

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO
***Urochloa* (POACEAE) E CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO**
DE *Cespedesia spathulata* (OCHNACEAE)

DÉBORA RAMOS DE OLIVEIRA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Urochloa* (POACEAE) e
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Cespedesia spathulata* (OCHNACEAE)**

Débora Ramos de Oliveira

Sob orientação do
Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho

E coorientação do
Prof. Dr. Raimundo Braz Filho

Tese submetida com requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2019

Oliveira, Débora Ramos de , 1989-
O48e ESTUDO FITOQUÍMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Urochloa*
(POACEAE) e CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Cespedesia*
spathulata (OCHNACEAE) / Débora Ramos de Oliveira. -
Seropédica, 2019.
172 f.

Orientador: Mário Geraldo de Carvalho.
Coorientador: Raimundo Braz Filho.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Pós-Graduação em Química, 2019.

1. *Urochloa ruziziensis*. 2. *Urochloa humidicola*.
3. *Cespedesia spathulata*. 4. Saponinas esteroidais.
5. Tirosinase. I. Carvalho, Mário Geraldo de , 1952-,
orient. II. Braz Filho, Raimundo , 1935-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós
Graduação em Química. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO


INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DÉBORA RAMOS DE OLIVIERA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

TESE APROVADA EM 16/12/2019



Mário Geraldo de Carvalho (Dr.) IQ-UFRRJ
(Orientador e Presidente)



Alaíde de Sá Barreto (Dr.^a) UEZO



Maria Raquel García Vega (Dr.^a) UENF



Lisieux de Santana Julião (Dr.^a) IQ-UFRRJ



Luciano Ramos Suzart (Dr.) IQ-UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Édila.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de ter nascido em um lar amoroso e por ter me dado pais que sempre me incentivaram a estudar e ir além de suas próprias conquistas. Aos meus pais, Antonio e Édila, meu irmão Renan e meu marido Fred que têm me acompanhado, apoiado e incentivado nesta caminhada árdua.

Agradeço pelos 11 anos de orientação que os professores Dr. Mário Geraldo de Carvalho e Dr. Raimundo Braz Filho dedicaram a mim, exemplos de pesquisador e educador.

Agradeço à UFRRJ que desde 2004 é responsável pela minha formação intelectual e pessoal desde o Ensino Médio até agora o Doutorado em Química. O ensino federal é transformador e tem muita qualidade, agradeço a todos os professores que me inspiraram e me ajudaram a chegar até aqui.

Aos técnicos do IQ-UFRRJ que com sua dedicação contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

A Professora Dr.^a Márcia Cristina pela oportunidade e orientação na execução dos ensaios enzimáticos. Aos doutores Kirley Canudo e Paulo Riceli (EMBRAPA-Ceará), que disponibilizaram os equipamentos e seu tempo na execução dos experimentos de desreplicação.

Aos amigos que fiz nesses anos que estudei na UFRRJ, aos que dividiram a bancada comigo, Carlos, Mirza, Ilna, Queli, Tereza e Victor, a companhia de cada um fez com que a jornada se tornasse mais leve e divertida. Em especial ao amigo Dr. Delci de Deus Nepomuceno[†] pela orientação Zootécnica desde meu Mestrado, pelo grande ensinamento sobre a pesquisa científica, que nos deixou em 2018 e faz muita falta.

A todas as alunas de iniciação científica que tive o prazer de acompanhar, que se tornaram minhas amigas e com orgulho vejo-as crescendo em suas profissões.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Assim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e aos órgãos de fomento FAPERJ e CNPQ pelo suporte financeiro.

RESUMO

de Oliveira, Débora Ramos. **Estudo fitoquímico de espécies do gênero *Urochloa* (Poaceae) e contribuição ao estudo de *Cespedesia spathulata* (Ochnaceae)**. 2019. P. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019

As técnicas cromatográficas aplicadas nos extratos e partições de *Urochloa ruziziensis*, aliado a aplicação de métodos físicos de análise orgânica, possibilitaram o isolamento e a identificação de oito substâncias; dentre elas os ácidos orgânicos já conhecidos no gênero, um flavonoide, a tricetina, e duas saponinas esteroidais, dioscina e colletinsídeo III, e as saponinas 3-*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-estigmasterol. Como análise adicional ao estudo fitoquímico clássico, os extratos brutos de *U. ruziziensis* e *U. humidicola* foram analisados por desreplicação com CLUE-EM. A comparação dos perfis cromatográficos e EM permitiu perceber que apresentaram em comum a presença de saponinas com esqueleto diosgenina e penogenina, sendo frequente as unidades de açúcar do tipo ramnose e glicose. Na espécie *U. ruziziensis* foi possível identificar mais sete substâncias, dentre elas quatro flavonoides, carlinsídeo, schaftosídeo, isoschaftosídeo e ombuina 3-*O*-rutinosídeo. As saponina dioscina e/ ou colletinsídeo III, que também foram identificadas durante o isolamento cromatográfico, e a penogenina-3 β -*O*- β -D-glicopiranosil-[(2-1)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(4-1)-*O*- α -L-ramnopiranosil. Na espécie *U. humidicola* foi possível identificar, através da desreplicação, cinco substâncias. Os flavonoides derivados da tricetina, a Tricetina-7-metil-eter-3'-*O*- β -D-glicosil-5'-*O*- α -L-raminosídeo e a sugestão da inédita Tricetina 4'-*O*- β -D-glicosil-[(2-*O*-1)- α -ramnosil-(1-*O*-1)- α -ramnosil. As saponinas Pariphyllin A, Solanigrósido H, e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-(1-4)- α -L-ramnopiranosil-(1-4)- β -D-glicopiranosil-(1-4)-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)]- β -D-glicopiranosídeo-espirosta-5-eno. Percebeu-se diferenças específicas principalmente nos tipos flavonoides presentes em ambas, já que em relação às classes de metabólitos já esperávamos a identificação das saponinas esteroidais e flavonoides. A contribuição ao estudo fitoquímico com a espécie *Cespedesia spathulata*, permitiu expandir os conhecimentos com relação à composição fitoquímica da espécie. Além do biflavonoide ochnaflavona já identificado, os processos cromatográficos e os métodos físicos de análise permitiram identificar mais vinte seis substâncias. As flavonas vitexina, orientina e 6''-acetil-vitexina, duas flavan-3-ol catequina e epicatequina, dois esteroides sitosterol e estigmasterol, o álcool fitol, (*Z*) 7-hexadecenal, hexadecil (4-metil-1-pentila) oxalato, 4-heptil- γ -lactona, 2-(5-oxohexil)ciclopentanona, decanodiato de 2-etil-hexila e treze ésteres metílicos alifáticos. A partição acetato de etila, oriunda do extrato bruto das folhas desta espécie, e as substâncias ochnaflavona, a mistura catequina e epicatequina, isoladas da mesma partição, tiveram seu potencial influenciador enzimático testado frente a ação da enzima tirosinase. Apenas a partição e as catequinas demonstraram ativação sobre a ação da enzima tirosinase, 104% e 384%, respectivamente.

Palavras chave: *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa humidicola*, *Cespedesia spathulata*, flavonoides, saponinas esteroidais, biflavonoides, tirosinase.

ABSTRACT

de Oliveira, Débora Ramos. **Phytochemical study of species of genus *Urochloa* (Poaceae) and contributon to the study of *Cespedesia spathulata* (Ochnaceae)**. 2019. P. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2019

The chromatographic techniques applied to *Urochloa ruziziensis* extracts and partitions, together with the application of physical methods of organic analysis, allowed the isolation and identification of eight substances, among them the organic acids already known in the genus, one flavonoid, tricetin, and two steroidal saponins, dioscin and collettinside III, and the triterpene saponins 3-O- β -D-glycopyranosyl sitosterol and 3-O- β -D-glycopyranosyl stigmaterol. In addition to the classical phytochemical study, the crude extracts of *U. ruziziensis* and *U. humidicola* were analyzed by dereplication using UPLC-MS. Their profiles were compared, being common the presence of diosgenin and penogenin skeleton saponins, together the sugar type unities rhamnose and glucose. In the species *U. ruziziensis* it was possible to identify seven more substances, among them four flavonoids, carlinside, schaftoside, isoschaftoside and ombuin 3-O-rutinoside. The saponin dioscin and / or collettinside III, that were also identified during chromatographic isolation and protodioscin and penogenin 3 β -O- β -D-glycopyranosyl-[(2-1)-O- α -L-rhamnopyranosyl-(4-1)-O- α -L-rhamnopyranosyl]. In *U. humidicola* it was possible to identify, through dereplication, five substances. Tricetin derived flavonoid, tricetin 7-methyl-ether-3'-O- β -D-glucosyl-5'-O- α -L-rhamnoside and the suggestion of unprecedented tricetin 4'-O- β -D-glucosyl-[(2-1)- α -rhamnosyl-(4-1)- α -L-rhamnopyranosil]. The saponins Pariphyllin A, Solanigrósido H and 3-O- β -D-glycopyranosyl-(1-4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-4)- β -D-glycopyranosyl-(1-4)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)]- β -D-glycopyranosyl spirost-5-eno. Specific differences were noticed mainly in the flavonoid types presente in both, since in relation to the metabolite classes we expected the identification of steroidal saponins and flavonoids. The contribution to the phytochemical study with the species *Cespedesia spathulata*, allowed expanding the knowledge regarding the phytochemical composition of the species. In addition to the ochnaflavone biflavonoid already identified, chromatographic processes and physical analysis methods allowed to the identification of additional twenty-six substances. The flavones vitexin, orientin and 6''-acetyl-vitexin, two flavan-3-ols catechin e epicatechin, two steroids sitosterol and stigmaterol, the alcohol phytol, (Z)-hexadec-7-enal, hexadecyl (4-methylpentyl) oxalate, 5-heptyldihydro-2(3H)-furanone, 2-(5-oxohexyl)cyclopentanone, 1,10-bis(2-ethylhexyl)decanediate and thirteen aliphatic methyl esters. The ethyl acetate partition, derived from the raw leaf extract of this species, and the ochnaflavone, catechin and epicatechin mixture, isolated from the same partition, had their enzymatic influencing potential tested against the action of the tyrosinase enzyme. Only the partition and catechins showed activation on the action of the tyrosinase enzyme, 104% and 384%, respectively.

Key words: *Urochloa ruziziensis*, *Urochloa humidicola*, *Cespedesia spathulata*, flavonoids, steroidal saponins, biflavonoids, tyrosinase.

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Expansão do espectro RMN ^1H (500 MHz; Piridina- d_5) substâncias 1 e 2.....	30
Espectro 2. Expansão do espectro RMN ^1H (Piridina, 500 MHz) substâncias 1 e 2.	30
Espectro 3. Expansão do espectro RMN ^{13}C -DEPTQ (125MHz; Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	30
Espectro 4. Expansão do espectro RMN ^{13}C -DEPTQ (125MHz; Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	31
Espectro 5. Expansão do espectro RMN ^{13}C -DEPTQ (125MHz; Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	31
Espectro 6. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	32
Espectro 7. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	32
Espectro 8. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	33
Espectro 9. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	34
Espectro 10. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	35
Espectro 11. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.	35
Espectro 12. EM-IES, modo positivo, $[\text{M}+\text{H}]^+$ da substância 1 e 2.....	36
Espectro 13. RMN ^1H (500 MHz; Piridina- d_5 ;) das substâncias 3 e 4.	38
Espectro 14. Expansão do RMN ^{13}C - DEPTQ (125 MHz; Piridina- d_5 ;) das substâncias 3 e 4.	39
Espectro 15. Expansão do RMN ^{13}C - DEPTQ (125 MHz, Piridina- d_5 ;) das substâncias 3 e 4.	39
Espectro 16. Experimento HSCQ (500/125 MHz; Piridina- d_5) da mistura de substâncias 3 e 4.	40
Espectro 17. RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$; 400 MHz) da substância 5.	41
Espectro 18. RMN ^{13}C - DEPTQ ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$, 100 MHz) da substância 5.	42
Espectro 19. Mapa de contorno HSQC (400/ 100 MHz) da substância 5.	42
Espectro 20. Mapa de contorno HMBC (400/ 100 MHz) da substância 5.	43
Espectro 21. EM-IES $[\text{M}-\text{H}]^-$ da substância 5, Tricina.....	43
Espectro 22. RMN ^1H (500MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.	46
Espectro 23. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.	47
Espectro 24. RMN ^{13}C – DEPTQ (125 MHz; MeOD) da substância 6, 7 e 8.....	47
Espectro 25. Mapa de contorno COSY (500/ 500 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.	48
Espectro 26. Mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.	49
Espectro 27. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.	49
Espectro 28. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.	50

Espectro 29. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 9.	55
Espectro 30. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 10.	56
Espectro 31. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 11.	56
Espectro 32. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 12.	57
Espectro 33. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 13.	58
Espectro 34. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 14.	58
Espectro 35. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 15.	59
Espectro 36. EM-IES [M-H] ⁻ da substância 16.	60
Espectro 37. EM-IES [M+H] ⁺ da substância 17.	61
Espectro 38. EM-IES [M+H] ⁺ da substância com tr 4,579 (UHMH ₂ O).	62
Espectro 39. EM-IES [M+H] ⁺ da substância 18.	63
Espectro 40. EM-IES [M+H] ⁺ da substância 19.	63
Espectro 41. EM-IES [M+H] ⁺ da substância 20.	64
Espectro 42. EM-IES [M+H] ⁺ da substância 21.	66
Espectro 43. EM-IES [M+H] ⁺ da substância com TR 7,09.	70
Espectro 44. Espectro de RMN ¹ H da fração CSMH ₂ O-H 10-11 (500 MHz) em CDCl ₃	92
Espectro 45. Espectro de RMN ¹³ C (DEPTQ) (125 MHz; CDCl ₃) da fração CSMH ₂ O-H 10-11.	92
Espectro 46.. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) do fitol presente na fração CSMH ₂ O-H 18-20.	97
Espectro 47. Espectro de RMN ¹³ C-DEPTQ da fração CSMH ₂ O-H 18-20 (125 MHz; CDCl ₃), indicando os sinais de deslocamentos químicos de carbonos do fitol.	98
Espectro 48. Expansão do espectro de RMN ¹³ C da fração CSMH ₂ O-H 18-20, indicando os sinais de deslocamentos químicos de carbonos do fitol.	98
Espectro 49. Espectro de RMN ¹ H da fração CSMH ₂ O-H 24-26.	101
Espectro 50. Expansão do espectro de RMN ¹³ C- DEPTQ (150-60 ppm) da fração CSMH ₂ O-H 24-26.	101
Espectro 51. Expansão do espectro de RMN ¹³ C- DEPTQ (125 MHz; CDCl ₃) da fração CSMH ₂ O-H 24-26.	102
Espectro 52. Expansão do espectro de RMN ¹³ C- DEPTQ (125 MHz; CDCl ₃) da fração CSMH ₂ O-H 24-26.	102
Espectro 53. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 22.	105
Espectro 54. Espectro de RMN ¹ H (125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 22.	105
Espectro 55. Mapa de contorno RMN- COSY (125/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 22.	106
Espectro 56. Mapa de contorno RMN- HSQC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 22.	107
Espectro 57. Mapa de contorno RMN- HMBC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 22.	108
Espectro 58. Mapa de contorno RMN- HMBC (500/125 MHz, DMSO-d ₆) da substância 22.	109
Espectro 59. Expansão do espectro NOEDIF (500 MHz; DMSO-d ₆) da substância 22.	110
Espectro 60. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da substância 23 e 24.	113

Espectro 61. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.	113
Espectro 62. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.	114
Espectro 63. Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.	114
Espectro 64. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.	115
Espectro 65. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.	115
Espectro 66. Mapa de contorno COSY (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.	116
Espectro 67. Mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24. ...	117
Espectro 68. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24. ...	118
Espectro 69. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, MeOD) da substância 25.	120
Espectro 70. Espectro de RMN ¹³ C - DEPTQ (125MHz, MeOD) da substância 25.	121
Espectro 71. Mapa de contorno de COSY (500 MHz, MeOD) da substância 25.	121
Espectro 72. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.	122
Espectro 73. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.	123
Espectro 74. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.	124
Espectro 75. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.	125
Espectro 76. Espectros de EM-IES [M-H] ⁻ da 6''-O-acetil-vitexina.	126
Espectro 77. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 26 e 27.	130
Espectro 78. Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 26 e 27.	130
Espectro 79. Expansão do espectro de RMN ¹³ C- DEPT (125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 26 e 27.	131
Espectro 80. Expansão do espectro de RMN ¹³ C-DEPT (125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 26 e 27.	131
Espectro 81. Mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 26 e 27.	132
Espectro 82. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, DMSO-d ₆) das substâncias 26 e 27.	133

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Proposta de fragmentação de massas das substâncias 1 e 2.....	36
Esquema 2. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 5.....	44
Esquema 3. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 9 (URMH ₂ O).....	55
Esquema 4. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 10 (URMH ₂ O).....	56
Esquema 5. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 11 (URMH ₂ O).....	57
Esquema 6. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 12 (URMH ₂ O).....	57
Esquema 7. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 13 (URMH ₂ O).....	58
Esquema 8. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 14 (URMH ₂ O).....	59
Esquema 9. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 15 (URMH ₂ O).....	60
Esquema 10. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^+$ da substância 16 (URMH ₂ O).....	61
Esquema 11. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 17 (UHMH ₂ O).....	62
Esquema 12. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 18 (UHMH ₂ O).....	63
Esquema 13. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 19 (UHMH ₂ O).....	64
Esquema 14. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ com a manutenção da hidroxila em C-17, da substância 20 (UHMH ₂ O).....	65
Esquema 15. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$, a partir da eliminação de água em C-17 e C-16, da substância 20 (UHMH ₂ O).....	65
Esquema 16. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 21 (UHMH ₂ O).....	66
Esquema 17. Proposta de fragmentação para a 6''-O-acetil-vitexina baseados nos íons presentes no espectro de alta resolução.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reação de formação da filoteritina.	6
Figura 2. Esqueletos de saponinas esteroidais comuns em <i>Urochloa</i> , formação do anel espiro pela hidrólise ácida.	8
Figura 3. Estrutura química das substâncias isoladas em espécies do gênero <i>Urochloa</i> (Continua).	11
Figura 4. Esquema do processo de separação e análise de uma amostra via CLAE-EM.	14
Figura 5. Etapas de desenvolvimento da espécie <i>U. ruziziensis</i> . (1) plantio 10/10/2015, (2) 11/11/2015, (3) 10/12/2015 e (4) 10/01/2016 data do corte.	17
Figura 6. Extração em fase sólida com uso de Manifold e cartucho SPE.	23
Figura 7. Substâncias isoladas e identificadas das folhas de <i>Urochloa ruziziensis</i>	24
Figura 8. Varredura de íons totais do extrato URMH ₂ O [H ₂ O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min] modo negativo.	51
Figura 9. Varredura de íons totais do extrato URMH ₂ O [H ₂ O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min], modo positivo.	51
Figura 10. Cromatograma de CLUE-EM do extrato UHMH ₂ O [H ₂ O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min], modo negativo.	51
Figura 11. Cromatograma de CLUE-EM do extrato UHMH ₂ O [H ₂ O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min], modo positivo.	52
Figura 12. Substâncias identificadas no extrato URMH ₂ O por desrepliação.	67
Figura 13. Substâncias identificadas por desrepliação no extrato hidrometanólico de <i>U. humidicola</i>	68
Figura 14. Agliconas presentes nos extratos de <i>U. humidicola</i> e <i>U. ruziziensis</i>	69
Figura 15. Protonação da tricina, obtenção do íon (100%) do espectro com TR 7,092.	70
Figura 16: <i>Cespedesia spathulata</i>	74
Figura 17. Cladograma dos gêneros da família Ochnaceae <i>sl</i> (MATTHEWS et al., 2012).	75
Figura 18: Substâncias identificadas no gênero <i>Sauvagesia</i>	76
Figura 19. Via biossintética da melanina. TYR, tirosinase; TRP; proteína relacionada com tirosinase; dopa, 3,4-di-hidroxifenilalanina; DHICA, ido 5,6-di-hidroxiindole-2-carboxico; DHI, 5,6-di-hidroxiindole; ICAQ, ácido 5-indol-2-carboxílico-5-quinona; QI, indole-5,6-quinona; HBTA, 5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina (CHANG, 2009).	77
Figura 20. Flavonoides (B-J) que apresentaram atividade análoga aos padrões destacados no grupo (A).	78
Figura 21. Reação de derivatização do éster metílico insaturado (Z) 9-octadecenoato.	83
Figura 22. Cromatograma da fração CSMH ₂ O-A 35/20/14-17/ 9-14.	85
Figura 23. Substâncias identificadas nas folhas de <i>Cespedesia spathulata</i>	88
Figura 24. Cromatograma da fração CSMH ₂ O-H 10-11.	89
Figura 25. Espectro de massas da substância com t _R 16,1, 17,3 e 18.1 min.	89
Figura 26. Proposta de fragmentação justificando os íons m/z 74, 87, 101 e 129, presentes nos espectros de massa dos ésteres graxos.	90
Figura 27. Estruturas das substâncias identificadas na fração CSMH ₂ O-H 10-11.	91
Figura 28. Espectro de massas antes da reação de adição do dimetildissulfeto da substância (Z) 9-octadecenoato de metila com tempo de retenção 18.8.	93

Figura 29. Proposta de fragmentação que justifica os principais picos detectados no espectro de massas do (Z) - 9 - octadecenoato de metila.	93
Figura 30. Cromatograma da fração CSMH ₂ O-H (MeS).	94
Figura 31. Espectro de massas do produto da reação 9,10-ditiometiléter dodecanoato de metila.	94
Figura 32. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos detectados no espectro de massas do derivado 9,10-ditiometiléter obtido do (Z) 9-octadecenoato de metila.	95
Figura 33. Cromatograma da fração CSMH ₂ O-H 18-20.	95
Figura 34. Substâncias identificadas na fração CSMH ₂ O-H 18-20.	96
Figura 35. Cromatograma da fração CSMH ₂ O-H 24-26.	99
Figura 36. Cromatograma da fração CSMH ₂ O-A 35/29-31.	127
Figura 37. Efeitos de ativação dose-dependente das catequinas sobre a ação da tirosinase. .	134
Figura 38. Experiência semelhante ao método de Lineweaver-Bruk para avaliar Km e Vm em ensaio de tirosinase. O substrato foi a mistura de catequina e epicatequina, e as concentrações de L-DOPA para cada etapa foram 0 (■), 167 (▼), 233 (▲) and 333 (●) μM.	135

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Partição do extrato bruto de <i>Urochloa ruziziensis</i>	18
Fluxograma 2. Fracionamento do extrato hexânico de <i>U. ruziziensis</i>	20
Fluxograma 3. Esquema de fracionamento da partição diclorometano.....	21
Fluxograma 4. Partição do extrato hidrometanólico de <i>Cespedesia spathulata</i>	81
Fluxograma 5. Resumo do fracionamento e identificação das substâncias identificadas em CSMH ₂ O-H.	82
Fluxograma 6. Fracionamento e identificação das substâncias isoladas na partição CSMH ₂ O-A.	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias identificadas em espécies de <i>Urochloa</i>	9
Tabela 2. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição URMH ₂ O-H.....	19
Tabela 3. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição URMH ₂ O-D.....	20
Tabela 4. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição URMH ₂ O-A.....	22
Tabela 5. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C das substâncias 1 e 2 e comparação com os dados da Dioscina e Collettinsideo III (PIRES et al., 2002; ESPEJO et al., 1982).....	27
Tabela 6. Dados de RMN ¹³ C das substâncias 3 e 4 e comparação com a literatura para 3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-sitosterol e 3- <i>O</i> -β-D-glicopiranosil-estigmasterol (BILIA et al., 1996/ PRACHAYASITTIKUL et al., 2009).....	37
Tabela 7. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C das substâncias 5 em comparação com valores da literatura para a Tricina (ZIELINSKA et al., 2008).....	41
Tabela 8. Dados de RMN da substância 6 e comparação com os dados do ácido -3-hidroxi-4-metoxi-benzóico (POUCHERT & BEHNKE, 1993).....	45
Tabela 9. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 7 e comparação com os dados de ácido trans-4-hidroxi-cinâmico (WANG et al., 2001).....	45
Tabela 10. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 8 e comparação com os dados do ácido p-hidroxi-benzóico (POUCHERT & BEHNKE, 1993).....	46
Tabela 11. Substâncias identificadas via desrepliação do extrato hidrometanólico de <i>Urochloa ruzizensis</i>	53
Tabela 12. Substâncias identificadas via desrepliação do extrato hidrometanólico de <i>Urochloa humidicola</i>	54
Tabela 13. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição CSMH ₂ O-H. ..	81
Tabela 14. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição CSMH ₂ O-D. ..	83
Tabela 15. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição CSMH ₂ O-A. ..	84
Tabela 16. Substâncias identificadas por CG-EM em CSMH ₂ O-H 10-11.....	91
Tabela 17. Substâncias identificadas na fração CSMH ₂ O-H 18-20.....	96
Tabela 18. Dados de RMN ¹³ C do Fitol (17) e comparação com os dados obtidos por GOODMAN et al., 1973.....	96
Tabela 19. Substâncias identificadas por CG-EM na fração CSMH ₂ O-H 24-26.....	99
Tabela 20. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 20 e 21 em comparação com os dados obtidos por PATEH et al., 2008 e POUCHERT et al., 1993.....	99
Tabela 21. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 22 em comparação com dados da ochnaflavona (SON et al., 1992).....	104
Tabela 22. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 23 em comparação com dados da literatura para catequina (LU & FOO, 1999).....	111
Tabela 23. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 24 em comparação com dados da literatura para epicatequina (LU & FOO, 1999).....	112
Tabela 24. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância 25 em comparação com dados da literatura para 6''- <i>O</i> -acetil-vitexina (OH & KIM, 1993).....	120
Tabela 25. Dados de RMN ¹ H e ¹³ C da substância (26) em comparação com dados da vitexina (KRAFCZYK & GLOMB, 2008).....	128

Tabela 26. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância (27) em comparação com dados da vitexina (KRAFCZYK & GLOMB, 2008).	129
Tabela 27: Velocidade constante e máxima de Michaelis para atividade de tirosinase na presença de \pm catequina.....	135

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio
δ_C	Deslocamento químico de carbono
ACD/Labs	Advanced Chemistry Development
AcOEt	Acetato de etila
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization (Ionização à pressão atmosférica)
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization (fotoionização a pressão atmosférica)
<i>calc.</i>	Calculada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
(CD ₃) ₂ CO	Acetona deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CHCl ₃	Clorofórmio
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CL	Cromatografia Líquida
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CL-EM	Cromatografia Líquida acoplada ao Espectrômetro de Massas
CL-UV/DAD	Cromatografia Líquida acoplada a detecção por UltraVioleta em Detector de Arranjo de Diodos
COSY	COrelated Spectroscopy
CSH	<i>Cespedesia spathulata</i> <i>n</i> -hexano
CSMH ₂ O	<i>Cespedesia spathulata</i> metanol água
CSMH ₂ O-A	<i>Cespedesia spathulata</i> metanol água - acetato de etila
CSMH ₂ O-B	<i>Cespedesia spathulata</i> metanol água – <i>n</i> -butanol
CSMH ₂ O-D	<i>Cespedesia spathulata</i> metanol água – diclorometano
CSMH ₂ O-H	<i>Cespedesia spathulata</i> metanol água – hexano
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo dublete
<i>ddd</i>	duplo duplo duplete
<i>dt</i>	duplo tripleto
DEPTQ	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer Quantum
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
eV	Elétron Volt
EM	Espectrometria de Massas
EMBR	Espectro de Massas de Baixa Resolução
EMAR	Espectro de Massas de Alta Resolução
EM-ESI	Espectrometria de Massas -Ionização por ElectroSpray
PDA	Arranjo fotodiodo
<i>g</i>	Grama
IES	Ionização por EletroSpray

<i>J</i>	Constante de acoplamento
HCl	Ácido clorídrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation ($^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ principalmente)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
Hz	Hertz
I.E.	Impacto de Elétrons
LQPN-IQ-UFRRJ	Laboratório de Química de Produtos Naturais- Instituto de Química- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<i>m</i>	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado
mg	Miligrama
min	Minutos
mm	Milímetro
mult	Multiplicidade
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega-Hertz
mL	Mililitro
<i>n</i> -ButOH	<i>n</i> -butanol
n°	Número
<i>n</i> -C ₆ H ₁₄	<i>n</i> -hexano
nm	Nanômetro
nOe	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Spectroscopy
p.	Página
P.A.	Pro analyse
ppm	Parte por milhão
QTOF	Quadrupole Time-of-Flight
RMN 1D	Ressonância Magnética Nuclear unidimensional
RMN 2D	Ressonância Magnética Nuclear bidimensional
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13
<i>s</i>	singleto
<i>sl</i>	singleto largo
T	(unidade dos espectrômetros)
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
<i>t</i>	Triplete
<i>td</i>	Triplo duplete
TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de retenção
UPLC	Ultra Performance Liquid Cromatography
URH	Urochloa ruzizensis hexano

URMH ₂ O	<i>Urochloa ruziziensis</i> metanol água
URMH ₂ O-A	<i>Urochloa ruziziensis</i> metanol água – acetato de etila
URMH ₂ O-B	<i>Urochloa ruziziensis</i> metanol água – butanol
URMH ₂ O-D	<i>Urochloa ruziziensis</i> metanol água – dicloromentano
URMH ₂ O-H	<i>Urochloa ruziziensis</i> metanol água – <i>n</i> hexano
UV- Vis	Ultravioleta no visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVOS GERAIS	2
3. ESTUDO FITOQUIMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Urochloa</i> (POACEAE)	2
3.1. INTRODUÇÃO	2
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3.3. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.3.1. Ordem Poaceae	3
3.3.2. Gênero <i>Urochloa</i>	4
3.3.3. <i>Urochloa humidicola</i>	4
3.3.4. <i>Urochloa ruziziensis</i>	5
3.3.5. Fotossensibilização secundária por consumo de <i>Urochloa</i>	5
3.3.6. Alelopatia das espécies de <i>Urochloa</i>	6
3.3.7. Metabólitos especiais identificados em espécies de <i>Urochloa</i>	8
2.3.8. Desreplicação.....	13
3.4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.4.1. Materiais	15
3.4.2. Equipamentos.....	15
3.4.3. Solventes	15
3.4.4. Softwares	16
3.4.5. Obtenção de exemplares das espécies <i>U. humidicola</i> e <i>U. ruziziensis</i>	16
3.4.5.1. Plantio da espécie <i>U. ruziziensis</i>	16
3.4.6. Coleta da espécie <i>Urochloa humidicola</i> e preparo dos extratos	17
3.4.7. Coleta da espécie <i>U. ruziziensis</i> e obtenção dos extratos	18
3.4.8. Fracionamento das partições oriundas do extrato hidrometanólico de <i>Urochloa ruziziensis</i>	19
3.4.8.1. Fracionamento da fração URMH ₂ O-H.....	19
3.4.8.1.1. Fracionamento de URMH ₂ O-H-8	19
3.4.8.1.2. Fracionamento de URMH ₂ O-H 53-55	19
3.4.8.2. Fracionamento da partição URMH ₂ O-D.....	20
3.4.8.2.1. Fracionamento de URMH ₂ O-D 37-38	21
3.4.8.3. Fracionamento da partição URMH ₂ O-A.....	22
3.4.8.3.1. Fracionamento de URMH ₂ O-A 20-22	22

3.4.9. Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos hidrometanólicos de <i>U. humidicola</i> e <i>U. ruziziensis</i> por desreplicação.....	22
3.4.9.1. Levantamento bibliográfico	22
3.4.9.2. Preparo da amostra	23
3.4.9.3. Condições da análise	23
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
3.5.1. Identificação das substâncias isoladas da partição URMH ₂ O-H.....	24
3.5.1.1. Identificação das substâncias 1 e 2.....	24
3.5.1.2. Identificação das substâncias 3 e 4.....	36
3.5.2. Identificação da substância 5 isolada de URMH ₂ O-D.....	40
3.5.3. Identificação das substâncias 6, 7 e 8 identificadas de URMH ₂ O-A.....	44
3.6. CONSIDERAÇÕES	71
4. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE <i>Cespedesia spathulata</i> (OCHNACEAE).....	71
4.1. INTRODUÇÃO	71
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	72
4.3 REVISÃO DA LITERATURA.....	72
4.3.1. Família Ochnaceae.....	72
4.3.2 Gênero <i>Cespedesia</i>	73
4.3.3. Gênero <i>Sauvagesia</i>	74
4.3.4. Tirosinase e a pigmentação de tecidos.....	76
4.3.5. Relevância do trabalho.....	79
4.4. PARTE EXPERIMENTAL	79
4.4.1. Materiais	79
4.4.2. Equipamentos.....	79
4.4.3. Solventes	80
4.4.4. Softwares.....	80
4.4.5. Material vegetal, coleta e preparo dos extratos.....	80
4.4.6. Partição dos extratos	80
4.4.7. Fracionamento da partição CSMH ₂ O-H	81
4.4.7.1. Fracionamento de CSMH ₂ O-H 24-26	82
4.4.7.2. Preparação de tio éter	83
4.4.8. Fracionamento da partição CSMH ₂ O-D	83
4.4.8.1. Fracionamento de CSMH ₂ O-D 23-24	84
4.4.9. Fracionamento da partição CSMH ₂ O-A	84

4.4.9.1. Fracionamento de CSMH ₂ O-A 24- 26	84
4.4.9.2. Fracionamento de CSMH ₂ O-A 35	85
4.4.10. Ensaio Biológico.....	86
4.4.10.1 Efeito modulador de extratos e substâncias isoladas sobre a ação da enzima tirosinase.....	86
4.4.10.2 Seleção de amostras e substâncias para o ensaio	86
4.4.10.4 Determinação do mecanismo de ativação sobre a tirosinase	87
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	87
4.5.1. Identificação das substâncias presentes na fração CSMH ₂ O-H 10-11	89
4.5.1.1. Análise do ditiometil éter, derivado do éster insaturado	94
4.5.2. Identificação das substâncias presentes na fração CSMH ₂ O-H 18-20.	95
4.5.3. Identificação das substâncias na fração CSMH ₂ O-H 24-26	98
4.5.4. Identificação de Ochnaflavona (22) em CSMH ₂ O- D 3/41-42.....	103
4.5.5 Identificação de Catequina (23) e Epicatequina (24) em CSMH ₂ O-A 24-26.....	110
4.5.6. Identificação da 6''-O-acetil-vitexin (25) de CSMH ₂ O-A	119
3.5.7. Identificação da vitexina (26) e da orintina (27) em CSMH ₂ O-A 35/29-31.....	127
4.5.8. Resultados da influência sobre a tirosinase	134
4.6. CONSIDERAÇÕES	135
5. CONCLUSÕES.....	136
6. BIBLIOGRAFIA	138

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado o país com a flora mais rica do globo, isso se deve, principalmente, à sua vasta extensão territorial, e da diversidade de espécies vegetais encontradas. Nessa diversidade há um número significativo de famílias pouco ou ainda não estudadas (GIULLIETTI & FORERO, 1990). Pode-se considerar três biomas de grande destaque em sua formação, Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica, por serem fontes de espécies e famílias com grande potencial a ser explorado tanto na composição fitoquímica quanto em relação ao seu potencial biológico.

A pesquisa em Química de Produtos Naturais tem recebido muita atenção de cientistas de diferentes áreas de conhecimento. A necessidade de obter novas drogas para diferentes áreas como a agricultura, alimentação humana e animal, obtenção de novos medicamentos, cosméticos, pesticidas, dentre outras, tem sido a principal motivação de profissionais das diferentes áreas de conhecimento procurarem os conhecimentos dos químicos de produtos naturais pela busca de novas substâncias naturais.

A evolução tecnológica tem relação direta com os resultados obtidos nas pesquisas na área de produtos naturais, mudanças como as condutas adotadas na seleção e coleta de plantas, técnicas de isolamento, evolução em técnicas espectrométricas para a elucidação estrutural de moléculas orgânicas, avaliação de atividades biológicas, preparação de derivados e propostas biossintéticas, tem sido amplamente relatados em diversos trabalhos científicos e livros didáticos ou de divulgação científica, como os principais fatores para o progresso da área (MACIEL et al., 2007).

As demandas atuais têm aproximado outras áreas de conhecimento como a Botânica, Agricultura, Ecologia Química, Zootecnia, Veterinária e Farmacologia, da Química de Produtos Naturais. O trabalho associado permite entender determinados fenômenos observados e buscar de substâncias naturais que possam ser usados para solucionar problemas.

Este trabalho almejou contribuir com o conhecimento fitoquímico das espécies *Urochloa ruziziensis* e *U. humidicola* (Poaceae), de grande interesse zootécnico, veterinário e agrônomo pela sua utilização no campo, tanto na alimentação animal quanto no plantio direto. Ao obtermos informações sobre a constituição química e a comparação entre as espécies, por desreplicação, do perfil dos constituintes. Para o melhoramento da produção animal e do plantio direto faz-se necessário conhecer melhor a constituição química dos metabólitos presentes nas espécies, em especial as substâncias que podem ocasionar efeitos de fotossensibilização e alelopatia.

O presente trabalho abrange também ao estudo da espécie *Cespedesia spathulata* (Ochnaceae), gênero monoespecífico, encontrados principalmente nas regiões norte e centro-oeste do Brasil (CHACON, 2011). Sobre a espécie sabe-se que biossintetiza os biflavonoides ochnaflavona e 7''-O-metil-ochnaflavona (LOBSTEIN et al., 2004) e a proximidade ao gênero *Sauvagesia*, pela análise genética das mesmas (MATTHEWS et al., 2012). O estudo mais aprofundado sobre sua constituição fitoquímica traz informações importantes para a biossistemática e, através da comparação das classes de metabólitos encontradas, ratifica a proximidade com o gênero *Sauvagesia*.

2. OBJETIVOS GERAIS

- Contribuir com o conhecimento da composição fitoquímica de espécies do gênero *Uroclhoa* (POACEAE).
- Contribuir para o conhecimento da composição fitoquímica e avaliação de atividade biológica do gênero *Cespedesia* (OCHNACEAE).

3. ESTUDO FITOQUIMICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Uroclhoa* (POACEAE)

3.1. INTRODUÇÃO

A produção alimentícia do Brasil tem se desenvolvido e atingido novos patamares graças ao desenvolvimento da pesquisa no ramo da agricultura e a pecuária. Em busca de melhoramento de seus resultados produtivos pesquisadores tem se empenhado em pesquisas que ofereçam ao produtor metodologias simplificadas que permitam maior produtividade, menor consumo de defensivos agrícolas e a conservação dos recursos naturais.

De acordo com pesquisa realizada pelo IBGE (2007) existem 170 milhões de hectares de pastagem no Brasil, dos quais mais de 120 são pastos cultivados, e o rebanho aproximado em 190 milhões de cabeças de gado. A sustentabilidade da pecuária brasileira está baseada na pastagem, pois 90% da carne produzida no Brasil ocorre em sistemas de produção baseados, exclusivamente, em pasto (BARCELLOS et al., 2001; ANUALPEC, 2004; MACEDO, 2005). No centro oeste, por exemplo, entre 70 e 80 % dos pastos são formados por espécies de *Brachiaria* (sinonímia *Urochloa*) (VALLE et al., 2001).

As gramíneas da família Poacea são muito utilizadas no Brasil na produção animal, destacam-se os gêneros *Panicum*, *Urochloa*, *Cynodon*, *Andropogon*, *Hemarthria*, *Avena*, *Pennisetum*, *Sorghum*, *Paspalum* como fontes das principais forragens no país (MACHADO et al., 2010). O consorciamento com outras espécies de leguminosas confere aumento da capacidade nutritiva do pasto e melhora os níveis de nutrientes no solo, principalmente nitrogênio que é fixado pelas bactérias do gênero *Rizobium* (MENDONÇA et al., 2015). Com a inclusão de uma leguminosa em um campo de gramínea pura, ocorre uma melhor distribuição da produção anual de forragem em oferta, devido a maior tolerância à seca que mostram algumas espécies de leguminosas usadas em consórcio, em relação às gramíneas forrageiras (KLUSMANN, 1988).

Apesar de ser uma boa ferramenta para melhoria do solo, o consórcio entre gramíneas e leguminosas não é duradouro, devido à grande atividade alelopática que as gramíneas do gênero *Urochloa* exercem. Os metabolitos secundários deste gênero são capazes de inibir a atividade de bactérias nitrificantes (GOPALAKRISHNAN et al., 2007; SUBBARAO et al., 2006), afetando o desenvolvimento de espécies daninhas (OLIVEIRA et al., 2014), interferem no desenvolvimento das espécies de leguminosas que, geralmente, são usadas no consórcio de melhoramento de pasto (RIBEIRO et al., 2018; FEITOZA et al., 2018; PACIULLO et al., 2003). Observando estes fatores o consórcio só apresenta efetividade caso haja manejo contínuo da área, adubação e irrigação por exemplo, e replantio das espécies de interesse que acabam, com o tempo, desaparecendo do pasto.

A camada de palha, sobre o solo, é essencial para o sucesso do Sistema Plantio Direto (SPD). Cria um ambiente extremamente favorável às condições físicas, químicas e biológicas do solo contribuindo para o controle de plantas daninhas, estabilização da produção e recuperação ou manutenção da qualidade do solo (ALVARENGA et al., 2001). Espécies do gênero *Urochloa* têm sido usadas como cobertura morta para o plantio de culturas de interesse econômico, devido sua alta produção de matéria seca e boa adaptação em diferentes solos. Apesar dos benefícios que estas espécies têm apresentado na proteção do ambiente, estudos demonstram a influência sobre o desenvolvimento de culturas como feijão, milho e soja, por exemplo, devido ao seu potencial alelopático (NEPOMUCENO et al., 2012; SOUZA et al., 2006).

Tendo visto as problemáticas que envolvem as espécies do gênero *Urochloa*, pesquisadores das áreas Zootecnia, Veterinária, Agronomia e Biologia tem se aproximado da Química com intensão de obter respostas e melhoramento de técnicas para suas áreas. Nos últimos dez anos o Laboratório de Química de Produtos Naturais- PPGQ- UFRRJ tem recebido alunos de outros departamentos para realizarem, em parceria, estudos com gramíneas do gênero. Nesse período foram publicados quatro trabalhos onde foi avaliado potencial alelopático dos extratos e do hidrolato de folhas e raízes de *U. humidicola*, que inibem a germinação e desenvolvimento de radícula, frente a sementes de determinadas leguminosas muito utilizadas no campo (RIBEIRO et al., 2018). Percebeu-se a interferência no desenvolvimento radicular de *Calopogonium mucunoides* Desv. (Fabaceae) quando expostos aos compostos fenólicos isolados de *U. humidicola* e seu extrato hidrometanólico (FEITOZA et al., 2018). Esses estudos contribuíram para duas publicações sobre identificação de metabólitos secundários presentes nas folhas e raízes de *U. humidicola* descrevendo a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e saponinas esteroidais (OLIVEIRA et al., 2017) além da revelação da presença de classes de metabólitos secundários e a descrição da composição bromatológica do extrato metanólico de *U. humidicola* (FREITAS et al., 2017). A continuidade deste trabalho será apresentada nesta tese; onde aborda o estudo fitoquímico da espécie *Urochloa ruziziensis* e a comparação entre as espécies *U. humidicola* e *U. ruziziensis*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, através de métodos cromatográficos clássicos, e identificar metabólitos secundários das folhas de *Urochloa ruziziensis*.
- Comparar o perfil fitoquímico das espécies *U. humidicola* e *U. ruziziensis* utilizando dados espectrais obtidos a partir da análise por CLUE-EM.

3.3. REVISÃO DA LITERATURA

3.3.1. Ordem Poaceae

Poaceae (Gramineae), pertencente à ordem Poales, que está dividida em 12 subfamílias: Anomochlooideae, Pharoideae, Puelioideae, Bambusoideae, Ehrhartoideae, Pooideae, Aristidoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Centothecoideae, Panicoideae e Danthonioideae (VIANA & LOMBARDI, 2007).

As gramíneas representam o componente básico de diversos ecossistemas terrestres, desempenhando papéis ecológicos diversos e contribuindo significativamente com a biodiversidade local. Ecossistemas savânicos tropicais, como o Cerrado brasileiro e a savana africana, caracterizam-se pelo extrato herbáceo composto por um tapete gramíneo, que ocupa biomassa expressiva, sendo uma base da cadeia alimentar (JACOBS et al., 1999; SHAW, 2000). Nesses ecossistemas verificam-se altíssima diversidade de espécies de Poaceae que se destacam como uma das mais importantes famílias na sua composição florística (DAVIS et al., 1994; MENDONÇA et al., 1998).

Estudos sobre a diversidade agrostológica brasileira, Burman e colaboradores (1985) citam 1368 espécies de gramíneas para o Brasil. Este estudo precisa ser atualizado, uma vez que nos últimos 20 anos, táxons novos foram descritos e diversas novas citações foram registradas para o Brasil. Grande parte da diversidade de gramíneas no Brasil concentra-se nos domínios fitogeográficos do Cerrado, Pampa e Mata Atlântica (BURMAN, 1985). A Amazônia e a Caatinga carecem de inventários significativos com enfoque à família Poaceae para que se tenha uma noção mais concreta da sua diversidade de plantas forrageiras.

3.3.2. Gênero *Urochloa*

O gênero *Urochloa* pertence à família das Poaceae, tribo Paniceae, também conhecido como *Brachiaria* (MORRONE & ZULOAGA, 1992; VELDKAMP, 1996). A este gênero foram incorporadas as do gênero *Brachiaria* que são caracterizados pela sua importância, tanto por servir como alimento para animais, como por serem de fácil adaptação em diferentes tipos de solo (LAPOINTE, 1993), além de serem usados como matéria morta em proteção dos sistemas agrícolas em solos para uso em cultivo direto; graças a sua relação carbono/nitrogênio, o que atrasa a decomposição e promove a sua utilização em diferentes regiões (TIMOSSI et al., 2007). Entre as espécies destacam-se o *Urochloa decumbens*, *U. brizantha* e *U. humidicola* como as mais utilizadas na alimentação animal no Brasil.

Segundo Tokarnia (2012) as espécies do gênero *Urochloa* produzem determinados metabólitos secundários que causam intoxicação em ruminantes. Estes metabólitos são as saponinas esteroidais, elas ocasionam indiretamente um quadro de intoxicação conhecido como fotossensibilização, identificado através de feridas cutâneas e, inclusive, podendo levar a óbito. Em estudos já realizados com as espécies *U. decumbens*, *U. brizantha* e *U. humidicola* relatam a presença de saponinas esteroidais e não esteroidais nestas espécies (BRUM et al., 2009; PIRES et al., 2002).

3.3.3. *Urochloa humidicola*

É originária do leste e sudeste da África tropical, onde ocorrem naturalmente em áreas relativamente úmidas (BOGDAN, 1977). É pouco exigente quanto ao solo, vegeta bem em locais úmidos ou secos, sendo resistente à geada. Tem sido largamente utilizada para formação de pastagens nas mais diferentes regiões do país, sendo muito promissora na região amazônica (ALCÂNTARA & BUFARAH, 1992).

A espécie vem sendo estudada pelo grupo de pesquisa LQPN-IQ-UFRRJ e seus parceiros desde 2013. Assim com as demais espécies de *Urochloa* ela apresenta expressivo potencial

alelopático frente às espécies de leguminosas (RIBEIRO et al., 2018; FEITOZA et al., 2018). O estudo fitoquímico da espécie revelou a presença de diferentes classes de metabólitos especiais, dentre eles flavonoides, ácidos orgânicos, flavonas e saponinas esteroidais (OLIVEIRA et al., 2017), cujas propriedades dos mesmos, nesse contexto, ainda carecem de pesquisas.

3.3.4. *Urochloa ruziziensis*

A espécie *Urochloa ruziziensis* originária da África, onde ocorre em condições úmidas e não inundáveis. Tendo sido encontrada no Zaire e oeste do Kenya. É uma espécie perene, sub ereta, com 1 a 1,5 m de altura, apresenta a base decumbente (característica comum a espécies do gênero) e radicante nos nós inferiores. As folhas são lineares e lanceoladas, com 100-200 mm de comprimento e 15 mm de largura, pubescentes, verde amareladas. A inflorescência está formada por 3-6 racemos de 4-10 mm de comprimento. Ráquis largamente alada, com 4 mm de largura, geralmente de cor arroxeadas. Espiguetas de 5 mm de comprimento, pilosas na parte apical, bisseriadas ao longo da ráquis. A gluma inferior tem 3 mm de comprimento e surge 0,5 a 1 mm abaixo do resto da espigueta. O flósculo fértil apresenta 4 mm de comprimento (SENDULSKY, 1977; SERRÃO et al., 1971).

U. ruziziensis tem aplicação na alimentação animal (MACEDO, 2009) como no fornecimento de palha para sistemas de plantio direto, e assim, assegurar uma maior sustentabilidade para ambientes produtivos (TORRES et al., 2008; MACHADO et al., 2010). O consorcio de *U. ruziziensis* tem sido recomendado com milho safrinha (*Zea mays*), posterior ao cultivo da soja afim de incrementar os nutrientes do solo (MENDONÇA et al., 2015). Ceccon (2008) observou parâmetros a serem considerados sobre *U. ruziziensis* que apresentou melhor resultado como produção de massa seca alternativa, massa seca de milho, massa seca total de parte aérea e rendimentos de grão de milho. Destacando os hábitos decumbentes de crescimento, maior fechamento dos espaços após a colheita do milho e melhor cobertura do solo, que garante uma proteção a espécies invasoras e a conservação da humidade do solo, constituindo fatores que a destacaram como a mais indicada para o consorciamento.

Segundo Palharini e colaboradores (2014), também indica o cultivo de *U. ruziziensis* para cobertura de solo nos períodos de entressafras do milho e da soja pois a massa seca de cobertura apresenta efeito inibidor no desenvolvimento simultâneo de espécies invasoras presentes no banco de sementes do solo, fator associado ao seu efeito alelopático.

3.3.5. Fotossensibilização secundária por consumo de *Urochloa*

A fotossensibilização caracteriza-se por uma sensibilidade exagerada do animal aos raios solares, cujas ondas causam as lesões, em geral situados dentro da faixa do visível, que é determinado pelo agente fotossensibilizador, na maioria das vezes, um pigmento fluorescente (TOKARNIA et al., 2012).

Existem dois tipos de fotossensibilização: a primária e a secundária ou hepatógena. Em ambos os casos a doença é causada pela presença de um agente sensibilizador na corrente sanguínea. A fotossensibilização primária é caracterizada pelo consumo da planta que contém o agente fotossensibilizante e esse é absorvido diretamente no intestino do animal. A

fotossensibilização secundária ocorre quando a planta ingerida possui uma substância que provoca alterações no parênquima hepático ou nos ductos biliares com perturbações da eliminação da filioeritrina (TOKARNIA et al., 2012).

A filioeritrina é subproduto da degradação da celulose pela ação de protozoários que se encontram dentro do estômago dos ruminantes e equinos. O líquido biliar, elimina essa substância do trato intestinal. A não eliminação desta substância leva à sua absorção no intestino e conseqüentemente acúmulo no sangue, nas regiões de pele clara e sob influência dos raios solares, provocam as feridas na pele TOKARNIA et al., 2012).

