03	0,02 0	0,04 0	0,00 0,0	3 0.05										0,03	0.03 0	08 0	06 0,0	0,00	0.04	0,00	0.02	0.07	0.04 0.0	2 0.02	0.02	tr	tr 0.0	3 0.02	0,03	0.04	0,05	0.02 0.0	0,01	0,04	0.04	0.02	0.02 (	0,02 0.06
30	270	0.19	0.10	0.15	0.20	0.18	0.11		0.09	0.06																																		
31	270	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	0,10	0,12	0,14	0.05	0.08 0	),10 (	0,09 0,11	0,13	0,10										0,02	0,03	0.05	(	0,02 0,0	2 0,03		0,05	(	0,02 ti	0,03	tr	++	0,03	tr	tr
32	270	0,31	0,42	0,26	0,61	0,11	0,34 0	),20	0,32	2 0,34																													·		++			
33	270	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	0,09	0,09	0,10	0,04	0,05 0	),08 (	0,07 0,09	0,10	0,08	tr	tr	tr	tr ti	· tr	tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr tr	tr	tr	tr	tr	tr ti	tr	tr	tr	tr	tr	tr tr
34	270	0,60	0,53	0,45	0,64	0,18	0,53 0	),23 0	0,05 0,90	0,26														·															·		1-1			
35	270	0,51	0,35	0,45	0,67	0,20	0,34 0	0,65 0	0,94 0,57	7 0,64																													·					
36	270	0,09	0,13	0,12	0,16	0,25	0,15 0	),12	0,1	1 0,24														·															·		1			
37	270	0,59	0,74	0,73	0,94	1,16	1,46 1	1,01	1,2	5 1,02																																		
38	270	0,23	0,33	0,40	0,25	0,40	0,33 0	0,45 0	0,26 0,17	7 0,14	0,53	0,89	0,75	0,96	0,95 0	),63 (	0,60 0,81	0,94	0,80	0,64	0,52 0	,29 0	,35 0,5	67 0,34	0,39	0,40	0,51	0,53	0,42 0,24	4 0,38	0,64	0,43 (	0,44 0,4	6 0,48	0,60	0,77	0,58	0,27 0,3	84 0,43	0,45	0,30	0,37	0,25 (	0,52 0,24
39	270	0,39	0,48	0,37	0,45	0,22	0,21 0	),43	0,96	6 0,67														·															·					
40	325	2,39	3,78	3,78	1,31	3,06	4,33 3	3,93 3	3,28 2,68	3 1,90	5,88	5,86	5,87	6,05	6,99 4	4,14	4,19 5,41	6,08	4,70	5,54	3,78 2	3,68	,75 4,8	3,39	3,03	4,00	3,86	4,98	5,85 3,2	8 4,01	5,35	3,84 4	,62 4,8	4 4,14	2,59	6,67	5,00	3,88 3,2	4,09	4,23	2,90	5,78	3,05 4	4,77 3,15
41	270	0,39	0,38	0,51	0,59	0,70	0,83 1	1,05 2	2,00 0,74	4 0,39																																		
42	270	0,56	0,45	1,19	0,52	0,94	1,21 0	0,71 0	0,70 0,53	3 0,36	0,81	0,90	0,95	1,40	0,60	),95 (	0,88 0,98	1,23	1,43	0,97	0,66 0	,41 0	,44 0,8	88 0,87	0,51	0,78	0,86	0,91	0,51 0,3	7 0,64	0,98	0,60 (	0,53 0,6	8 0,67	0,81	1,22	0,89	0,79 0,5	5 0,79	0,96	0,48	0,70	0,66 (	0,84 0,64
43	270	0,04	0,06	0,05	0,14	0,17	0,10 0	),21 0	0,32 0,13	3 0,10														·																				