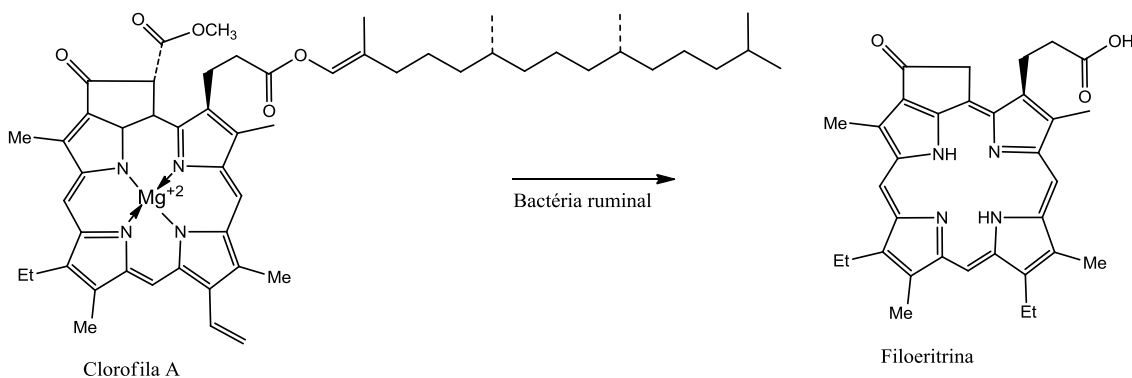


Figura 1. Reação de formação da filioeritrina.

A fotossensibilização relacionada às espécies do gênero *Urochloa* pode ser classificada como do tipo secundária, uma vez que determinada classe de metabólitos presentes na espécie levam ao mal funcionamento do fígado e vesícula biliar. A classe de metabólitos associada ao fenômeno são as saponinas esteroidais, mais especificamente atribuída a substância protodioscina (**Figura 2, página 8**) (BRUM et al., 2009; FACCIN et al., 2014). Entretanto sabe-se que as espécies do gênero produzem outros tipos de saponinas, não somente com esqueleto esteroidal como também pela formação do anel espiro (PEREZ et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017; NEPOMUCENO et al., 2017).

Os estudos que abordam o tema fotossensibilização, abordam a influência da exposição solar (PORTO et al., 2013), casos de intoxicação em rebanhos jovens e experientes (FACCIN et al., 2014), intoxicação por espécies de *Urochloa* em ovinos, caprinos, bovinos e equinos (ROSA et al., 2016; MOREIRA et al., 2018; OGLIARI et al., 2018; AMADO et al., 2018), concentração de saponinas em diferentes estágios do desenvolvimento da espécie estudada (BRUM et al., 2009), por exemplo.

3.3.6. Alelopatia das espécies de *Urochloa*

Do ponto de vista etimológico do termo alelopatia significa prejuízo mútuo, um termo composto de duas palavras, "Allelon" ("um do outro") e "pathos" ("sofrimento") (MOLISH, 1937). A definição tradicional do fenômeno da alelopatia é descrito como "qualquer efeito direto ou indireto causado por uma planta (incluindo microrganismos) a outro por meio da produção de substâncias químicas que escapam para o meio ambiente" (RICE, 1984).

Em uma definição mais abrangente a alelopatia, segundo a Sociedade Internacional de Alelopatia em 1996, é definida como "qualquer processo que envolve metabólitos secundários

produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que, afetam o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos e agrícolas”. As plantas, apesar de autotróficas, são imóveis, não podendo por isso escapar dos ataques de inimigos. Por este motivo, a principal função dos aleloquímicos nas plantas é a proteção ou defesa contra o ataque de fitopatógenos e pragas ou invasão de outras plantas (WHITTAKER, 1970).

Os efeitos alelopáticos desempenhados pelas plantas estão diretamente ligados às formas de liberação de seus metabólitos no ambiente. É possível classificar quatro possíveis mecanismos de liberação: volatilização, lixiviação, decomposição e exsudação (RICE, 1984). Fala-se sobre a ação alelopática de espécies do gênero *Urochloa* e há algum tempo pesquisadores têm buscado explicações para a supressão de outras espécies, de interesse econômico ou daninhas, em pastos ocupados por espécies deste gênero.

Estudos realizados por Oliveira Jr e colaboradores (2014) comprovaram a eficácia do efeito supressor da palha de *Brachiaria ruziziensis* (sinonímia para *U. ruziziensis*) sobre as plantas invasoras *Euphorbia heterophylla* e *Bindens pilosa*, no cultivo de outras culturas como milho e soja. O melhor resultado foi observado quando a palha foi irrigada, lixiviando aleloquímicos ao solo.

O extrato hidrometanólico de *B. decumbens* inibiu o crescimento de raízes e brotações de mudas de agrião (*Lepidium sativum*), alface (*Lactuca sativa*), timóteo (*Phleum pratense*) e azevém (*Lolium multiflorum*) (KOBAYASHI & KATO-NOGUCHI, 2015). Exsudatos de raízes de *U. decumbens* foram avaliados sobre o desenvolvimento de espécies nativas da Mata Atlântica, *Trema micranta* (Cannabaceae), *Heliocarpus popayanensis* (Malvaceae) e *Cecropia pachystachya* (Urticaceae) (pioneiras), *Cariniana estrellensis* (Lecythidaceae), *Eugenia brasiliensis* (Myrtaceae) e *Guarea kunthiana* (Meliaceae) (não pioneiras). A área foliar total, o peso seco das raízes e da parte aérea das mudas de espécies pioneiras, foram drasticamente reduzidos pela ação do exudato, enquanto os não pioneiros foram menos afetados negativamente (DA SILVA et al., 2017). O extrato etanólico obtido de *U. brizantha* e *U. decumbes* apresentou efeito inibitório na germinação de crescimento e metabolismo de mudas de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae) (OLIVEIRA et al., 2016)

Os exsudatos das raízes de *U. humidicola* demonstraram ação sobre a nitrificação do solo (GOPALAKRISHNAN et al., 2007). Os exsudatos de *U. humidicola* (Rendle) Schweick, apresentaram influência sob a ação da bactéria nitrificadora *Nitrosomonas europaea*, que age na interface planta/ solo na conversão de nitrogênio (SUBBARAO et al., 2006).

O interesse agrônomo do plantio direto sobre a palhada de espécies de *Urochloa* está também associado ao seu poder alelopático em suprimir o desenvolvimento de espécies consideradas daninhas que competem pelos nutrientes do solo com a cultura principal e por isso são indesejadas, mas existem estudos que demonstram negatividade no plantio direto usando espécies de *Urochloa*. A ação alelopática da palha de *B. ruziziensis* foi verificada sobre o desenvolvimento de *Euphorbia heterophylla* e *Bindens pilosa* (OLIVEIRA et al., 2014). O plantio direto de soja sobre campos de *U. ruziziensis* vem sendo estudado pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Agrônomicas e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal-SP, publicaram em 2012 sobre o efeito que a espécie causava, mesmo após a queimada, sobre a germinação, desenvolvimento e produtividade dos grãos de soja (NEPOMUCENO et al., 2012). O trabalho levou a uma investigação mais detalhada sobre quais metabólitos especiais que são

produzidos por *U. ruzizensis* que poderiam afetar o desenvolvimento da soja; e confirmaram que a responsabilidade da ação era pela presença de saponinas esteroidais (**figura 2**) (NEPOMUCENO et al., 2017). A incorporação de parte aérea de *B. decumbens* no solo e a avaliação do desenvolvimento de seis culturas (arroz, milho, trigo, soja, feijão e algodão), mostrou que após um intervalo de tempo, verificou-se que o desenvolvimento das espécies foi reduzido e que houve redução do teor de nitrato no solo (SOUZA et al., 2006).

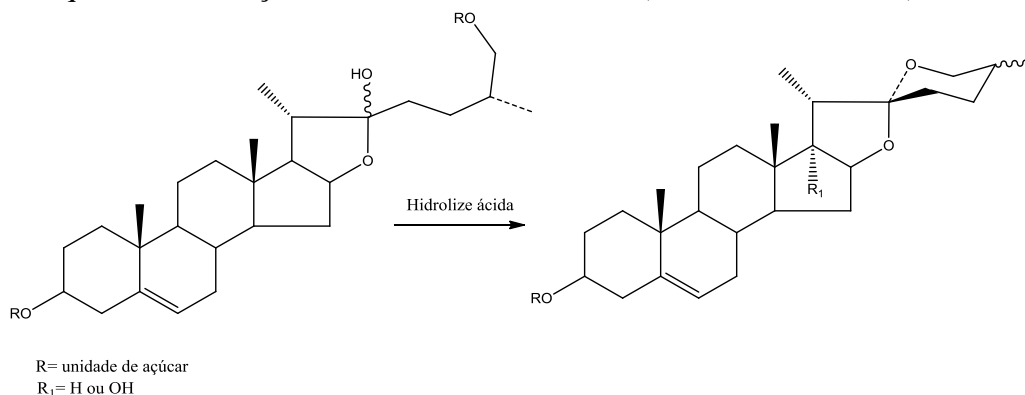


Figura 2. Esqueletos de saponinas esteroidais comuns em *Urochloa*, formação do anel espiro pela hidrólise ácida.

3.3.7. Metabólitos especiais identificados em espécies de *Urochloa*

O gênero *Urochloa* tem sido estudado em função da utilização de suas espécies, destacando-se na alimentação de ruminantes, no plantio direto de culturas sobre a palhada e pelo efeito alelopático que apresentam. Alguns trabalhos abordam o valor nutricional das espécies ao medirem determinados nutrientes como (Ca, Mg, P, K), teor de fibras e proteína, voltando sua avaliação à produção animal (OLIVEIRA et al., 2019; SARTO et al., 2019; LIMA et al., 2019; EPIFANIO et al., 2019).

Os estudos realizados por Pires e colaboradores (2002) com as folhas de *U. decumbens* identificaram a presença de saponinas esteroidais e sapogeninas na partição butanólica do extrato metanólico. Neste trabalho foram identificadas as seguintes sapogeninas 3- β -metóxi-lanost-9(11)-eno, diosgenina e yamogenina, as saponinas 3-*O*- β -D-glicopiranosil-24(*S*)-etil-22*E*-deidrocolesterol, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-24(*R*)-etil-22*E*-deidrocolesterol, protodioscina e 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil-(1-4)-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)]- α -D-glicopiranosil}-25(*S*)-espirost-5-eno.

Em um trabalho apresentado na 34^ªRA SBQ (FREITAS et al., 2011) apresentou a seguinte composição para a partição n-butanol do extrato hidrometanólico das folhas de *U. humidicola*, identificaram a presença de quatro saponinas com esqueleto furostânico, a protodioscina e a metilprotodioscina, pela primeira vez identificadas nas folhas da espécie além de duas outras, o costusosídeo-I e costusosídeo-J.

Brum e colaboradores (2009) quantificaram saponinas do tipo protodioscina nas folhas das espécies de *B. decumbens* e *B. bisantha* por espectrofotometria no extrato etanólico das folhas. A partição butanólica foi submetida a cromatografia em camada fina eluída em clorofórmio: metanol: água (16:9:2) e revelada com ácido sulfúrico 10% e reagente de Ehrlich,

e a determinação do percentual de saponina foi feito em comparação com o padrão previamente isolado a protodioscina. Neste trabalho conclui-se que o período de maior concentração de saponinas nas folhas ocorre quando a planta está no período de liberação de sementes, o estágio maduro da planta seria o período de maior intoxicação nos ruminantes.

Um estudo com interesse de identificar os compostos liberados no solo foi feito avaliando os exsudatos das raízes de *U. ruziziensis* e *U. decumbens*, os extratos metanólicos obtidos de cada uma das espécies foram analisados por HPLC e neles foram identificados dois ácidos, o ácido 1,3-di-O-trans-ferrulinico e sua versão sem uma metoxila, não especificada pelos autores, as plantas foram submetidas a condições de cultivo diferenciadas, em solo de alta e baixa fertilidade. (WENZL et al., 2000).

As raízes de *U. humidicola* foram submetidas à extração com solução metanólica 70%, e então uma partição líquido-líquido com acetato de etila, a fração apolar foi analisada por HPLC, nesta foi identificado os ésteres graxos: p-cumarato de metila e ferrulato de metila (GOPALAKRISHMAN et al., 2007)

O estudo desenvolvido por Perez e colaboradores (2016), concluiu, através da interpretação de análises quimiométricas, do extrato de *U. decumbens* e *U. brizantha* que as espécies podem se diferenciar qualitativamente e quantitativas em relação os metabólitos tóxicos de ambas espécies. A quantificação da protodioscina em ambas não apresentou diferença considerável, não podendo ser responsabilizada pela intoxicação em ruminantes, já que a espécie *U. decumbens* apresenta maior toxidez que a *U. brizantha*. Os autores apontam a possibilidade de o estereoisômero, protoneodioscina ser o responsável pela intoxicação. Neste experimento também foram identificadas outras 20 substâncias, dentre essas ácidos fenólicos, flavonas C- e O- glicosiladas, flavonol O-glicosilado, flavolignanas e saponinas esteroidais, apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Substâncias identificadas em espécies de *Urochloa*.

Substância	Espécie	Referência
Saponinas		
1 Protodioscina	<i>U. humidicola</i>	Freitas et al., 2011
	<i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
	<i>U. decumbens</i>	Nepomuceno et al.,
	<i>U. ruziziensis</i>	2017
2 Metilprotodioscina	<i>U. humidicola</i>	Freitas et al., 2011
3 Costusosídeo-I	<i>U. humidicola</i>	Freitas et al., 2011
4 Costusosídeo-J	<i>U. humidicola</i>	Freitas et al., 2011
5 Acetil-protodioscina	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
6 Protoneodioscina	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
	<i>U. brizantha</i>	
7 Dioscina	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
8 Collettinsídeo III	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
	<i>U. ruziziensis</i>	Nepomuceno et al., 2017

9	Penogenina	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
10	3-O- β -D-glicopiranosil-24(R)-etil-22E-diidrocolesterol	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
11	3-O- β -D-glicopiranosil-24(S)-etil-22E-diidrocolesterol	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
Sapogeninas			
12	Diosgenina	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
13	Iamogenina	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
14	3- β - metóxi-lanost-9(11)-eno.	<i>U. decumbens</i>	Pires et al., 2002
Ácidos orgânicos e derivados			
15	Ácido 1,3-di-O-trans-feruloilquínico	<i>U. ruziziensis</i> <i>U. decumbens</i>	Wenzl et al., 2000
16	p-cumarato de metila	<i>U. decumbens</i>	Gopalakrishnan et al., 2007)
17	ferrulato de metila	<i>U. decumbens</i>	Gopalakrishnan et al., 2007)
18	Ácido 2-hidroxi-3-metoxibenzoico	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
19	Ácido <i>trans</i> -4-hidroxicinâmico	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
20	Ácido <i>para</i> -hidroxibenzóico	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
Flavonol			
21	Quercetina 3- O- β -D- glucuronato de metila	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
22	3,7-di-O - α -L- ramnopiranosilcanferol	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
23	Isorhamnetina 3-O- β -D-glicosídeo	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
24	5,7,3',4'-tretrahidroxi-3-O-ramnopiranosil-flavona	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
25	Ombuina -3-O- rutinosídeo	<i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
Flavona			
26	Tricina	<i>U. humidicola</i>	Oliveira et al., 2017
27	Tricina 7-O-glucosídeo	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
28	Orientina 2''-O-glucosídeo	<i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
29	Carlinosídeo	<i>U. decumbens</i> <i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
30	Schaftosídeo	<i>U. decumbens</i> <i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
31	Orientina 7-O-raminosídeo	<i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
32	Apigenina 6,8-di-C-arabnosídeo	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
33	2',4',5,7-tetrahidroxi- flavone-8-C-arabinosil-7-O-glucosídeo	<i>U. brizantha</i>	Perez et al., 2016
34	Diosmetin-8-C-rhamnosil-7-O-glucosídeo	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
35	Luteolina 6-C-pentosil-8-C-deoxihexosídeo	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
36	Apigenina 6-C-deoxihexosil-8-C-pentosídeo	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016
37	Cassiaoccidentalin B	<i>U. decumbens</i>	Perez et al., 2016

Catequina		
38	Catequina-7-O-β-D-glicopiranosideo	<i>U. humidicola</i> Oliveira et al., 2017
Flavolignana		
39	Tricina 4'-O- (β-guaiacilgliceril) éter 7-O-(deoxihexosil)-glucosideo	<i>U. decumbens</i> Perez et al., 2016

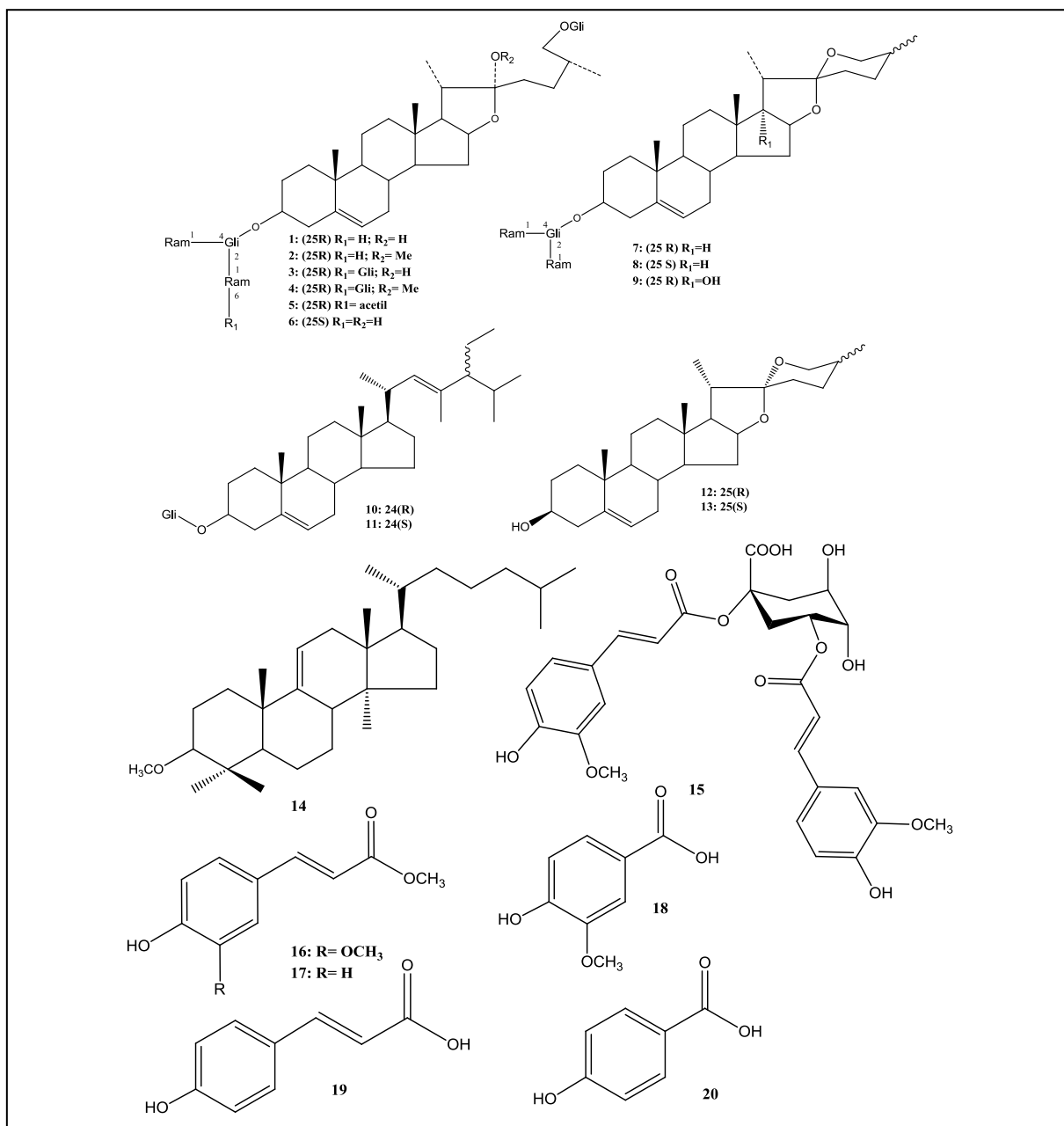


Figura 3. Estrutura química das substâncias isoladas em espécies do gênero *Urochloa* (continua).

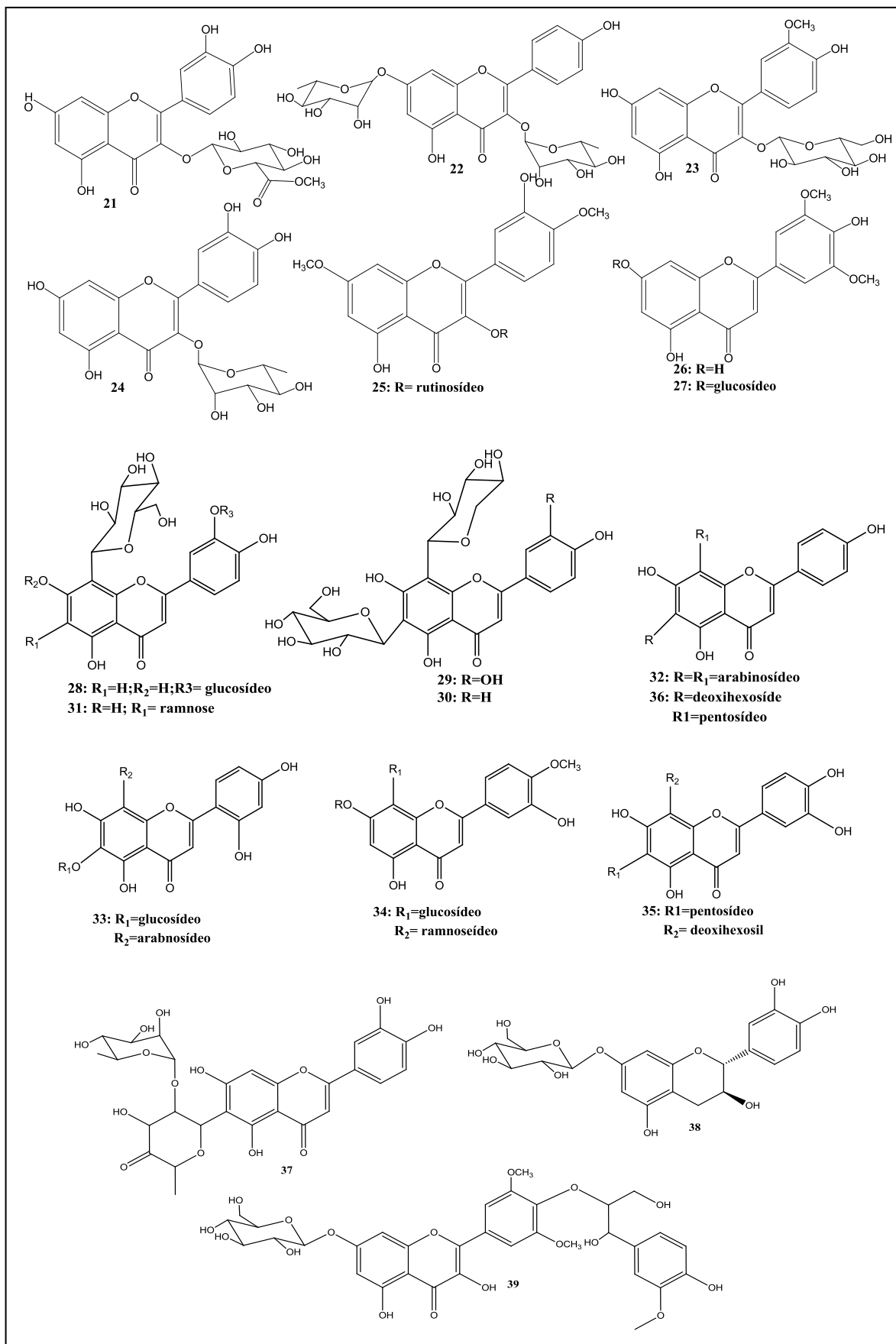


Figura 3. Continuação.

2.3.8. Desreplicação

O método de análise por desreplicação consiste em uma identificação rápida de substâncias presentes em amostras biológicas complexas. Utilizando o mínimo de material, produzindo pouco resíduo, acelerando a identificação das substâncias conhecidas e indicando a presença de novos constituintes (NIELSEN et al., 2011).

A desreplicação baseia-se em métodos analíticos hifenados como CLAE-UV, CLAE-EM, CLUE-EM/EM e CG-EM, técnicas que têm sido extensivamente utilizadas em análises metabolômicas de plantas. (ERNST et al., 2014; WOLFENDER et al., 2013; CARNEVALE et al., 2013). O procedimento consiste na separação dos componentes das matrizes complexas através de métodos cromatográficos, coleta de dados espectroscópicos pelo acoplamento aos diferentes detectores e/ou coletor de frações, e com comparação das informações obtidas em bases de dados e, por fim, a detecção de rota para proposta de estruturas de metabolitos (LANG et al., 2008).

A espectrometria de massas (EM) tem sido utilizada na desreplicação de matrizes naturais devido à sua versatilidade, rapidez e elevada sensibilidade, possibilitando o uso de menores quantidades de amostra. A partir dos dados obtidos, como a massa molecular, de baixa ou alta resolução, e as fragmentações, realiza-se a proposta estrutural, através da busca da fórmula molecular em bases de dados e, através de propostas mecanísticas de fragmentação, justifica-se a estrutura proposta (WOLFENDER et al., 2009).

As dificuldades encontradas pela desreplicação estão na complexidade das matrizes vegetais e, por isso, exige-se uso de ferramentas estatísticas que consigam extrair informações abrangentes dos dados adquiridos. Outra dificuldade que aumenta a complexidade deste trabalho são as possibilidades de se encontrar isômeros, com isto deve-se trabalhar com um grande conjunto de dados que possa identificar metabolitos inéditos.

Além do método de fracionamento e detecção, o banco de dados apresenta-se como uma ferramenta de extrema importância para este tipo de análise, conseguir identificar os padrões em fragmentação como, por exemplo, perdas de unidades de açúcar em moléculas C-glicosiladas ou O-glicosiladas, e conhecimento na fragmentografia típica de metabolitos oriundos de mesma origem biossintética (YANG et al., 2013; GU et al., 2013).

A utilização de um analisador como a espectrometria de massas permite diferentes abordagens para a análise de matrizes complexas como extratos brutos e frações obtidas por partição. Um fator que contribui para isso é a diversidade de métodos de ionização e seleção que melhor se aplica a substâncias de origem natural. A ionização feita à pressão atmosférica produz grande quantidade de íons moleculares e pouca fragmentação, dentre as que se destacam nesta aplicação temos a APCI (ionização à pressão atmosférica), APPI (fotoionização à pressão atmosférica) e ESI (Electro Spray Ionization) (NICULAU et al., 2016).

Além da indicação quanto ao peso molecular, as técnicas de ionização também apresam outras indicações, por exemplo, a APCI é indicada para moléculas com polaridade que variam de apolar a média, voláteis e termicamente estáveis, opera tanto no modo negativo e quanto no positivo. Na ESI gera-se gotículas altamente carregadas a partir das quais os íons são ejetados por um processo de evaporação do solvente, um campo elétrico gerado na ponta do pulverizador pela aplicação da alta tensão, consegue abranger bem moléculas de polaridades diferentes e

pode, também, ser operado no modo negativo e positivo. A APPI é indicada para compostos pouco ionizados por ESI e APCI, e contemplam grupos apolares ou de baixa polaridade, por exemplo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Nesta técnica adiciona-se um dopante, uma substância ionizada preferencialmente, que atua como intermediário entre os fótons e o analito (NICULAU et al., 2016).

Quanto às variações dos analisadores de massa eles deverão contribuir para os diferentes tipos de análise que se deseja realizar. “A maioria dos trabalhos de quantificação em CL-EM usa quadropolos únicos e triplo quadropolos” (NICULAU et al., 2016). Para análises em que se deseja obter EM/EM a sequência triplo quadropolo é a mais usual, o primeiro funciona como selecionador de íons, no segundo atua como a segunda cela de colisão e o terceiro selecionador de íons. Este analisador pode operar diferentes tipos de análise, modo “Full Scan” (verificação total de íons), monitoramento de íons produtos e precursores, monitoramento de reações selecionadas (SRM) ou monitoramento de reações múltiplas (MRM), monitoramento de íons selecionados (SIM) e perda neutra (NL) (KOPKA et al., 2004; LU et al., 2008).

Em uma análise exploratória, uma ampla faixa de massa deve ser adotada, o modo de aquisição utilizado pode ser o EM^E, cuja aquisição independente de dados (DIA) nomeado MS^E, tornando-se um método simples e genérico (untargeted) para aquisição de dados de forma compreensiva e completa. Em instrumentos TOF (time of flight) e QTOF, quando programados a EM^E todos os íons gerados na fonte são transmitidos até a cela de colisão, que alterna sequencialmente entre funções de baixa e alta energia, enviando alternadamente precursores e fragmentos ao analisador TOF. Assim, são adquiridos dados de massa exata de precursores e fragmentos ao mesmo tempo (todos os dados, todo o tempo). Os dados são então processados por software para deconvolução, associando os fragmentos a seus precursores com base na separação cromatográfica previamente feita no CLAE ou UPLC (SILVA et al., 2006).

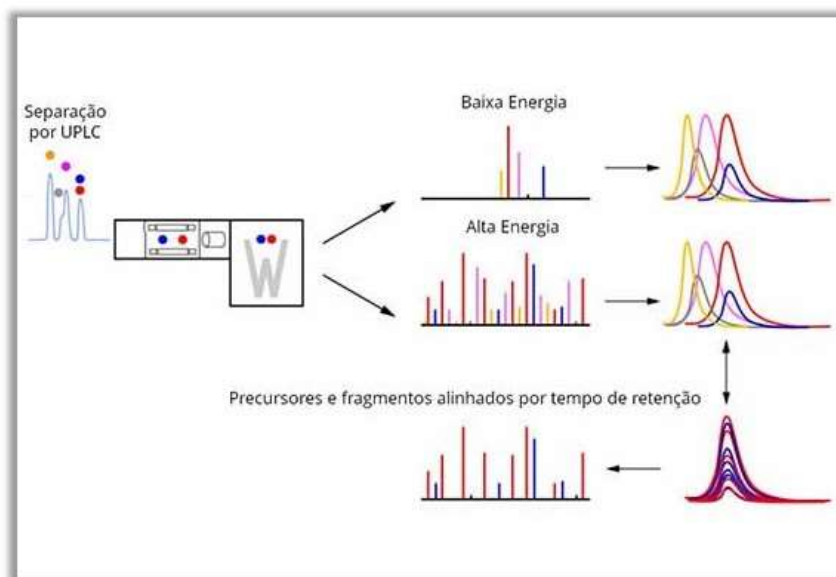


Figura 4. Esquema do processo de separação e análise de uma amostra via CLAE-EM.

Disponível em: <<https://www.labnetwork.com.br/destaque/decodificando-a-espectrometria-de-massas/>>
Acessado em: 02 jan. 2020.

Pela diversidade de substâncias e suas polaridades distintas, considerando a grande diferença de massa entre as saponinas e flavonoides, principais classes de substâncias presentes nos extratos de maior polaridade de *Urochloa ruziziensis* e *U. humidicola*, a ionização por electrospray foi utilizada para analisar as substâncias presentes nos extratos.

3.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1. Materiais

Para o fracionamento cromatográfico em coluna de vidro foi utilizado gel de sílica 60 (230 - 400 ou 70 – 230 mesh) da Silicycle. Cromatografia por exclusão molecular utilizou-se Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich.

O acompanhamento por CCDA foi feita em cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₆ sobre alumínio das marcas Silicycle e Sorbent. Utilizou-se para revelação das cromatoplasmas irradiação com luz ultravioleta (254-366 nm); revelador químico vanilina sulfúrica [(1g de vanilina em solução com 45 mL de água destilada (H₂O), 45 mL de etanol (CH₃CH₂OH) e 10 mL ácido sulfúrico (H₂SO₄)] seguido de aquecimento; solução aquosa 10% cloreto de alumínio (AlCl₃) e vapores de iodo.

3.4.2. Equipamentos

Utilizou-se evaporador rotativo Fisaton 801 para concentração dos extratos brutos e frações.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D) foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE II, 9,4 T (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C), espectrômetro de RMN com 11,5 T (500MHz para ¹H e 125MHz para ¹³C), central analítica IQ-UFRRJ. Como padrão interno para referência de deslocamento químico foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

Os cromatogramas e os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa (CG/EM), a Shimadzu modelo QP-2010 (Kyoto, Japan), HP-5880 acoplado a espectrômetro de massas de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV.

As análises de CLAE foram feitas no equipamento HPLC Shimadzu LC-20AT, CBM-20A, ICE-UFRRJ, pela colaboração da Prof. ^a Dr.^a Rosane Nora Castro.

Espectros de massas de alta resolução foram obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta resolução (CLUE/EM-EM), no sistema UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), coluna Waters Acquity UPLC BEH C 18 (150 mm x 2,1 cm, 1,7 μ m), temperatura de 40 °C e fases móveis de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, realizada na Embrapa Agroindústria Tropical, *Campus* do Pici - Fortaleza – CE.

3.4.3. Solventes

Nos processamentos cromatográficos foram utilizados solventes orgânicos grau analítico (P.A.) das empresas Vetec e Neon. Para as análises de RMN ^1H e ^{13}C foram utilizados solventes deuterados (CDCl_3 , $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD) da marca Tedia.

3.4.4. Softwares

O programa ACD/Labs (versão 12.0) e o MestReNova foram utilizados no processamento dos espectros obtidos nos experimentos de RMN.

As estruturas foram desenhadas nos programas ChemWindow ou ChemDraw Ultra 12.0.

Os espectros de massas de baixa resolução foram processados no programa GCMS Postrun Analysis (Shimadzu).

As interpretações dos espectros de massas de alta resolução foram feitas com o auxílio do software de espectrometria de massas MassLynx (Waters).

3.4.5. Obtenção de exemplares das espécies *U. humidicola* e *U. ruzizensis*

As duas espécies foram coletadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ. A cidade possui um clima classificado como Aw, com chuvas concentradas no período de novembro a março, precipitação anual média de 1.213mm e temperatura média anual de 24,5°C.

A espécie *U. humidicola* existe em um pasto homogêneo que é utilizado como pastagens para ovinos e caprinos. O setor de coleta foi a Caprinocultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, (latitude: 22°44'38" S; longitude: 43°42'27" W; altitude: 26m).

A espécie *U. ruzizensis* não possuía área de cultivo pré-estabelecida em localidade próxima ao campus da Universidade, sendo assim seu cultivo foi necessário. O plantio foi desenvolvido em parceria no setor de forrageiras do Instituto de Zootecnia. Nessa etapa do trabalho tivemos e valorosa colaboração do Dr. Delci de Deus Nepomuceno (in memoriam)[†].

3.4.5.1. Plantio da espécie *U. ruzizensis*

A *Urochloa ruzizensis* é uma espécie de cultivo típico no sul do país, ela é utilizada principalmente na produção extensiva de gado. Como citado acima, nas áreas com culturas previamente estabelecidas no campus Seropédica da UFRRJ não havia uma área de cultivo de *U. ruzizensis*, sendo assim dentro do nosso planejamento foi necessário realizar o plantio de uma área.

O plantio pode ser feito por mudas ou através de sementes, a última a semeadura pode ser feita a laço ou deve ser feito no período da primavera (setembro a dezembro) podendo se estender até fevereiro, neste período do ano a espécie tem maior tempo de exposição solar a luz solar o que favorece o seu desenvolvimento adequado (PUPO, 1981).

As sementes foram doadas pela empresa Wolf Sementes. A área selecionada foi preparada no dia 11/10/2015, pasto onde a espécie predominante era o *Panicum maximum* (capim colônia) fez-se necessário sua remoção por capina para então o cultivo da espécie desejada. No momento do preparo da terra foi observada a presença de algumas espécies

invasoras típicas como do plantio ao estágio de colheita são necessários 3 a 4 meses e após o primeiro corte de 35 a 42 dias.

O preparo da área e o plantio da espécie foram realizados em 10 de outubro de 2016, no Campo Agrostológico localizado no Instituto de Zootecnia-UFRRJ (22°46' 27,8'' S; 43°41' 14'' O), o clima local é classificado, de acordo com a classificação Köppen, com tipo Aw, caracterizado como tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno. O solo local é do tipo Planossolo Háptico (EMBRAPA, 1999), a área reservada mede 3 x 10 m onde foram feitos 7 canteiros com distância média de 40 centímetros entre eles. O crescimento foi acompanhado durante 3 meses até o ponto do corte.

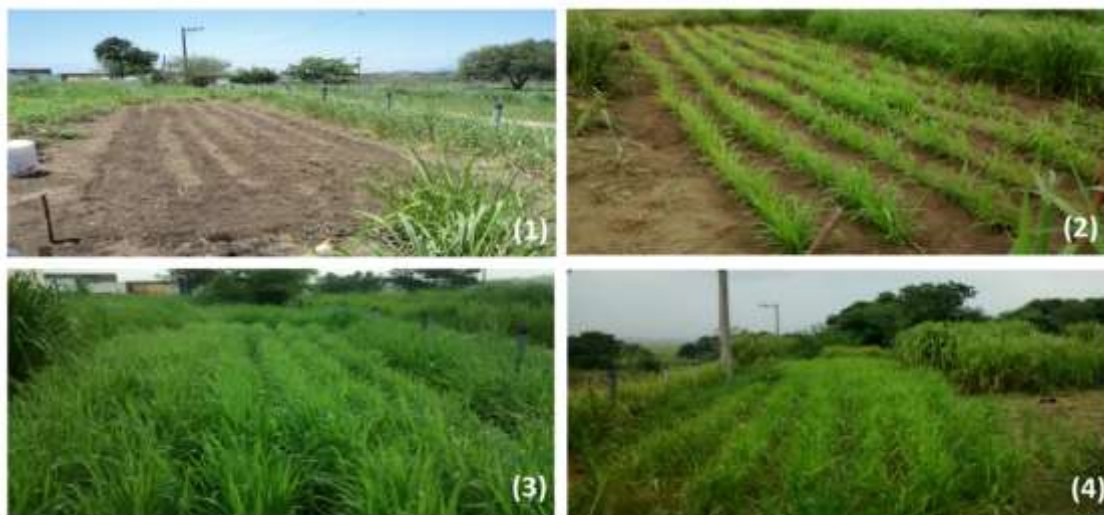


Figura 5. Etapas de desenvolvimento da espécie *U. ruziziensis*. (1) plantio 10/10/2015, (2) 11/11/2015, (3) 10/12/2015 e (4) 10/01/2016 data do corte.

Fonte: Autoria própria.

3.4.6. Coleta da espécie *Urochloa humidicola* e preparo dos extratos

Para a espécie *U. humidicola* não foi necessário o plantio visto que já existia um campo homogêneo e bem estabelecido disponível para a coleta. A parte aérea (folhas e colmo) foi colhida em 11/08/2015 entre 8:00 h e 10:00 h, o material verde foi seco à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar e posteriormente pulverizado em moinho de facas, ao final do processo obteve-se 536,17g de material seco. A amostra para exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Departamento de Botânica e encontra-se sob o código alfanumérico RBR 38719.

Os extratos foram preparados por maceração, utilizando com líquido extrator hexano e solução hidrometanólica a 80%. A mistura foi deixada em maceração por sete dias, a o abrigo da luz, então filtrada. As soluções extrativas foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas, obtendo-se assim os extratos brutos.

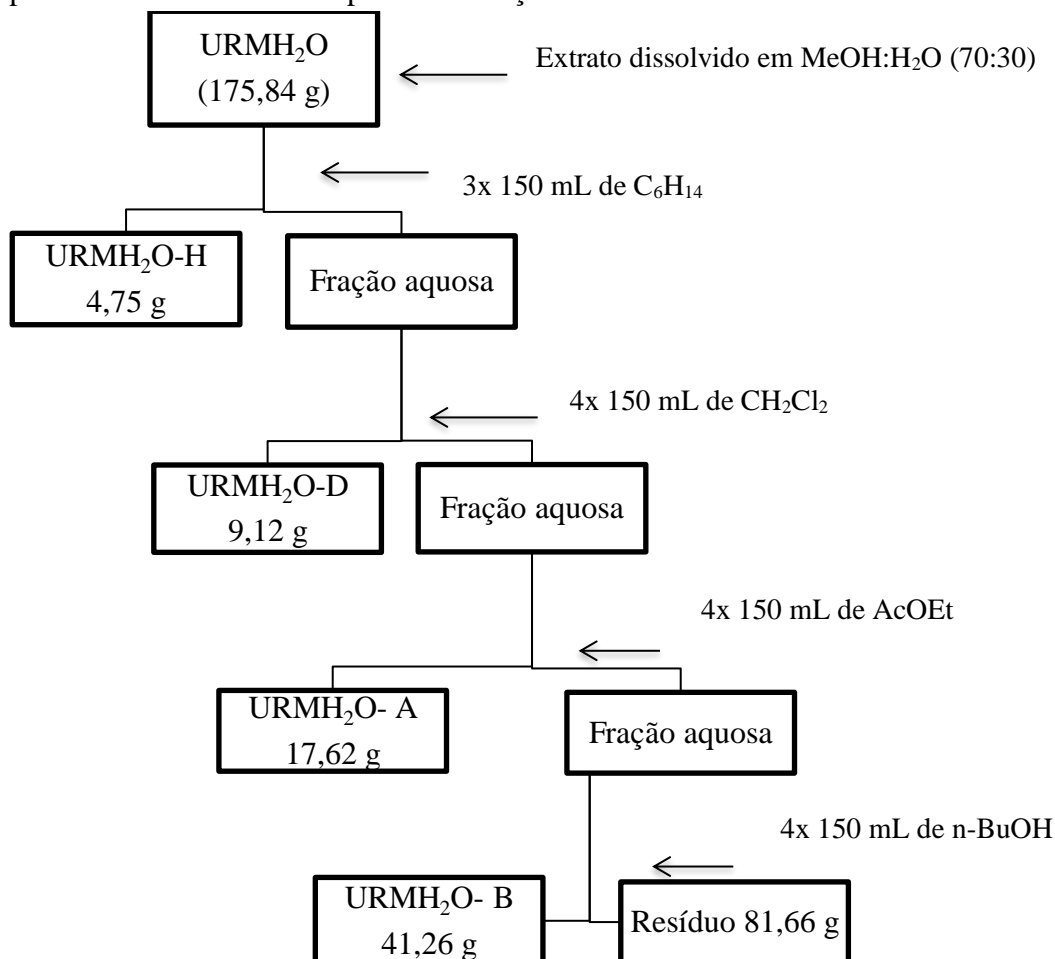
A partir de 536,17g de *U. humidicola* foram produzidos 4,77 g de extrato hexânico (UHFH), 45,69 g do extrato hidrometanólico (UHFM).

3.4.7. Coleta da espécie *U. ruziziensis* e obtenção dos extratos

A parte aérea (folhas e colmo) foi colhida em 11/01/2016 entre 8:00 e 10:00 horas, o material verde foi seco à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar e posteriormente pulverizado em moinho de facas, ao final do processo obteve-se 1441,44 g. A amostra para exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Departamento de Botânica e encontra-se sob o código alfanumérico RBR 387120.

Seguindo-se extração (maceração a frio) com hexano e solução metanólica a 80% a temperatura ambiente. As soluções extrativas obtidas foram concentradas em evaporador rotativo até completa eliminação do líquido extrator, obtendo-se assim os extratos brutos. A partir de 1441,44 g de *U. ruziziensis* foram produzidos 12,37 g de extrato hexânico (**URFH**) e 175,84 g do extrato hidrometanólico (**URMH₂O**).

O extrato hidrometanólico foi dissolvido em 50 mL de solução metanol: H₂O (70:30) e então submetido à partição com solventes orgânicos de polaridade crescente fornecendo as frações (partições): hexano (**URMH₂O-H**) 4,75 g, diclorometano (**URMH₂O-D**) 9,12g, acetato de etila 17,62g (**URMH₂O-A**) e butanol 41,26 g (**URMH₂O-B**), o resíduo teve massa igual a 81,66g. Cada extração foi repetida 8 vezes utilizando 150,00 mL cada. As frações foram secas em evaporador rotativo até a completa eliminação do solvente.



Fluxograma 1. Partição do extrato bruto de *Urochloa ruziziensis*.

3.4.8 Fracionamento das partições oriundas do extrato hidrometanólico de *Urochloa ruziziensis*

3.4.8.1. Fracionamento da fração URMH₂O-H

O extrato URMH₂O-H em sua totalidade (4,75g) foi submetido à cromatografia em coluna aberta em gel de sílica (230 - 400 mesh) (230,18g). Utilizou-se como eluentes, hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, que combinados dois a dois proporcionaram gradiente crescente de polaridade. Este fracionamento gerou 60 frações de 250 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador. O perfil cromatográfico das frações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), observadas por luz ultravioleta e reveladas com vanilina sulfúrica. As frações que apresentaram similaridade na análise por CCDA foram reunidas em grupos de frações, conforme apresentado na **Tabela 2**, para processamentos adicionais que visaram o isolamento de metabólitos especiais.

Tabela 2. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição URMH₂O-H.

Frações destaque	Massa (g)	Eluente
8	0,0325	C ₆ H ₁₂ : CH ₂ Cl ₂ (20:80)
21-24	0,0398	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (90:10)
28-30	0,1434	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (85:15)
53-55	0,9128	AcOEt: MeOH (60:40)

A fração 8 e a reunião 53 a 55 foram submetidas ao fracionamento subsequente pois, pelo aspecto apresentado na análise em placa cromatográfica, apresentarão poucos constituintes o que favoreceu sua seleção.

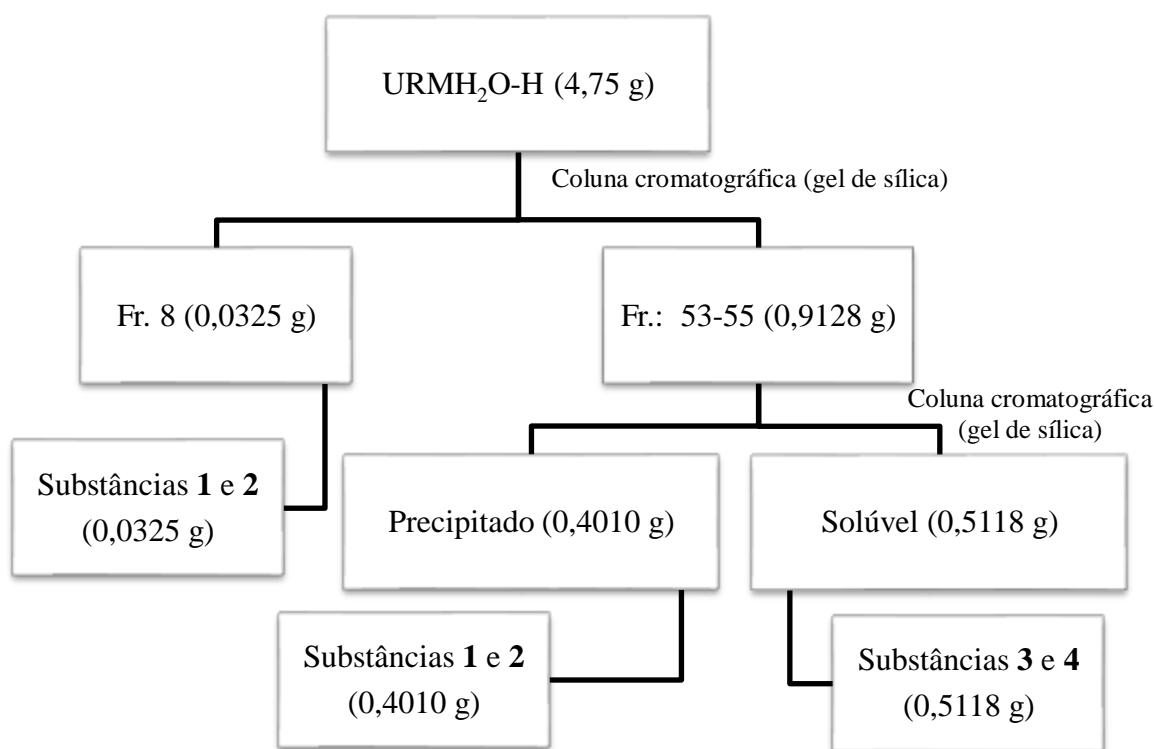
3.4.8.1.1. Fracionamento de URMH₂O-H-8

No processo de secagem da fração de número 8 (0,0325 g) observou-se o aparecimento de um precipitado de cor branca, ao utilizarmos hexano na lavagem do precipitado foi possível remover outras substâncias que estavam presentes. Na análise por RMN ¹H e ¹³C foi possível identificar as substâncias **1** e **2**.

3.4.8.1.2. Fracionamento de URMH₂O-H 53-55

O grupo de frações 53-55 foi reunido (0,9128 g) e ao ser dissolvido em diclorometano apresentou um precipitado de coloração branca, insolúvel nesse solvente, com massa igual a 0,4010 g, que foi submetido à análise de RMN ¹H e ¹³C, em piridina, identificando-se as substâncias **1** e **2**. A parte solúvel (0,5118 g) foi refractionada em uma coluna de gel de sílica, eluída em diclorometano e acetato de etila em gradiente de concentração, da qual obtiveram-se 40 frações de 50 mL cada. Após concentradas em rotaevaporador as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) observadas na câmara ultravioleta e reveladas com vanilina sulfúrica. As frações que apresentaram similaridade foram reunidas.

Deste processo a fração de número 24 (0,010 g), que apresentou uma mancha principal arroxeadada, foi refractionada em sephadex LH20, eluída em CH₂Cl₂: MeOH (30:70). O perfil das frações obtidas foi acompanhado por CCDA, as frações de número 11 e 12 (0,0062 g) foram reunidas e analisadas por RMN ¹H e ¹³C identificando-se as substâncias **3** e **4**.



Fluxograma 2. Fracionamento do extrato hexânico de *U. ruziziensis*.

3.4.8.2. Fracionamento da partição URMH₂O-D

A partição URMH₂O-D (8,27 g) foi fracionada em coluna aberta de gel de sílica (70 – 230 mesh), 231,53 g para o recheio da coluna e para a pastilha utilizou-se 10,03 g. A fase móvel utilizada foi em gradiente crescente de polaridade, iniciando com diclorometano, passando por acetato de etila e metanol até 100 % de metanol. Foram coletadas 74 frações de 125 mL cada, concentradas em rotaevaporador.

O acompanhamento do perfil de cada amostra foi analisado por CCDA, utilizando como eluente os mesmos solventes utilizados no fracionamento da coluna. As amostras foram reunidas pela sua similaridade de acordo com seu perfil cromatográfico, os grupos de frações são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição URMH₂O-D.

Frações reunidas	Massa (g)	Eluente
37-38	0,0203	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (60:40)
39-41	0,1103	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (50:50)
42-43	0,0724	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (40:60)
58-59	0,072	AcOEt
67-68	0,6390	AcOEt: MeOH (70:30)

Dentre as amostras reunidas, destacaram-se os grupos de frações 37 e 38, que apresentou uma mancha principal amarela quando revelada em vanilina sulfúrica, e a reunião 67 e 68, que

apresentou uma mancha principal rocha ao utilizarmos o mesmo revelado na análise por CCDA apresentaram poucas manchas, estes grupos foram selecionados para posterior fracionamento.

3.4.8.2.1. Fracionamento de URMH₂O-D 37-38

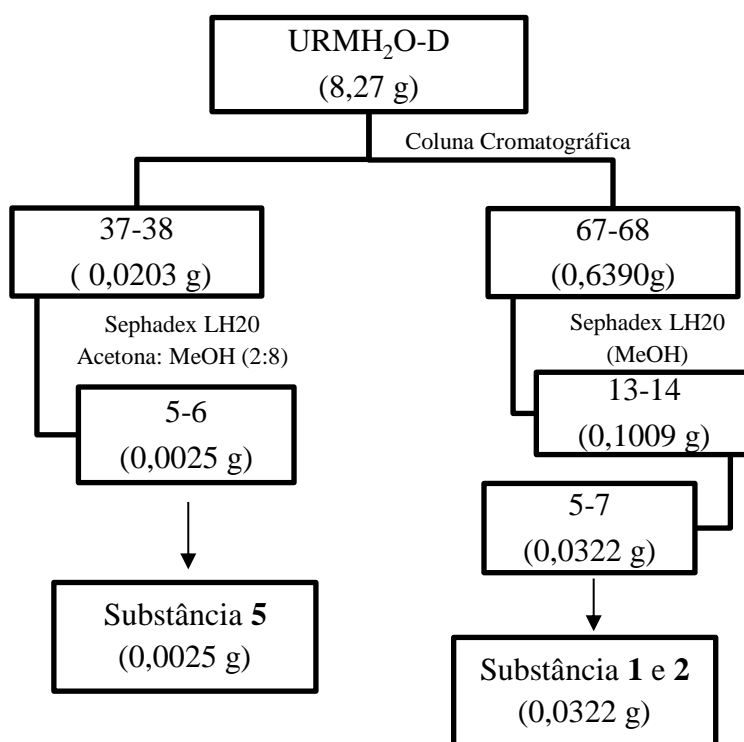
As frações de número 37 e 38 apresentaram um precipitado amarelo em formato de agulhas, e similaridade em placa, foram reunidas, totalizando 0,0203g. O resíduo foi dissolvido em acetona: metanol (3:7) e refracionado em sephadex LH20 utilizando como eluente a mesma solução usada na dissolução. Este processo rendeu 13 frações, as de número 5-6 (0,0025 g) foram analisadas por RMN ¹H e ¹³C, cuja interpretação dos dados permitiu a identificação da substância **5**.

3.4.8.2.2. Fracionamento de URMH₂O-D 67-68

A fração 67 e 68 foram reunidas após avaliação do seu perfil cromatográfico e renderam 0,6390 g. A amostra foi submetida ao fracionamento subsequente em sephadex LH20 com o intuito de purificar a amostra.

Ambas as substâncias foram identificadas por análises de RMN ¹H e ¹³C além dos experimentos bidimensionais. Neste processo foi isolada novamente as substâncias **1** e **2** obtidas inicialmente na fração URMH₂O-H.

O diagrama a seguir apresenta um esquema resumido do processamento das frações de interesse e indica a obtenção das substâncias isoladas na fração URMH₂O-D.



Fluxograma 3. Esquema de fracionamento da partição diclorometano.

3.4.8.3. Fracionamento da partição URMH₂O-A

A partição URMH₂O-A (11,02 g) foi fracionada em coluna aberta de gel de sílica (70 – 230 mesh), 200,64 g para o recheio da coluna e para a pastilha utilizou-se 18,52 g. O eluente utilizado foi um gradiente crescente em polaridade partindo-se de diclorometano, passando por acetato de etila e metanol até 100 %. Foram coletadas 78 frações de 125 mL cada, que foram concentradas em rotaevaporador.

O acompanhamento do perfil de cada amostra foi analisado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como eluente os mesmos solventes utilizados no fracionamento da coluna, utilizou-se luz ultravioleta com comprimento de onda em 294 nm e vanilina sulfúrica como reveladores. As amostras foram reunidas pela sua similaridade de acordo com seu perfil cromatográfico, os grupos de frações estão descritos na **Tabela 4**. O grupo de frações 20 a 22 foi o único que, após outras etapas cromatográficas nos permitiu identificar as substâncias presentes.

Tabela 4. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição URMH₂O-A.

Frações reunidas	Massa (g)	Eluente
20-22	0,1612	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (60:40)
26-30	0,0260	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (10:90)
36-37	0,2918	AcOEt: MeOH (70:30)
41-42	0,8024	AcOEt: MeOH (60:40)

3.4.8.3.1. Fracionamento de URMH₂O-A 20-22

As frações de número 20 a 22 foram reunidas pela semelhança em placa, totalizando 0,1612 g. O resíduo foi solubilizado em metanol e refracionado em sephadex LH20 utilizando como eluente metanol. Este processo rendeu 12 frações e nas de número 9-11 (0,1124 g) foi purificada em coluna de gel de sílica, o eluente utilizado foi a combinação dos solventes diclorometano e acetato de etila na proporção 60:40, respectivamente, desta purificação obtiveram-se 17 frações. As frações 12 e 13 (0,0104 g) foram analisadas por RMN ¹H e ¹³C, possibilitando a identificação do conjunto de substâncias **7**, **8** e **9**, em mistura.

3.4.9. Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos hidrometanólicos de *U. humidicola* e *U. ruzizensis* por desreplicação

3.4.9.1. Levantamento bibliográfico

Os estudos de desreplicação tem uma ferramenta de extrema importância que é a comparação dos resultados obtidos que são descritos na literatura, informações de massa, espectrométricas, espectroscópicas e estruturais. Nesse aspecto faz-se necessário um levantamento de dados que deve ser orientado sobre duas vertentes, o conhecimento sobre o gênero e a família a qual a planta em estudo pertence; e a busca dentro das classes de metabólitos especiais que são bioproduzidas pelas espécies estudadas. Deste modo, foi necessário o levantamento de dados de massas de moléculas já reportadas para o gênero *Urochloa* e da Família Poaceae.

As bases de dados consultadas foram: Scifinder, Dictionary of Natural Products, Scopus, PubChem, ScienceDirect. A consulta foi direcionada pela família, gênero, além de análise de trabalhos científicos envolvendo, livros, artigos, teses e revisões em busca de substâncias presentes no gênero. Foram pesquisadas diversas classes de metabólitos, mas a busca pelos flavonoides, ácidos orgânicos e saponinas foram o principal alvo. As informações levantadas estavam relacionadas: ao desenho estrutural, massa monoisotópica, massa monoisotópica protonada e desprotonada, e a fórmula molecular.

3.4.9.2. Preparo da amostra

Nesta etapa foram utilizados os extratos obtidos por maceração, procedimento descrito no item 3.4.6. (Página 17) e 3.4.6. (Página 18), e houve uma preparação das amostras antes da análise por CLUE-EM.

Cerca de 5 mg de cada extrato hidrometanólico, URMH₂O e UHMH₂O, foram dissolvidos em solução metanol: água (90:10) e submetido a uma purificação prévia utilizando o método por extração em fase sólida, com cartucho C-18. Inicialmente o cartucho foi condicionado utilizando 5 mL de solução metanólica 90%, a amostra foi então incorporada, lavada com 10 mL de água ultrapura e submetida a extração com 100% de metanol grau UPLC. A solução contendo o extrato foi seca em rotaevaporador, e dissolvida em 300 µL de metanol, o volume de injeção foi 10 µL.



Figura 6. Extração em fase sólida com uso de Manifold e cartucho SPE.

3.4.9.3. Condições da análise

A análise dos produtos de extração das duas espécies de *Urochloa* foi realizada por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLUE-EM) e em um sistema UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), pertencente a Embrapa Agroindústria Tropical, *Campus* do Pici - Fortaleza - CE.

As corridas cromatográficas foram realizadas em uma coluna Waters Acquity UPLC BEH C 18 (150 mm x 2,1cm, 1,7 µm), com temperatura fixa de 40 °C. As fases móveis foram compostas de água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B, com fluxo de 0,4 mL / min e volume de injeção de 5 µL.

Os espectros de massa de alta resolução obtidos numa fonte de ionização por eletrospray (ESI) nos modos positivo (ESI+) e negativo (ESI-). O modo de aquisição dependente de dados (fragmentação sequencial de todos os picos detectados).

As condições do analisador de massas XEVO-QToF no modo negativo foram faixa de aquisição: 110-1180 Da; Temperatura da fonte: 120 ° C; Temperatura de dessolvatação 350 ° C; Fluxo do gás de dessolvatação: 500 L .h⁻¹. Cone de extração: 0,5 v; Voltagem capilar: 3,2 kV; Padrão “lock mass”: leucina encefalina. As condições do analisador de massas XEVO-QToF no modo negativo foram Faixa de aquisição: 110-1180 Da; Temperatura da fonte: 120 ° C; Temperatura de dessolvatação 350 ° C; Fluxo do gás de dessolvatação: 500 L .h⁻¹. Cone de extração: 0,5 v; Voltagem capilar: 3,2 kV; Padrão “lock mass”: leucina encefalina; A função do padrão “lock mass” é corrigir automaticamente todos os espectros adquiridos. O modo de aquisição será EM/EM. O controle do aparelho e a análise dos espectros gerados foram feitas com o software Masslynx 4.1 (Waters Corporation), bem como o fornecimento das massas e as fórmulas moleculares.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O processamento cromatográfico dos extratos de folhas de *Urochloa ruziziensis* resultou no isolamento e identificação de cinco substâncias apresentadas na **Figura 7**. A elucidação das mesmas foi realizada através de análises espectrais e por comparações com dados da literatura. O detalhamento do procedimento de elucidação será descrito nos próximos tópicos.

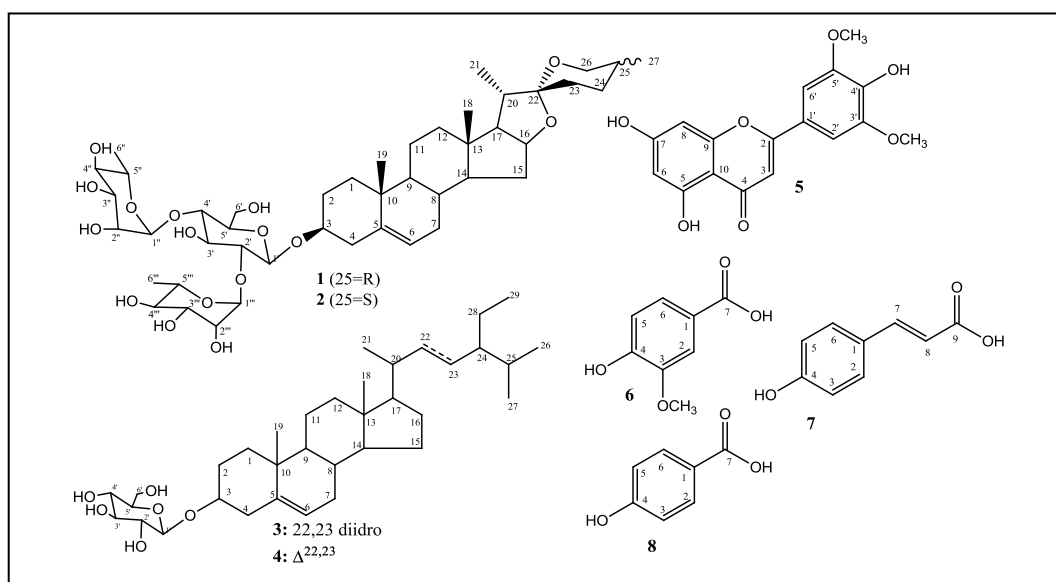


Figura 7. Substâncias isoladas e identificadas das folhas de *Urochloa ruziziensis*.

3.5.1. Identificação das substâncias isoladas da partição URMH₂O-H

3.5.1.1. Identificação das substâncias 1 e 2

As substâncias **1** e **2**, se apresentaram como um precipitado amorfo de coloração branca, foram identificadas na fração URMH₂O-H 8 e na fração URMH₂O-H 53-55, a identificação foi feita com a solubilização do precipitado em piridina e analisado por ressonância magnética nuclear e por espectrometria de massas com ionização elétron spray (EM-IES). A interpretação dos espectros de RMN ¹H, ¹³C e a comparação com dados da literatura demonstraram que se

travam de duas saponinas com esqueleto do tipo furostânico. O carbono 22, quaternário duplamente oxigenado, com deslocamento químico próximo a 109 ppm, caracteriza o sistema espiro com os anéis furano e pirano na estrutura, nesta região foi observada a presença de dois sinais 110,26 e 109,79 ppm (**Espectro 3, Página 30**).

Com a presença de dois valores para C-22 foi investigado então o comportamento do centro quiral 25 que, dependendo da sua estereoquímica, provocaria diferenças de deslocamento químico dos carbonos do anel furostânico. A aglicona pode ser classificada como diosgenina (25-R) ou yamogenina (25-S), a definição depende da posição da metila C-27, equatorial (25-R) ou axial (25-S). A posição da metila provoca uma variação no deslocamento químico do C-25, uma diferença em torno de 2 ppm, quando a metila está em equatorial observa-se δ_C 31,10 para C-25 e quando a metila está em axial δ_C 28,03 para o mesmo carbono (PIRES et al., 2002 e ESPEJO et al., 1982).

O comportamento do C-23 e seus respectivos hidrogênios também é afetado pela posição da metila 27. O efeito gama de proteção que a metila C-27 axial exerce sobre o carbono 23 faz com que o seu deslocamento químico seja menor, δ_C 26,88 e os hidrogênios diastereotópicos absorvem em δ_H 1,45 e 1,92; enquanto que, quando a metila 27 está em equatorial, observa-se δ_C em 30,66 e os hidrogênios diastereotópicos absorvem em δ_H 1,88 e 2,07. Mediante esta análise e a comparação dos dados obtidos na literatura (PIRES et al., 2002 e ESPEJO et al., 1982), concluímos que existem duas saponinas furostânicas com a diferenciação no centro quiral C-25. Os carbonos com deslocamento químico específico para cada aglicona foram assinalados nos espectros com letras entre parênteses, para **1** (D) e para **2** (C).

As unidades de açúcar presentes na saponina foram propostas com a análise do espectro de RMN ^{13}C que permitiu a indicação de três unidades cujos deslocamentos em 100,77; 102,57 e 103,40 ppm correspondem aos carbonos anoméricos de cada um. O primeiro açúcar ligado é uma glicose, ligada ao C-3 da aglicona. Observou-se facilmente o acoplamento a longa distância entre o H-3 e o carbono anomérico C-1' (100,77 ppm) no experimento HMBC (**Espectro 10, Página 35**).

Os outros dois açúcares são ramnoses e estão conectados diretamente a glicose nas posições C-2' e C-4'. A presença de quatro carbonos metínicos com deslocamento entorno de 78 ppm demonstram que houve variação nos deslocamentos químicos de C-2' e C-4', caracterizando a substituição na glicose. Sem a substituição a glicose apresentaria dois carbonos com deslocamentos δ_{CH} 78,8 (C-3') e δ_{CH} 78,7 (C-5'). Quando substituídos por ramnoses os valores dos carbonos C-2' e C-4' apresentam-se com maiores valores de deslocamento químico variando de δ_{CH} 75,5 para δ_{CH} 78,32 (C-2') e δ_{CH} 71,8 para δ_{CH} 79,03 (C-4'). As interações no mapa de contorno HMBC onde apontam o acoplamento dos hidrogênios do carbono anomérico H-1'' e o carbono C-2', H-1''' e o carbono C-4' (espectro 11). Esses dados justificam a substituição em C-2 e C-4.

A interpretação de RMN 1H e ^{13}C (espectros 1 a 5) e 2D-HMBC (espectro 9 a 11) permitiram fazer a completa atribuição dos valores de RMN 1H e ^{13}C das substâncias **1** e **2** apresentados na **Tabela 5 (Página 27)**.

Os resultados obtidos confirmam que a saponina em questão corresponde a 3-O- β -D-glicopiranosil-[(4'-1''')-O- α -L-ramnopiranosil-(2'-1'')-O- α -L-ramnopiranosil]-25(R)-

espirosta-5-eno (Dioscina, **1**) e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-[(4'-1''')-*O*- α -L-ramnopiranosil-(2'-1'')-*O*- α -L-ramnopiranosil]-25(*S*)- espirosta-5-eno (Collettinsídeo III, **2**). As saponinas **1** e **2** foram encontradas na *B. decumbens* (PIRES et al., 2002) e a saponina **1** em *U. humidicola* (OLIVEIRA et al., 2017).

O espectro de massas de alta resolução da substância (**Espectro 12, Página 36**), feito em modo positivo, apresenta íons em m/z 869,4952 $[M+H]^+$, 723,4363 $[(M+H)-146]^+$, 577,3753 $[(M+H)-146-146]^+$, 415,3194 $[(M+H)-146-146-162]^+$, 146 e 162 correspondem a massa perdida após a eliminação de ramnose e glicose, respectivamente. O pico com m/z 869,4952 $[M+H]^+$ é compatível com a fórmula molecular $C_{45}H_{73}O_{16}$ (cal. 869,4898). Os demais valores de m/z justificam a presença das três unidades de açúcar, duas ramnoses e uma glicose **Esquema 1 (Página 36)**.

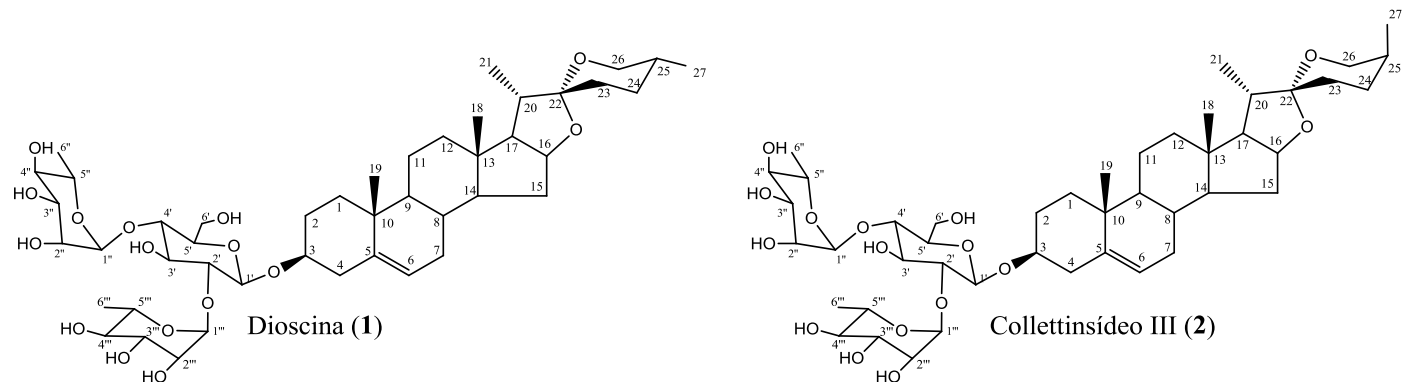
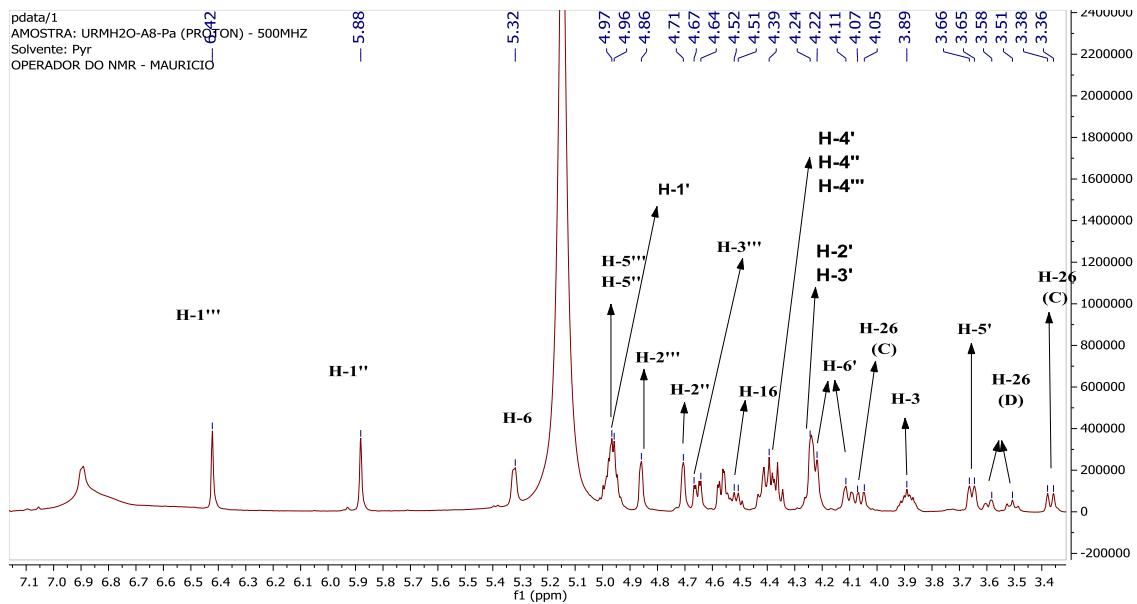


Tabela 5. Dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias 1 e 2 e comparação com os dados da Dioscina e Collettinsídeo III (PIRES et al., 2002; ESPEJO et al., 1982).

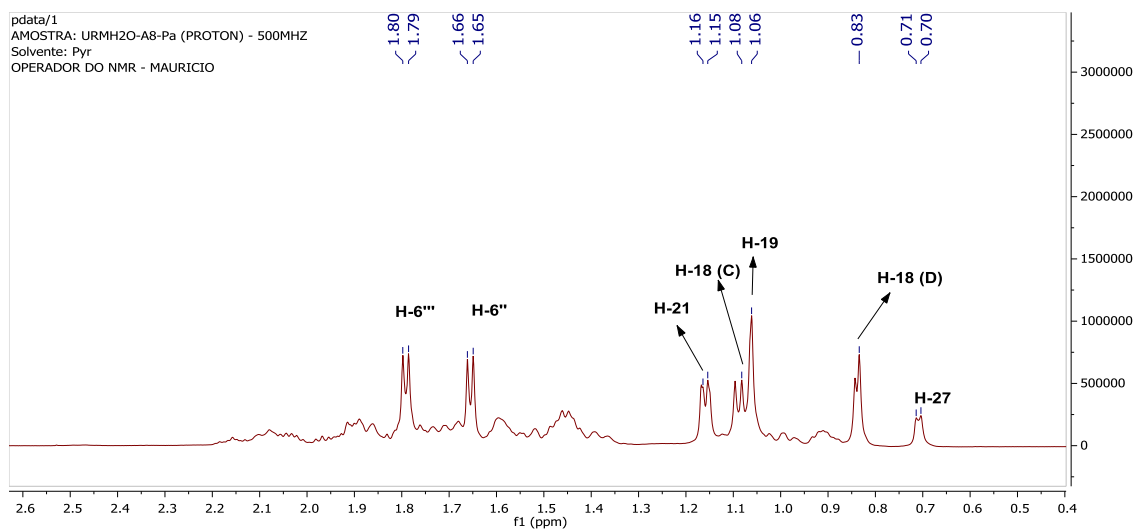
	Dioscina (1)		Espejo (25 = R)	J2	J3	Collettinsídeo III			Pires (25=S)	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}			δ_{C}	δ_{H}	J2	J3	δ_{C}
1	38,0	1,00; 1,75	37,4			1	38,00	1,00; 1,75		37,6
2	29,76	1,47	32,2			2	29,76	1,47		30,3
3	78,56	3,89 (m)	78,4		1'	3	78,56	3,89		78,1
4	39,46	2,81; 27,9	38,5	3; 5	2; 6; 10	4	39,46	2,81; 27,9		39,1
5	141,29	-	140,4			5	141,29	-		140,9
6	122,33	5,32 (sl)	122,5			6	122,33	5,32 (sl)		121,9
7	32,32	1,68	32,2			7	32,32	1,68		32,4
8	31,10	1,52	31,7			8	31,10	1,52		31,8
9	50,78	0,90	50,3			9	50,78	0,90		50,4
10	37,64	-	37,1			10	37,64	-		37,2
11	21,60	1,48	21,5			11	21,60	1,48		21,2
12	40,35	1,10 ; 1,70	39,9			12	40,35	1,10 ; 1,70		39,9

13	40,93	-	40,5			13	40,93	-	40,5		
14	57,12	1,064	56,6			14	57,12	1,064	56,7		
15	32,69	1,88; 2,03	31,7			15	32,81	1,88; 2,03	32,3		
16	81,69	4,50	81,1			16	81,61	4,50	81,2		
17	63,18	1,80	62,9			17	63,36	1,80	63,0		
18	16,85	0,83 (s)	16,4	12; 17	14;	18	16,80	1,08 (s)	16,4		
19	19,92	1,06 (s)	19,4	10	9; 5	19	19,92	1,06 (s)	19,5		
20	42,95	1,91	42,0			20	42,47	1,97	42,5		
21	15,56	1,16 (d; 7Hz)	15,0	20; 22	17	21	15,40	1,16 (d; 7Hz)	15,0		
22	110,26	-	109,3			22	109,79	-	109,4		
23	30,66	1,88 ; 2,07	29,9			23	26,88	1,45 ; 1,92	26,5		
24	29,76	1,59	29,3			24	26,69	2,16 ; 1,38	26,3		
25	31,10		30,6			25	28,03		27,6		
26	65,58	3,51; 3,58	66,9		22; 24;	26	67,37	3,36; 4,05	65,2	25	
27	17,84	0,71 (d; 5Hz)	17,3	25	27	27	17,84	0,71 (d; 5Hz)	15,2	26	
gli						gli					
1'	100,77	4,95	102,9		3	1'	103,40	4,95	100,4		
2'	78,43	4,23	78,8			2'	78,43	4,23	77,9		
3'	78,32	4,23	76,9			3'	78,32	4,23	78,2		
4'	79,03	4,39	78,1			4'	79,03	4,39	78,6		
5'	77,42	3,66 (d; 9Hz)	77,9			5'	77,42	3,66 (d; 9Hz)	77,0		
6'	61,77		61,3			6'	61,77		61,3		
ram						ram					
1''	102,57	5,88 (s)	100,3	2''	5''; 2'	1''	100,77	5,88 (s)	102,1		
2''	73,05	4,71 s	72,5			2''	73,05	4,71 s	72,6		
3''	73,05		72,7			3''	73,05		72,7		
4''	74,60	4,39	73,9			4''	74,60	4,39	74,2		

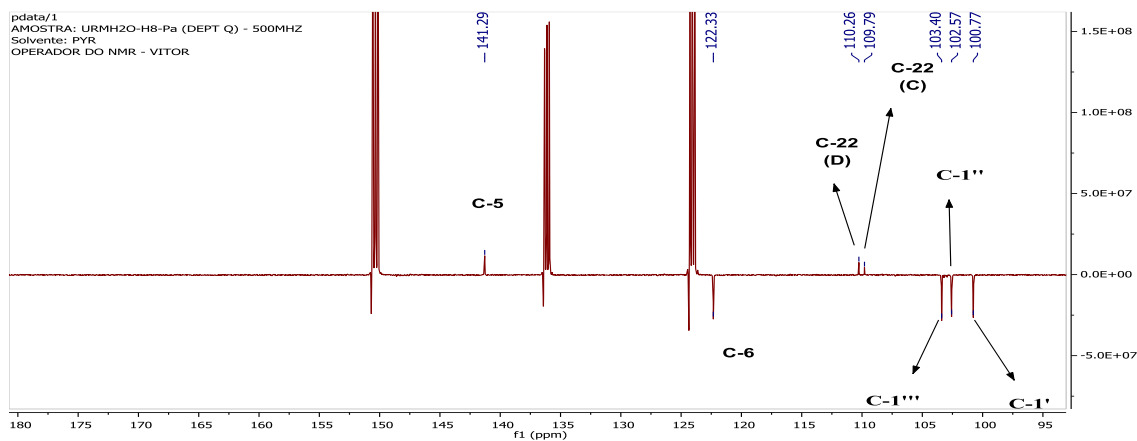
5''	70,91	3,66 (d; 9,5Hz)	69,6	5''		5''	70,91	3,66 (d; 9,5Hz)	69,6
6''	19,02	1,66 (d; 6Hz)	18,5	5''	4''	6''	19,02	1,66 (d; 6Hz)	18,8
ram						ram			
1'''	103,40	6,42 (s)	102,0	2'''	5''' ; 2'	1'''	102,57	6,42 (s)	103
2'''	73,33	4,86	74,1			2'''	73,33	4,86	72,9
3'''	73,23	4,39	72,8			3'''	73,23	4,39	72,8
4'''	74,40	4,39	73,7			4'''	74,40	4,39	74,0
5'''	70,04	4,97 (m)	70,4			5'''	70,04	4,97 (m)	70,5
6'''	19,17	1,80 (d; 6Hz)	18,6	5'''	4''	6'''	19,17	1,80 (d; 6Hz)	18,6



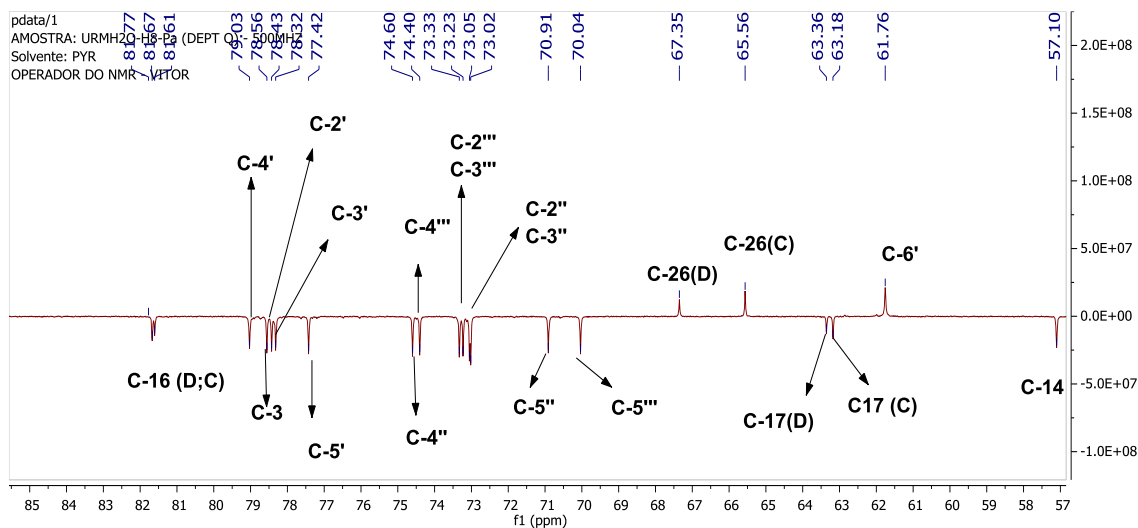
Espectro 1. Expansão do espectro RMN ^1H (500 MHz; Piridina- d_5) substâncias 1 e 2.



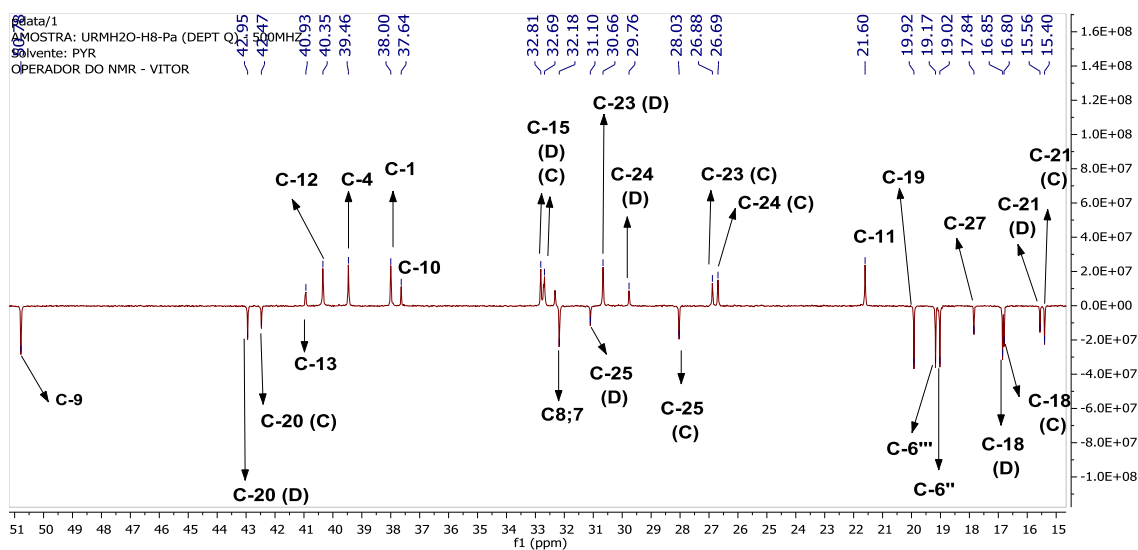
Espectro 2. Expansão do espectro RMN ^1H (Piridina, 500 MHz) substâncias 1 e 2.



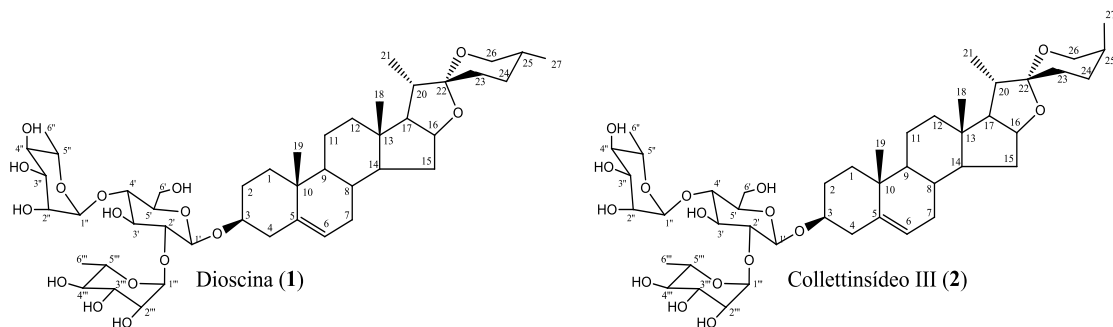
Espectro 3. Expansão do espectro RMN ^{13}C -DEPTQ (125MHz; Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.

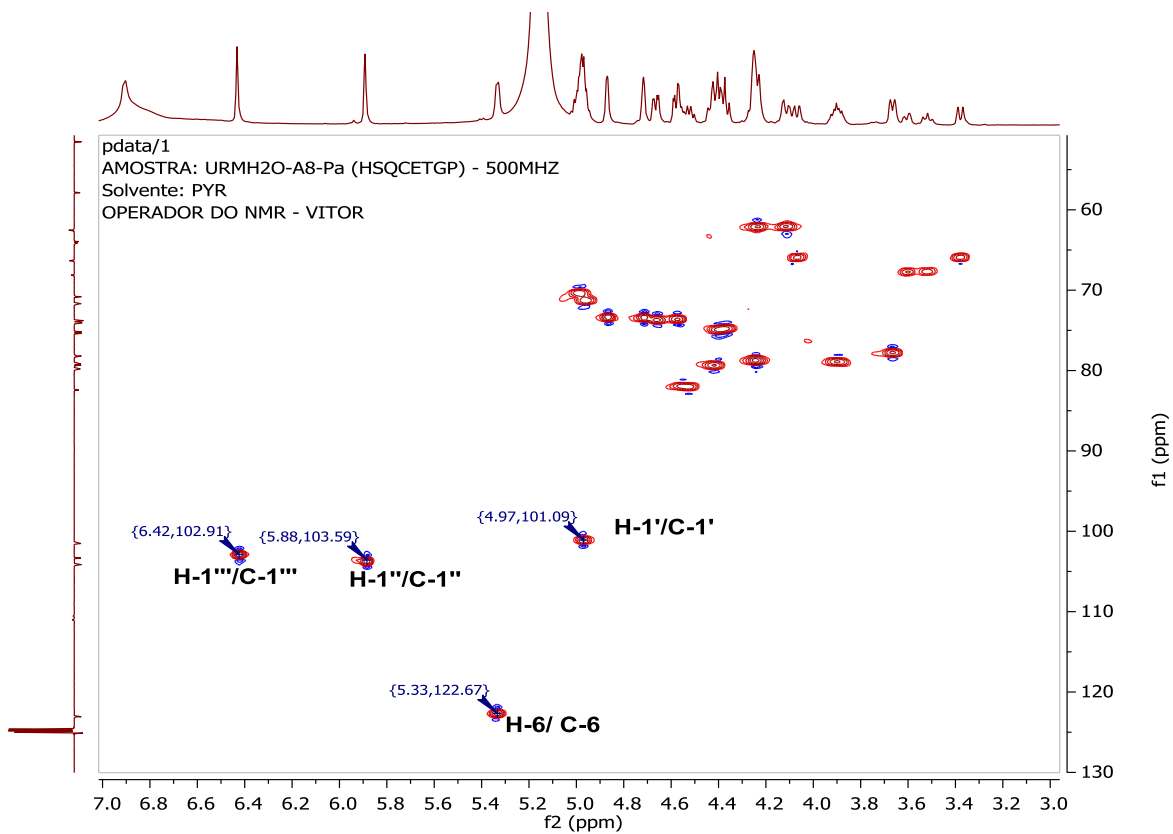


Espectro 4. Expansão do espectro RMN ^{13}C -DEPTQ (125MHz; Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.

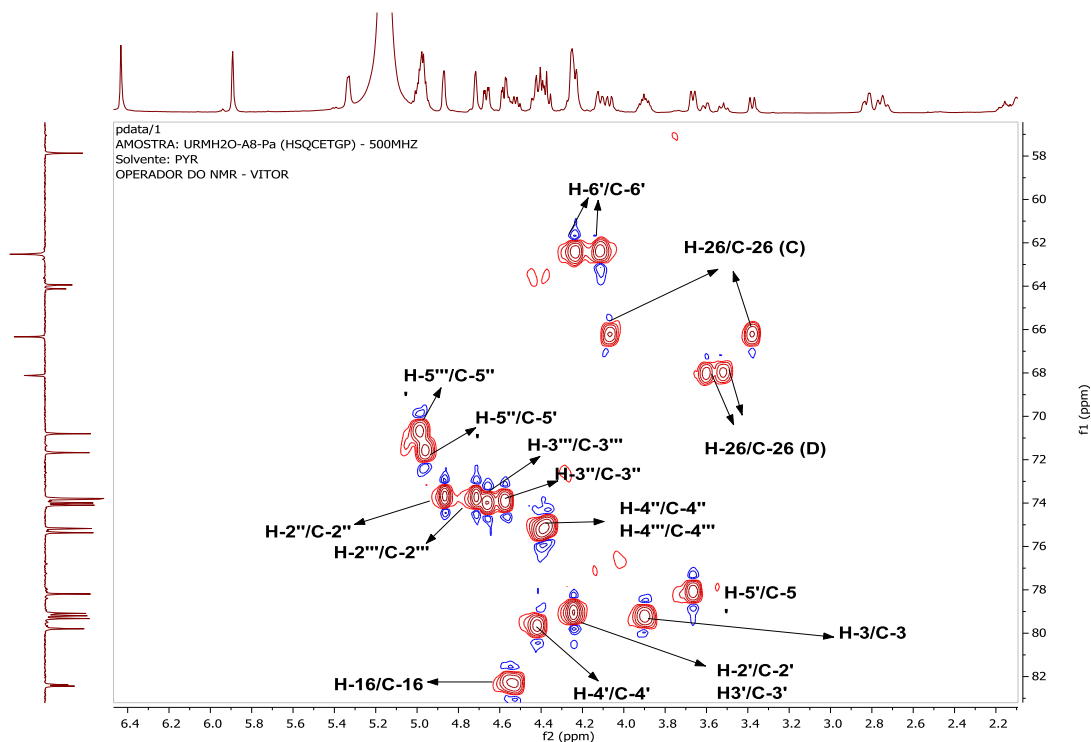


Espectro 5. Expansão do espectro RMN ^{13}C -DEPTQ (125MHz; Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.

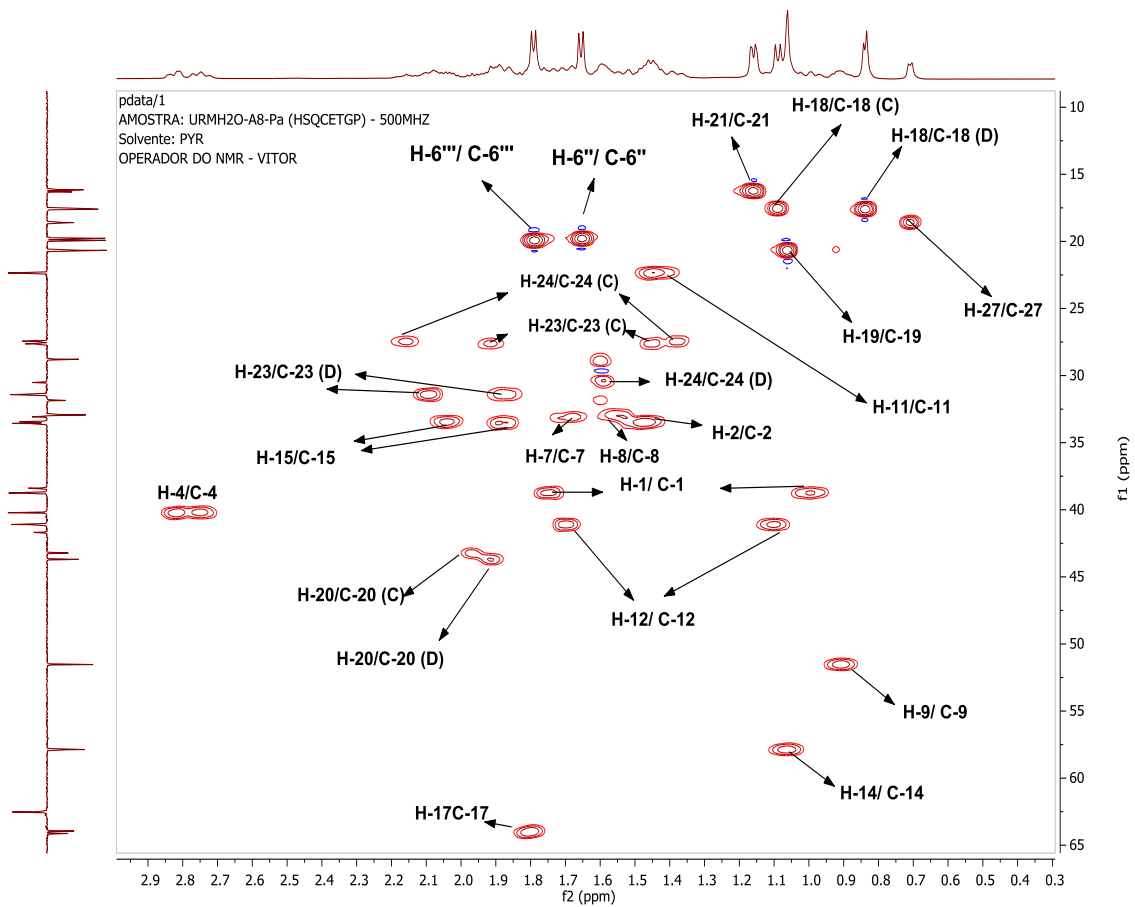




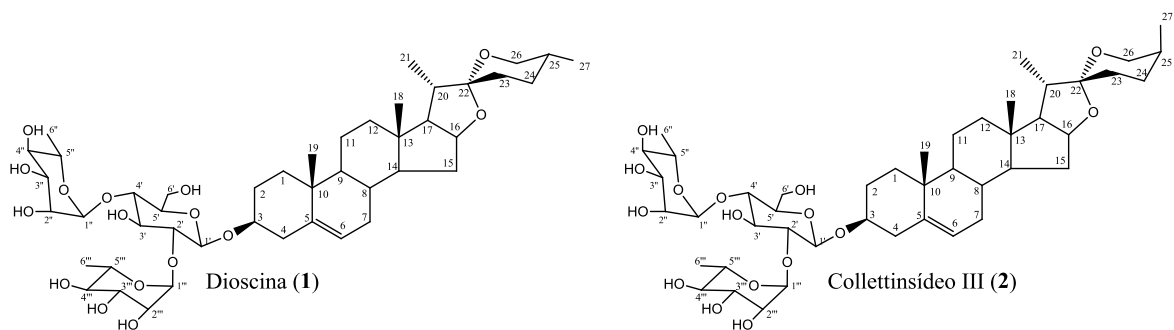
Espectro 6. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.

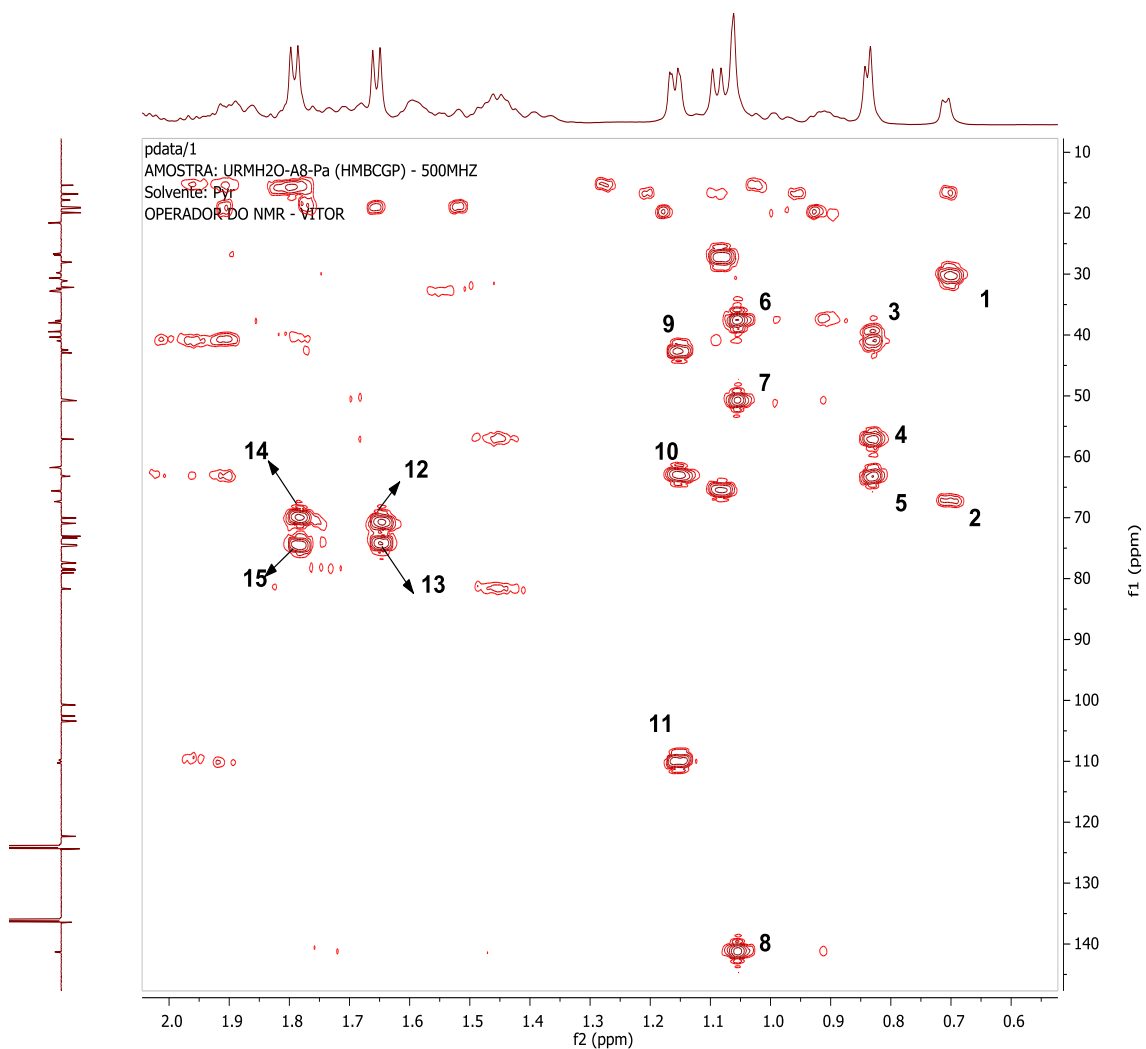


Espectro 7. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.



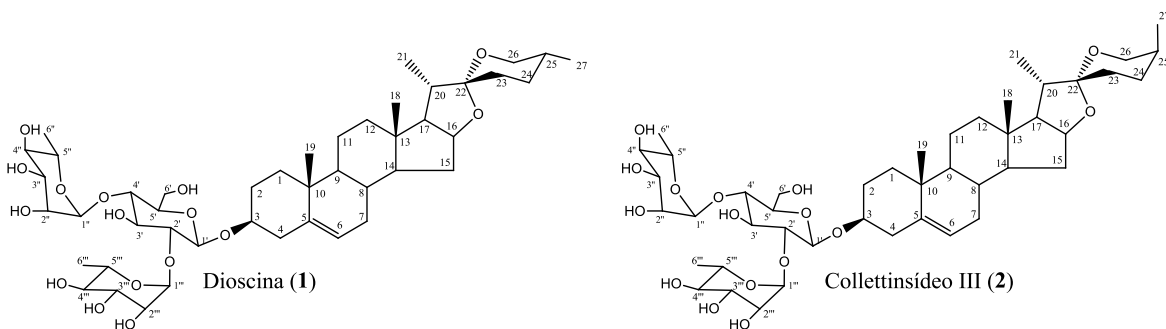
Espectro 8. Expansão do mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.