44	270	tr	0,04	0,11	0,02	0,03	0,09 0	0,03 0	0,05 0,02	2 tr	0,06	0,14	0,16	0,24	0,25 0	),11 (	0,10 0,15	0,20	0,09	0,07	0,06 0	,02 0	,02 0,0	07 0,02	0,01	tr	0,05	0,05	0,03 tr	tr	0,06	0,02 (	0,03 0,0	3 0,03	0,02	0,04	0,02	0,03 0,0	0,04	0,02	tr	0,09	tr (	0,04 tr
45	325	4,86	11,4	8,96	3,73	9,00	10,3 8	3,54 1	2,3 7,73	3 5,29	5,19	9,65	6,63	7,87	7,69 6	5,09 \$	5,98 6,48	8,03	7,80	8,00	5,38 3	,86 5	,01 5,5	51 5,76	4,51	5,02	7,63	6,86	8,75 6,6	6 6,05	7,04	6,51 6	6,96 6,2	9 5,81	1,97	8,32	7,97	8,19 6,9	9,57	6,53	5,19	11,7	4,83 8	8,01 7,08
46	270	0,02	0,06	0,08	0,04	0,05	0,09 0	0,05 0	0,05 0,02	2 0,04	0,06	0,08	0,09	0,11	0,16	),10 (	0,08 0,09	0,11	0,08	0,11	0,05 0	0,03 0	,06 0,0	06 0,03	0,04	0,04	0,07	0,66	0,05 tr	0,04	0,07	0,05 (	0,05 0,0	4 0,03	0,03	0,05	0,06	0,05 0,0	0,04	0,04	0,04	0,11	0,03 (	0,06 0,03
47	270	0,32	0,52	0,97	0,59	0,59	0,72 1	1,40 0	0,73 0,44	+ 0,33	0,70	1,68	1,40	1,65	1,29 1	1,35	1,31 1,46	1,70	1,83	0,57	0,48 0	0,24 0	,39 0,3	0,53	0,34	0,38	0,64	0,51	0,50 0,5	2 0,61	0,89	0,45 (	0,83 0,6	3 0,63	0,69	0,92	0,47	0,57 0,2	4 0,67	0,42	0,30	0,78	0,31 (	0,59 0,41
48	270	0,06 +r	0,06	0,10	0,06	0,00	0,14	1,07 0		0,04	0,08	0,32	0,32	U,20 tr	0.05	1,40 ( 1,02 (		0,29	0,21	0,23	0.10		12 0.2	9 0,10	0,12	0,15	0,24	0,22	0,13 0,0	1 U,U6	0,19	0,19 (	1, 12 0, 1	3 0.04	0,16	0,20	0.12		0,13	0,18	0,09	0,40	0.12 0	0,34 0,11
49 50	270	u tr	0,03	0,02	0,02	0,02	0,00			3 0.02	u tr	0,03	0.05	u 0.07				0,04	0,04	0,22	0,19		07 0.0	0 0,14	0,09	0,10	0,12	0,14	tr 0.0	7 0.00	0,11	0,03	02 0,0	5 0.04	0,03	0,09	0,12			0,09	0,07	0,17	0,13 0	
51	270	u tr	0,02	0,05	0,00	0,04	0,00 0			3 0.03	u tr	0,09	0,00 tr	0.02				0,00	0,00	0,00	J,U4 U		,07 0,0		0,11	0,00	0,12	0,10	u 0,0	, 0,09	0,00	0,09 ( tr	,20 U, I	0,03	0,12	0,12	0.07			0,07	0.05	0,00	0.04 0	0,03
52	270	u 	0,02			0,00		,+ U			u 0 14	0,03	0.35	0.46	0.32	) 19 (	0,00 0,00	0.37	0.22						<u> </u>							u 		0,03		0,04		u,uz U,U		0,05		0,00	J, J4 (	
V2	210		<u> </u>		<u> </u>						5,17	5,23	0,00	5, 10	5,52	.,	, <u></u> 0,00	3,51	<i>v,22</i>						1	1									<u> </u>					_				

APÊNDICE C -	Áreas relativas (área do pico da substância	/ área do p.i.) dos picos cromatográficos	, obtidas para os 50 índivíduos de <i>L</i>	ericoides analisados pela metodologia an
--------------	---	---	---	--

tr = traços ; ---- = não observado

## nalítica.