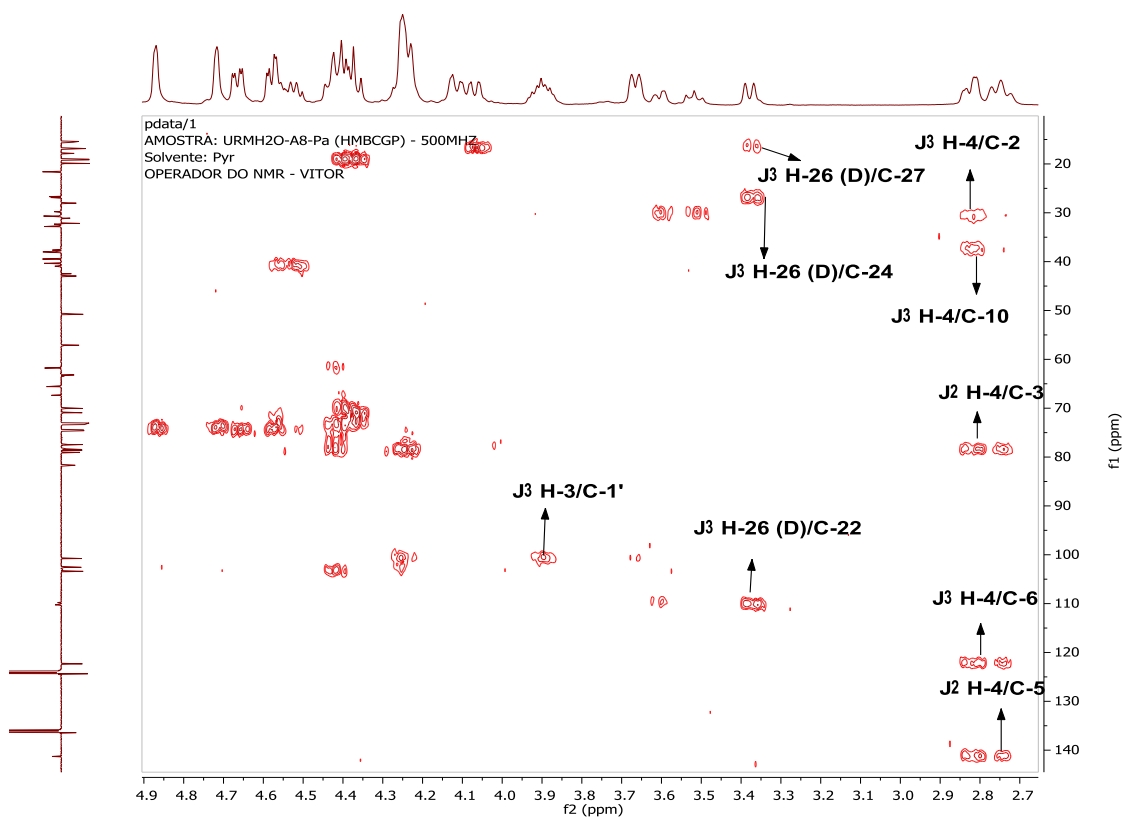




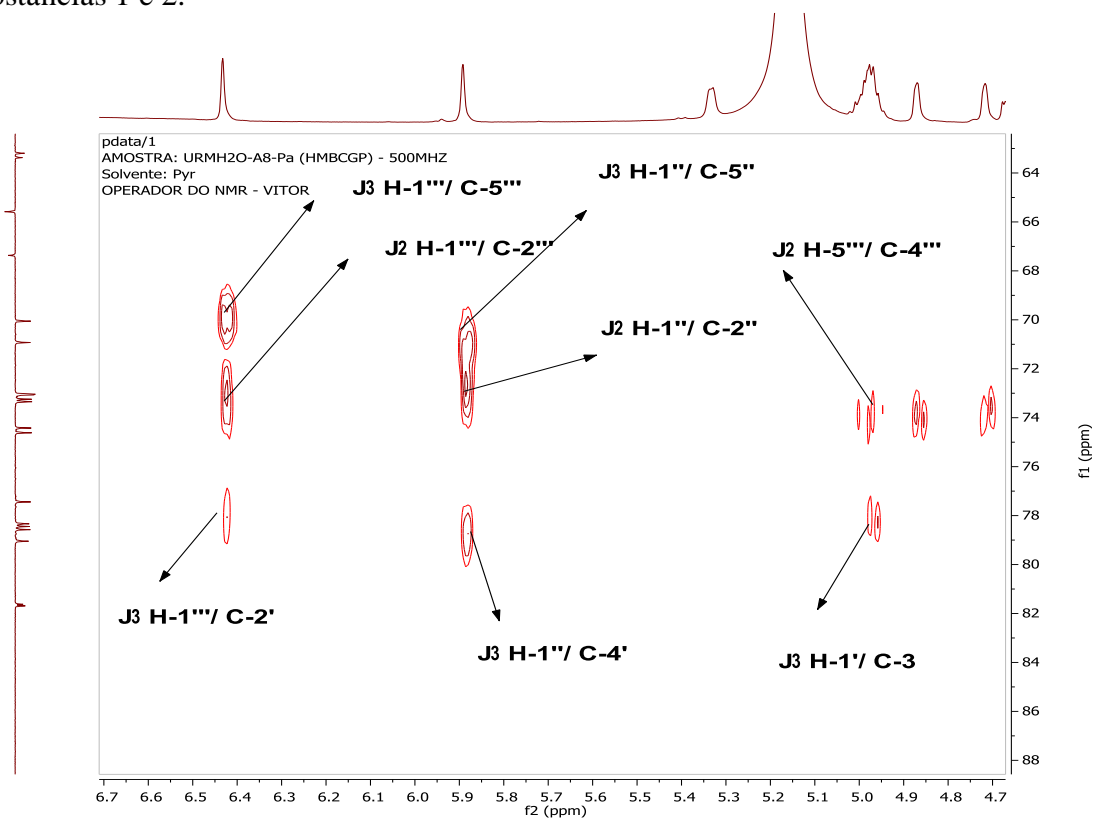
1: J^2 H-27/C-25 ; 2: J^3 H-27/C-26; 3: J^2 H-18 (D)/C-12; 4: J^3 H-18(D)/ C-14; 5: J^2 : H-18(D)/C-17; 6: J^2 H-19/ C10;
 7: J^3 H-19/C-9; 8: J^3 H-19/C-5 ; 9: J^2 H-21 (C)/C-20; 10: J^3 H-21 (C)/C-17; 11: J^2 H-21 (C)/C-22; 12: J^2 H-6'''/C-5'''; 13: J^3 H-6'''/C-4'''; 14: J^2 H-6''/C-5''; 15: J^3 H-6''/C-4''.

Espectro 9. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, Piridina-*d*₅) das substâncias 1 e 2.

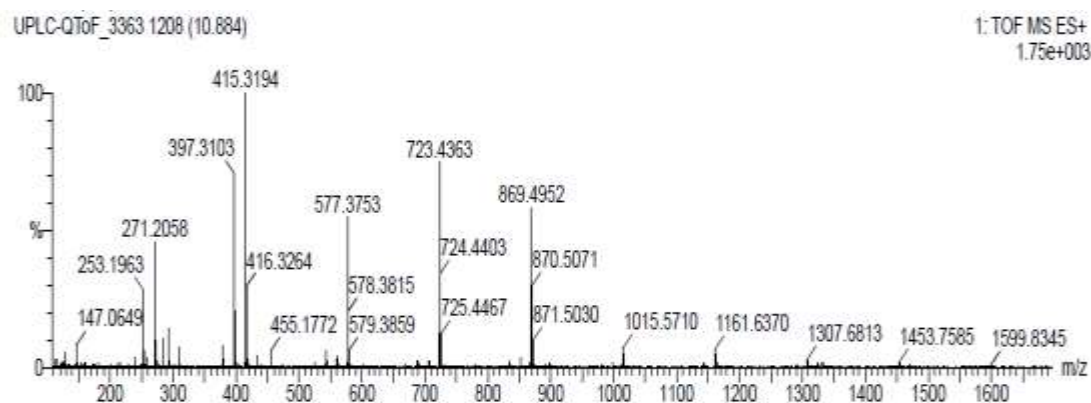




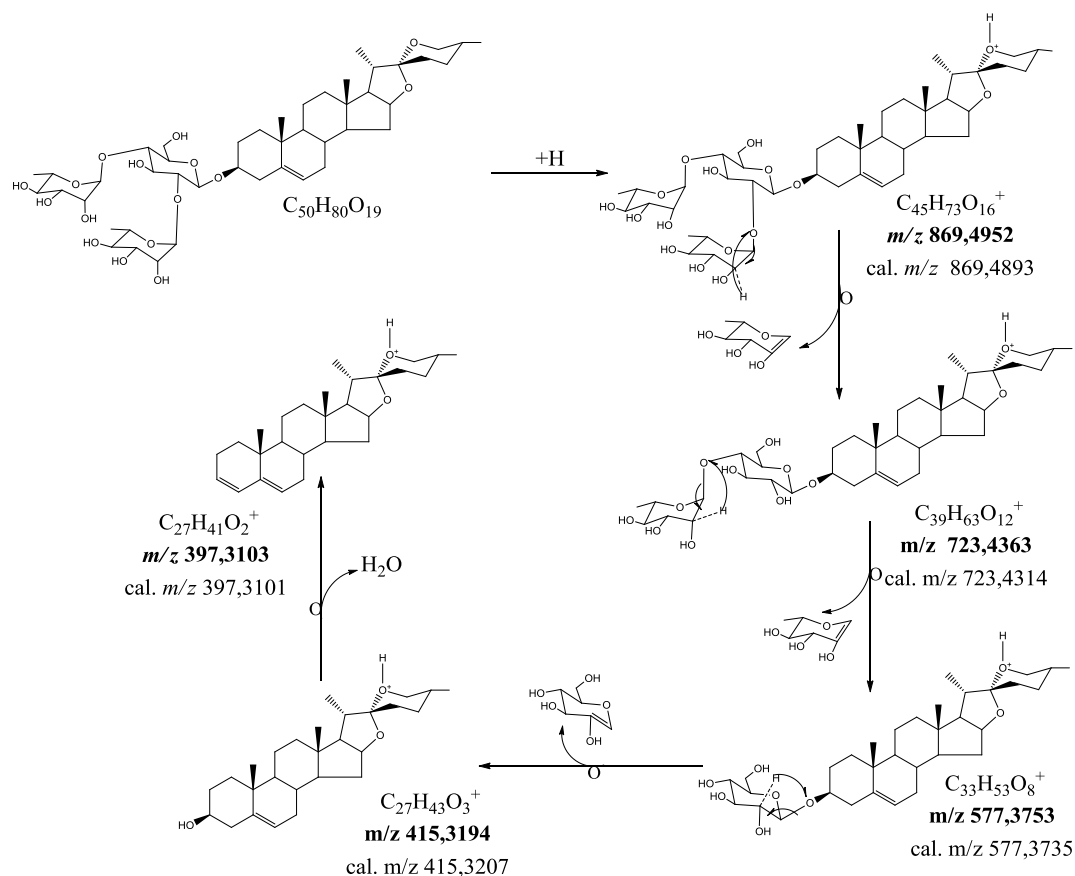
Espectro 10. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.



Espectro 11. Expansão do mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 1 e 2.



Espectro 12. EM-IES, modo positivo, $[M+H]^+$ da substância 1 e 2.



Esquema 1. Proposta de fragmentação de massas das substâncias 1 e 2.

3.5.1.2. Identificação das substâncias 3 e 4

O grupo de frações 53-55 (0,9128 g), apresentou um precipitado de coloração branca insolúvel em diclorometano que, então, foi submetido a análise de RMN 1H e ^{13}C , em piridina. A interpretação dos dados levou a identificação das saponinas esteroidal dioscina (1) previamente identificada em *Urochloa humidicola* (OLIVEIRA et al., 2017), e collettinsídeo III (2). A parte solúvel foi purificada, conforme descrito no item 3.4.8.1.2. (Página 19), a fração

24 foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C , sendo possível identificar a mistura de esteroides glicosilados, 3-*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol (**3**) e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-estigmasterol (**4**), os dados obtidos foram comparados com a literatura (BILIA et al., 1996 e PRACHAYASITTIKUL et al., 2009).

A fração foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN ^1H (**Espectro 13, Página 38**) observou-se a presença de singletos em δ_{H} 0,66 a 0,99 provenientes dos grupos metilas, sinais dos hidrogênios de açúcar δ_{H} 5,09 (*m*, H-1'), identificado através da análise do experimento de HSQC (espectro 16); δ_{H} 4,32 (*m*, H-3' e H-4'); δ_{H} 4,58 (*m*, H-5') e δ_{H} 4,45 e 5,36 referentes aos hidrogênios diastereotópicos do C-6'. Na expansão do espectro de RMN ^{13}C (espectro 15), em campo baixo, verificou-se a presença dos sinais δ_{C} 139,39 para C-22 (**4**) e 130,00 para C-23 (**4**), 141,45 para C-5 e 122,48 para C-6; em δ_{C} 103,11 sinal de C-1', carbono anomérico. Ainda no espectro 15, temos os valores δ_{C} 79,15 e 79,05 que correspondem aos carbonos oxigenados C-3, δ_{C} 78,5 para C-5', 75,89 para C-5', 72,23 para C-4' e 63,36 para C-6'. As demais atribuições dos respectivos carbonos encontram-se no espectro 14. Os valores de deslocamento de carbono encontram-se listados na **Tabela 6**.

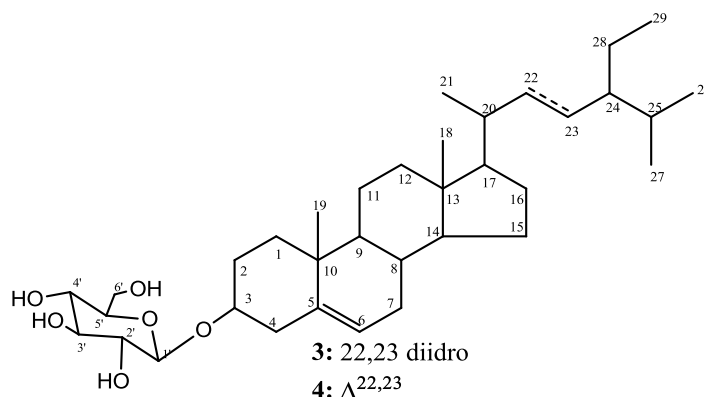
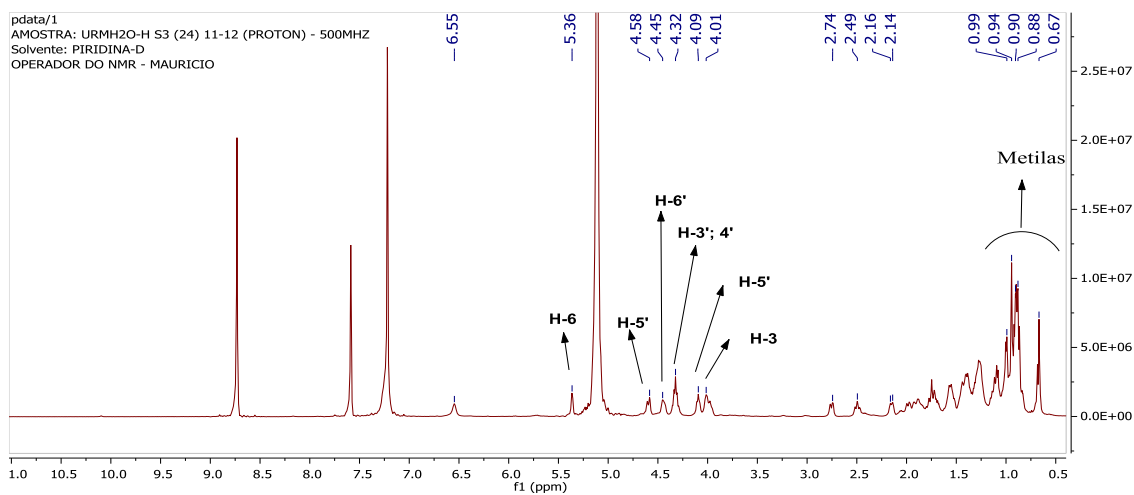


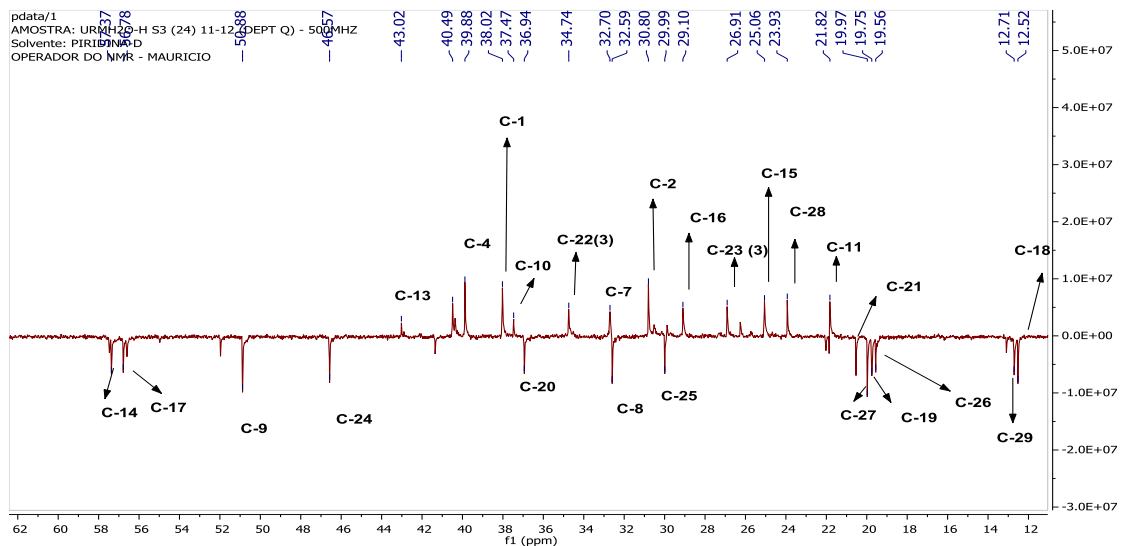
Tabela 6. Dados de RMN ^{13}C das substâncias 3 e 4 e comparação com a literatura para 3-*O*- β -D-glicopiranosil-sitosterol e 3-*O*- β -D-glicopiranosil-estigmasterol (BILIA et al., 1996/ PRACHAYASITTIKUL et al., 2009).

	Substâncias 3 / 4 (pidirina-d ₅)	3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-sitosterol/ 3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosil-estigmasterol
	δ_{C}	δ_{C}
1	38,02	37,6
2	30,80	30,3
3	79,15	79,7
4	39,88	39,4
5	141,06	141,0
6	122,08	123,8
7	32,70	32,3
8	30,59	32,1
9	50,88	50,5
10	37,47	37,0

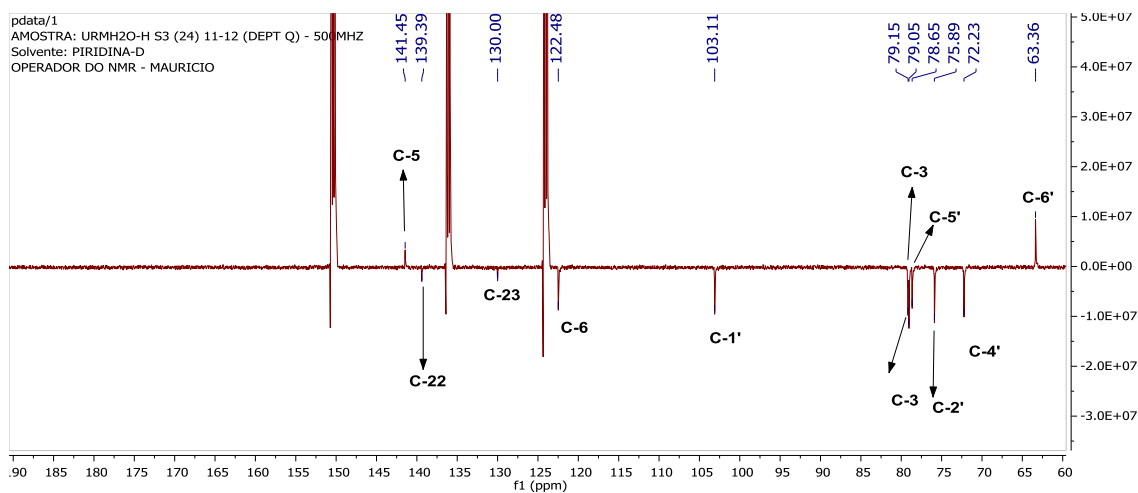
11	21,82	21,4
12	40,05	40,0
13	43,02	42,7
14	57,37	57,0
15	25,06	24,6
16	29,10	28,7
17	56,78	56,4
18	12,52	12,1
19	19,75	19,4
20	36,94	36,5
21	20,53	20,93
22	34,35/ 139,39	34,3/138,11
23	26,91/ 130,00	26,4/ 129,05
24	46,57	46,1
25	29,99	29,5
26	19,56	19,3
27	19,97	20,1
28	23,94	23,4
29	12,71	12,2
glicosídeo		
1'	103,11	102,0
2'	75,89	75,2
3'	79,05	78,1
4'	72,23	71,8
5'	78,65	77,9
6	63,36	63,7



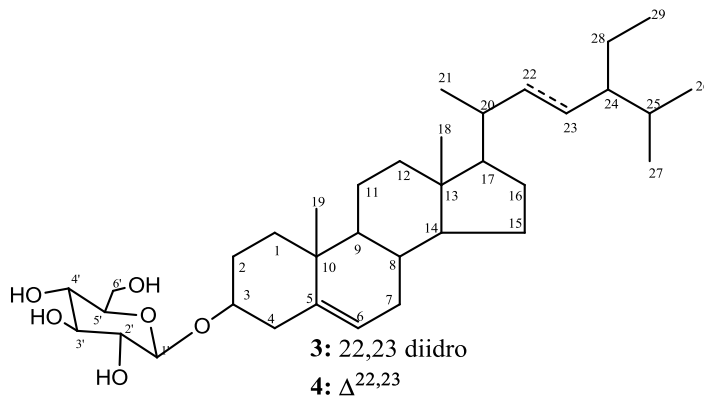
Espectro 13. RMN ^1H (500 MHz; Piridina- d_5) das substâncias 3 e 4.

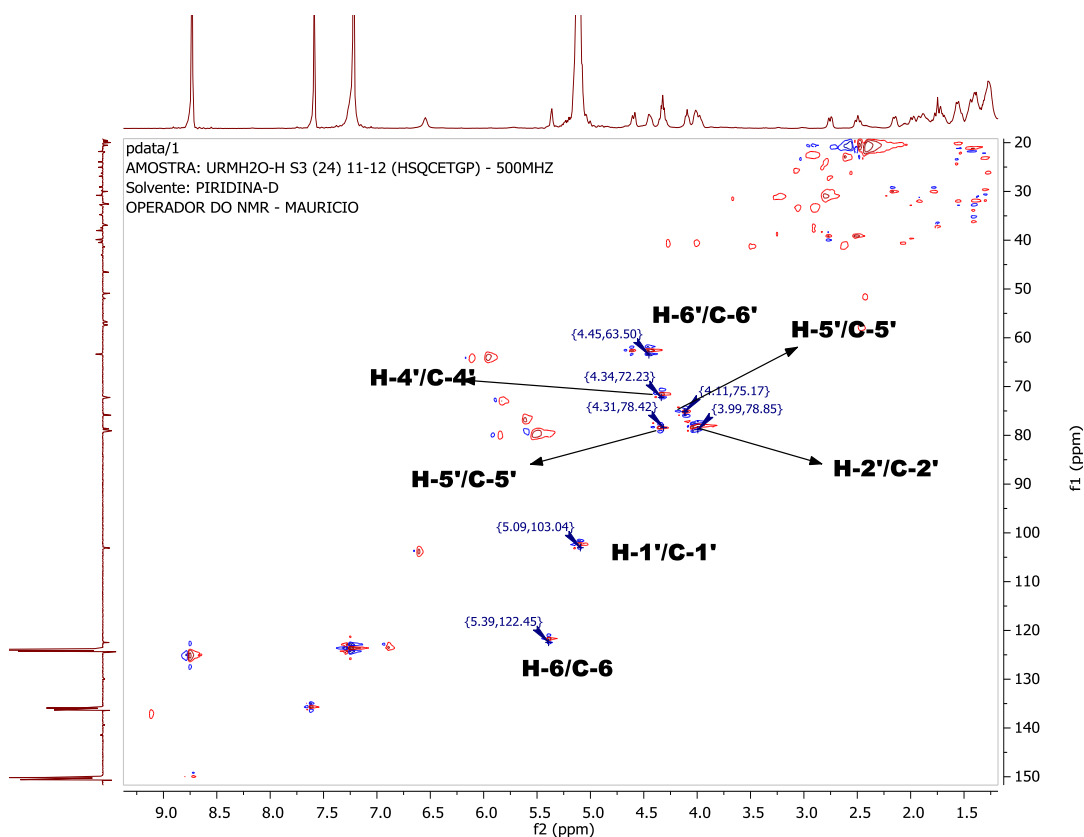


Espectro 14. Expansão do RMN ^{13}C - DEPTQ (125 MHz; Piridina- d_5) das substâncias 3 e 4.



Espectro 15. Expansão do RMN ^{13}C - DEPTQ (125 MHz, Piridina- d_5) das substâncias 3 e 4.



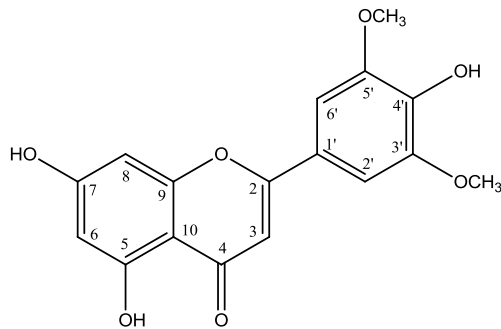


Espectro 16. Experimento HSCQ (500/125 MHz; Piridina- d_5) da mistura de substâncias 3 e 4.

3.5.2. Identificação da substância 5 isolada de URMH₂O-D

A substância **5**, apresentou-se como um cristal em formato de agulhas de coloração amarela, foi identificada pela interpretação de espectro de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN ^1H (espectro 17) observaram-se os sinais na região δ_{H} 8,0 e 6,0 valores característicos de hidrogênio de sistema aromático compatíveis com um flavonóide. Os sinais em δ_{H} 7,40 (*s*, 2H) referentes aos hidrogênios 2' e 6', os sinais revelam a simetria entre os substituintes do anel B pois não houve acoplamento entre os estes hidrogênios, sinais em δ_{H} 6,27 (*d*, 2,2 Hz) e 6,57 ppm (*d*, 2,2 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios 6 e 8, respectivamente, o valor da constante de acoplamento revela o acoplamento meta desses hidrogênios; o singlete δ_{H} 6,75 foi atribuído ao H-3. O singlete em δ_{H} 3,98 (6H) é referente às metoxilas que estão ligadas a C-3' e 5', as interações foram observadas no experimento de HMBC (espectro 20). Esses valores obtidos nos espectros da substância **5** estão apresentados na **Tabela 4** e a comparação com os dados obtidos da tricina (ZIELINSKA et al., 2008).

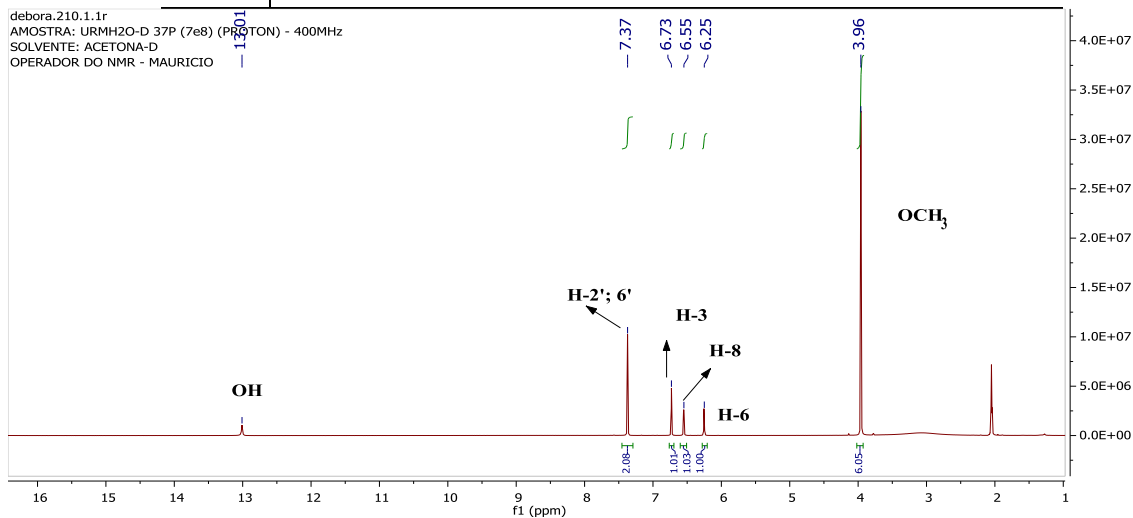
O espectro de massas de alta resolução da substância **5** (espectro 21), feito em modo negativo, apresenta picos em m/z 329,0623 $[\text{M-H}]^-$, 314,0402 $[(\text{M-H})-15]^-$, 299,0185 $[(\text{M-H})-30]^-$, 271,0224 $[(\text{M-H})-30-28]^-$. O pico em m/z 329,0623 $[\text{M-H}]^-$ é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_7$ (cal. 329,0667). As justificativas para os principais picos estão descritas no **Esquema 2**.



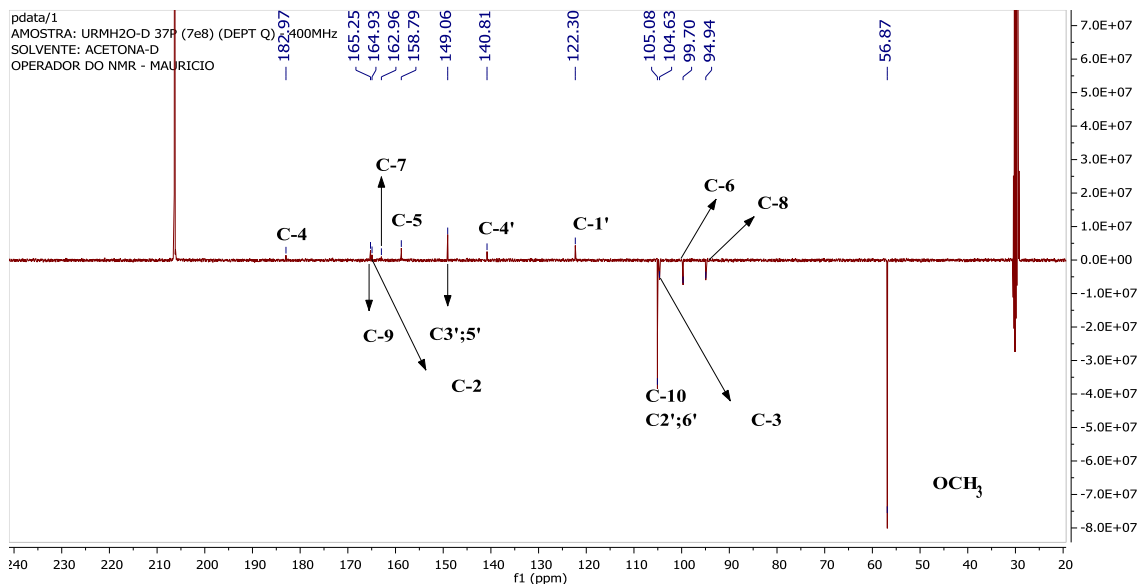
Tricina (5)

Tabela 7. Dados de RMN ^1H e ^{13}C das substâncias **5** em comparação com valores da literatura para a Tricina (ZIELINSKA et al., 2008).

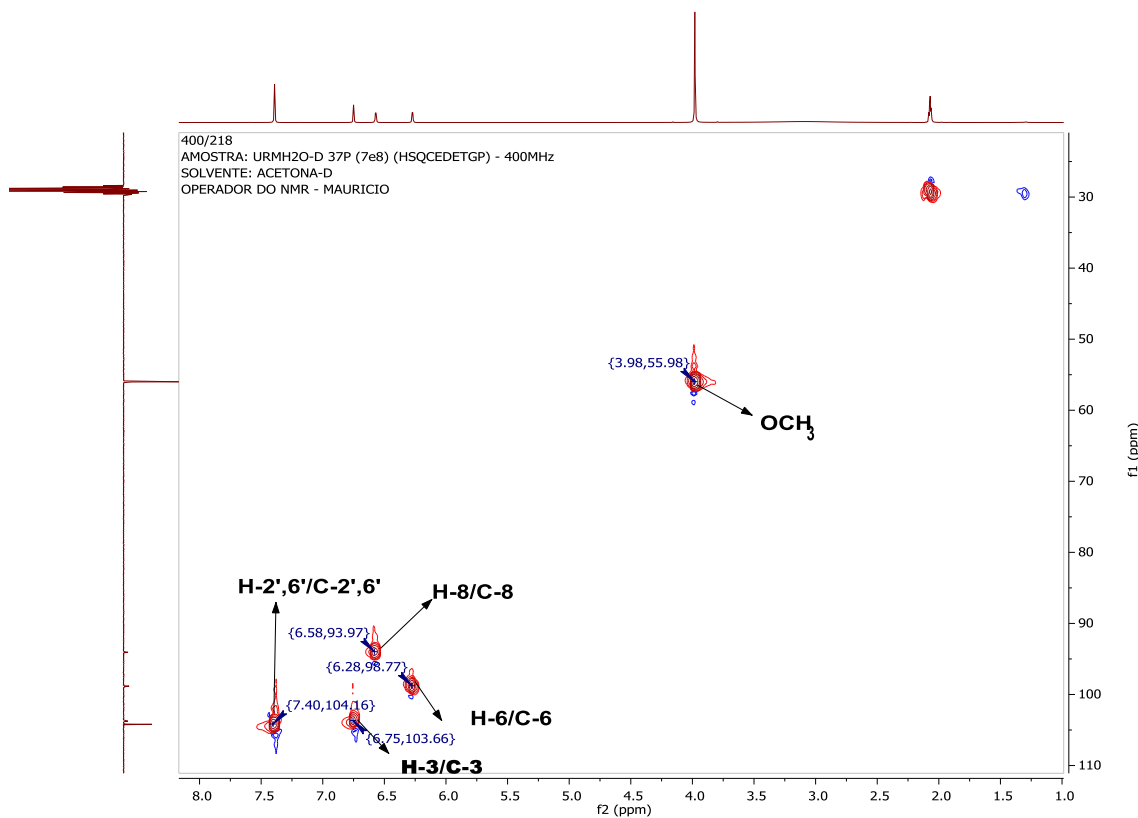
	Substância 5 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$)			Tricina (piridina- d_5)	
	δ_{C}	δ_{H}	J^2	J^3	δ_{C}
2	164,12	-			164,07
3	104,63	6,73(s)	2;4	10; 1'	103,56
4	182,19	-			181,74
5	158,79	-			157,30
6	99,70	6,25(s)		8; 10	98,79
7	162,96	-			163,61
8	94,94	6,55(s)	9	6	94,14
9	165,25	-			161,37
10	105,08	-			103,72
1'	122,30	-			120,41
2'	105,08	7,37(s)	1';3';5'	2; 4';3	104,42
3'	149,06	-			148,18
4'	140,63	-			139,88
5'	149,06	-			148,18
6'	105,08	7,37(s)			104,42
OCH_3	56,87	3,96(s)		3',5'	56,36



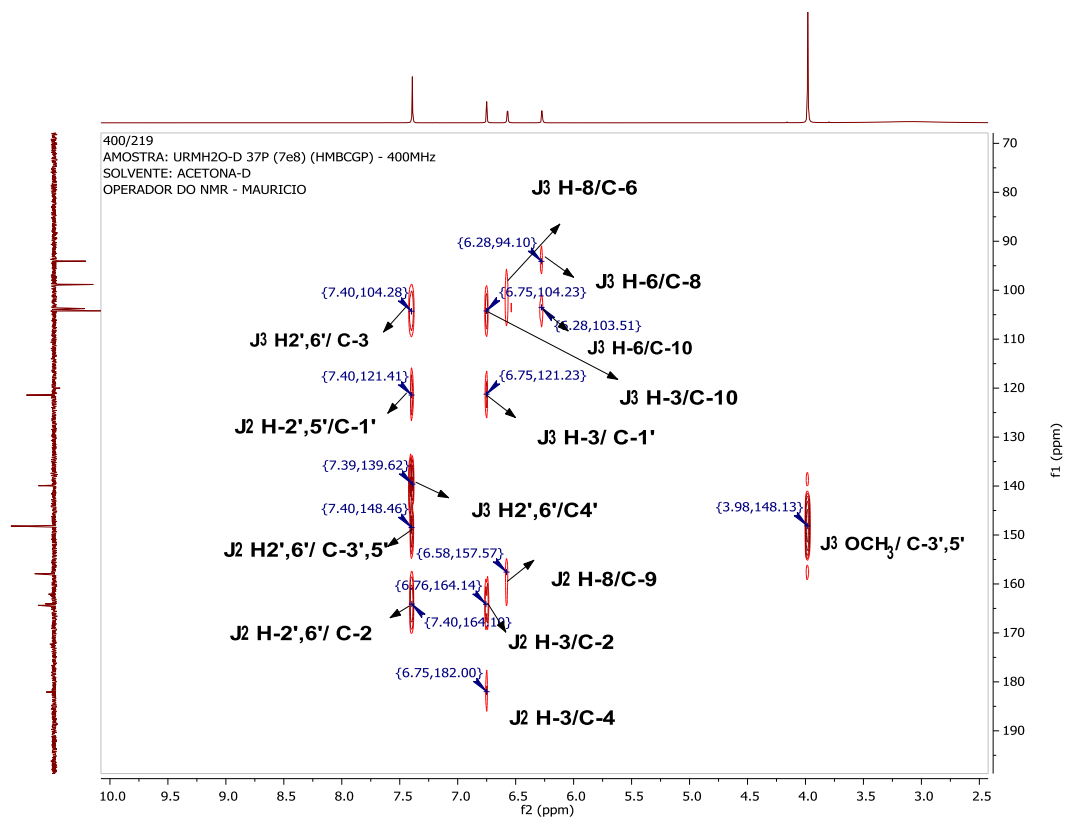
Espectro 17. RMN ^1H ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$; 400 MHz) da substância 5.



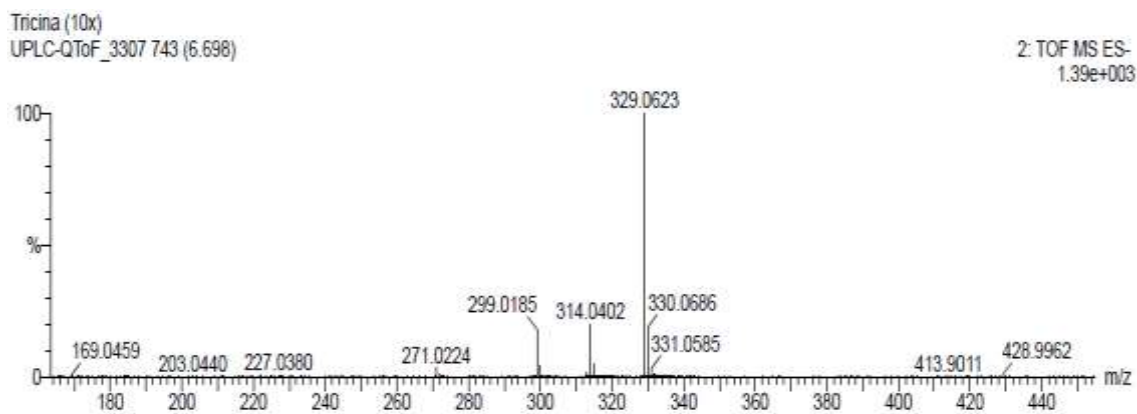
Espectro 18. RMN ¹³C - DEPTQ (C₃D₆O, 100 MHz) da substância 5.



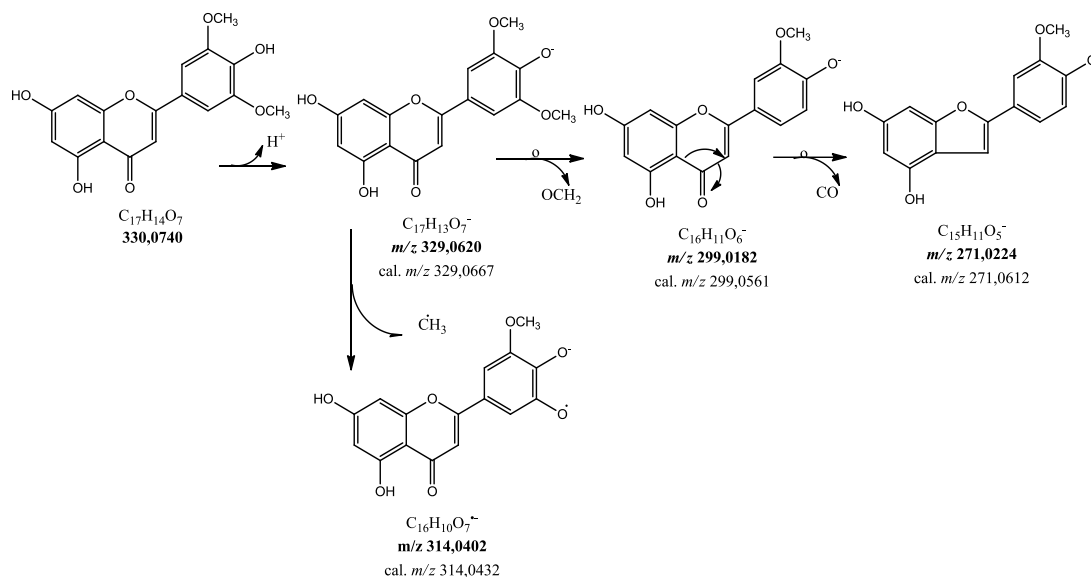
Espectro 19. Mapa de contorno HSQC (400/ 100 MHz) da substância 5.



Espectro 20. Mapa de contorno HMBC (400/ 100 MHz) da substância 5.



Espectro 21. EM-IES $[M-H]^-$ da substância 5, Tricina.

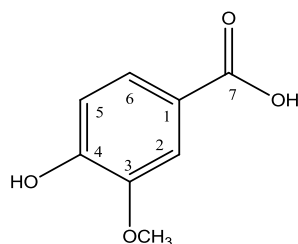


Esquema 2. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^-$ da substância 5.

3.5.3. Identificação das substâncias 6, 7 e 8 identificadas de URMH₂O-A

A identificação das substâncias **6**, **7** e **8** (0,0104), foram identificadas em mistura seu aspecto foi um sólido amorfo de colocação creme, foi realizada por interpretações de espectros de RMN ¹H (**Espectro 22 e 23, Páginas 46 e 47**) e ¹³C (**Espectro 24, Página 47**), experimentos bidimensionais COSY (**Espectro 25, página 48**), HSQC (**Espectro 26, Página 49**) e HMBC (**Espectros 27 e 28, Páginas 49 e 50**). Os dupletos de 16 Hz, δ_H 7,61 e 6,28 correspondem a ligação dupla em *trans*, hidrogênios 7 e 8, respectivamente, da substância **7**. Os dupletos com 8.5 Hz, δ_H 7,43 e 6,79 foram atribuídos aos hidrogênios 2;6 e 3;5 da substância **7**, enquanto os dupletos δ_H 7,88 e δ_H 6,84 correspondem aos hidrogênios 2;6 e 3;5 da substância **8**, as interações homonucleares entre esses hidrogênios são observadas no experimento ¹Hx¹H-COSY. A identificação da substância **6** foi feita com identificação do sinal δ_H 7,56 referente ao hidrogênio 2, além dos dois dupletos de 8,5 Hz, δ_H 6,82 e 7,56, referentes aos hidrogênios 5 e 6. O espectro de HSQC revela as interações a uma ligação entre carbonos e seus respectivos hidrogênios, fator que contribuiu a adequada atribuição dos valores de deslocamento dos carbonos de cada substância. A diferença na intensidade dos sinais permite sugerir a mistura das mesmas.

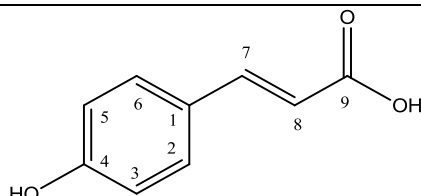
O padrão de substituição AA'BB' é observado nas substâncias **7** e **8**, a constante de acoplamento entre os sinais é a mesma (8,5Hz), com isso, além do espectro 1D, foi necessária para a correta atribuição de cada duplete a análise do experimento COSY que demonstra a interação entre hidrogênios vizinhos (**Espectro 25, Página 48**). As correlações a longa distância podem ser observadas nos experimentos de HMBC (**Espectro 27 e 28, Páginas 49 e 50**), os dados coletados estão listados nas próximas três tabelas. O resultado das análises de RMN ¹H e ¹³C puderam confirmar, nessa fração, a existência do ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico (**6**), do ácido *trans*-4-hidroxicinâmico (**7**), ácido *p*-hidroxi-benzóico (**8**), além da comparação com os valores da literatura propostos por Wang (2011) (**7**) e Pouchert & Behnke (1993) (**6 e 8**).



Ácido 3-hidroxi-4-metoxi-benzóico (**6**)

Tabela 8. Dados de RMN da substância **6** e comparação com os dados do ácido -3-hidroxi-4-metoxi-benzóico (POUCHERT & BEHNKE, 1993)

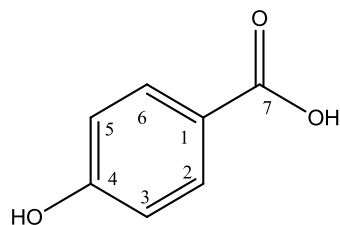
Substância 6 (MeOD)				Ácido 3-hidroxi-4- metoxi-benzóico (DMSO-d ₆)	
	δ_C	δ_H	J^2	J^3	δ_C
1		-			121,74
2	113,76	7,56 (s)			112,62
3	148,6	-			147,02
4	152,52	-			150,95
5	113,76	6,82 (d; 8,5 Hz)			114,84
6	125,21	7,56 (d; 8.5 Hz)		2	123,56
7	166,03	-			167,46
OCH ₃	56,36	3,83 (s)		3	55,55



Ácido trans-4-hidroxicinâmico (**7**)

Tabela 9. Dados de RMN ¹H e ¹³C da substância **7** e comparação com os dados de ácido trans-4-hidroxi-cinâmico (WANG et al., 2001).

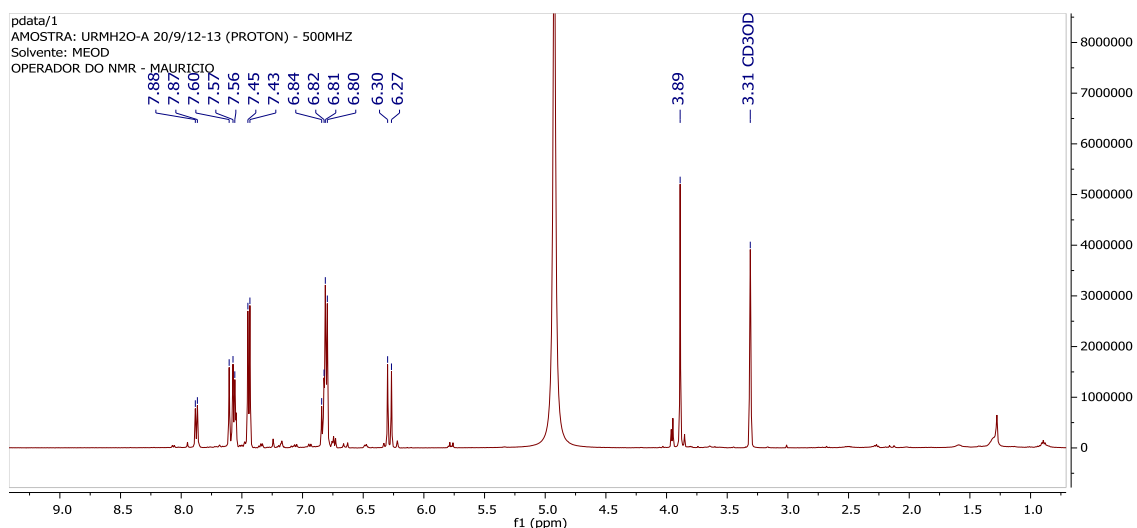
Substância 7 (MeOD)				Ácido trans-4-hidroxi- cinâmico (DMSO-d ₆)	
	δ_C	δ_H	J^2	J^3	δ_C
1	127,28	-			125,18
2	131,03	7,43 (d; 8,5 Hz)	1	4; 7	129,96
3	116,78	6,79 (d; 8,5 Hz)	4	1	115,66
4	161,09	-			159,47
5	116,78	6,79 (d; 8,5 Hz)			115,66
6	131,03	7,43 (d; 8,5 Hz)			129,96
7	146,40	7.61 (d; 16 Hz)		9; 2 e 6	144,07
8	115,99	6,28 (d; 16 Hz)	9	1	115,24
9	171,50	-			167,86



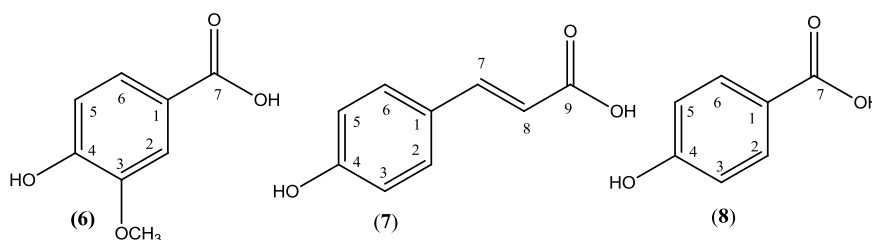
Ácido p-hidroxi-benzóico (8)

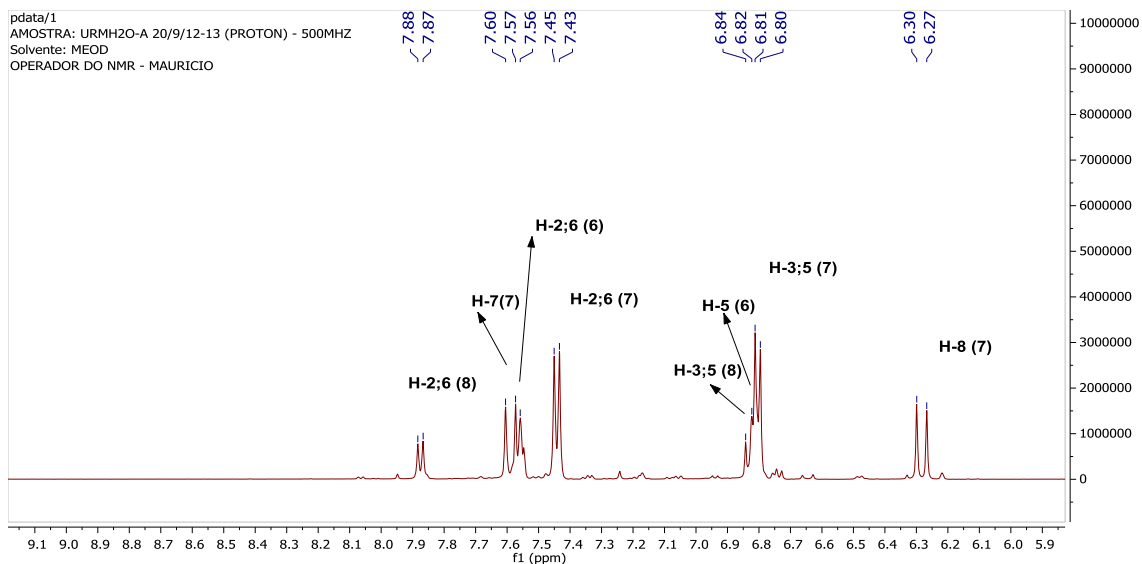
Tabela 10. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 8 e comparação com os dados do ácido p-hidroxi-benzóico (POUCHERT & BEHNKE, 1993).

	Substância 8 (MeOD)		Ácido p-hidroxi- benzóico ($\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$)		
	δ_{C}	δ_{H}	J^2	J^3	δ_{C}
1	121,00	-			121,40
2	132,97	7,88 (d; 8,5 Hz)			131,46
3	115,78	6,84 (d; 8,5 Hz)		1	114,96
4	163,26	-			161,55
5	115,78	6,84 (d; 8,5 Hz)			131,46
6	132,97	7,88 (d; 8,5 Hz)		4	131,46
7	166,03				167,49

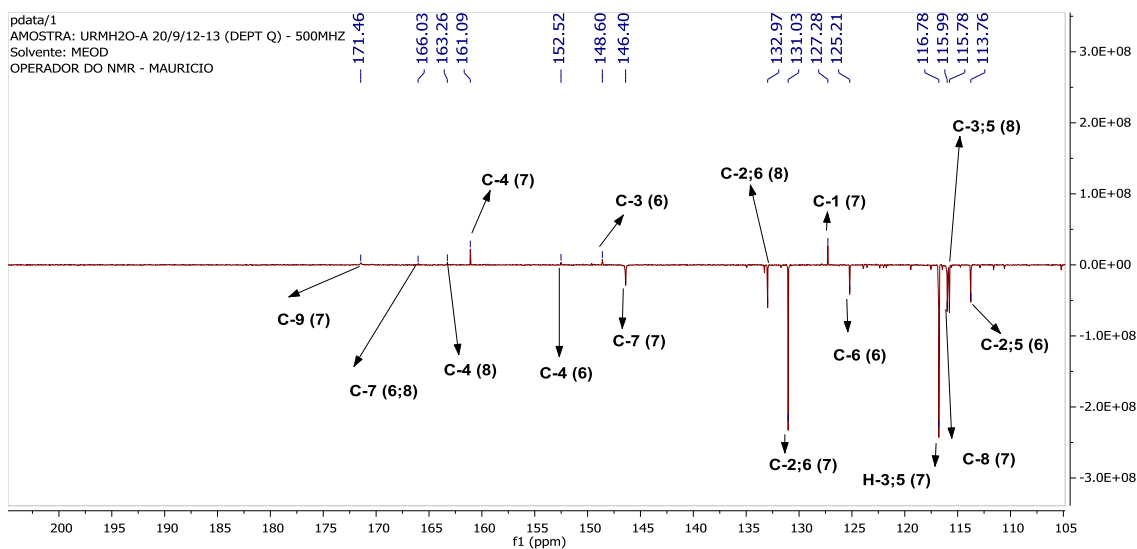


Espectro 22. RMN ^1H (500MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.

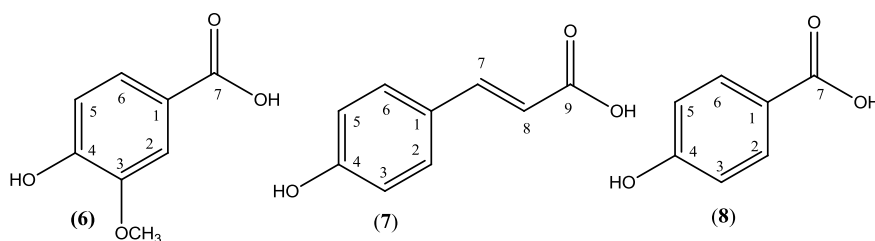


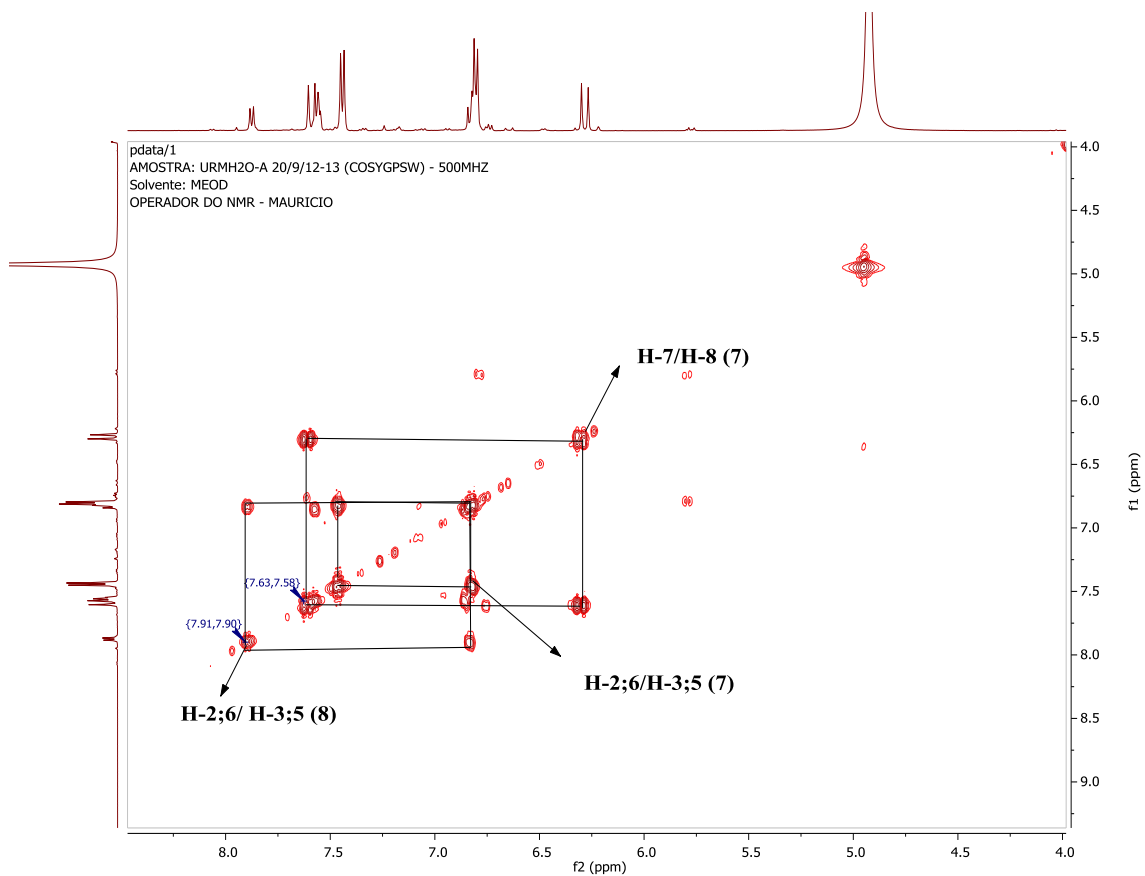


Espectro 23. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.

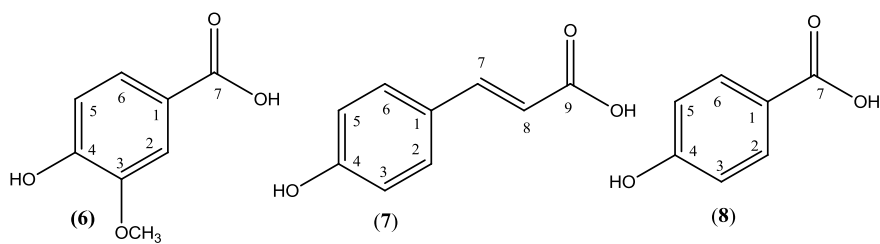


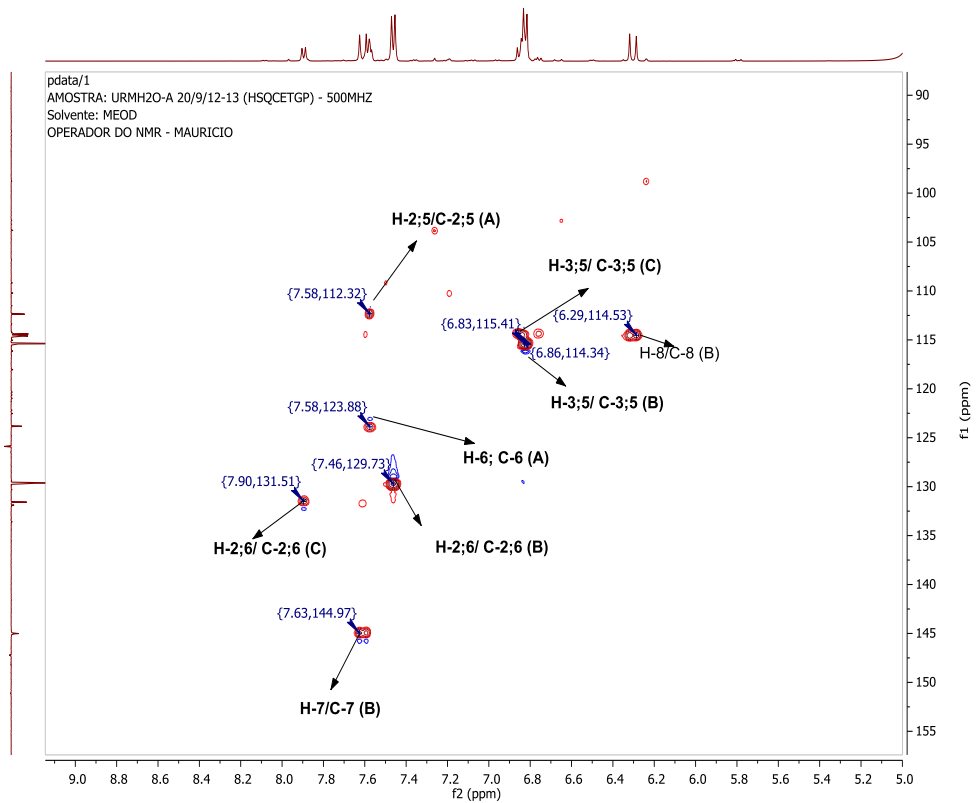
Espectro 24. RMN ^{13}C – DEPTQ (125 MHz; MeOD) da substância 6, 7 e 8.



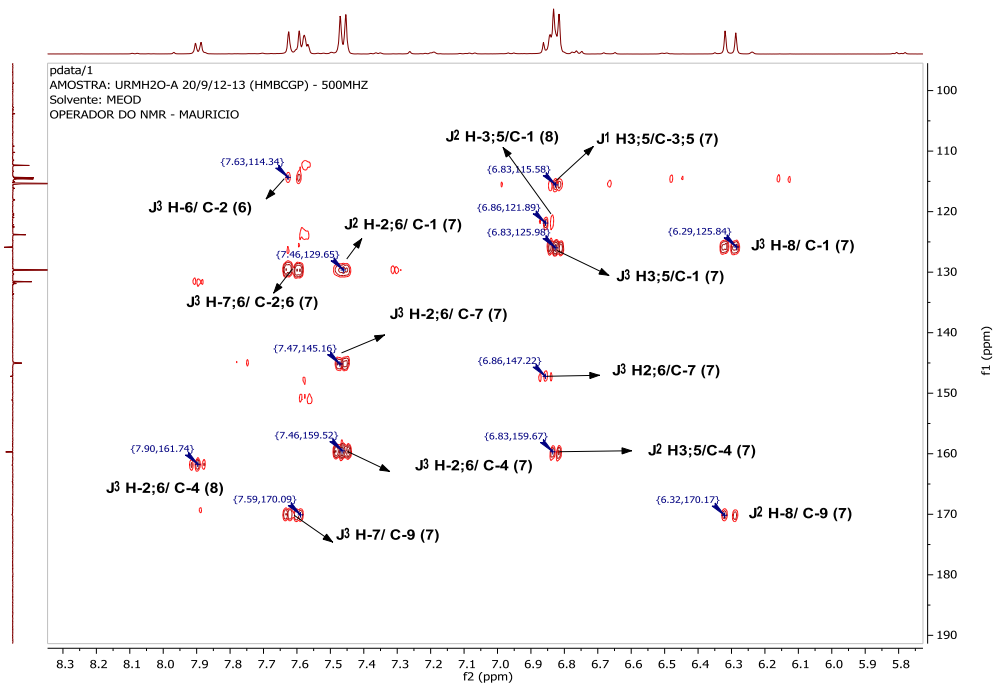


Espectro 25. Mapa de contorno COSY (500/ 500 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.

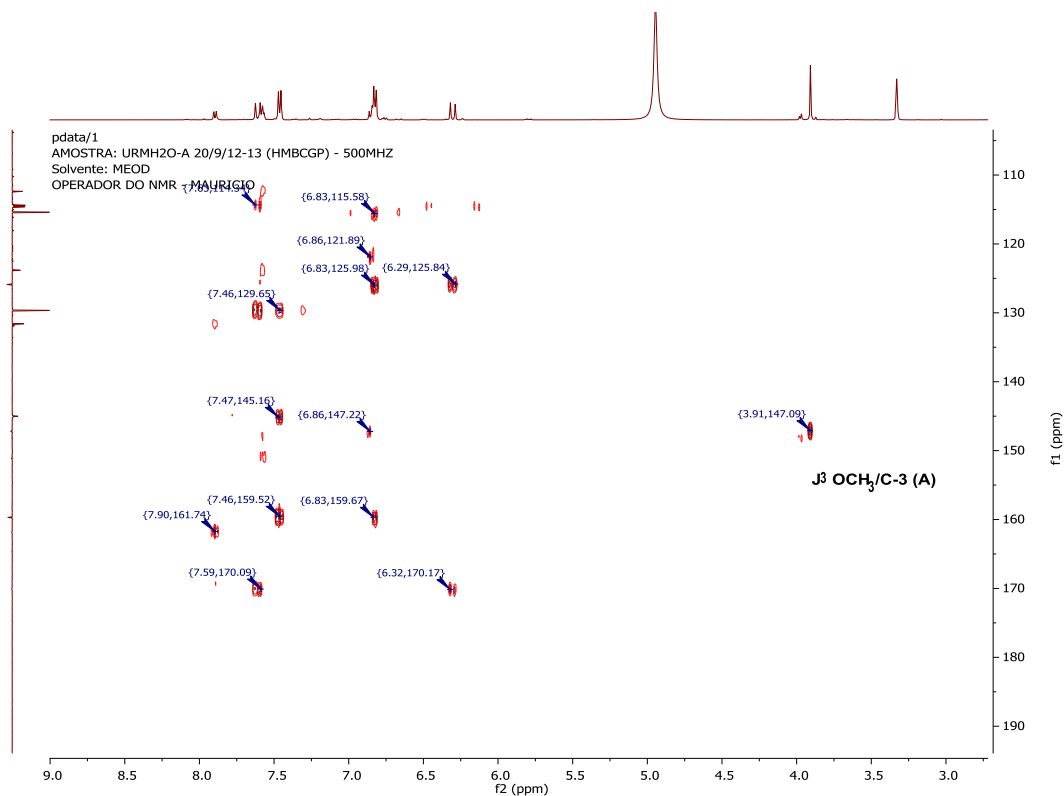




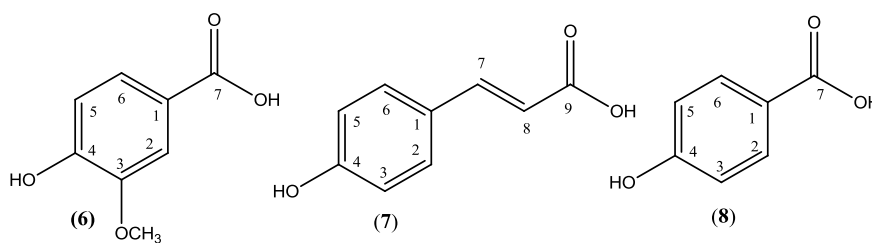
Espectro 26: Mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.



Espectro 27. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.



Espectro 28. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz; MeOD) das substâncias 6, 7 e 8.



3.5.4 Estudo por desreplcação das folhas de *Urochloa humidicola* e *Urochloa ruzizensis* por EM-IES

Os extratos brutos URMH₂O e UHMH₂O (representado no cromatograma pela sigla BHFMH₂O), foram submetidos a análise por CLUE-EM, tanto no modo positivo quanto no negativo. A interpretação das substâncias presentes foi feita, sempre que possível, pela seleção do pico observado nos dois modos. As **Figuras 8 e 9 (Página 51)** correspondem a varredura de íons totais obtidos do extrato URMH₂O no modo positivo e negativo. As **Figuras 10 e 11 (Página 51 e 52)** são os cromatogramas obtidos em cada modo de ionização do extrato UHMH₂O. Observam-se, obviamente, diferenças entre eles, já que cada substância interage de maneira diferente em cada modo e que cada análise contou com uma energia de ionização diferenciada.

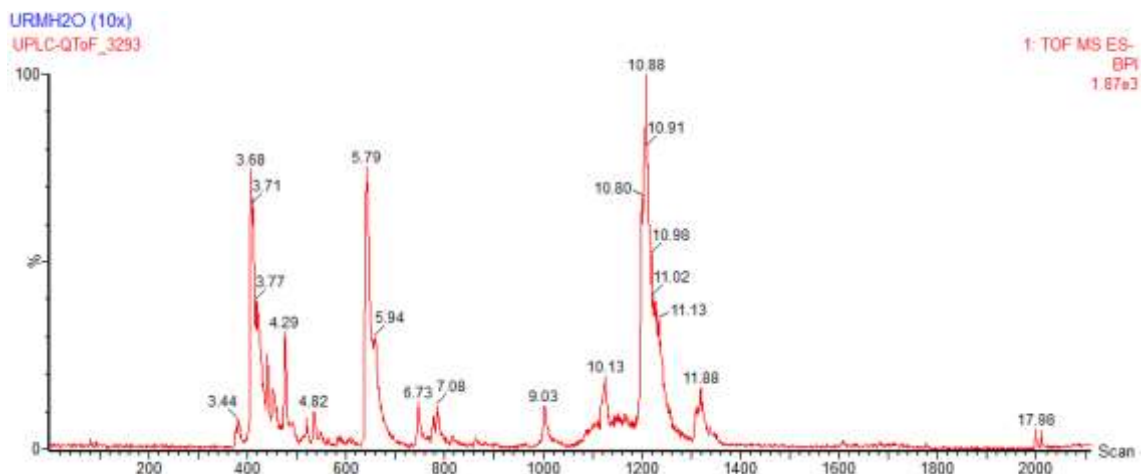


Figura 8. Varredura de íons totais do extrato **URMH₂O** [H₂O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min] modo negativo.

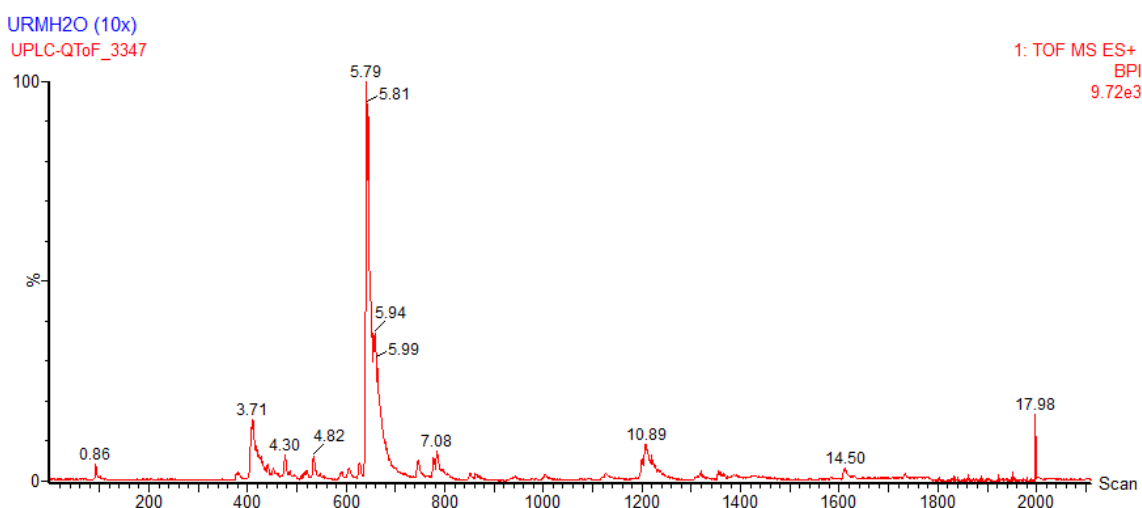


Figura 9. Varredura de íons totais do extrato **URMH₂O** [H₂O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min], modo positivo.

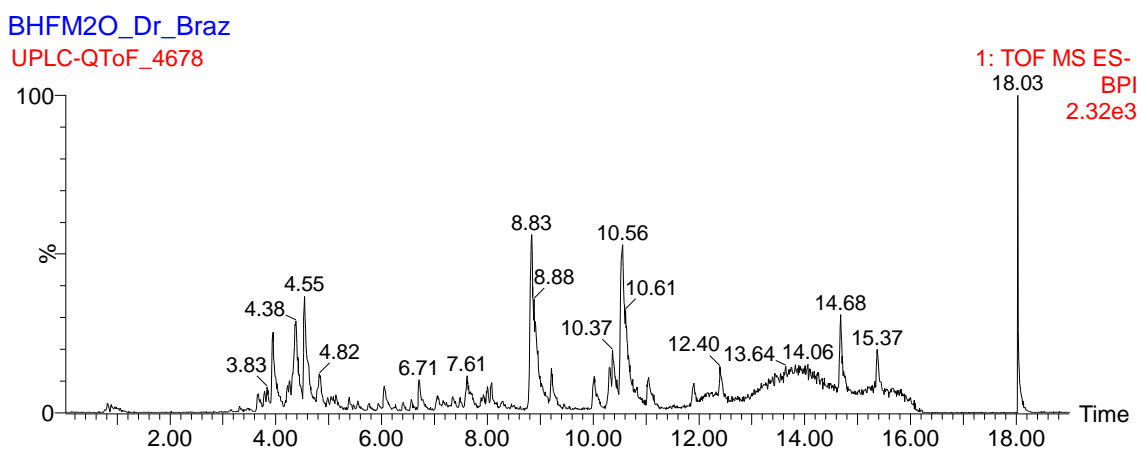


Figura 10. Cromatograma de CLUE-EM do extrato **UHMH₂O** [H₂O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min], modo negativo.

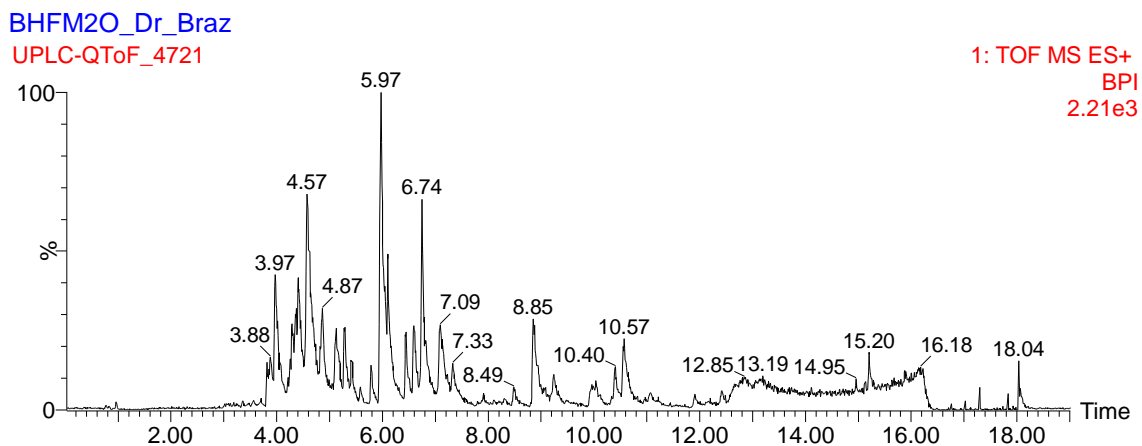


Figura 11. Cromatograma de CLUE-EM do extrato **UHMH₂O** [H₂O + 1% AF (A), ACN + 1% AF (B), 2-95% de A em 18 min], modo positivo.

Os resultados apresentados para as substâncias presentes no extrato URMH₂O foram obtidos a partir da interpretação dos espectros de massas em modo negativo, este modo foi selecionado pois as substâncias produziram fragmentos melhor justificáveis. Enquanto as substâncias presentes no extrato UHMH₂O foram justificadas a partir dos espectros de massas obtidos via modo positivo, os fragmentos obtidos nos conduziram a melhor identificação das substâncias.

Nas **Tabelas 11 e 12 (Páginas 52 e 53)** são apresentadas as substâncias identificadas, sua massa de alta resolução detectada, a calculada, fórmula molecular, os fragmentos de maior relevância para a identificação da molécula, nome, e a referência onde comparamos os fragmentos das moléculas já conhecidas na literatura.

Justificando os dados apresentados nas tabelas de identificação, os espectros de massas (espectros pertencentes a URMH₂O; espectros pertencentes a UHMH₂O) e a proposta de fragmentação para cada substância identificada, ordenadas de acordo com seu tempo de retenção, estão apresentados após a tabela nos itens **3.5.4.1.** e **3.5.4.2.**

Tabela 11. Substâncias identificadas via desreplicação do extrato hidrometanólico de *Urochloa ruziziensis*.

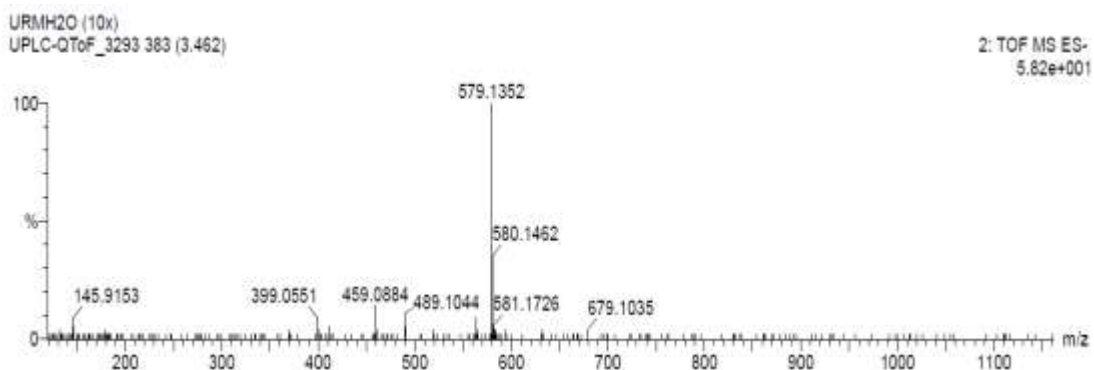
Nº	t _R	m/z Observado	m/z Calculado	Íons Diagnósticos (%)	Fórmula Molecular	Substância	Referência
9	3,45	579,1333 [M-H] ⁻	579,1355	579.1393 (100); 489.1146 (11); 459.0981 (15); 399.0822 (8)	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	Carlinosideo	Perez et al., 2016
10	3,67	563,1352 [M-H] ⁻	563,1406	563,1385 (100); 473,0986 (10); 443,1038 (10); 353,0704 (5)	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Schaftosideo	Perez et al., 2016
11	3,71	563,1352 [M-H] ⁻	563,1406	563,1352(100); 473.1109 (10); 443.1099 (10); 353.0689 (10)	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	Isoschaftosideo	Colombo et al., 2008
12	4,70	637,1790 [M-H] ⁻	637,1774	637,1790 (100); 607,1752 (40); 577,1614 (18); 503,1469 (4); 329,0710 (12); 299,0588 (6)	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	Ombuina 3- <i>O</i> -rutinosideo	Perez et al., 2016
13	5,79	1093,5508 [M+HCOOH – H] ⁻	1093,5431	1093,5508 (15); 1047,5400 (100); 901,4771 (2,5)	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	Protodioscina	Perez et al., 2016
14	6,73	329,0682 [M-H] ⁻	329,0637	329,0624 (100); 314,0375 (52); 299,0172 (68); 271,0135 (14)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Ombuina/ Tricina	
15	9,03	929,4756 [M+HCOOH – H] ⁻	929,4752	929,4756 (22); 883,4715 (100); 737,4147 (7,5); 591,2686 (2,4);	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	Penogenina-3- <i>O</i> - β-D-glicopiranosil-[(2-1)- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosil-(4-1)- <i>O</i> -α-L-ramnopiranosil	Oliveira et al., 2017.
16	10,88	913,4753 [M+HCOOH – H] ⁻	913,4802	913,4776 (30); 867,4618 (100); 721,4085 (5); 575,1081 (2,5)	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	Dioscina	Oliveira et al., 2017.

Tabela 12. Substâncias identificadas via desreplicação do extrato hidrometanólico de *Urochloa humidicola*.

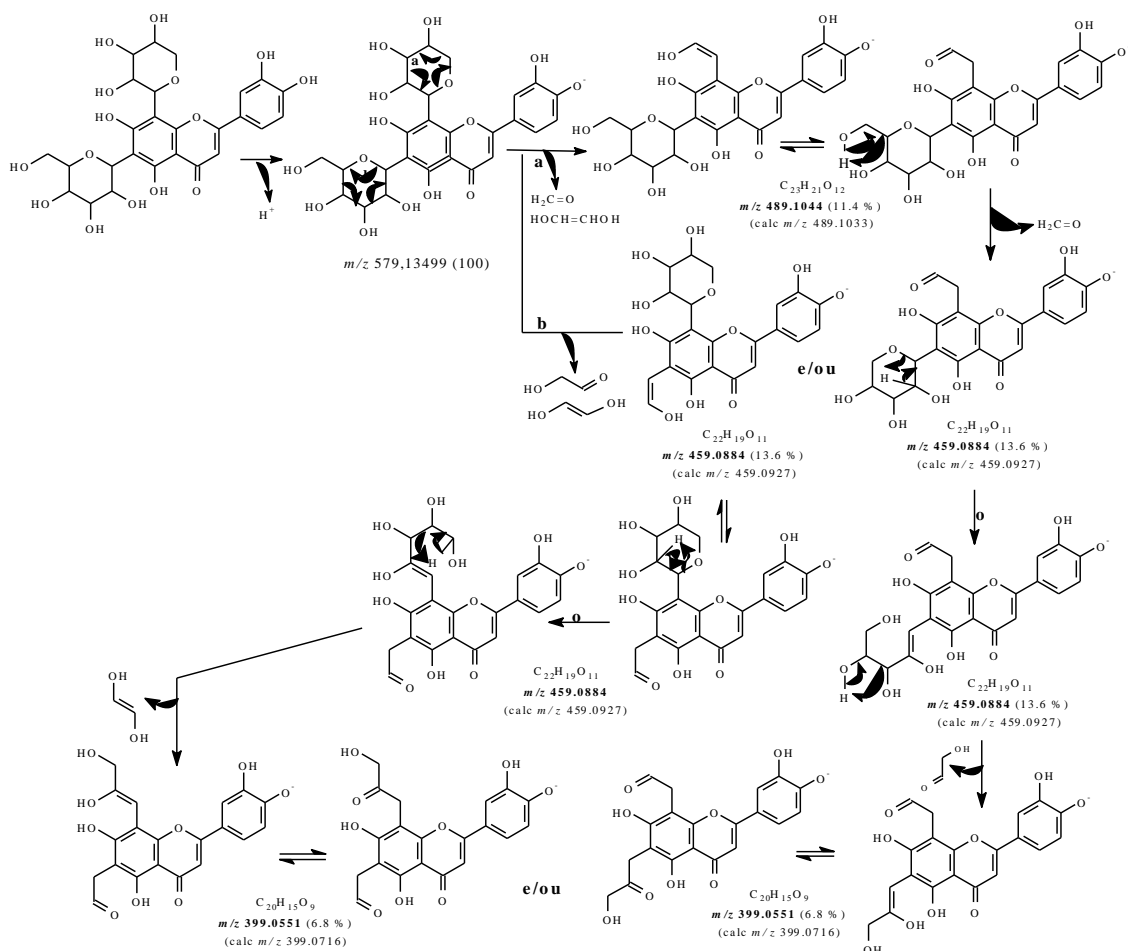
Nº	t _R	m/z Observado	m/z Calculado	Íons Diagnósticos (%)	Fórmula Molecular	Substância	Referência
17	3,97	757,2247	757,2186	757,2247; 611,1616 (6); 465,0973 (6); 303,0464 (100)	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	Tricetina 4'-O-β-D-glicosil- [(2-O-1)-α-ramnosil-(1-O-1)-α-ramnosil]	*
	4,57	579,1714		579,1711 (7); 479,0870 (10); 433,1125 (22); 303,0461 (100); 287,0543 (45)		Tricetina +276*	
18	4,86	625,1799	625,1763	625,1799(7); 479,1095 (7); 317,0646 (100); 303,0502 (31)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	Tricetina-7-metil-eter- 3'-O-β-D-glicosil-5'-O-α-L-raminosideo	Sharaf et al., 1999.
19	5,97	1193,6204	1193,5950	1193,6204 (100); 1031,5718 (7); 885,4999 (25); 739,4366 (15); 577,3762 (25); 415,3221 (7)	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₆	3-O-b-D-glicopiranosil-[(2-O-1)-a-L-ramnopiranosil]- (4-O-1)-b-D-glicopiranosil- (4-O-1)-a-L-ramnopiranosil- (4-O-1)-b-D-glicopiranosil- espirosta-5-eno	Ohtsuki et al., 2006
20	8,86	1047,5490	1047,5371	1047,5490 (7); 1029,5487 (14); 885,4825 (14) 867,4838 (7); 739,4399 (11); 721,4272 (64); 575,3643 (85); 431,3171 (21); 413,3055 (100); 395,2932 (42);	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₂	Solanigrosideo H	Zhou et al., 2006.
21	10,57	1031,5571	1031,5421	1031,5571 (12); 869,5073 (17); 723,4396 (100); 577,3805 (65); 415,3222 (87); 397,3102 (62); 271,2071 (45)	C ₅₁ H ₈₃ O ₂₁ ⁺	Parifillina A	Man et al., 2009.

* Proposta de substância inédita.

3.5.4.1. Espectros de Massas e justificativas para cada substância identificada no extrato URMH₂O



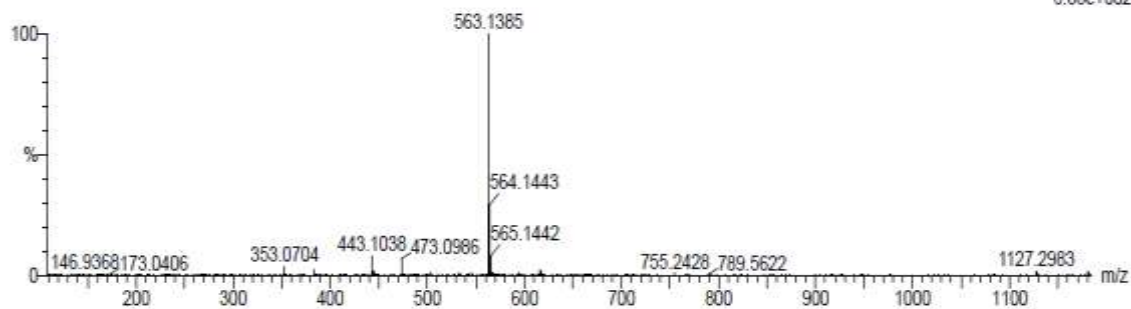
Espectro 29. EM-IES [M-H]⁻ da substância 9.



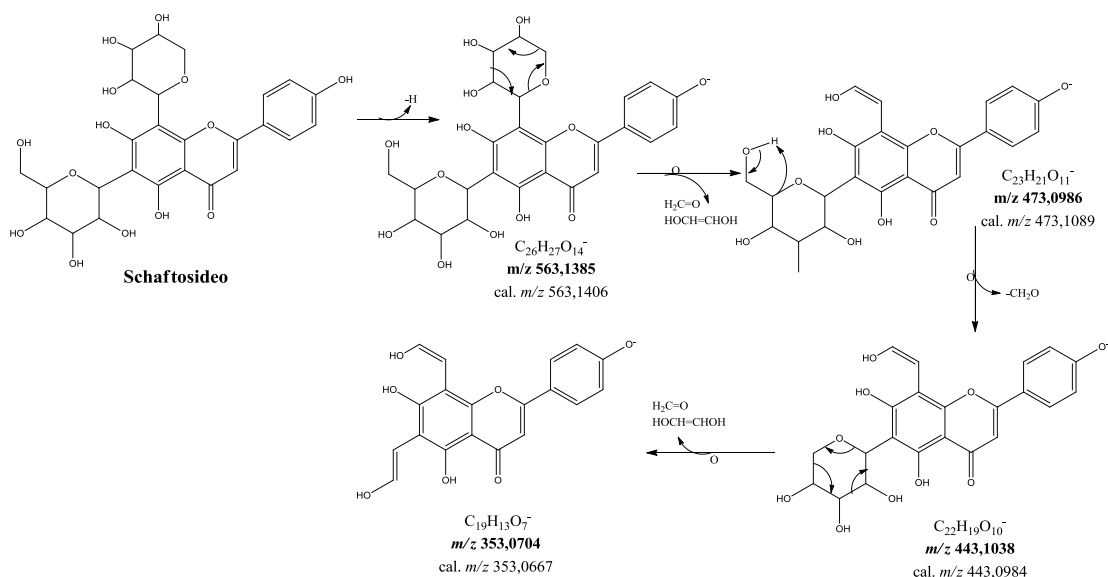
Esquema 3. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, [M-H]⁻ da substância 9 (URMH₂O).

URMH2O (10x)
UPLC-QToF_3293 406 (3.673)

2: TOF MS ES-
6.83e+002



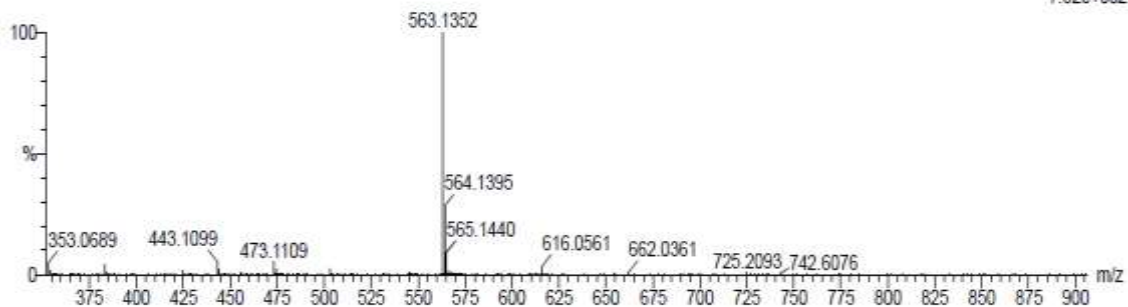
Espectro 30. EM-IES $[M-H]^-$ da substância 10.



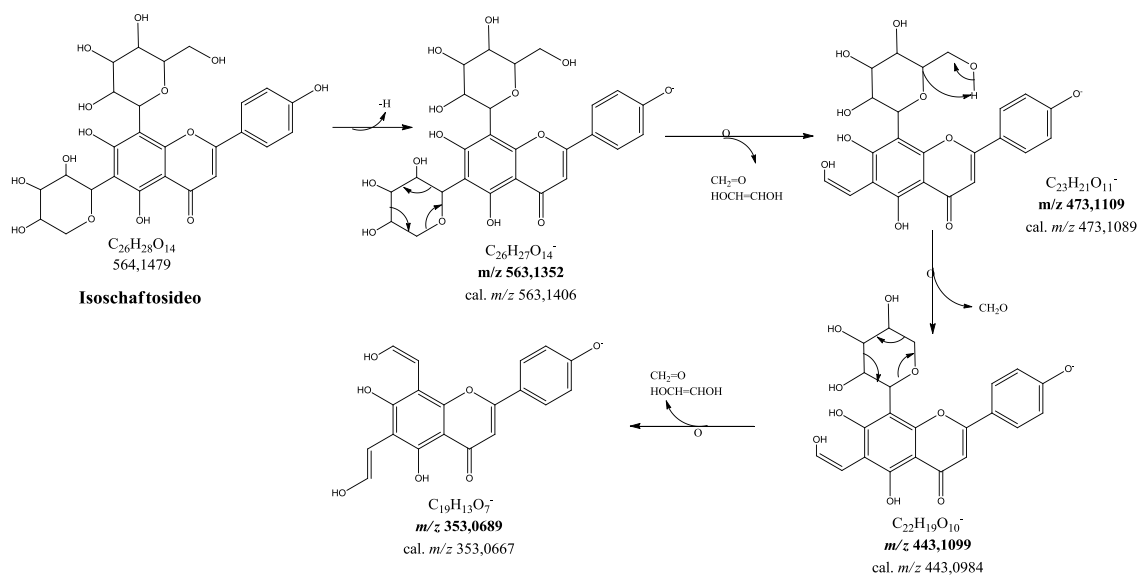
Esquema 4. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^-$ da substância 10 (URMH₂O).

URMH2O (10x)
UPLC-QToF_3293 411 (3.715)

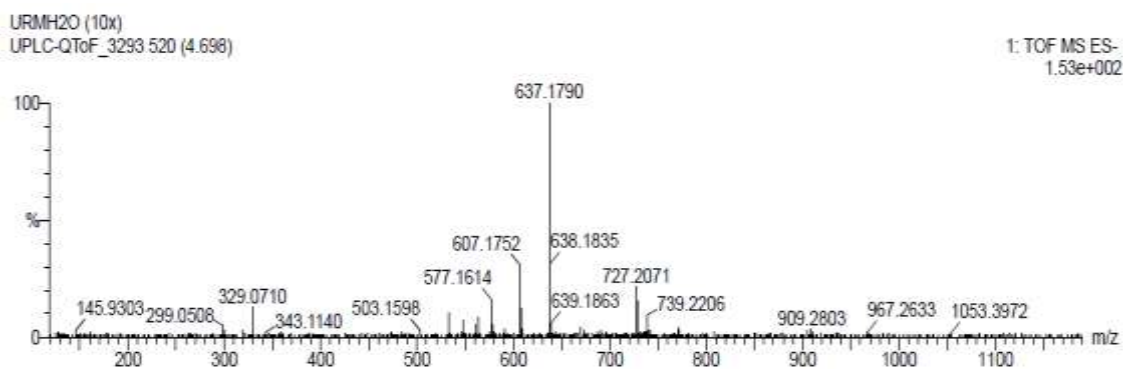
2: TOF MS ES-
7.32e+002



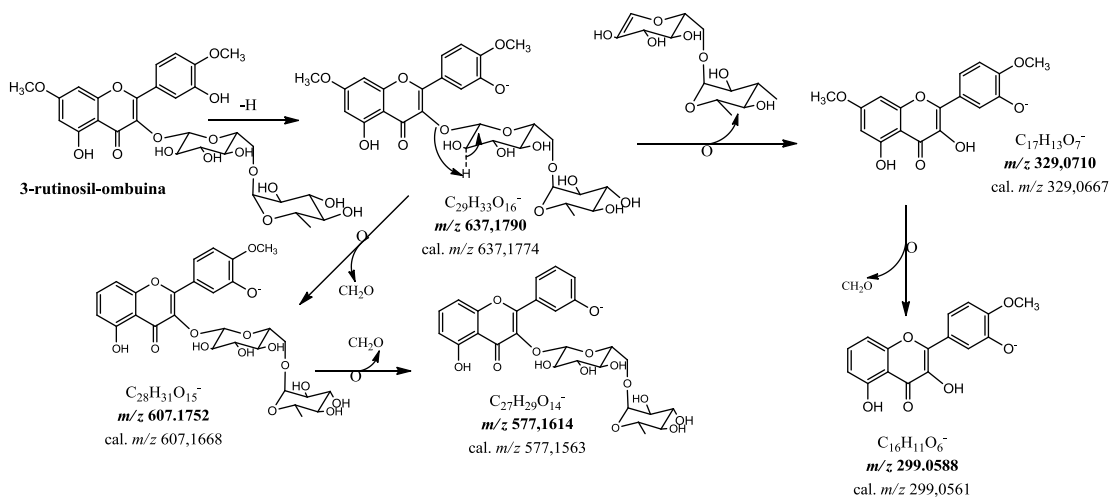
Espectro 31. EM-IES $[M-H]^-$ da substância 11.



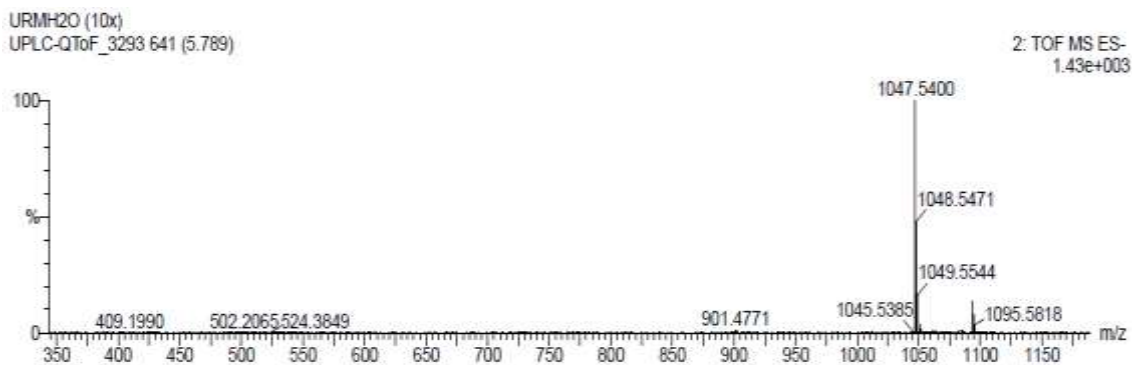
Esquema 5. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^-$ da substância 11 (URMH₂O).



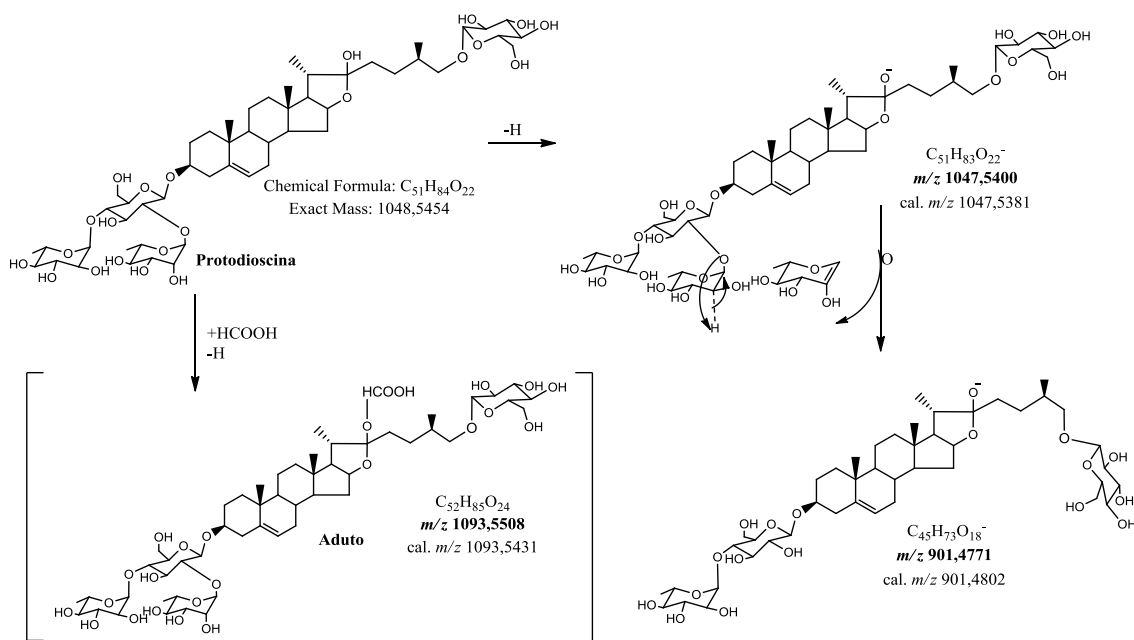
Espectro 32. EM-IES $[M-H]^-$ da substância 12.



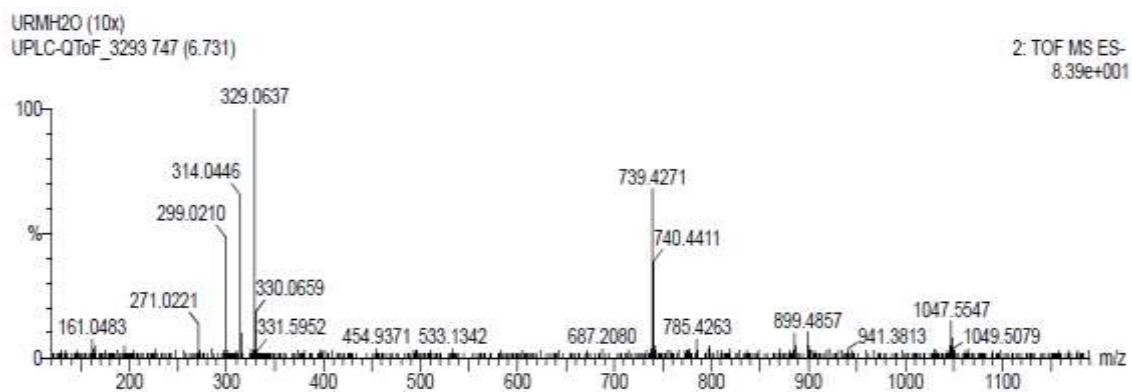
Esquema 6. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^-$ da substância 12 (URMH₂O).



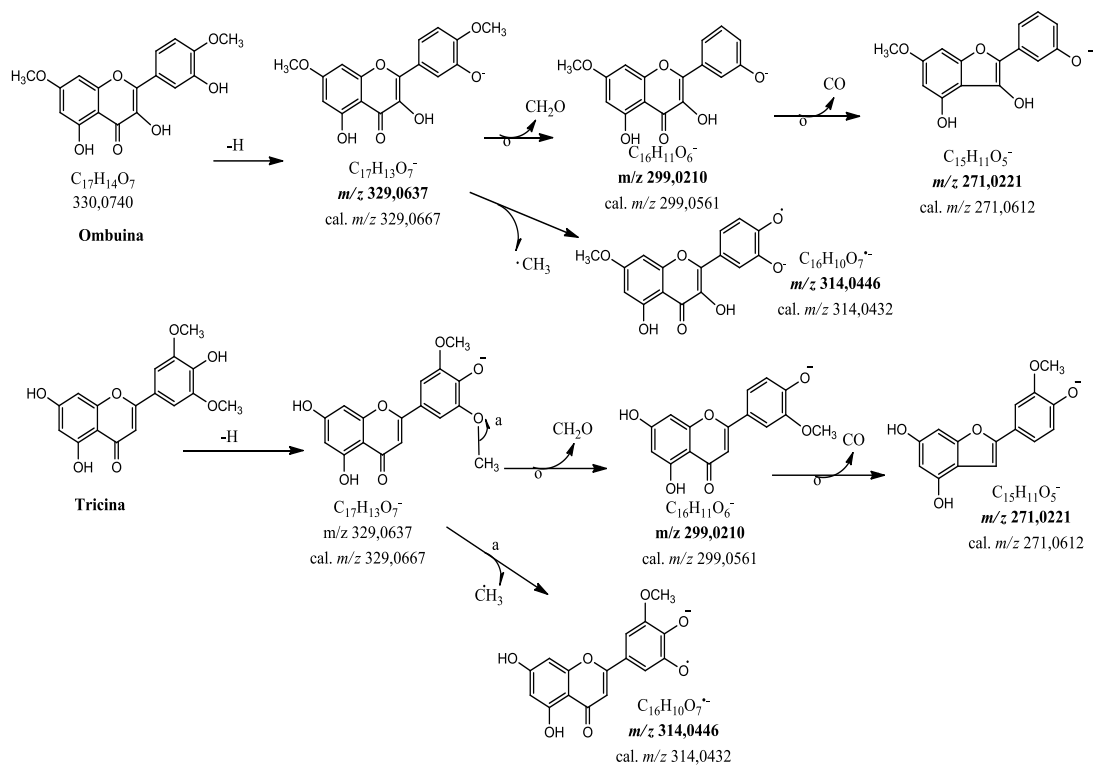
Espectro 33. EM-IES [M-H]⁻ da substância 13.



Esquema 7. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, [M-H]⁻ da substância 13 (URMH₂O).

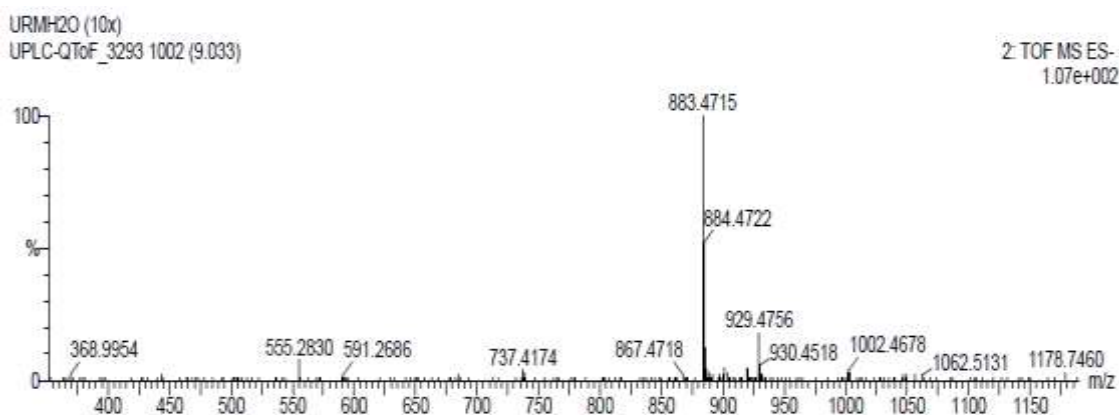


Espectro 34. EM-IES [M-H]⁻ da substância 14.

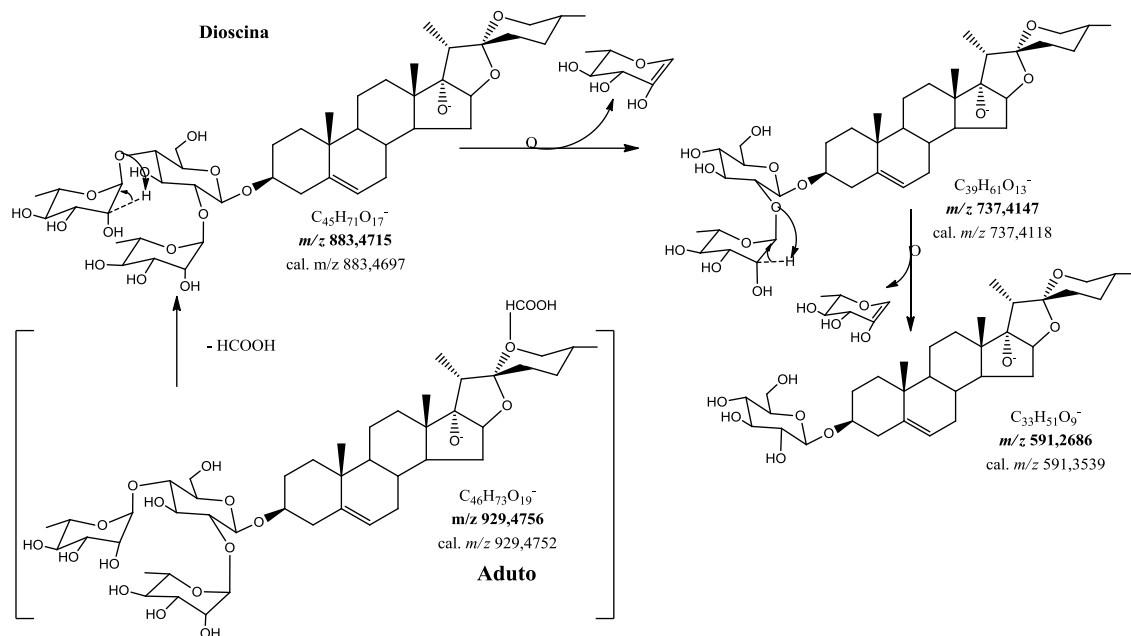


Esquema 8. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, [M-H]⁻ da substância 14 (URMH₂O).

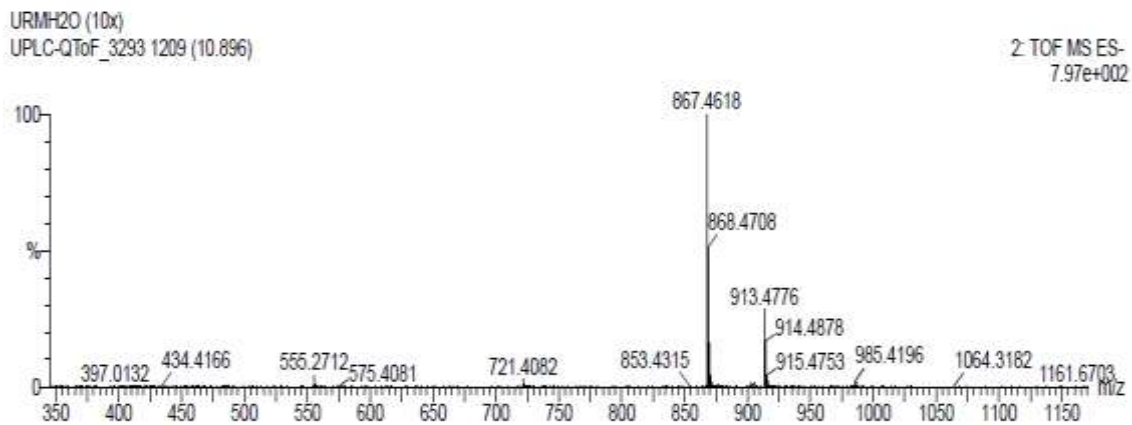
Observação: Os íons (m/z 1047,5547; 899,4857; 739,4271) detectados no **espectro 34 (Página 58)** são típicos de saponina, entretanto não foi possível identificar qual a substância correspondente. Destaca-se um típico caso de co-eluição de substância, já que podemos identificar dois grupos de íons correlacionados entre si.



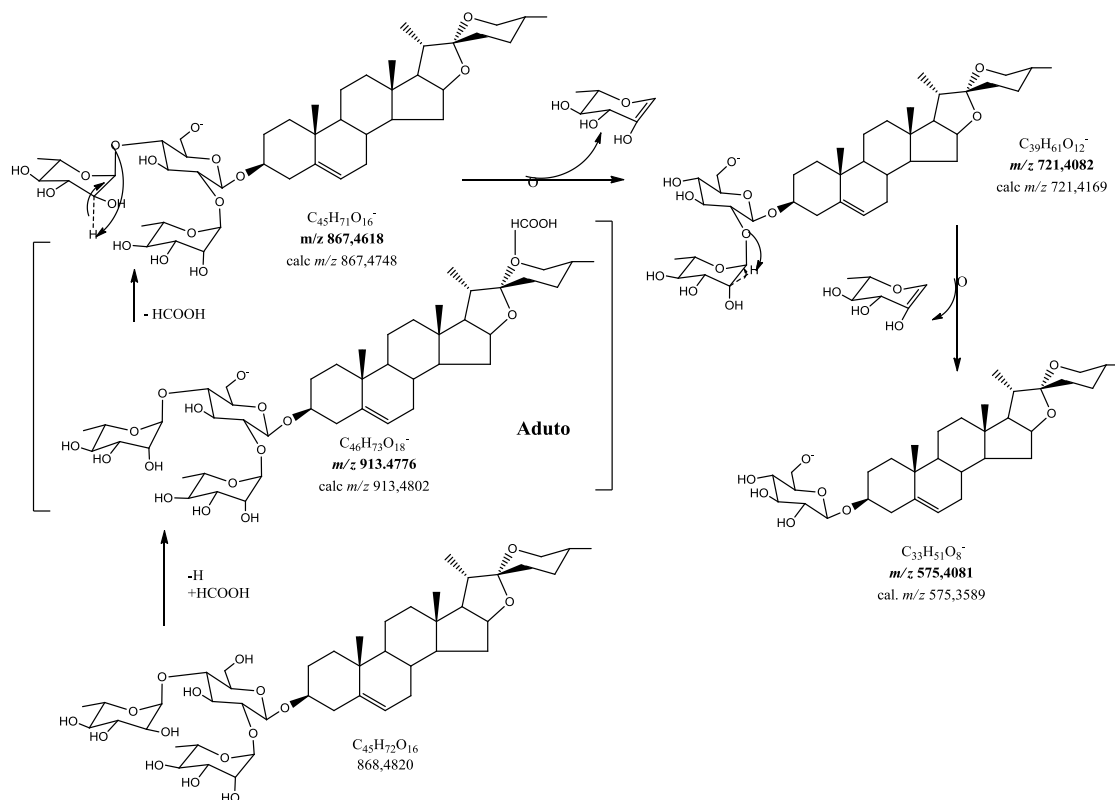
Espectro 35. EM-IES [M-H]⁻ da substância 15.



Esquema 9. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^-$ da substância 15 (URMH₂O).

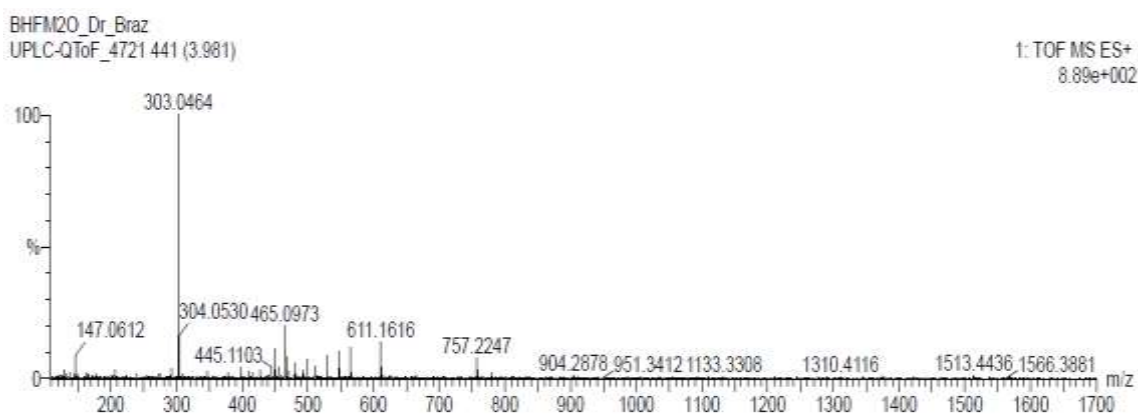


Espectro 36. EM-IES $[M-H]^-$ da substância 16.

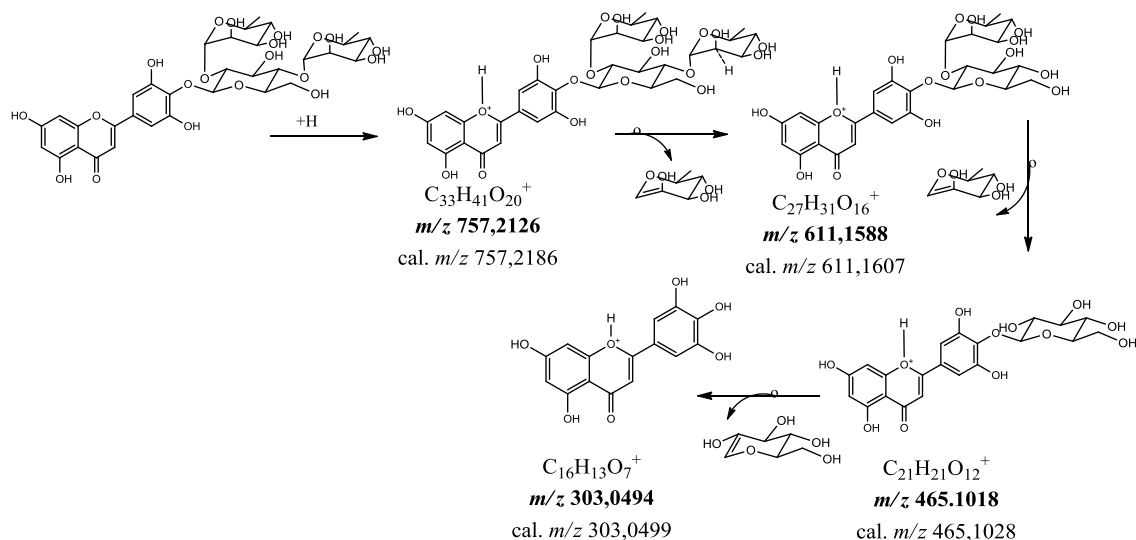


Esquema 10. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M-H]^-$ da substância 16 (URMH₂O).

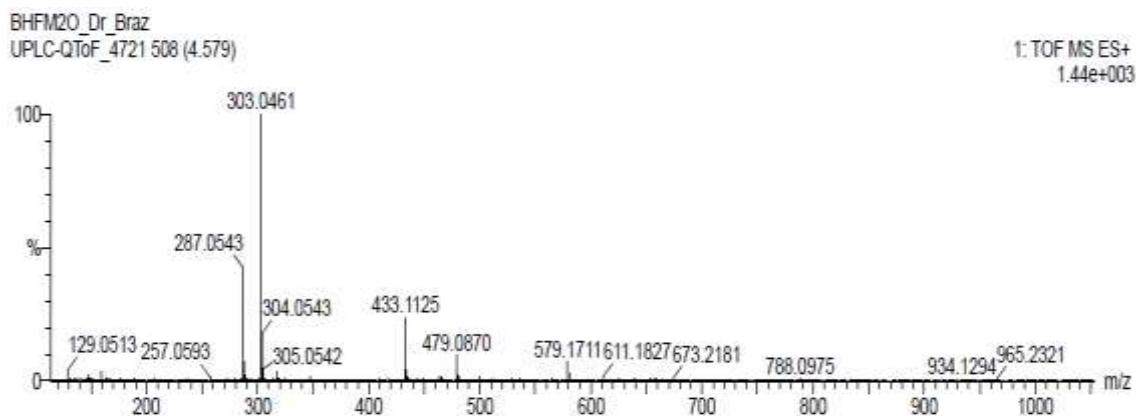
3.5.4.2. Espectros de Massas e justificativas para as substâncias identificadas no extrato UHMH₂O



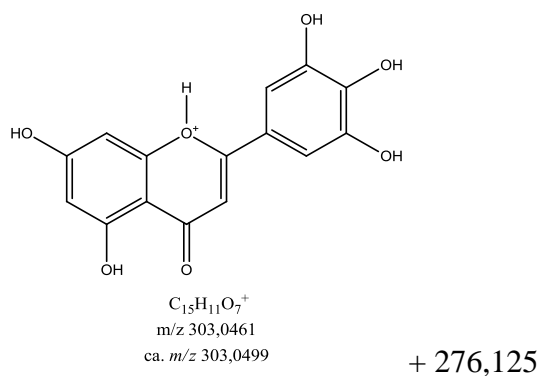
Espectro 37. EM-IES $[M+H]^+$ da substância 17.



Esquema 11. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 17 (UHMH₂O).



Espectro 38. EM-IES $[M+H]^+$ da substância com tr 4,579 (UHMH₂O).

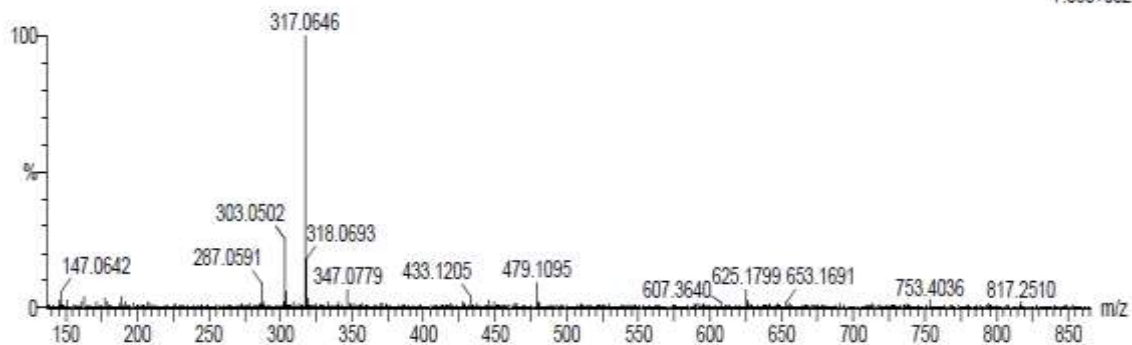


Neste espectro de massas destaco a presença do íon de massa 303,0499, condizente com o esqueleto básico da flavona tricetina acrescida de um próton. Na busca pela molécula correspondente à massa observada (579,1711), não foi identificada uma molécula que

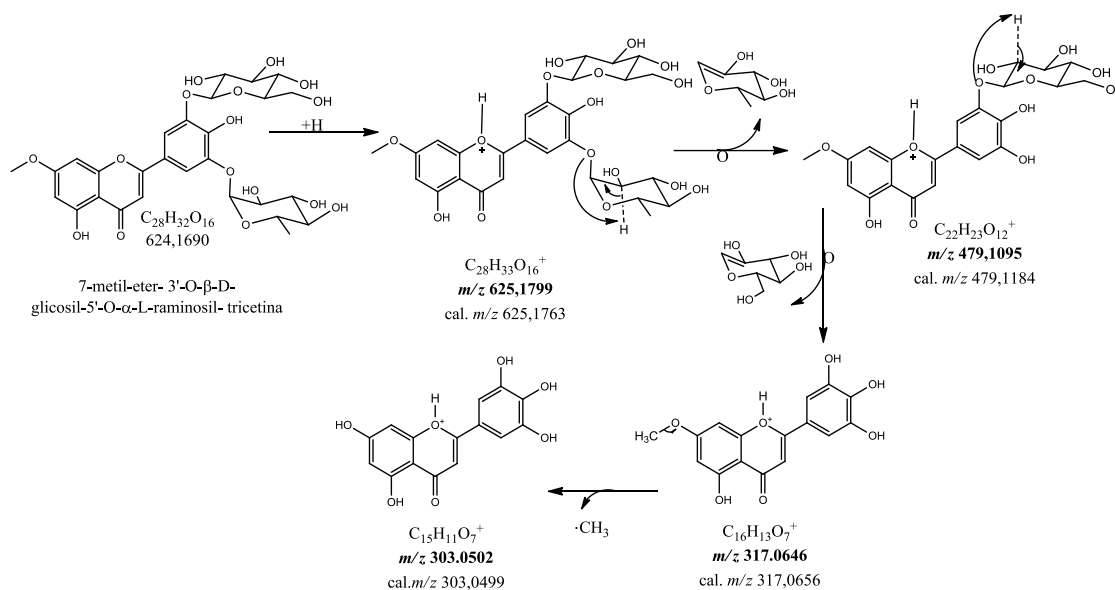
correspondesse a massa total observa, por isso indicamos a possibilidade de ser a [tricetina+276,125].

C: 0-60 H: 0-80 O: 0-40
BHF20_Dr_Braz
UPLC-QToF_4721 540 (4.865)

1: TOF MS ES+
7.08e+002



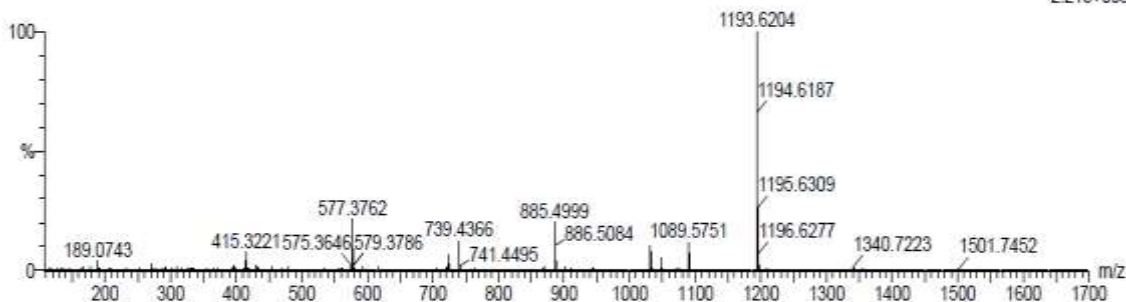
Espectro 39: EM-IES $[M+H]^+$ da substância 18.



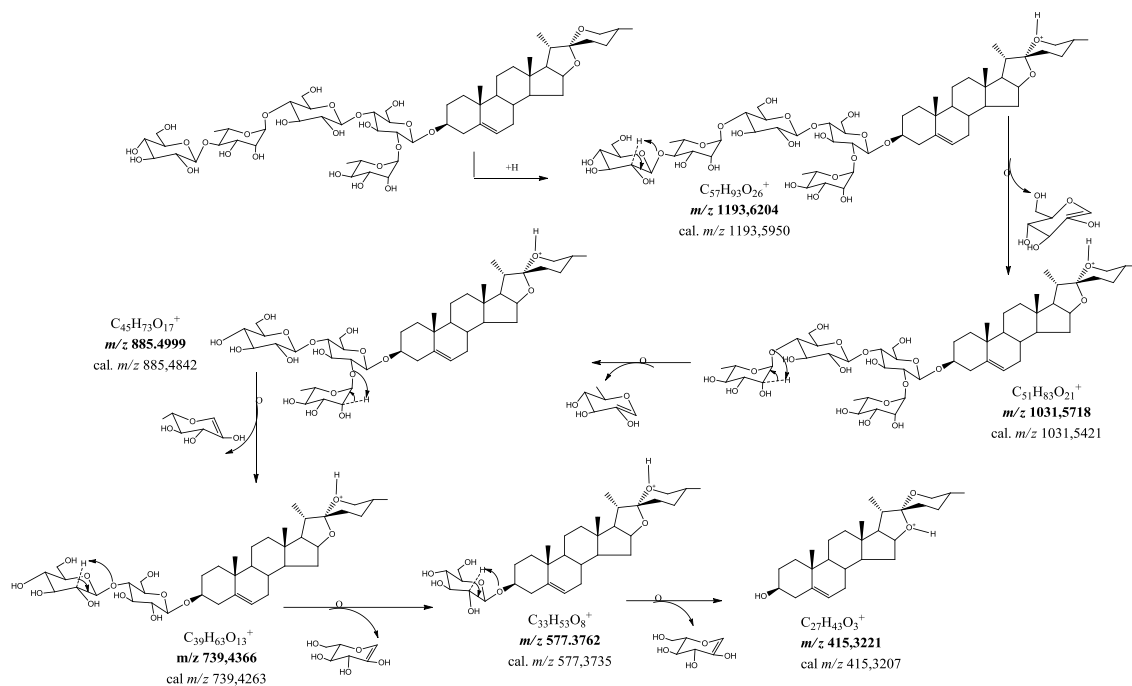
Esquema 12. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 18 (UHMH₂O).

BHF20_Dr_Braz
UPLC-QToF_4721 661 (5.972)

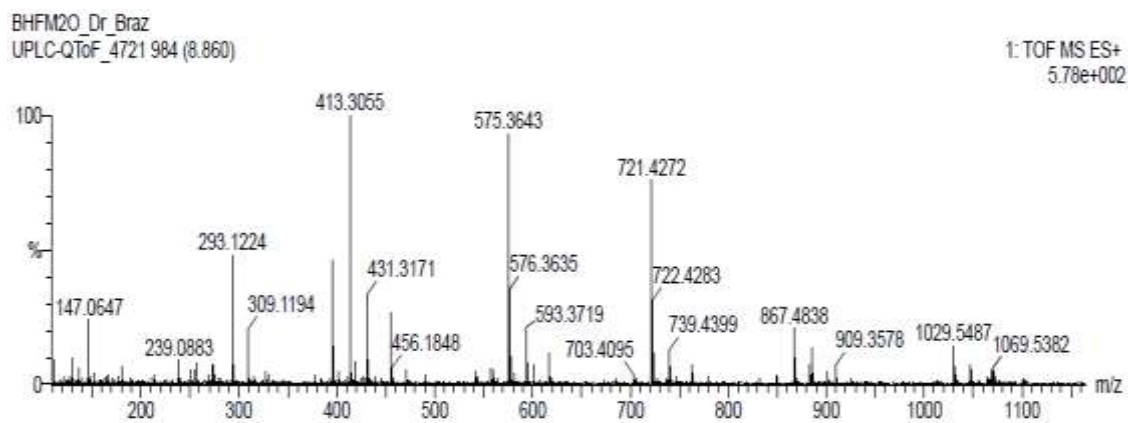
1: TOF MS ES+
2.21e+003



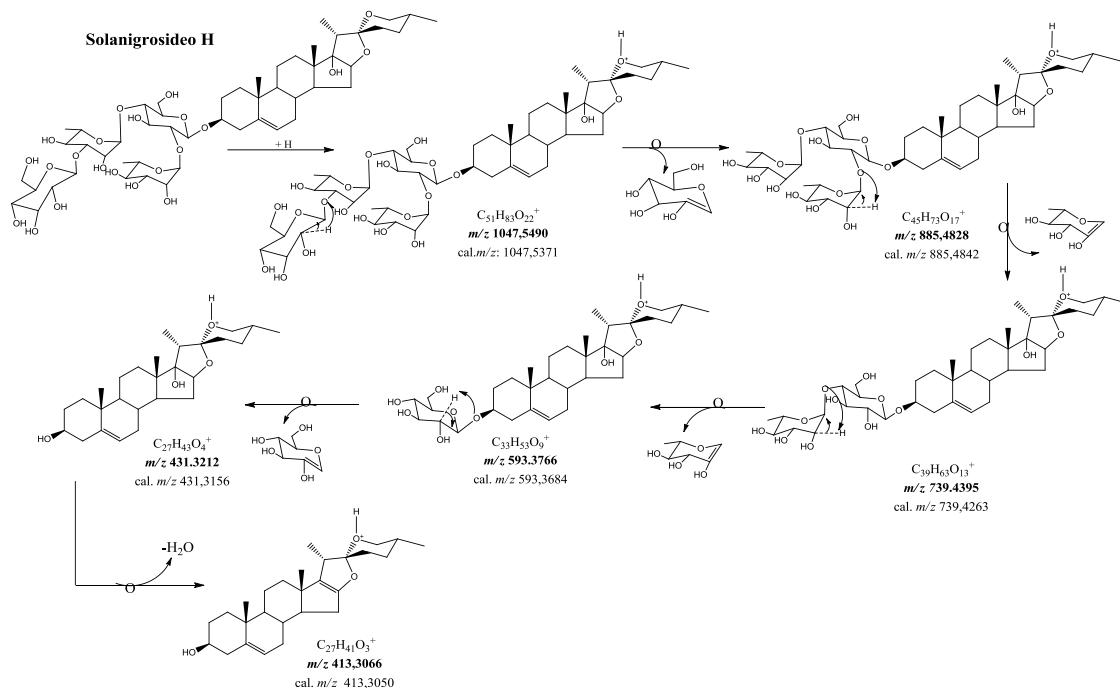
Espectro 40. EM-IES $[M+H]^+$ da substância 19.



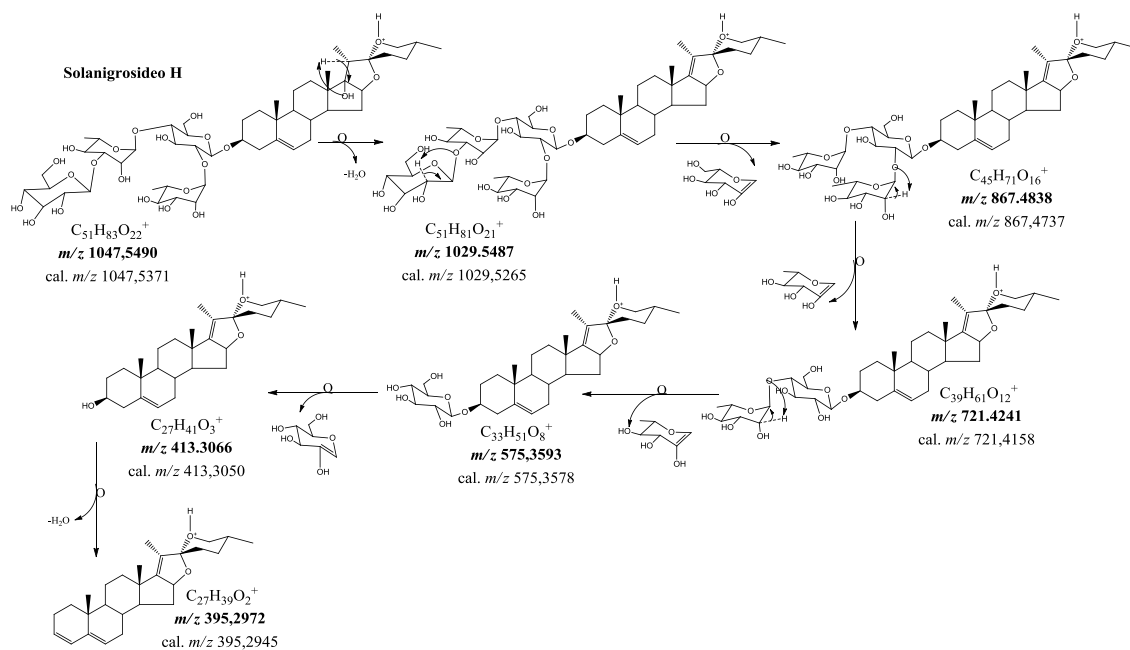
Esquema 13. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 19 (UHMH₂O).



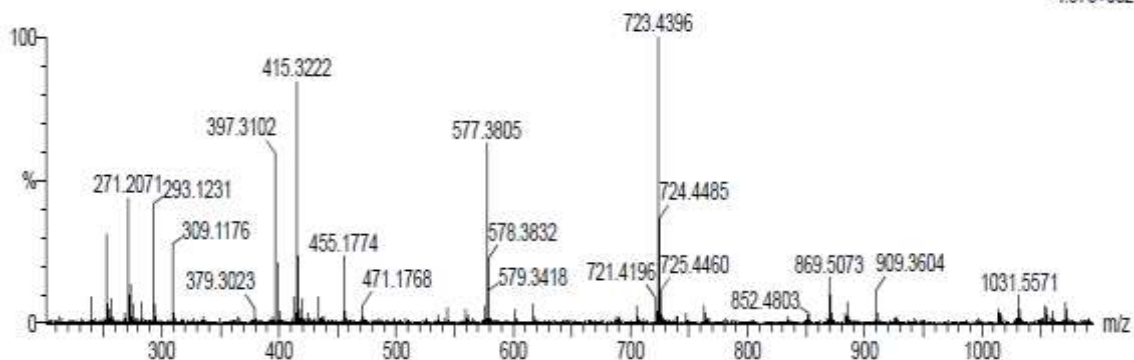
Espectro 41. EM-IES $[M+H]^+$ da substância 20.



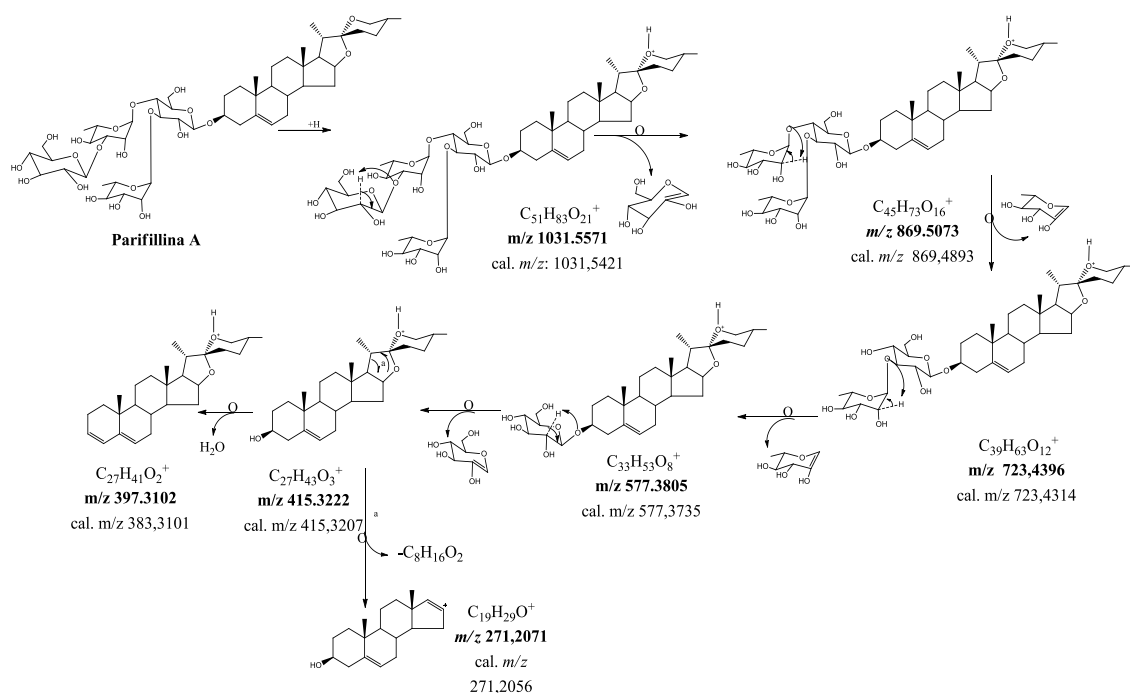
Esquema 14. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ com a manutenção da hidroxila em C-17, da substância 20 (UHMH₂O).



Esquema 15. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$, a partir da eliminação de água em C-17 e C-16, da substância 20 (UHMH₂O).



Espectro 42. EM-IES $[M+H]^+$ da substância 21.



Esquema 16. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos apresentados no EM-IES, $[M+H]^+$ da substância 21 (UHMH₂O).

3.5.4.3. Considerações sobre as substâncias identificadas no extrato URMH₂O

A interpretação dos espectros de massas feitos em modo negativo do extrato hidrometanólico de *Urochloa ruzizensis* nos permitiu a indicar a presença de oito substâncias (**Figura 12, Página 67**). A justificativa é baseada na análise dos espectros de massas de cada tempo de retenção destacado, comparando a massa de alta resolução observada com a da substância apresentada na literatura, comparando também os fragmentos encontrados com a literatura sempre quando disponível.

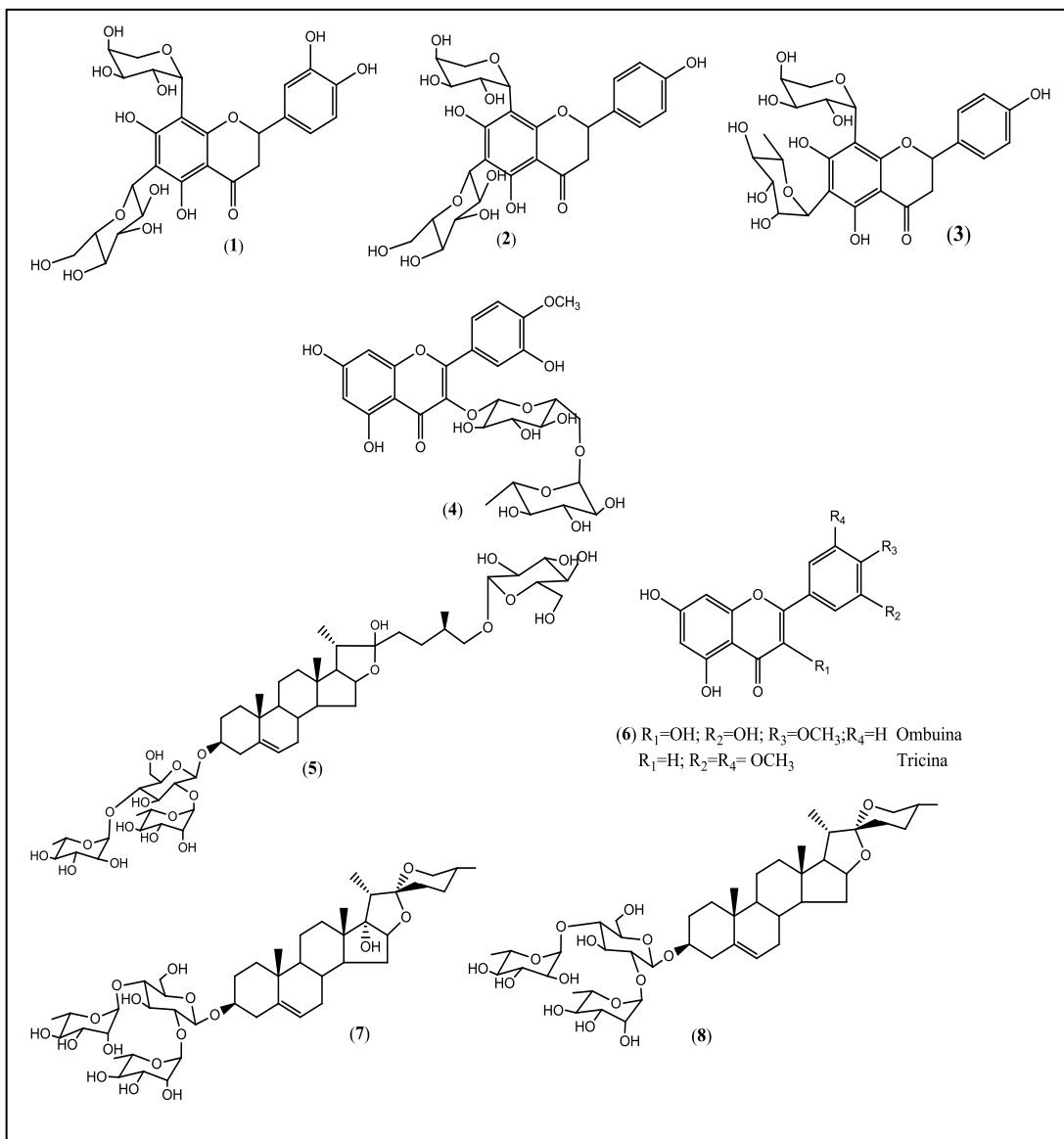


Figura 12. Substâncias identificadas no extrato URMH₂O por desrepliação.

Durante a etapa de preparo da amostra é adicionado ácido fórmico, com intuito de facilitar a protonação das substâncias quando analisadas em modo positivo. Esta mesma solução é usada na análise em modo negativo e neste caso observamos a formação de adutos nos espectros de massas das saponinas indicadas na tabela e também nas propostas de fragmentação. Foi confirmada a presença das saponinas **1** e **2**, pela comparação do tempo de retenção do padrão e proposta de fragmentação de massas, outra saponina furostânica foi identificada, com aglicona do tipo penogenina, a **3 β -O- β -D-glicopiranosil-[(2-1)-O- α -L-ramnopiranosil-(4-1)-O- α -L-ramnopiranosil-penogenina** (tr = 9,03), não isolada nos processos cromatográfico. A substância foi confirmada pela comparação com o tempo de retenção e o espectro do padrão, previamente identificada na espécie *U. humidicola* (OLIVEIRA et al., 2017). A presença da saponina **protodisciona** (TR= 5,79) é uma proposta já que apenas três fragmentos gerados condizem com a molécula, mesmo analisando o espectro obtido em energia mais alta de ionização.

As unidades de açúcar presentes nas saponinas identificadas são sempre do tipo glicose, observa-se a eliminação de uma unidade com massa igual a 162, e ramnose, observa-se a eliminação de uma unidade de massa igual a 146, esse padrão já havia sido observado nas substâncias que foram isoladas por metodologias clássicas de isolamento tanto no trabalho já executado com pelo grupo de pesquisa com a espécie *U. humidicola* (OLIVEIRA et al., 2017), em outras publicações com as espécies *U. decumbens* e *U. brizantha* (PIRES et al., 2002; PEREZ et al., 2016), e com as substâncias **1** e **2** apresentadas neste trabalho de tese.

No trabalho de isolamento realizado com a espécie *U. humidicola* foram identificados flavonoides livres ou C-O glicosilados (OLIVEIRA et al., 2017). Esperava-se o mesmo perfil para os flavonoides identificados em *U. ruziziensis*, mantendo o padrão, por isolamento, foi identificada a flavona tricina. Por desrepliação foi possível identificar a **ombuina 3-O-rutinosídeo** (t_R 4,70) e a indicação da aglicona **ombuina** ou **tricina** (t_R 6,73). Os demais flavonoides identificados são C-C glicosilados revelando a diferença entre as espécies.

Por comparação com os dados obtidos por Perez e colaboradores (2016), através de análise em CLUE-AR-QTOF-EM, verificamos que a espécie *U. ruziziensis* apresenta em comum flavonoides C-C glicosilados como **carlinosídeo** (t_R 3,45), **schafitosídeo** (t_R 3,67), presentes também na espécie *U. ruziziensis*, e **isoschafitosídeo** (t_R 3,71) com as espécies *U. brizantha* e *U. decumbens*. Flavonoides C-C glicosilados não foram isolados por cromatografia em nenhuma das espécies trabalhadas.

3.5.4.4. Considerações sobre as substâncias identificadas no extrato UHMH₂O

A interpretação dos espectros de massas feitos em modo positivo do extrato hidrometanólico de *Urochloa humidicola* nos permitiu a indicar a presença de cinco substâncias (**Figura 13**). A justificativa é baseada na análise dos espectros de massas de cada tempo de retenção destacado, comparando a massa de alta resolução observada com a respectiva substância e seus fragmentos informados na literatura, sempre quando disponíveis.

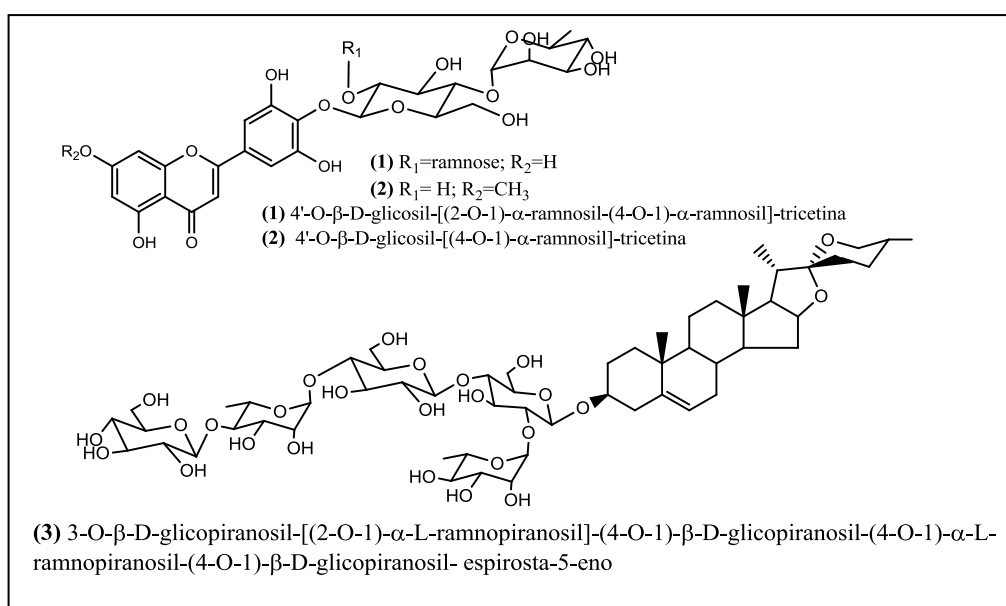


Figura 13. Substâncias identificadas por desrepliação no extrato hidrometanólico de *U. humidicola* (continua).

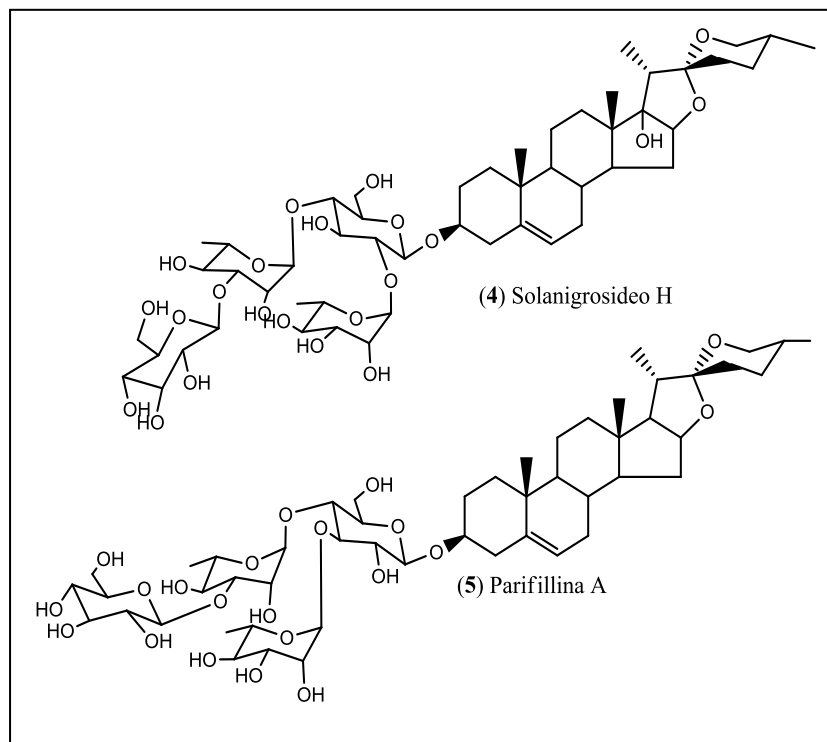


Figura 13. Continuação.

As saponinas furostânicas presentes no extrato apresentam-se com dois tipos de aglicona, substâncias **3** e **5** do tipo diosgenina (identificável pelo fragmento com $m/z = 415$ $[M+H]^+$ observado nos espectros) e substância **4**, a versão com hidroxila no carbono 17, penogenina (fragmento observado nos espectros com $m/z = 431$ e, após eliminação de água, o íon $m/z = 413$ $[M+H]^+$) (**Figura 14**).

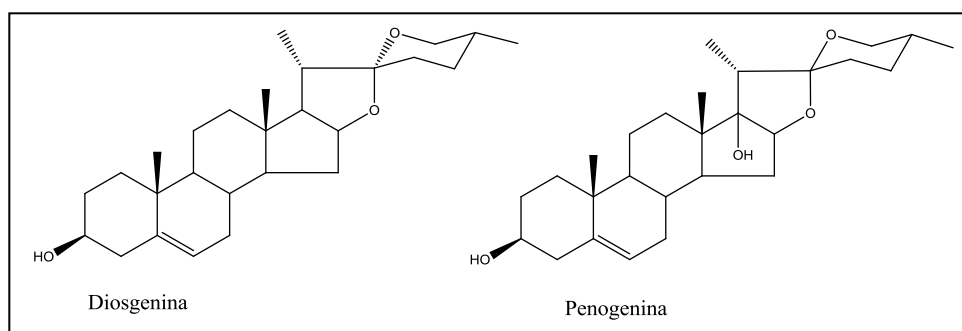


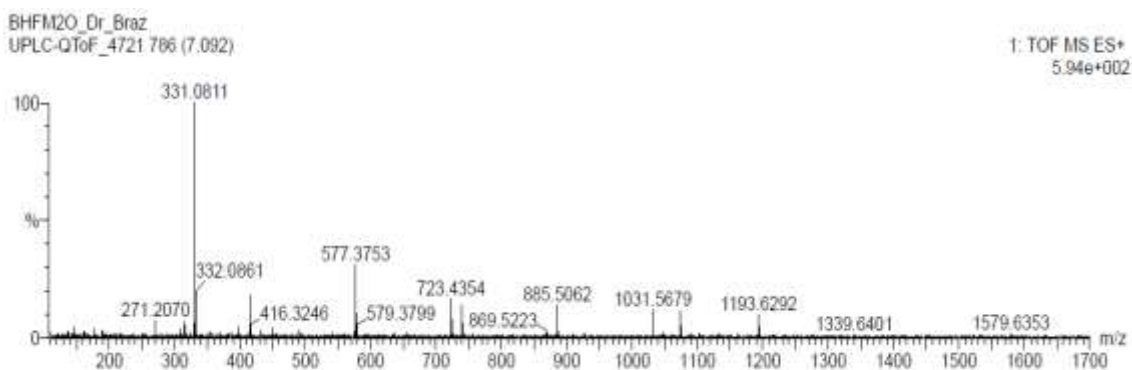
Figura 14. Agliconas presentes nos extratos de *U. humidicola* e *U. ruzizensis*.

Outro fator observado para as saponinas e os flavonoides, substituídos por unidades glicosídicas, é que as unidades de açúcar presentes são sempre do tipo glicose e/ ou ramnose. Quanto ao padrão de substituição nas unidades de açúcar das saponinas, comumente observa-se substituintes nos carbonos 2 e 4, entretanto na substância **5**, Parifillina A, a glicose apresenta-se substituída em 3 e 4 saindo do formato mais comum observado inclusive nas demais saponinas identificadas no extrato UHMH₂O e URMH₂O. A devida atribuição desse tipo de conexão só pode ser feita utilizando outros métodos físicos de análise como a ressonância magnética nuclear.

Com relação às saponinas identificadas em *U. humidicola*, todas estão sendo informadas pela primeira vez na espécie. A confirmação, para a devida atribuição das conexões entre unidades de açúcar e a definição da estereoquímica do centro quiral 25, faz-se necessário o isolamento e a análise por RMN já que estas moléculas já foram identificadas previamente, possibilitando a comparação com os dados da literatura.

Foram observadas algumas diferenças entre os flavonoides identificados no extrato URMH₂O e no UHMH₂O. No extrato hidrometanólico de *U. humidicola* foram detectados flavonoides com um único tipo de esqueleto básico, a tricetina ($m/z = 303 [M+H]^+$), enquanto que no extrato hidrometanólico de *U. ruziziensis* foi possível identificar variações nas agliconas, foram identificados flavonóis e flavonas.

A interpretação dos espectros de massa demonstrou-se uma tarefa complexa, para determinados tempos de retenção foi observada a nítida co-eluição de substâncias. Vide o **Espectro 43**, onde o íon de massa 331,0811, característico de flavonas com esqueleto tricetina é observado, enquanto que os valores m/z 1031.5679; 885.5062; 739.4243; 723.4354; 577.3753 e 415.3228 são valores que correspondem a uma saponina esteroidal, inclusive já demonstramos a proposta de fragmentação justificando esses íons em outros tempos de retenção.



Espectro 43. EM-IES $[M+H]^+$ da substância com TR 7,09.

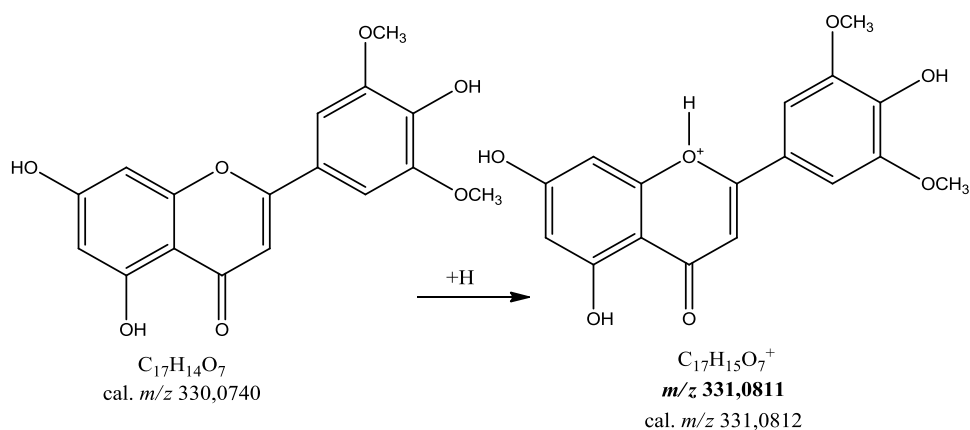


Figura 15. Protonação da tricetina, obtenção do íon (100%) do espectro com TR 7,092.

3.6. CONSIDERAÇÕES

Através dos processos cromatográficos descritos na metodologia, e o uso de diferentes técnicas espectrométricas de análise de substâncias, foi possível identificar oito constituintes presentes nas folhas de *Urochloa ruziziensis*, sendo que seis delas estão sendo descritas pela primeira vez na espécie. Assim como outras espécies do gênero foram identificados ácidos orgânicos, saponinas furostânicas, esteroides e um flavonoide.

A presença de saponinas furostânicas em todas as partições sugere sua alta concentração no momento inicial de maturação da espécie *U. ruziziensis*, devido aos problemas de fotosensibilização podemos não recomendar o consumo da espécie no terceiro mês após o plantio.

A técnica desreplicação nos permitiu identificar oito substâncias no extrato URMH₂O, dentre essas apenas uma foi isolada através das técnicas cromatográficas descritas neste trabalho. Enquanto que na análise do extrato UHMH₂O, foi possível identificar cinco substâncias e, mesmo tendo realizado um trabalho prévio de isolamento e identificação que permitiu a identificação de 11 substâncias (OLIVEIRA et al., 2017), por desreplicação foi possível identificar 5 diferentes substâncias presentes nesta espécie, dentre elas sugerimos que uma seja inédita. A comprovação exige que façamos o isolamento e, através de técnicas espectroscópicas, façamos a devida identificação dos deslocamentos químicos e possamos definir a localização das unidades de açúcar presente, bem como a definição da esteroquímica dos mesmos.

Os resultados das análises por desreplicação nos permite identificar algumas similaridades entre as espécies como o tipo de aglicona encontrada nas saponinas furostânicas, penogenina e dioscina, e as unidades de açúcar sempre do tipo ramnose e glicose. As diferenças foram detectadas principalmente nos tipos flavonoides presentes em ambas, os padrões de substituição das agliconas e a conectividade entre os substituintes glicosilados. A conexão entre a aglicona e a unidade de açúcar, no extrato UHMH₂O, é do tipo C-O-C, enquanto no extrato URMH₂O observamos principalmente o padrão de substituição C-C. Outra diferença que podemos destacar é que na espécie *U. humidicola* os açúcares identificados são apenas glicose e ramnose, enquanto na *U. ruziziensis* foi observada também a presença de xilose.

4. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Cespedesia spathulata* (OCHNACEAE)

4.1. INTRODUÇÃO

Espécies pertencentes à família Ochnaceae estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Muitas espécies são utilizadas na medicina caseira de países como Brasil, Camarões, Nigéria, Congo e Gabão da África (BOUQUET, 1969). Nesta família destacam-se quatro gêneros, *Ouratea*, *Sauvagesia*, *Luxemburgia* e *Ochna* (TIH et al., 1989; MESSANGA et al., 2002; LIKHITWITAYAWUID et al., 2001; TIH et al., 1992; ZAPPI, 2018).

O grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFRRJ, sob o comando dos professores Dr. Mario Geraldo de Carvalho e Dr. Raimundo Braz Filho, vem desde 1994

estudando espécies da família Ochnaceae, em especial espécies do gênero *Luxemburgia* e *Ouratea*. As publicações de autoria do grupo relatam a identificação, elucidação estrutural de substâncias isoladas e atividades biológicas de espécies da família Ochnaceae. Dentre as classes de metabólitos presente destacam-se os flavonoides e biflavonoides (CARVALHO et al., 2002; 2005; 2008.a; 2008.b; FIDELIS et al., 2012; 2014; NASCIMENTO et al., 2009; SUZART et al., 2007; 2016). Além da investigação com relação a composição fitoquímica de espécies desta família o grupo de pesquisa, também se dedica a investigação potenciais biológicos que as espécies, através de seus extratos brutos, frações ricas e mesmo substâncias isoladas possam apresentar, no parágrafo seguinte são apresentadas algumas publicações contendo atividades biológicas de algumas espécies estudadas.

A capacidade antioxidante, inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase foi verificada utilizando o extrato metanólico obtido de inflorescência de *Ouratea hexasperma* (FIDELIS et al., 2019). Os biflavonoides obtidos de *Ouratea hexasperma* e *O. ferruginea* apresentaram ação antinoceceptiva e anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2019). Flavonoides isolados de *O. ferruginea* também apresetaram ação anticâncer e quimiopreventiva (FIDELIS et al., 2012). As partições acetato de etila e n-butanol obtidas do extrato metanólico de folhas de *O. hexasperma* apresentaram ação antifúngica de contra células de *Candida albicans* (DE ARAÚJO et al., 2013). Os biflavonoides agathisflavone e 7"-metil-agathisflavone, isolado das folhas de *O. parviflora* apresentaram atividade antiviral (DE ARAÚJO et al., 2011). O biflavonóide 2", 3"-diidrochnaflavona, isolado das folhas de *Luxemburgia nobilis*, apresentou atividade citotóxica para carcinoma de Ehrlich murinho, células K562 de leucemia humana e ação inibidora enzimática de topoisomerases I e II- α do DNA humano (OLIVEIRA et al., 2005)

O presente trabalho teve como objetivo incorporar conhecimento sobre a química da família Ochnaceae tendo como objeto de pesquisa a espécie *Cespedesia spathulata*. E assim, ao realizar o estudo químico desta espécie identificação de constituintes, como flavonoides, biflavonoides, entre outros, avaliar atividades biológicas de extratos e substâncias isoladas e fazer considerações sobre aspectos quimiosistemáticos, etnofarmacológicos e biológicos do gênero *Cespedesia*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver o estudo fitoquímico da espécie *Cespedesia spathulata*;
- Fazer avaliação do potencial biológico de frações dos extratos obtidos e com as substâncias isoladas de folhas de *Cespedesia spathulata* sobre a enzima tirosinase;
- Fazer correlação dos constituintes identificados com a classificação botânica da planta;

4.3 REVISÃO DA LITERATURA

4.3.1. Família Ochnaceae

A família Ochnaceae está inserida na ordem Theales (DAHLGREN et al., 1980), possui 27 gêneros e aproximadamente 600 espécies, com distribuição pantropical (AMARAL 1991). De acordo com o Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil, existem 14 gêneros, 197 espécies (116 endêmicas), 2 subespécies (nenhuma endêmica), 5 variedades (4 endêmicas) no nosso país. A família é caracterizada por apresentar folhas simples, alternas, com estípulas; flores pentâmeras, dialipétalas, dialissépalas, andróginas, hipóginas; pedicelos articulados; anteras

poricidas ou rimosas, estaminódios presentes ou não; gineceu sincárpico; sementes com ou sem albúmen. Esta família botânica está no maior grupo das angiospermas (possuem flores e fruto). Algumas espécies de Ochnaceae são utilizadas como ornamentais ou medicinais (MONTEIRO, 1877; CORRÊA, 1984; LORENZI & SOUZA, 2001; LORENZI, 2002a, b; SIMONI et al., 2002). Apresenta quatro gêneros de grande destaque, são eles o *Ouratea*, *Sauvagesia*, *Luxemburgia* e *Ochna* (TIH et al., 1989; MESSANGA et al., 2002; LIKHITWITAYAWUID et al., 2001; TIH et al., 1992; ZAPPI, 2018).

O gênero *Ouratea* Aubl. apresenta uma distribuição neotropical, compreende cerca de 310 binômios, dos quais 160 são baseados em plantas brasileiras encontradas em florestas, cerrados, campos de altitude e restinga. O número de espécies válidas que compreende o gênero é indefinido, devido a espécies que podem ser sinonimizadas e ao grande número de espécies novas sendo descritas (YAMAMOTO, 1995). Várias espécies deste gênero foram estudadas pelo grupo LQPN-UFRRJ com divulgação de diversas substâncias novas, novos derivados e detecção de várias atividades biológicas (FIDELIS et al., 2012; 2014; NASCIMENTO et al., 2009; CARVALHO et al., 2002; 2005; 2008.a; 2008.b)

O gênero *Sauvagesia* L. é neotropical e apresenta 40 espécies. No Brasil ocorrem 20 espécies sendo encontradas principalmente em cerrados, campos de altitude e restinga (SASTRE 1997).

O gênero *Luxemburgia* é um gênero exclusivamente brasileiro, seus exemplares são em geral arbustos com flores amarelas que ocorrem na vegetação de campo rupestre do Brasil, em regiões com altitude acima de 1000 metros. Estão distribuídas em Minas Gerais, Bahia (Serra do Espinhaço), Goiás, Rio de Janeiro e Espírito Santo (FRAGA & FERES, 2007). Este gênero também se destaca pela biossíntese de biflavonoides (CARVALHO et al., 2009), inclusive pode-se destacar a proximidade deste gênero ao *Ouratea* através da avaliação de seus constituintes sintetizados (SUZART et al., 2007).

O gênero *Ochna* apresenta cerca de 85 espécies de árvores perenes e arbustos, está distribuído amplamente pela Ásia tropical, África e América (RENDLE, 1952) onze espécies tem ocorrência na Índia (KIRTIKAR & BASU, 1980).

4.3.2 Gênero *Cespedesia*

O gênero *Cespedesia* está inserido na tribo Luxemburgetae, subfamília Ochnoideae (STEVENS, 2001). O gênero foi descrito inicialmente por Goudot (1844) e foi revisado por Sastre (1975), que sinonimizou as oito espécies descritas para o gênero com três combinações feitas em apenas uma única espécie: *Cespedesia spathulata*, tornando um gênero monoespecífico. As diferenciações observadas que justificavam a existência de outras espécies se tratavam de variações na morfologia foliar que, segundo Sastre (1975), eram variações possíveis de serem observadas num mesmo indivíduo (CHACON, 2011).

A espécie *Cespedesia spathulata* tem distribuição geográfica na região Norte (Amazonas, Acre, Pará e Rondônia), região Centro Oeste (Goiás, Mato Grosso) (CHACON, 2011) e, também, presente em outros países da América do Sul e Central como Equador, Nicarágua, Peru, Panamá, Colômbia, Costa Rica e Venezuela (SASTRE, 2003).

Cespedesia spathulata pode ser encontrada como árvore ou arbusto, de 2 a 15 metros de altura, apresenta ramos glabros. É reconhecida por suas folhas espatuladas (aparentam uma forma de espátula ou colher) a obovais, são grandes, coriáceas, alternadas, as margens denteadas e inflorescências em panículas terminais com flores amarelas (CHACON, 2011).



Figura 16: *Cespedesia spathulata*.

Fonte: <http://hasbrouck.asu.edu/neotrop/plantae/imagelib/imgdetails.php?imgid=185626> ;
<https://herbariovaa.org/imagelib/imgdetails.php?imgid=185632>

O extrato etanólico (95%) obtido de *Cespedesia macrophylla*, foi avaliado *in vivo* em células tumorais de carcinoma de cólon 38, melanoma B16 e leucemia P388 demonstrando seu potencial citotóxico (SUFFNESS & ABBOTT, 1988).

Com relação à composição química da espécie conhece-se a presença de dois metabólitos a ochnaflavona e 7''-*O*-metil-ochnaflavona que foram identificadas através de técnicas espectroscópicas como ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (LOBSTEIN et al., 2004). A identificação do biflavonoide ochnaflavona levou a Lobstein e colaboradores (2014) a afirmarem a proximidade da espécie com o gênero *Ochna* uma vez que o biflavonoide é considerado marcador do gênero (RAO et al., 1997; JAYPRAKASAN et al., 2000) já que foi isolado em diversas espécies do gênero como *Ochna pumila*, *O. obtusata*, *O. beddomei*, *O. intetegerrima*, *O. ochna lanceolata*, (JAYAKRISHNA et al., 2003; LIKHITWITAYAWUID & KAEWAMATAWONG, 2005; REDDY et al., 2008; RAO et al., 1997; À ZINTCHEN et al., 2007).

A partir desta data não foram publicados outros trabalhos sobre estudo químico desta espécie. Visto a grande diversidade de metabólitos sintetizados pelos demais gêneros e a vasta distribuição nacional das espécies pertencentes à família Ochnaceae, selecionamos a espécie *Cespedesia spathulata* para estudo mais aprofundado de sua composição química cujas informações poderão contribuir para a confirmação da classificação botânica e/ou a detecção de metabólitos com possíveis atividades biológicas.

4.3.3. Gênero *Sauvagesia*

Cladograma é uma ferramenta que demonstra a proximidade entre gêneros pertencentes à mesma família. Análise evolutiva das espécies pertencentes à família Ochnaceae (**Figura 17**,

página 75) revela via cladograma a maior aproximação entre os gêneros *Cespedesia* e *Sauvagesia*. A **Figura 17** demonstra que as três famílias, Ochnaceae, Quiinaceae e Medusagynaceae, estão próximas e todas se encontram dentro de um mesmo clado (grupo de famílias) maior, Ochnaceae *sl.* A aproximação entre estes gêneros foi definida através da análise genética de 13 genes específicos verificado em cada espécie listada (MATTHEWS et al., 2012).

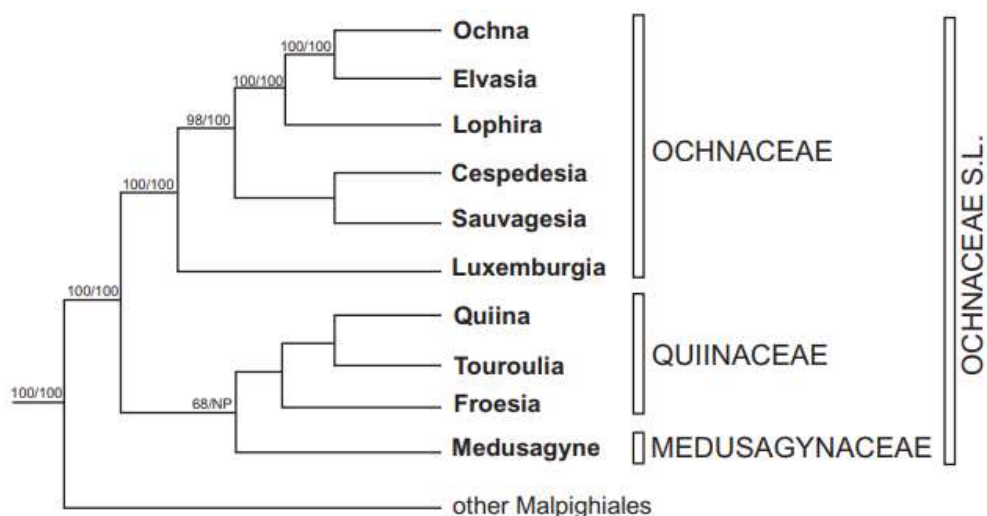


Figura 17. Cladograma dos gêneros da família Ochnaceae *sl* (MATTHEWS et al., 2012).

Sauvagesia é predominantemente neotropical, com exceção da espécie pantropical, *S. erecta* L. (DWYER, 1945). Compreende aproximadamente 40 espécies, sendo 31 brasileira e destas 14 são endêmicas do Brasil (CHACON, 2011). O gênero está distribuído pela América do Sul, exceto no Chile e na Argentina, ocorrem em campos, cerrados, savanas, restingas e raramente em matas. (DWYER, 1945).

O artigo publicado por Paris e colaboradores (1978) a identificou nas folhas de *S. erecta* quatro flavonas c-glicosiladas vitexina (1), vicentina-2 (2), isoorientina (3) e orientina (4). Albuquerque (2012) identificou a presença dos triterpenos sitosterol (5) e estigmasterol (6), lupeol (7), α -amirina (8) e β -amirina (9), ácido ursólico (10), a isoflavona 5,7,4'-trimetoxisoflavona (11), as saponinas 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol (12) e 3-O- β -D-glicopiranosil estigmasterol (13), e novamente a flavona vitexina (1). O extrato bruto desta mesma espécie apresentou atividade antifúngica avaliada por Kongstad e colaboradores (2014). Todas as estruturas estão devidamente representadas na **Figura 18 (Página 76)**. Os constituintes isolados desta espécie e de *Cespedesia* podem ser usados para o entendimento da proximidade entre os dois gêneros.

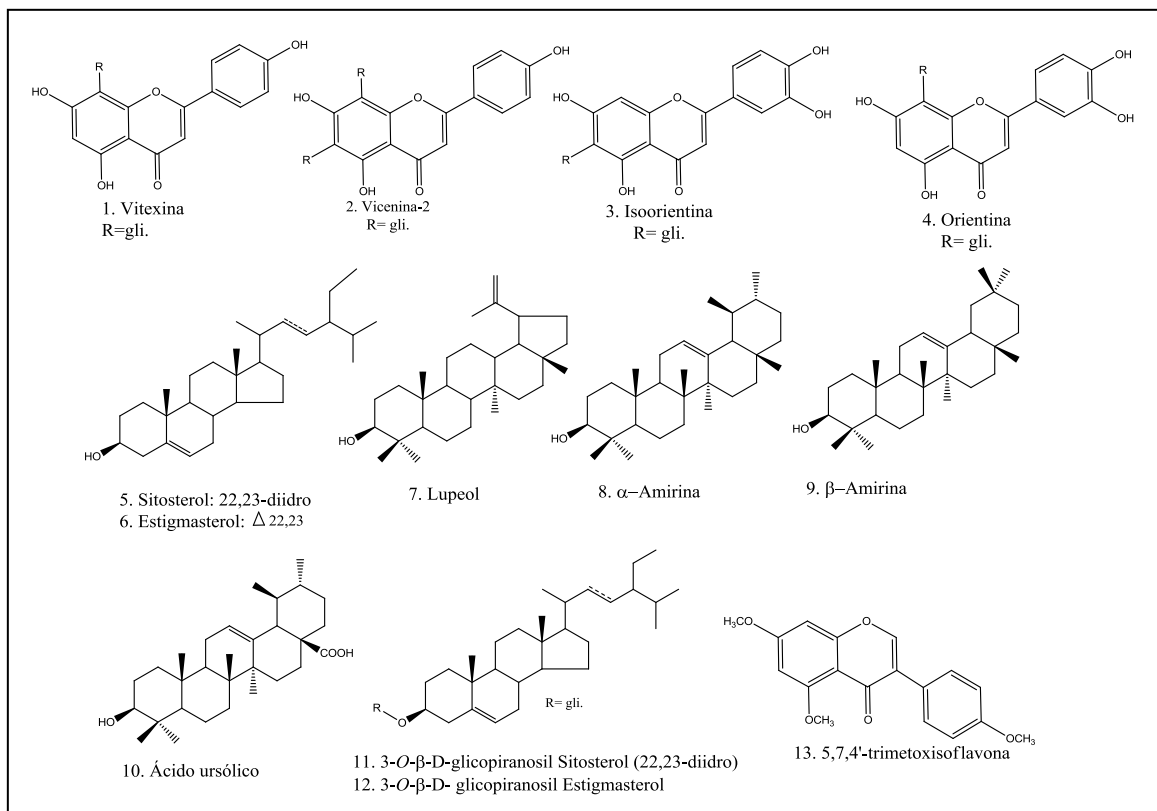


Figura 18: Substâncias identificadas no gênero *Sauvagesia*.

4.3.4. Tirosinase e a pigmentação de tecidos

A tirosinase é uma oxidase multifuncional, glicosilada e contém cobre, que catalisa duas primeiras etapas da melanogênese em mamíferos e é responsável por reações enzimáticas de escurecimento em frutos danificados durante o manuseio e processamento pós-colheita. A melanogênese é o processo que leva à formação de pigmentos macromoleculares escuros, ou seja, a melanina. A melanina é formada por uma combinação de reações químicas catalisadas enzimaticamente (CHANG et al., 2009).

A tirosinase catalisa as primeiras etapas da formação da melanina, etapa limitante da síntese já que as demais ocorrem de forma espontânea dependendo apenas do pH fisiológico (HALABAN et al., 2002). A dopaquinona é convertida em dopa e dopacromo através de uma redução. A dopa é também o substrato da tirosinase e é novamente oxidada para a dopaquinona pela enzima. Finalmente, a eumelanina é formada através de uma série de reações de oxidação do dihidroxiindole (DHI) e do ácido dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), que são os produtos da reação do dopacromo. Na presença de cisteína ou glutatona, a dopaquinona é convertida em cisteinildopa ou glutationildep. Subsequentemente, a feomelanina é formada. Além da eumelanina e da feomelanina, outras “melaninas” que dependem de monômeros fenólicos diferentes da tirosina são denominadas alomelaninas (CHANG et al., 2009).

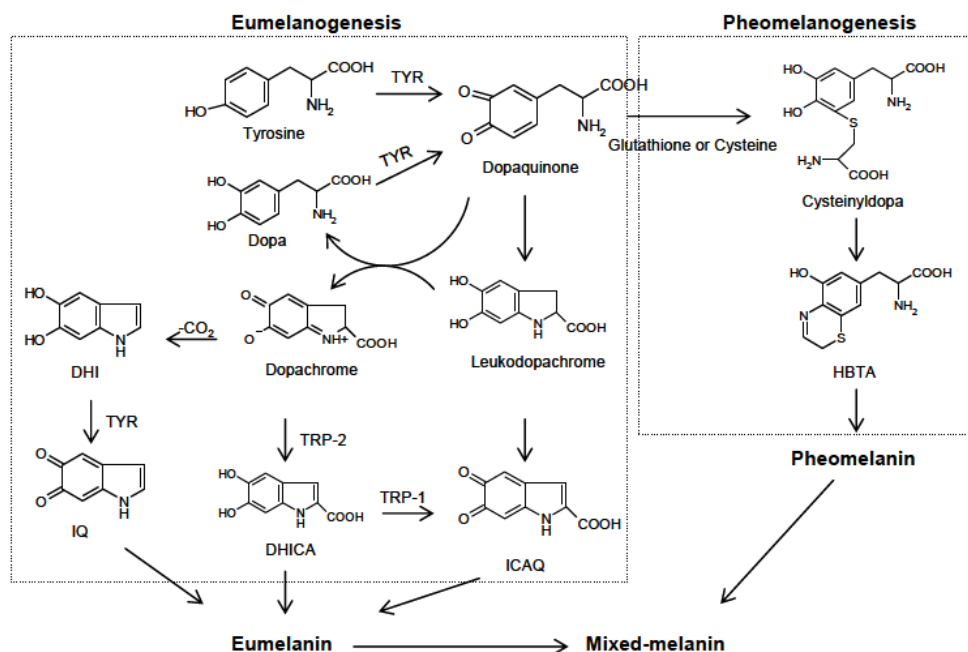


Figura 19. Via biossintética da melanina. TYR, tirosinase; TRP; proteína relacionada com tirosinase; dopa, 3,4-di-hidroxifenilalanina; DHICA, ácido 5,6-di-hidroxiindole-2-carboxílico; DHI, 5,6-di-hidroxiindole; ICAQ, ácido 5-indol-2-carboxílico-5-quinona; IQ, indole-5,6-quinona; HBTA, 5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina (CHANG, 2009).

Os inibidores da melanogênese se apresentam com seis diferentes propostas de ação, podem atuar reduzindo a *o*-dopaquinona a dopa, desta forma impedem a continuidade do processo, pois não formam dopacromo e melanina, por exemplo, o ácido ascórbico. Sequestradores de *o*-dopaquinona, sua presença retarda a melanogênese até que todo o sequestrador seja consumido, retomando assim as taxas originais do processo. Compostos fenólicos que competem com a dopa, pela interação com a enzima, evitando a formação de dopacromo, este processo não é considerado um mecanismo inibidor. Substâncias que inativam a ação da enzima, podem ser ácidos ou bases, que ao desnaturar a enzima inibem sua atividade. Há inativadores específicos de tirosinase, também chamado de “substrato suicida”, ao serem catalisados pela enzima ocorre uma ligação covalente que não se desfaz, ocorrendo a inativação irreversível da enzima. Por fim os inibidores específicos de tirosinase que se ligam de forma irreversível a enzima e reduzem sua capacidade catalítica (CHANG, 2009).

Dentre as drogas utilizadas no combate a melanogênese destaca-se a classe dos polifenóis que são os maiores grupos de inibidores da tirosinase. A principal via de ação inibitória desses fenóis é que eles são aceitos pela tirosinase como substrato. E sua ação inibitória depende da existência e da posição dos substituintes adicionais (CHANG, 2009).

Em sua revisão Chang destaca os polifenóis como inibidores de tirosinase. Dentre eles estão flavonoides, cujo modo inibitório geralmente está na inibição competitiva para a oxidação da L-dopa pela tirosinase e a porção 3-hidroxi-4-ceto da estrutura do flavonol atua como o papel chave na quelação do cobre. A **Figura 20 (Página 78)** mostra as principais flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonoides, chalconas e estilbenos que apresentam ação sobre esta enzima, alguns ensaios inclusive compararam a ação destas moléculas frente aos principais inibidores, o ácido kójico, tropolona e L-minosina (Grupo A).

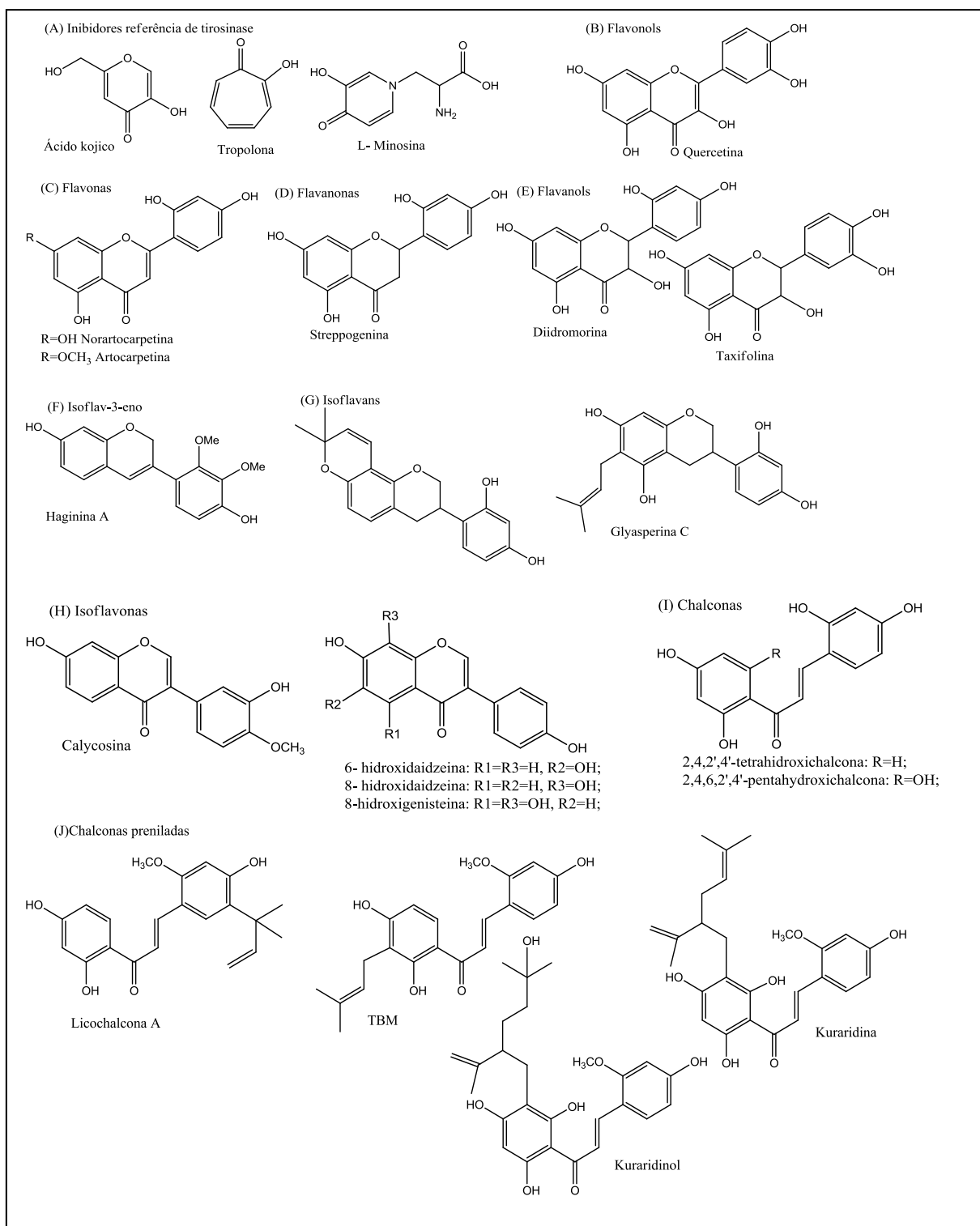


Figura 20. Flavonoides (B-J) que apresentaram atividade análoga aos padrões destacados no grupo (A).

4.3.5. Relevância do trabalho

Apesar de a literatura relatar um estudo fitoquímico *Cespedesia spathulata*, há poucas informações sobre a espécie, como demonstrado no tópico anterior. Seu potencial biológico e demais metabólitos ainda não foram devidamente explorados, ou ao menos, não relatados na literatura.

A literatura aponta extratos e metabólitos especiais isolados de espécies da família Ochnaceae com influência enzimática, como por exemplo, as biflavonas isoladas de *Ouratea spectabilis* com a capacidade de inibir a ação da aldose redutase (FELICIO et al., 1995), agatisflavona isolada de *Ouratea polyantha* apresentando potencial inibitório sobre a enzima G-6-pase (BERMÚDEZ et al., 2012). O biflavonoide 2'',3''-diidroochnaflavona, isolada de *Luxemburgia nobilis*, demonstrou influência sobre a topoisomerase I e II (PENUMALA et al., 2017). Os extratos obtidos de *Ochna obtusata* demonstraram influência sobre a ação das acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e α -glucosidase (OLIVEIRA et al., 2005). Baseado nesses estudos decidiu-se explorar os potenciais de influência enzimática dos extratos e substâncias isoladas de *C. spathulata* sobre a tirosinase.

No presente trabalho foi possível identificar um biflavonoide, duas flavan-3-ol, duas flavonas, uma sequência de metil ésteres, dois esteroides, e um álcool de cadeia longa (**Figura 23, Página 88**). A diversidade metabólica apresentada pela espécie revela-a como promissora fonte de moléculas bioativas entre as espécies da família Ochnaceae. Justificando-se, assim, a realização de estudos químicos e biológicos adicionais para a espécie *Cespedesia spathulata*

4.4. PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1. Materiais

Para o fracionamento cromatográfico em coluna de vidro foi utilizado gel de sílica 60 (230 - 400 ou 70 – 230 mesh) da Silicycle. Cromatografia por exclusão molecular utilizou-se Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich.

O acompanhamento por CCDA foi feita em cromatoplasmas de gel de sílica 60 F₂₅₆ sobre alumínio das marcas Silicycle e Sorbent. Utilizou-se para revelação das cromatoplasmas irradiação com luz ultravioleta (254-366 nm); revelador químico vanilina sulfúrica [(1g de vanilina em solução com 45 mL de água destilada (H₂O), 45 mL de etanol (CH₃CH₂OH) e 10 mL ácido sulfúrico (H₂SO₄)] seguido de aquecimento; solução aquosa 10% cloreto de alumínio (AlCl₃) e vapores de iodo.

4.4.2. Equipamentos

Utilizou-se evaporador rotativo Fisaton 801 para concentração dos extratos brutos e frações.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D) foram obtidos em espectrômetro Bruker ADVANCE II, 9,4 T (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C), espectrômetro de RMN com 11,5 T (500MHz para ¹H e 125MHz para ¹³C), central analítica IQ-UFRRJ. Como padrão interno para referência de deslocamento químico foi usado tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz).

Os cromatogramas e os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em cromatógrafo com fase gasosa, HP-5880 acoplado a espectrômetro de massas computadorizado HP-5897A de analisador de íons quadrupolo e ionização por impacto de elétrons, 70 eV, CG/EM Varian Saturn 2000 da UFRRJ.

As análises de CLAE foram feitas no equipamento HPLC Shimadzu LC-20AT, CBM-20A, ICE-UFRRJ, pela colaboração da Prof. ^a Dr.^a Rosane Nora Castro.

Espectros de massas de alta resolução foram obtidos por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas de Alta resolução (CLUE/EM-EM), no sistema UPLC-ESI-q-TOF (Acquity-Xevo, Waters), coluna Waters Acquity UPLC BEH C 18 (150 mm x 2,1 cm, 1,7 µm), temperatura de 40 °C e fases móveis de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, realizada na Embrapa Agroindústria Tropical, *Campus* do Pici - Fortaleza – CE.

4.4.3. Solventes

Nos processamentos cromatográficos foram utilizados solventes orgânicos grau analítico (P.A.) das empresas Vetec e Neon. Para as análises de RMN ¹H e ¹³C foram utilizados solventes deuterados (CDCl₃, C₅D₅N, DMSO-*d*₆, CD₃OD) da marca Tedia.

4.4.4. Softwares

O programa ACD/Labs (versão 12.0) e o MestReNova foram utilizados no processamento dos espectros obtidos nos experimentos de RMN.

As estruturas foram desenhadas nos programas ChemWindow ou ChemDraw Ultra 12.0.

Os espectros de massas de baixa resolução foram processados no programa GCMS Postrun Analysis (Shimadzu).

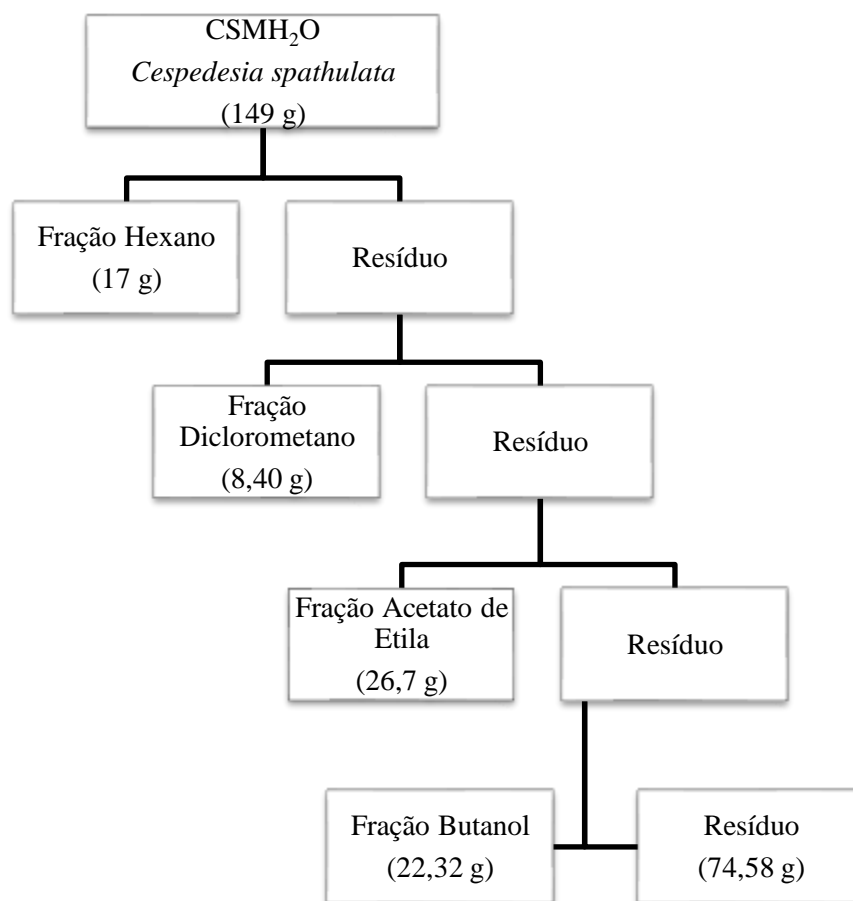
As interpretações dos espectros de massas de alta resolução foram feitas com o auxílio do software de espectrometria de massa MassLynx (Waters).

4.4.5. Material vegetal, coleta e preparo dos extratos

As folhas de *Cespedesia spathulata* foram coletadas em 05 de setembro de 2016 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro pelo pesquisador Dr. Marcus Nadruz, o registro da espécie foi feito no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, nº RB 777053. O material foi submetido à secagem a sombra e então pulverizado em moinho tipo Willey, etapa realizada no Instituto de Zootecnia da UFRRJ. Depois de triturado obtiveram-se 1,55 Kg de pó que então foram conduzidas ao processo de extração por maceração com hexano e solução hidrometanólica 20%. O extrato obtido com hexano rendeu 21,77 g e o hidrometanólico 242,23 g.

4.4.6. Partição dos extratos

Parte do extrato hidrometanólico obtido (149 g) foi conduzido a partição líquido-líquido com solventes orgânicos hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, respectivamente, nesta ordem. 149 g de extrato foram suspensas em solução metanólica 70% (350 mL), com auxílio de um funil de separação para realizar o processo de partição onde cada solvente, em ordem crescente de polaridade, foi utilizado por quatro vezes com um volume de 200 mL. Cada porção orgânica extraída foi conduzida a evaporação a pressão reduzida e seus rendimentos foram: CSMH₂O-Hexano 17 g, CSMH₂O-Diclorometano 8,40 g, CSMH₂O- Acetato de etila 26,7 g e CSMH₂O-Butanol 22,32 g. O **Fluxograma 4 (Página 81)** mostra o resumo desse procedimento.



Fluxograma 4. Partição do extrato hidrometanólico de *Cespedesia spathulata*.

4.4.7. Fracionamento da partição CSMH₂O-H

Separou-se 4,00 g da partição CSMH₂O-H (*Cespedesia spathulata* metanol água-hexano), e submeteu-se ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta com gel de sílica (70 – 230 mesh), utilizando 80,7 g para o recheio da coluna e 1,57 g de no preparo da pastilha. A eluição em gradiente crescente iniciou com hexano, diclorometano, acetato de etila, até metanol 100%. Foram coletadas 75 frações de 125 mL cada, que foram concentradas em rota evaporador, analisadas em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), e reunidas de acordo com suas similaridades, as frações utilizadas para fracionamento posterior estão apresentadas na **Tabela 13**.

Tabela 13. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição CSMH₂O-H.

Frações reunidas	Massa (g)	Eluente
10-11	(0,1941 g)	C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂ (90:10)
18-20	(0,4822 g)	C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂ (60:40)
24-26	(0,0929 g)	C ₆ H ₁₄ : CH ₂ Cl ₂ (40:60)

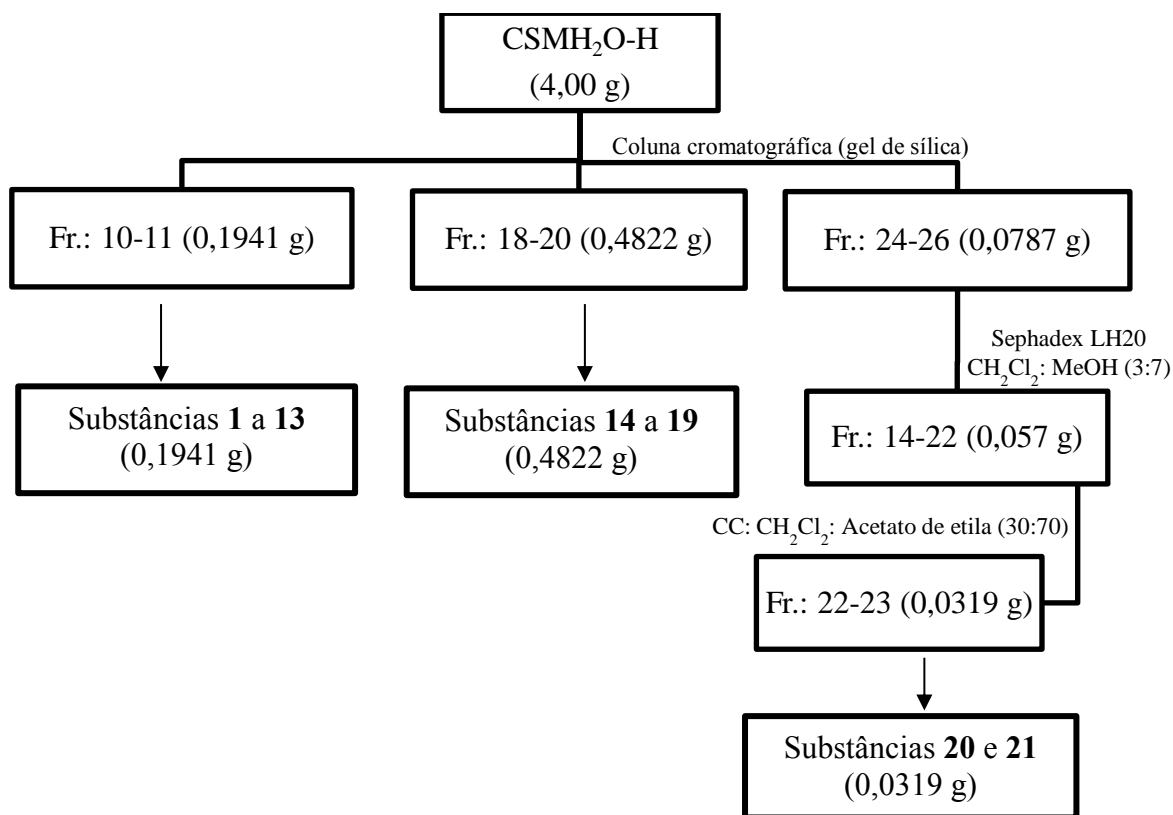
Após análise do perfil das frações por CCDA os grupos de frações 10-11 (0,1941 g) e 18-20 (0,4822 g) foram submetidas diretamente a análise com CG-EM, conduzindo à identificação de 19 substâncias, enquanto o grupo de frações 24-26 (0,0929 g) foi reconduzido a outro processo de fracionamento descrito no item a seguir. O **Fluxograma 5** esquematiza o

fracionamento desta partição e mostra em quais frações foi possível identificar respectivas substâncias **1-19**.

As análises por cromatografia a gás aplicada as frações selecionadas da partição CSMH₂O-H ocorreram sobre as seguintes condições: o equipamento usado foi o GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu), a coluna HP-5 (30X0.25X0.25), a injeção tipo Split e a temperatura da injeção 250 °C, corrida em gradiente de temperatura, iniciando em 60 °C e terminando em 290 °C; o tempo de análise durou 40 minutos.

4.4.7.1. Fracionamento de CSMH₂O-H 24-26

O grupo CSMH₂O-H-24-26 (0,0787 g) foi fracionado em sephadex LH-20, eluindo com diclorometano: metanol (3:7). Coletou-se 23 frações de aproximadamente 10 mL cada, que foram analisadas em CCDA, as frações que apresentaram perfil similar foram reunidas formando o grupo 14-22 (52 mg). Foi feita uma coluna filtrante do material reunido, eluída com mistura de diclorometano e acetato de etila em polaridade crescente. Foram coletadas 24 frações e analisadas em CCDA. Obtendo-se 45,1 mg de CSMH₂O-H-24/14(18-23) que apresentaram perfil similar e foram encaminhadas para análises de RMN¹H e ¹³C, e CG-EM. Nesta amostra foram identificadas as substâncias **20 e 21**.



Fluxograma 5. Resumo do fracionamento e identificação das substâncias identificadas em CSMH₂O-H.

4.4.7.2. Preparação de tio éter

A análise por CG-EM da fração CSMH₂O-H 10-11 revelou a presença de um éster insaturado, cuja definição da posição da ligação dupla foi feita através de uma reação de adição à dupla (**Figura 21**) utilizando o método proposto por Carvalho e colaboradores (2000). Em um balão de 50 mL foram adicionados dimetildissulfeto (2,0 mL), a fração contendo o éster insaturado (5 mg), um agitador magnético e 0,5 mL de uma solução clara de I₂ em dimetildissulfeto (3 mL). O balão foi fechado com um septo e purgado com argônio usando duas agulhas. Após agitação por 24 horas à temperatura ambiente, a reação foi encerrada. O produto foi analisado através de injeção direta no cromatógrafo a gás acoplado com espectrômetro de massas (CG-EM).

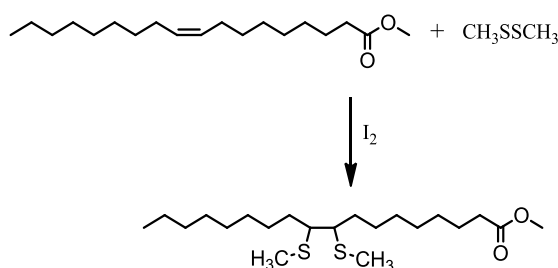


Figura 21. Reação de derivatização do éster metílico insaturado (Z) 9-octadecenoato.

4.4.8. Fracionamento da partição CSMH₂O-D

A partição CSMH₂O-D (*Cespedesia spathulata* metanol água - diclorometano) foi fracionada em coluna aberta com gel de sílica, no recheio da coluna foi usado 76,9 g de sílica. A partição (3,05 g) foi solubilizada em metanol e incorporado em sílica gel (6,89 g) para a confecção da pastilha. A coluna foi eluída com os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila e metanol, individualmente ou em mistura binária de forma a obter um gradiente crescente da polaridade. Foram coletadas 36 frações de 125 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo. O perfil de metabólitos presentes em cada uma das frações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e, de acordo com a similaridade, as frações foram reunidas e pesadas, os grupos reunidos estão descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição CSMH₂O-D.

Frações Reunidas	Massa (g)	Eluente
11-12	0,1085	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (60:40)
18-20	0,0567	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (20:80)
20-22	0,0135	AcOEt
23-24	0,3786	AcOEt: MeOH (90:10)
25-27	0,0014	AcOEt: MeOH (70:30)

A informação obtida pela CCDA revelou a presença de uma mancha principal amarelada nas frações 23-24, elas então foram reunidas e selecionadas para o refração, descrito no item a seguir.

4.4.8.1. Fracionamento de CSMH₂O-D 23-24

As frações de número 23-24, recolhidas em uma faixa de solvente de AcOEt: MeOH (90:10), apresentaram semelhança na CCDA, foram reunidas e conduzidas à fracionamento em sephadex LH20, eluindo com solução CH₂Cl₂: MeOH (30:70). O fracionamento de CSMH₂O-D 23-24 (0,378 g), produziu 42 frações das quais as de número 40 a 42 apresentaram uma mancha amarela majoritária, ao revelar com vanilina sulfúrica, foram reunidas (0,0051 g) e analisadas por RMN ¹H e ¹³C, e EM-AR, nesta fração foi possível identificar o biflavonoide ochnaflavona (**22**).

4.4.9. Fracionamento da partição CSMH₂O-A

O extrato CSMH₂O-A (*Cespedesia spathulata* metanol água - acetato de etila) foi fracionado em coluna aberta com gel de sílica, no recheio da coluna foi utilizado 84,14 g de sílica. O extrato (7,20 g) foi solubilizado em metanol e incorporado em sílica gel para a confecção da pastilha. A coluna foi eluída com os solventes orgânicos diclorometano, acetato de etila e metanol, individualmente ou em mistura binária de forma a aumentar a polaridade gradualmente. Foram coletadas 67 frações de 125 mL cada, que foram concentradas em evaporador rotativo. O perfil de metabólitos presentes em cada uma das frações foi acompanhado por CCDA e, de acordo com a similaridade, as frações foram reunidas e pesadas, cada grupo formado está descrito na **Tabela 15**.

Tabela 15. Grupos de frações reunidos a partir do fracionamento da partição CSMH₂O-A.

Frações Reunidas	Massa (g)	Eluente
7-9	0,0295	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (90:10)
12-13	0,0288	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (80:20)
24-26	0,0368	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (40:60)
27-29	0,0291	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (30:70)
32-33	0,0441	AcOEt
35	2,0734	AcOEt
36-37	0,0677	AcOEt

Os grupos de frações 24 a 26 e a fração 35 foram selecionados para o fracionamento subsequente. A escolha foi feita pelo perfil apresentado em placa cromatográfica, apresentando poucas manchas e boa resolução. O **Fluxograma 6 (Página 86)** esquematiza o fracionamento desta partição e indica as substâncias que foram identificadas a partir dessa partição.

4.4.9.1. Fracionamento de CSMH₂O-A 24- 26

As frações de 24-26 apresentaram uma mancha vermelha majoritária quando acompanhadas em CCDA, utilizando vanilina sulfúrica como revelador, ela foram então conduziu-se a fracionamento em sephadex LH-20, utilizando metanol como eluente. A

fracionamento de 24-26 (0,0368 g) produziu 16 frações. A mancha vermelha predominou nas subfrações de número 11-15 (0,0304 g), estas frações foram reunidas e conduzidas então a análises de RMN ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais. Nesta amostra foi possível identificar a presença das substâncias catequina (**23**) e epicatequina (**24**).

4.4.9.2. Fracionamento de CSMH₂O-A 35

A fração de número 35 (2,0734 g) apresentou um precipitado que foi separado por solubilização parcial em uma mistura de acetado de etila: metanol (40:60), a parte solúvel (1,782 g) foi submetida a fracionamento em sephadex LH-20, eluída em metanol, obtiveram-se 90 frações que foram acompanhadas por CCDA e reunidas de em grupos acordo com a similaridade.

- A sequência de 20-23 (0,0508 g) foi reconduzida ao fracionamento em sephadex LH-20, eluído com metanol, onde as de número 14-17 (0,0190 g) foi mais uma vez fracionada em sephadex LH-20 onde um grupo de frações foi reunido, 9-14 (0,010 g), e então conduzida ao fracionamento por purificada em CLAE-DAD.

Os parâmetros cromatográficos foram injetor manual Rheodyne, detector DAD SPD-M20A, forno CTO-20A, coluna Betasil-Thermo C18 (25cm x 4,6mm x 5 μm), sistema isocrático: FM= B: MeOH (35%) e H₂O: AcOH 1%(65%), gradiente T= (15 min 30- 70%; 17 min 15-85%; 19min 35-65%), temperatura do forno 26 °C, fluxo 1,0mL/min-340nm(PDA 200-500nm), pressão= 161kgf/com e volume 20UI. Esta atividade teve a colaboração da prof.^a Dr.^a Rosane Nora Castro.

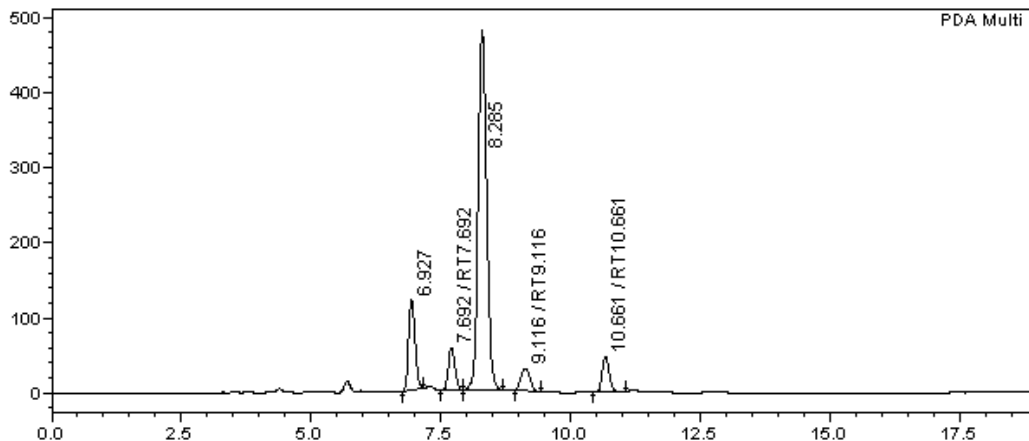
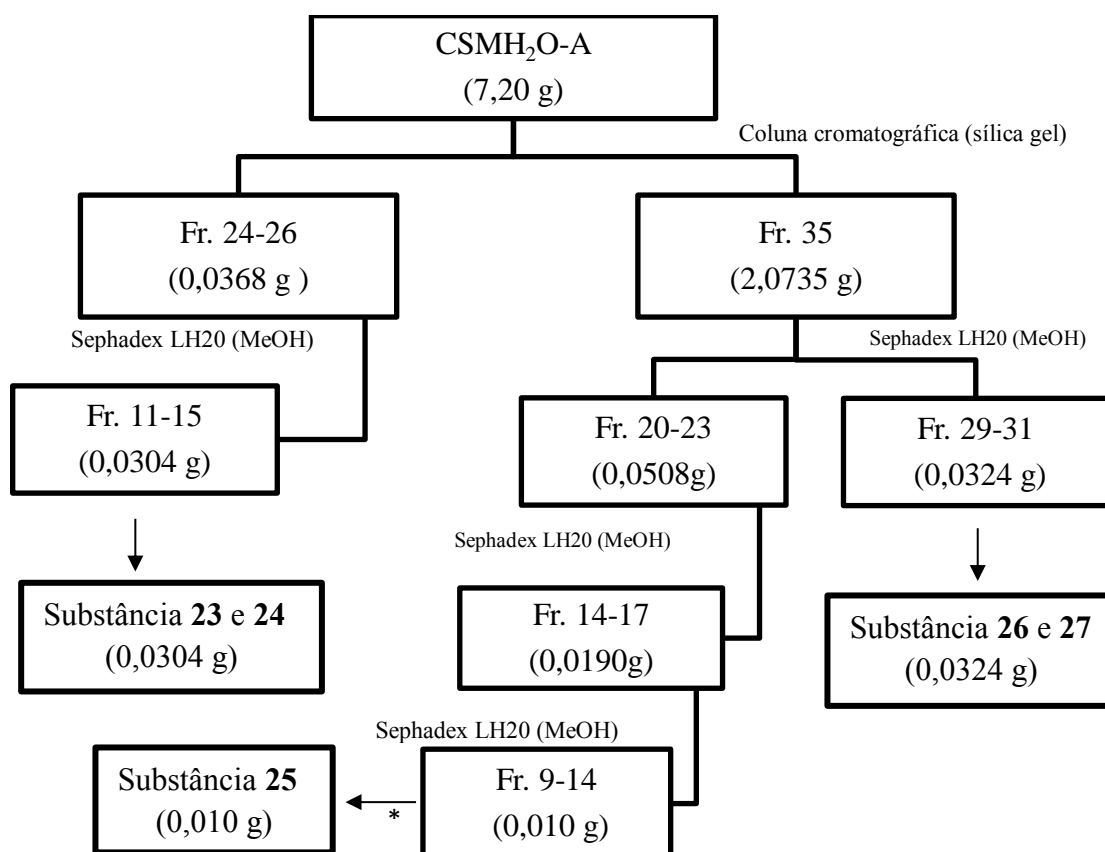


Figura 22. Cromatograma da fração CSMH₂O-A 35/20/14-17/ 9-14.

Da fração de código 9-14 foi isolado o pico majoritário, com tempo de retenção em 8,285 min, CLAE-DAD semi-preparativo e através de análises de RMN ^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais, e EM-ESI MS/MS conduziu a identificação da substância 6''-O- acetil-vitexina (**25**).

- As frações de número 29 a 31 (0,0251 g) foram submetidas a análise por RMN ^1H e ^{13}C , e seu perfil foi analisado via CLAE-UV. O cromatograma apresentado na figura a seguir demonstra a presença de suas substâncias majoritárias com tempo de retenção 4,85 min e

6,01 min. A interpretação dos dados obtidos por RMN permitiu identificar as duas substâncias majoritárias como vitexina (**26**) e orientina (**27**).



* Purificação via CLAE-UV.

Fluxograma 6. Fracionamento e identificação das substâncias isoladas na partição CSMH₂O-A.

4.4.10. Ensaio Biológico

4.4.10.1 Efeito modulador de extratos e substâncias isoladas sobre a ação da enzima tirosinase.

4.4.10.2 Seleção de amostras e substâncias para o ensaio

Compostos polifenólicos são biossintetizados como metabólitos secundários em plantas superiores, apresentando algumas atividades biológicas importantes desde a proteção contra radiações até a inibição de diferentes enzimas. Alguns flavonoides, por exemplo, o canferol, quercetina e morina demonstram atividades de inibição da tirosinase enquanto outras, como exemplo, as catequinas, podem atuar como cofatores ou substrato para a tirosinase (BAYAILA BA NJOCK et al., 2012). Nesse sentido, a triagem do potencial regulador da tirosinase foi avaliada a partir de alguns extratos, flavonoides e biflavonoide presente nas folhas de *Cespedesia spathulata*.

As partições de diclorometano e acetato de etila, CSMH₂O-D e CSMH₂O-A, respectivamente, foram selecionados para a realização deste ensaio. Individualmente foram

preparadas soluções em DMSO com concentração 10 mg ml⁻¹. Algumas substâncias isoladas a partir destes extratos que apresentaram massa suficiente para o teste também foram testadas. São elas, ochnaflavona (oriunda da partição diclorometano) e a mistura de catequina e epicatequina (isoladas em mistura da partição acetato de etila). A partir destes isolados foram preparadas duas soluções de concentração 10 mmol ml⁻¹ cada.

4.4.10.3 Metodologia de análise

Determinou-se a influências dos extratos e frações analisadas sobre a ação da tirosinase através da exposição de alíquotas com diferentes concentrações das soluções preparadas sob o meio reacional contendo tirosinase (50-70 unidades), EDTA (0,022 mmol L⁻¹), o substrato L-DOPA (0,17 mmol L⁻¹), em tampão de fosfato (50 mmol L⁻¹, pH 6,8) a temperatura ambiente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A formação da dopaquinona foi determinada após trinta minutos através do monitoramento da absorvância utilizando o espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo Mini 1240, Japão, a 475 nm e à temperatura ambiente. O percentual de inibição ou ativação para cada extrato ou substâncias foi calculado através da equação proposta por Soares e colaboradores (2017).

$$\% \text{ Inibição ou Ativação} = \{[(B_{30} - B_0) - (A_{m30} - A_{m0})] / (B_{30} - B_0)\} \times 100 \quad (1)$$

Nesta equação, B₀ e B₃₀ são os valores de absorvância de controle (L-DOPA + tirosinase) no tempo zero e no tempo 30 minutos, respectivamente. A₀ e A₃₀ são as absorvâncias do teste (L-DOPA + tirosinase + inibidor/ativador) no tempo zero e após 30 minutos, respectivamente.

4.4.10.4 Determinação do mecanismo de ativação sobre a tirosinase

O gráfico de Lineweaver-Burk avalia o mecanismo de inibição da enzima tirosinase pela oxidação da L-DOPA. Este gráfico expressa os parâmetros cinéticos da ação da enzima pelas variáveis *K_m* e *V_{max}*. Pelo perfil ativador apresentado pela fração acetato de etila e pela mistura de catequinas, suspeitou-se que essas matrizes apresentaram efeito competitivo pelo sítio da enzima e com isso aplicamos um mecanismo diferenciado na produção de pontos para o gráfico. Nesta análise foi utilizada diferentes concentrações de L-DOPA (0; 167; 233 e 333 μmol mL⁻¹) como substrato competidor e diferentes concentrações para a mistura de catequinas (33; 50; 100, 166, 233 e 333 μmol mL⁻¹), sendo este o substrato preferencial. Após a incubação por 30 minutos a temperatura ambiente, a absorvância foi medida em 475 nm, a absorção foi determinada no intervalo de 0 a 60 minutos, com 10 minutos de entre os intervalos.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O processamento cromatográfico dos extratos de folhas de *Cespedesia spathulata* resultou no isolamento e identificação de vinte e cinco substâncias apresentadas na **Figura 23**. A elucidação das mesmas foi realizada através de análises espectrais e por comparações com dados da literatura. O detalhamento do procedimento de elucidação será descrito nos próximos tópicos.

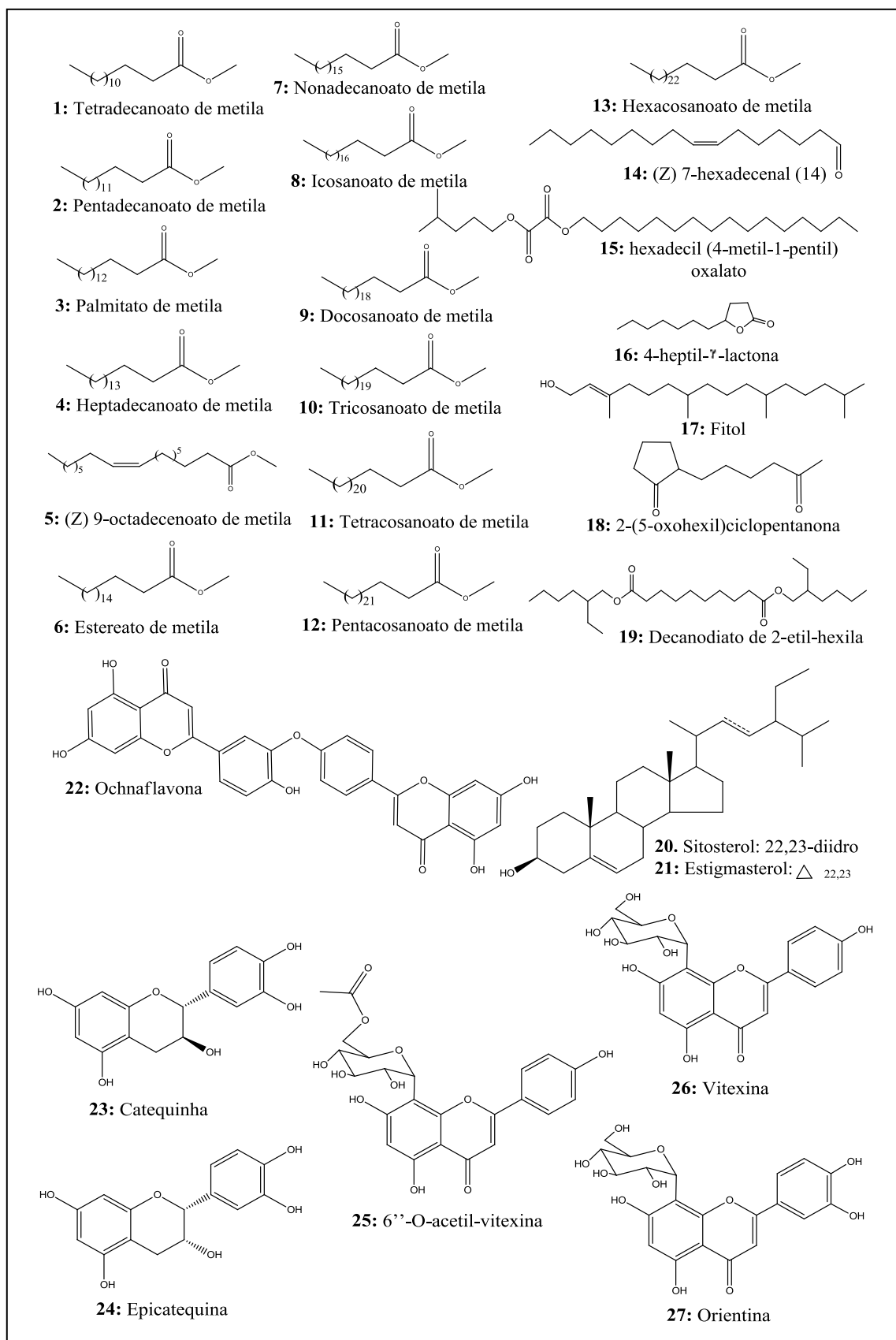


Figura 23. Substâncias identificadas nas folhas de *Cespedia spathulata*.

4.5.1. Identificação das substâncias presentes na fração CSMH₂O-H 10-11

A interpretação dos dados obtidos na análise via CG-EM (**Figura 23, Página 88**) e espectros de RMN ¹H e ¹³C da fração CSMH₂O-H 10-11 (**Espectro 44 e 45, Página 92**) permitiram a identificação de uma mistura de ésteres metílicos graxos. Os ésteres metílicos saturados com mais de cinco carbonos, ao serem bombardeados com elétrons de alta energia dão origem a fragmentos de tipo íons de alquila e íons contendo oxigênio da função éster. De um modo geral, a fragmentação dos ésteres metílicos apresenta o pico do íon molecular pouco intenso. Em comparação com o pico base, a intensidade do pico do íon molecular tende a aumentar com o aumento do tamanho da cadeia. Os treze componentes principais (**Figura 26, Tabela 16, Página 90 e 91**) foram identificados através da comparação com a biblioteca NIST, com similaridade superior a 90 %. Comparando os espectros de massas de cada substância identificada (**Figura 24**) destacam-se a presença de íons comuns como o *m/z* 74, massa típica verificada após o rearranjo de McLaferty, e os íons *m/z* 87, 101, 115 e 129 correspondentes a perda radicalar e formação de um cátion heterocíclico de quatro, cinco, seis e sete membros, respectivamente, todos justificados na **Figura 25**.

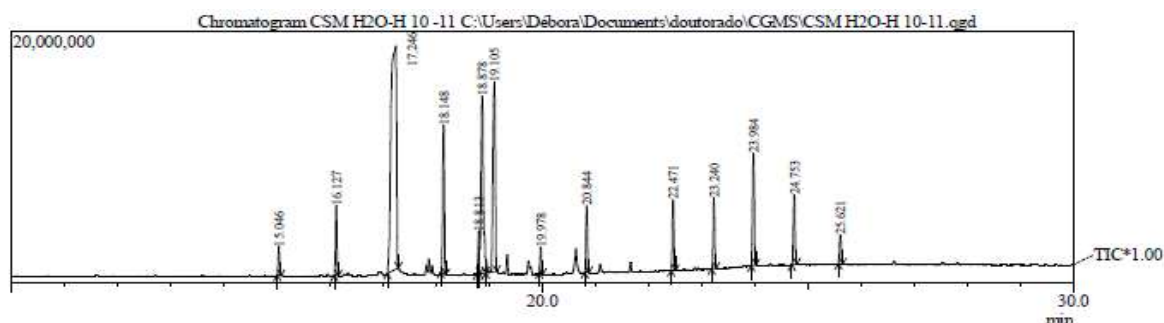


Figura 24. Cromatograma da fração CSMH₂O-H 10-11.

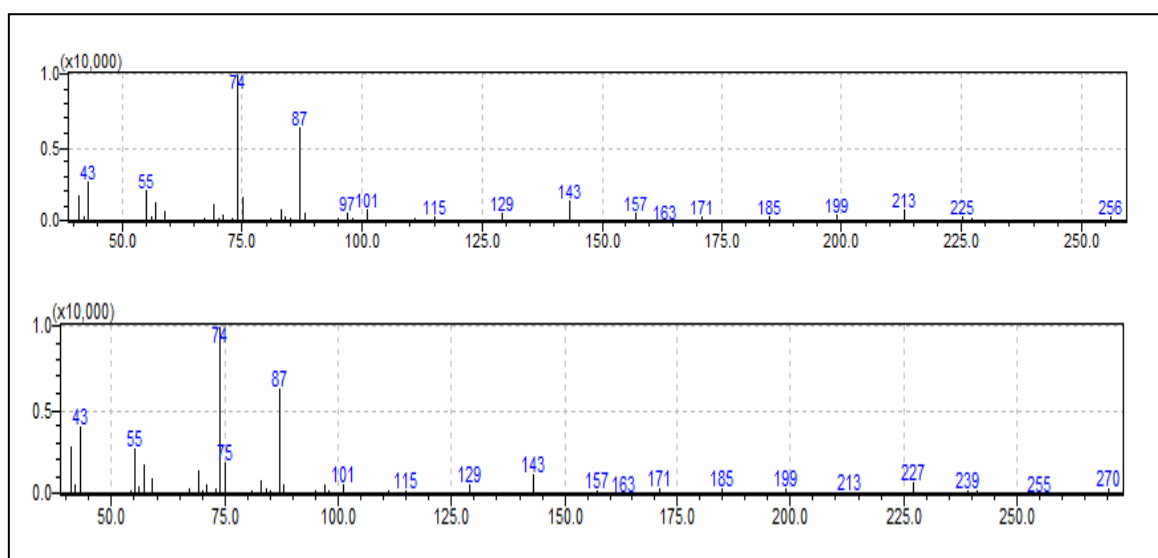


Figura 25. Espectro de massas da substância com *t_R* 16,1, 17,3 e 18.1 min (continua).

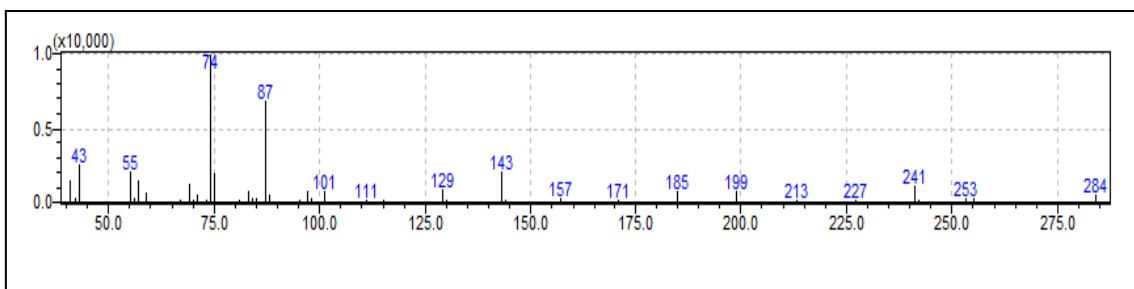


Figura 25. Continuação.

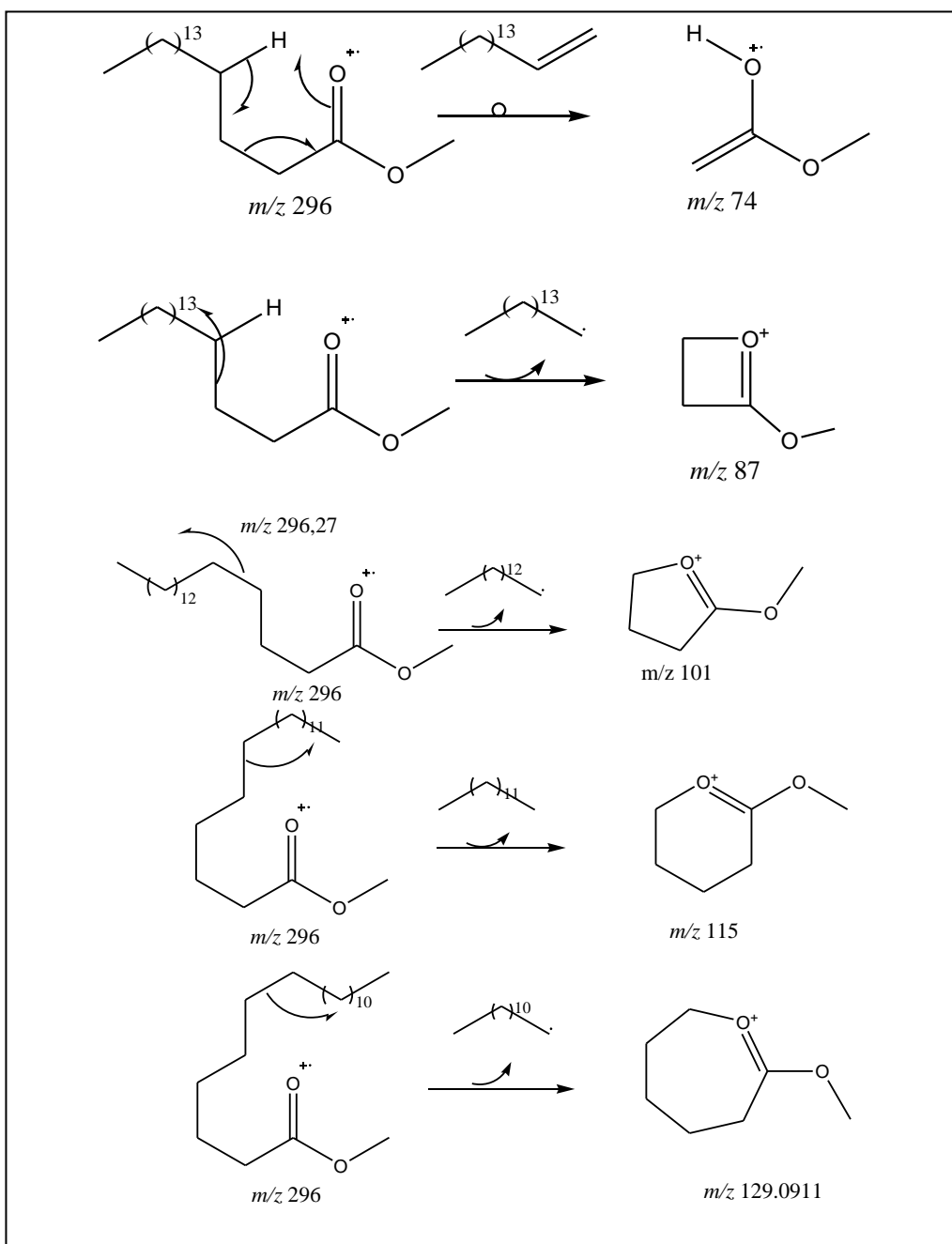


Figura 26. Proposta de fragmentação justificando os íons m/z 74, 87, 101 e 129, presentes nos espectros de massa dos ésteres graxos.

Tabela 16. Substâncias identificadas por CG-EM em CSMH₂O-H 10-11.

	t_R	Substância identificada	Similaridade biblioteca	Porcentagem
1	15.033	Tetradecanoato de metila	96	1.22
2	16.117	Pentadecanoato de metila	97	3.00
3	17.242	Palmitato de metila	97	37.94
4	18.142	Heptadecanoato de metila	96	7.50
5	18.867	(Z) 9-octadecenoato de metila	95	13.07
6	19.100	Estearato de metila	96	13.73
7	19.967	Nonadecanoato de metila	97	1.10
8	20.833	Icosanoato de metila	94	2.96
9	22.467	Docosanoato de metila	93	3.31
10	23.233	Tricosanoato de metila	94	3.24
11	23.975	Tetracosanoato de metila	92	5.68
12	24.742	Pentacosanoato de metila	93	3.54
13	25.617	Hexacosanoato de metila	93	1.55

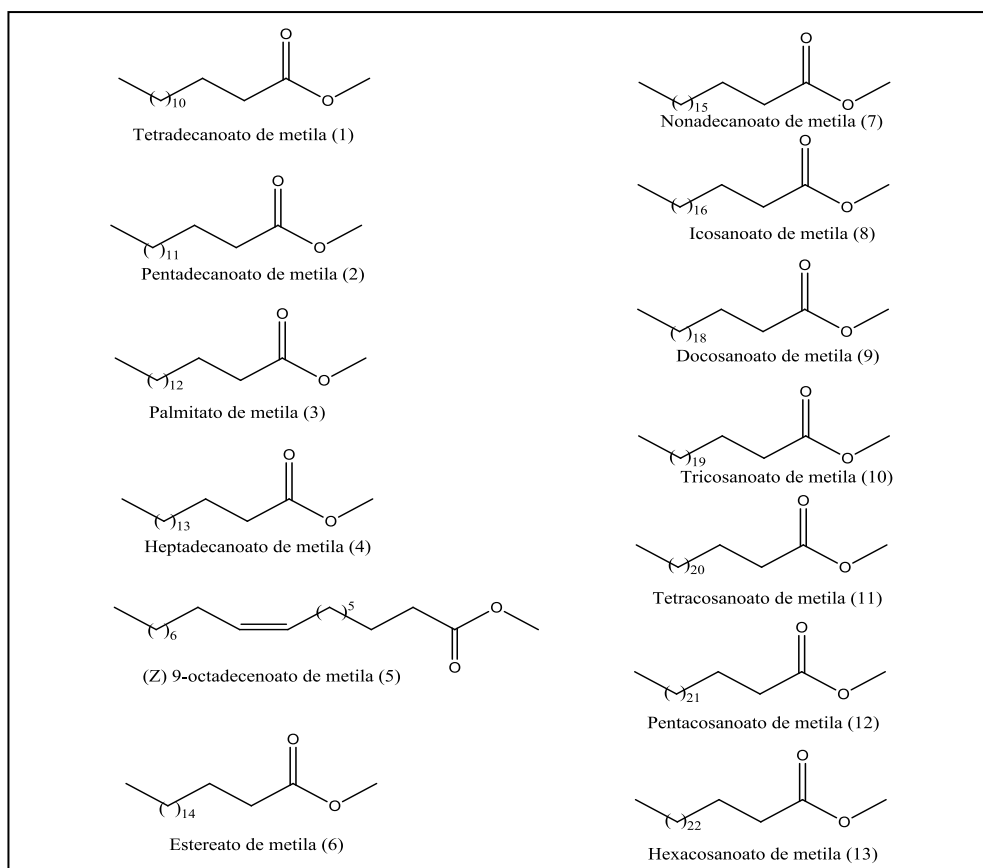
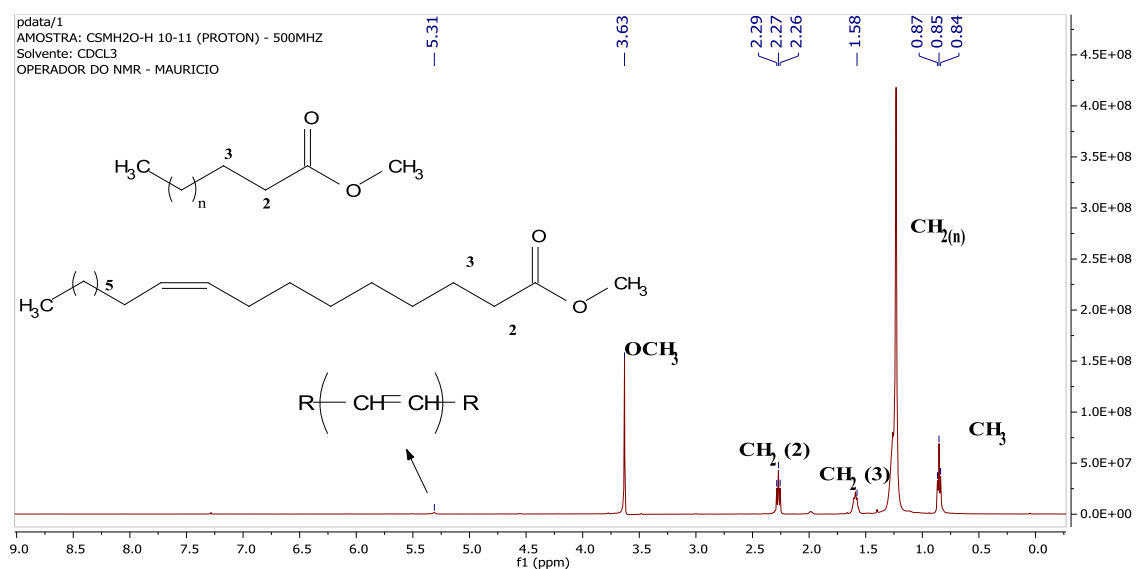
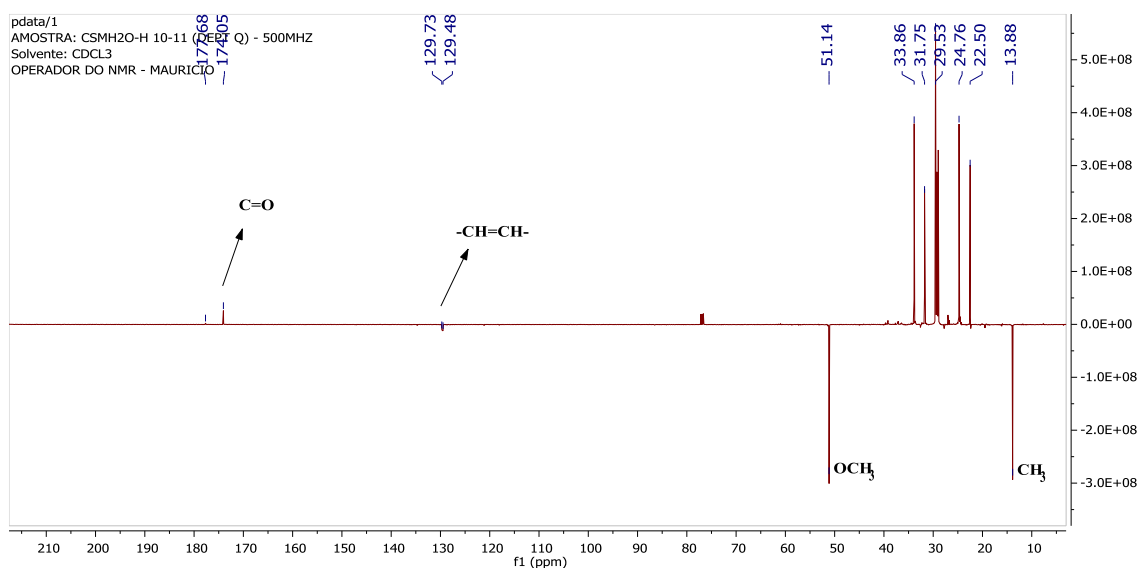


Figura 27. Estruturas das substâncias identificadas na fração CSMH₂O-H 10-11.

A interpretação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura permitiu perceber informações que confirmaram as estruturas propostas. Na figura 13 pode-se observar os valores de deslocamento químico típicos para os hidrogênios de CH_3 alifático em δ_{H} 0,84 (t), os deslocamentos do CH_2 α e β à carbonila em δ_{H} 1,98 (t) e δ_{H} 2,27 (t), respectivamente. O sinal em δ_{H} 3,63 (s) corresponde a metila do éster. O sinal em δ_{H} 5,31 corresponde ao deslocamento químico dos hidrogênios da instauração da substância (Z) 9-octadecenoato de metila. Na interpretação do espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 45**) são observados sinais de carbonos metílicos (δ_{H} 51,14 e 13,88), metilênicos (vários valores de cadeias alifáticas) e os metínicos sp^2 em δ_{H} 129,73 e 129,48. Os deslocamentos em 174,05 e 177,68 correspondem aos valores típicos de carboxilas de éster.



Espectro 44. Espectro de RMN ^1H da fração CSMH $_2$ O-H 10-11 (500 MHz) em CDCl $_3$.



Espectro 45. Espectro de RMN ^{13}C (DEPTQ) (125 MHz; CDCl $_3$) da fração CSMH $_2$ O-H 10-11.

A substância (Z) 9-octadecenoato de metila (**5**), é o único éster insaturado identificado na amostra CSMH₂O-H 10-11, de acordo com a interpretação da análise de RMN realizada e do espectro de massas não foi possível determinar a posição da dupla ligação ao longo da porção alifática do éster. As figuras 12 e 13 apresentam o espectro de massas correspondente a substância **5** e a proposta de fragmentação que justificam os íons produzidos, respectivamente.

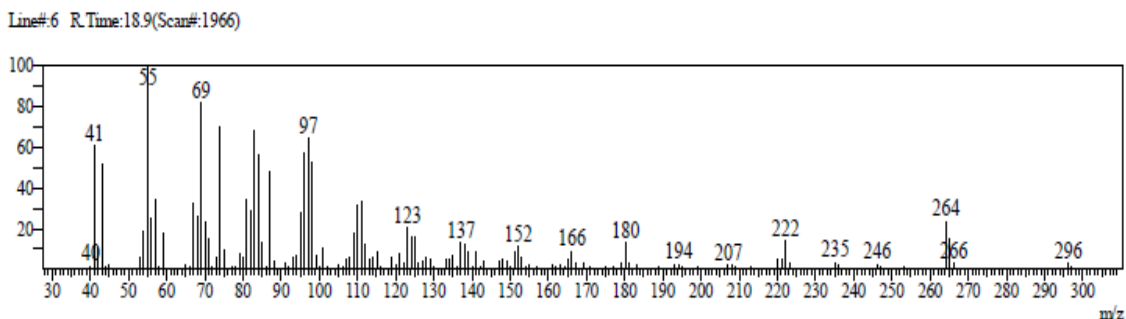


Figura 28. Espectro de massas antes da reação de adição do dimetildissulfeto da substância (Z) 9-octadecenoato de metila com tempo de retenção 18.8.

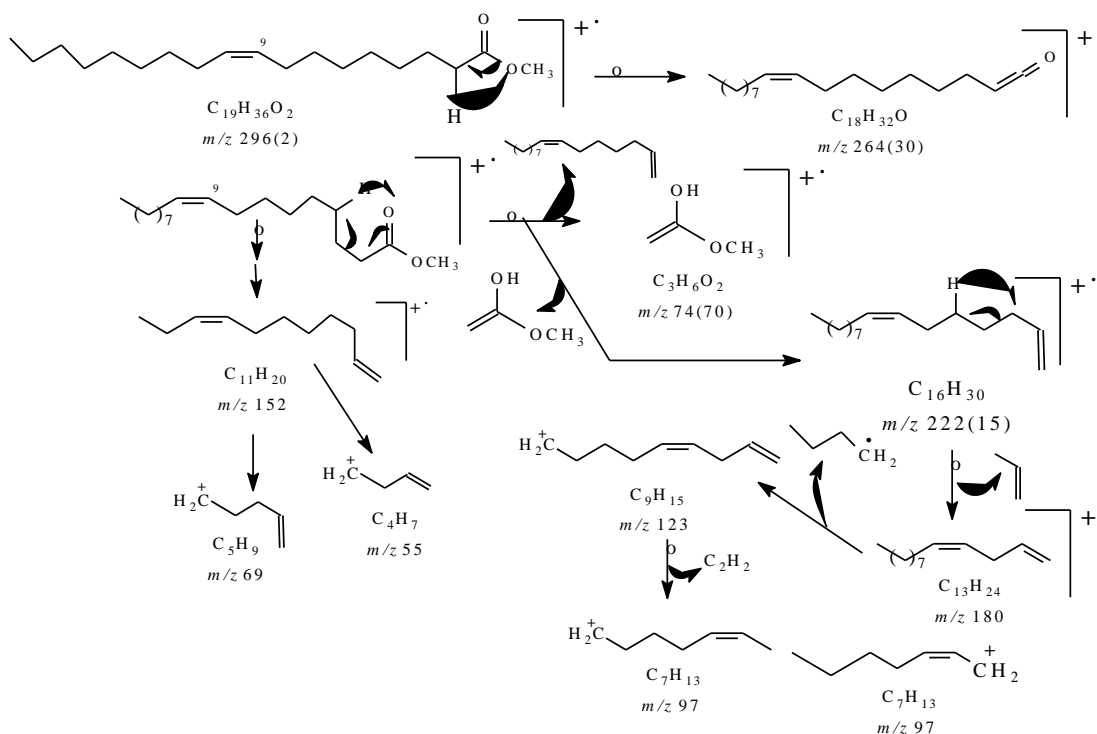


Figura 29. Proposta de fragmentação que justifica os principais picos detectados no espectro de massas do (Z) - 9 - octadecenoato de metila.

A localização da ligação dupla foi feita após submetermos a amostra à reação de adição à ligação dupla utilizando como substituinte o reagente dimetildissulfeto (**4.4.7.2., Página 83**), o resultado desta análise está apresentado no item a seguir.

4.5.1.1. Análise do ditiometil éter, derivado do éster insaturado

O produto da reação de adição de ditiometil éster da amostra CSMH₂O-H 10-11 foi submetido a análise por CG-EM, segundo as condições de análise, obteve-se o cromatograma (**Figura 30**), a substância com tempo de retenção 24,01 min corresponde ao produto, seu espectro está destacado na **Figura 31**. A **Figura 32 (Página 94)** mostra as propostas de fragmentação para justificar os principais picos detectados. Merecem destaques os picos em m/z 173 (90 %) e 217 (100 %), que justificam a quebra da ligação que sustenta os grupos tiometílicos. Valores que estão de acordo com localização desses grupos nas posições 9-10. Sendo assim, a ligação dupla foi localizada nos carbonos 9 e 10.

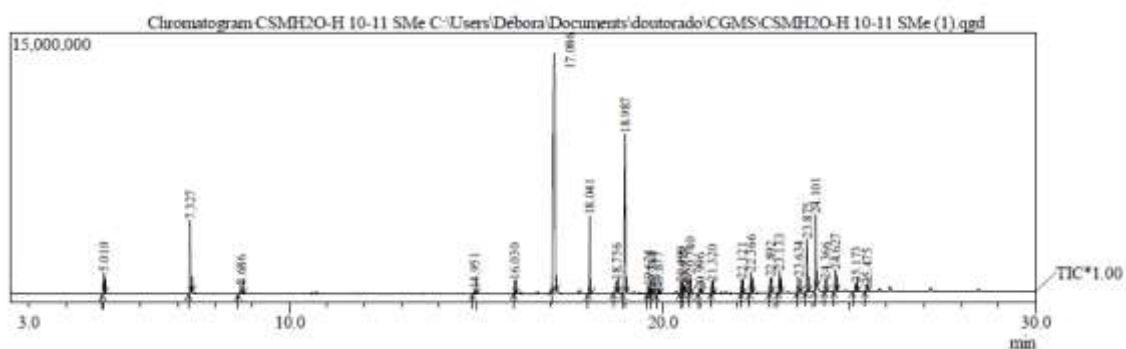


Figura 30. Cromatograma da fração CSMH₂O-H (MeS).

Line#:24 R.Time:24.1(Scan#:2593)

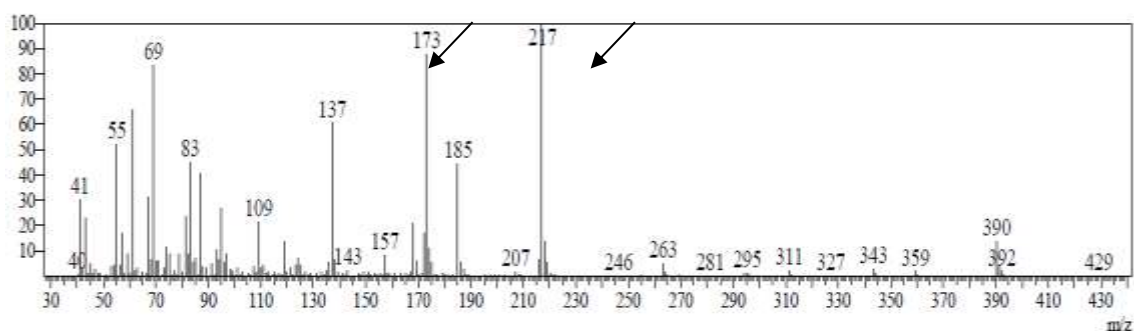


Figura 31. Espectro de massas do produto da reação 9,10-ditiometiléter dodecanoato de metila.

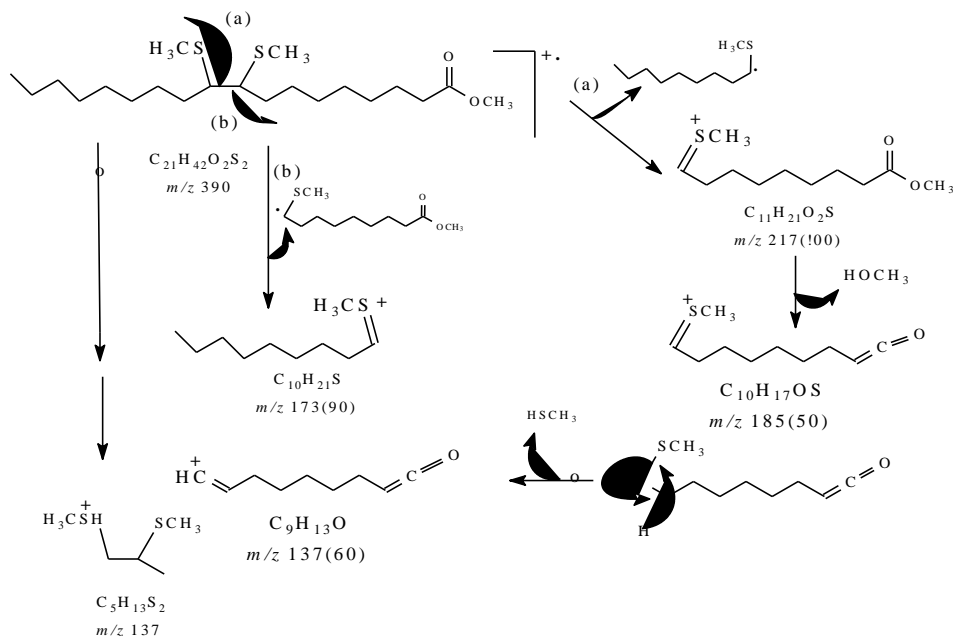


Figura 32. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos detectados no espectro de massas do derivado 9,10-ditiometiléter obtido do (Z) 9-octadecenoato de metila.

4.5.2. Identificação das substâncias presentes na fração CSMH₂O-H 18-20

O cromatograma da fração CSMH₂O-H 18-20 esta apresentado na **Figura 33**. O principal componente desta fração apresentou tempo de retenção 19,11 que foi identificado como fitol, constituindo quase 86% do material analisado. Os componentes minoritários, propostos de acordo com a biblioteca, estão apresentados na **Tabela 17** e **Figura 34**. Assim como a amostra anterior, fez-se análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (**Espectros 46, 47 e 48, Páginas 97 e 98**) que confirmaram a presença do fitol como componente principal na fração. A pequena quantidade dos demais componentes não conduziu a detecção de sinais de deslocamentos químicos que confirmassem os mesmos. Os dados, apresentados na **Tabela 17**, estão de acordo com literatura (GOODMAN et al., 1973). O fitol é um álcool terpênico alílico constituinte de parte da clorofila, frequente em plantas e com diversas atividades biológicas. Como exemplo pode-se destacar a ação bactericida; é usado, também, em tratamento de tuberculose, obesidade, diabetes e dislipidemia (GOTO et al., 2005).

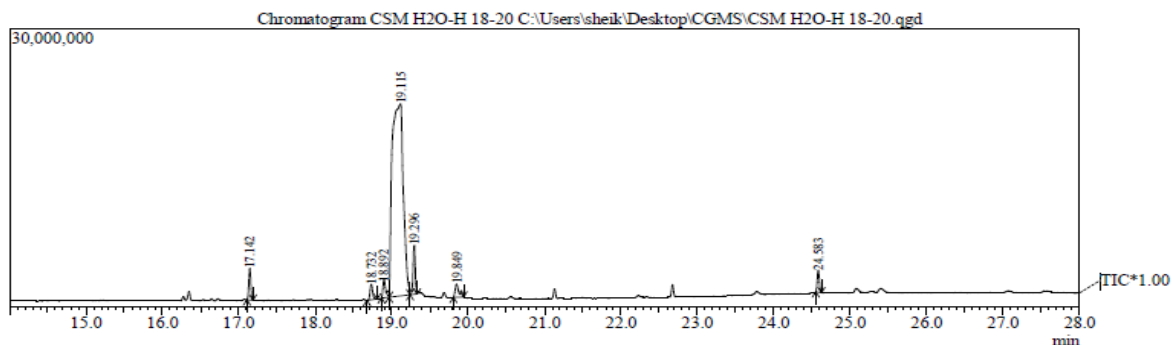
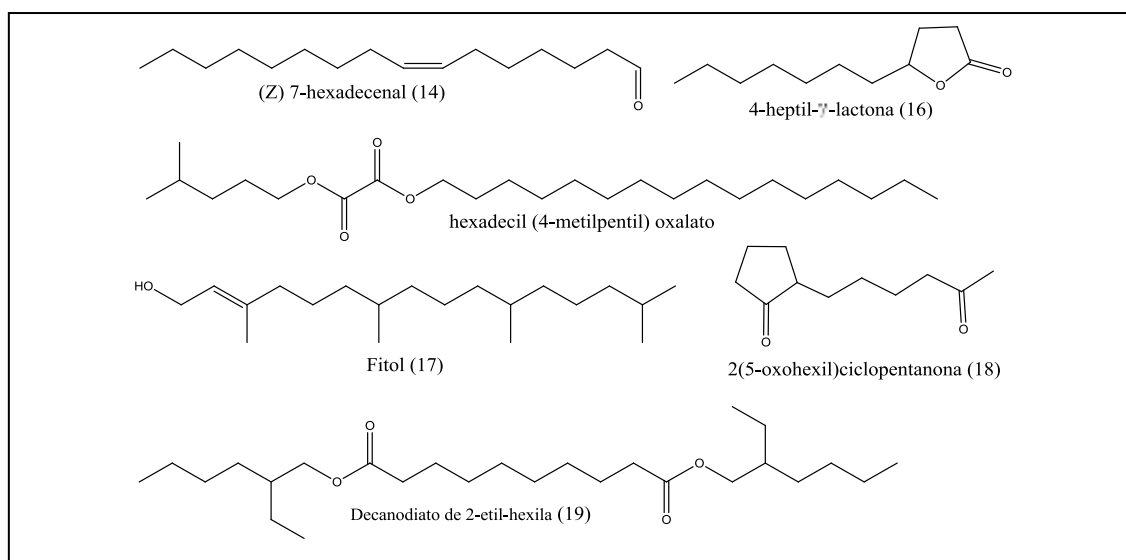


Figura 33. Cromatograma da fração CSMH₂O-H 18-20.

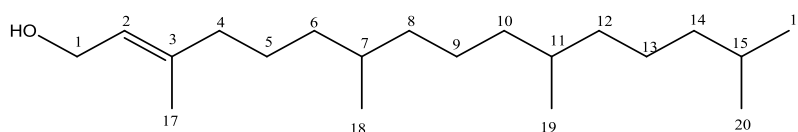
Tabela 17. Substâncias identificadas na fração CSMH₂O-H 18-20.

Nº	t _R	Substâncias identificadas	Similaridade biblioteca	Porcentagem
14	17,133	(Z) 7-hexadecenal	84	2,44
15	18,725	Oxalato de hexadecil, 4-metil-1-pentila	84	1,61
16	18,883	4-heptil- γ -lactona	85	2,32
17	19,108	Fitol	98	85,43
18	19,292	2 (5-oxohexil) ciclopentanona	82	4,23
	19,842	Não identificado	85	2,11
19	24,575	Decanodiato de 2-etil-hexila	95	1,86

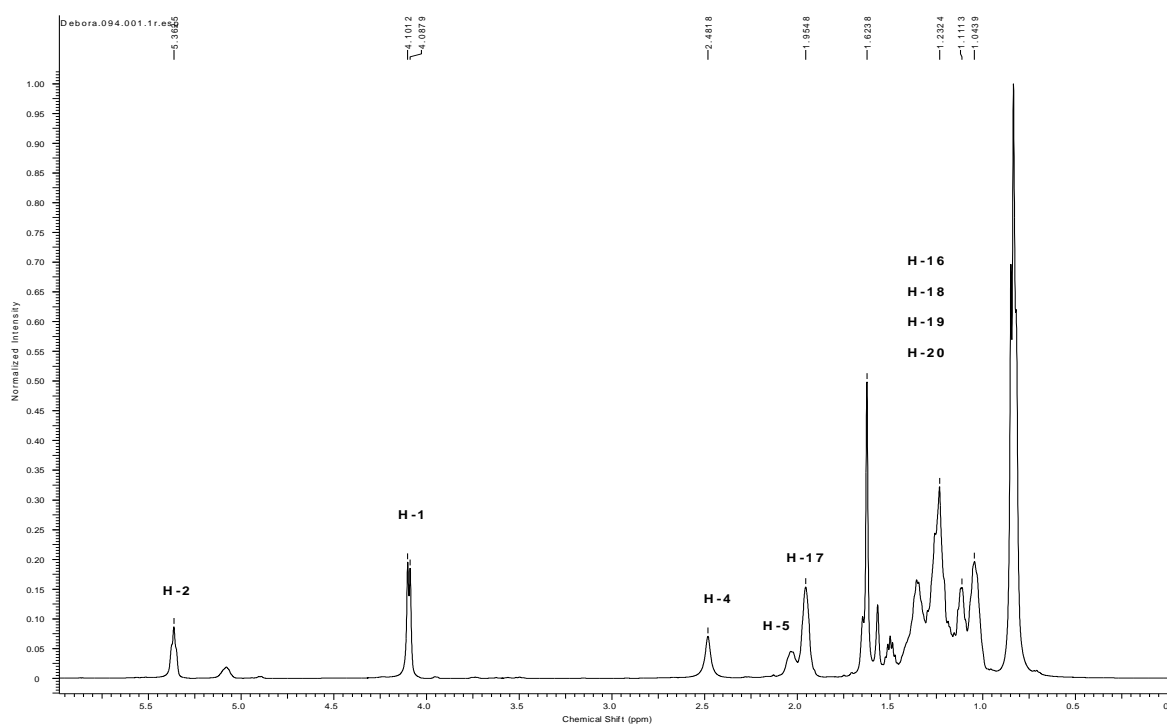
**Figura 34.** Substâncias identificadas na fração CSMH₂O-H 18-20.**Tabela 18.** Dados de RMN ¹³C do Fitol (17) e comparação com os dados obtidos por GOODMAN et al., 1973.

	Substância 17 (CDCl ₃)	Fitol (55 MHz, CDCl ₃)
	δ_c	δ_c
1	58,96	59,44
2	123,18	123,4
3	139,41	139,9
4	39,26	39,95
5	25,05	25,28
6	37,32	36,80
7	32,66	32,80
8	37,26	37,49
9	24,69	24,56
10	37,18	37,55

11	32,58	32,89
12	36,59	37,42
13	24,37	24,85
14	39,79	39,50
15	27,85	28,04
16	22,60	22,72
17	16,00	16,17
18	19,62	19,80
19	19,58	19,80
20	22,50	22,72



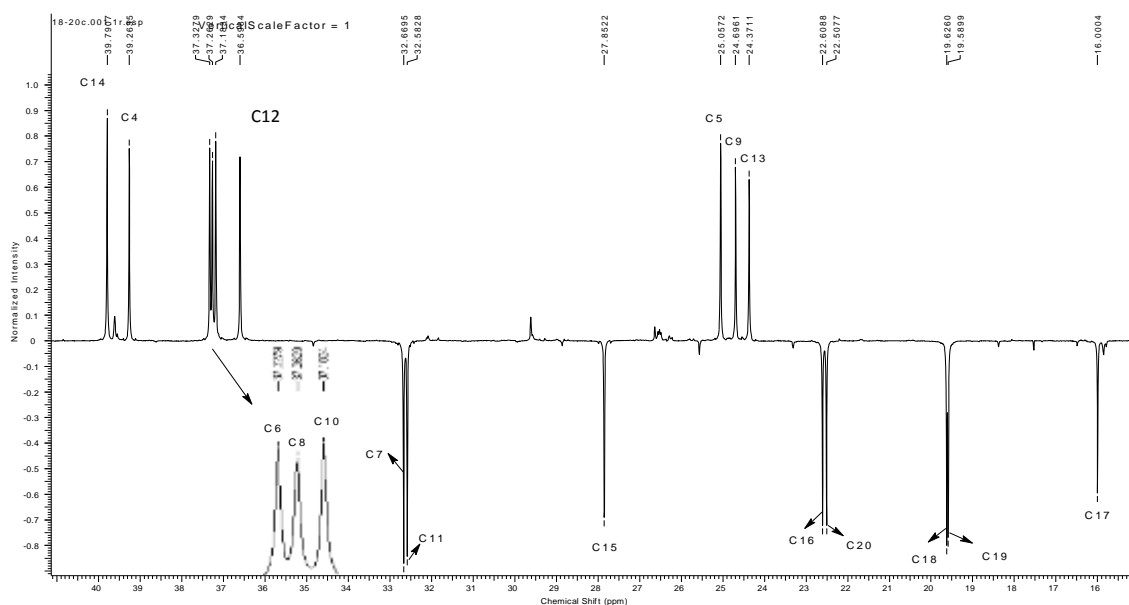
Fitol (17)



Espectro 46. Espectro de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃) do fitol presente na fração CSMH₂O-H 18-20.



Espectro 47. Espectro de RMN ^{13}C -DEPTQ da fração $\text{CSMH}_2\text{O-H}$ 18-20 (125 MHz; CDCl_3), indicando os sinais de deslocamentos químicos de carbonos do fitol.



Espectro 48. Expansão do espectro de RMN ^{13}C da fração $\text{CSMH}_2\text{O-H}$ 18-20, indicando os sinais de deslocamentos químicos de carbonos do fitol.

4.5.3. Identificação das substâncias na fração $\text{CSMH}_2\text{O-H}$ 24-26

A interpretação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Espectros 49 a 52, Páginas 101 e 102), aliado ao resultado obtido na análise de CG-EM (Figura 35), permitiu identificar a mistura dos esteroides: sitosterol (20) e estigmasterol (21). A análise via CG-EM demonstra a presença de dois compostos majoritários.

Foram detectados 12 picos de diferentes componentes na fração, segundo a análise do cromatograma da fração CSMH₂O-H 24-26, porém apenas as duas descritas na **Tabela 19** foram identificadas e obtiveram maior índice de similaridade com a biblioteca, tendo o sitosterol (**20**), como substância majoritária. Apesar da baixa similaridade do estigmasterol (**21**), os dados de RMN confirmaram sua proposta. A **Tabela 20** apresenta os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios de ambas as estruturas bem como a comparação com os dados propostos por Pateh e colaboradores (2008) e Pouchert e colaboradores (1993).

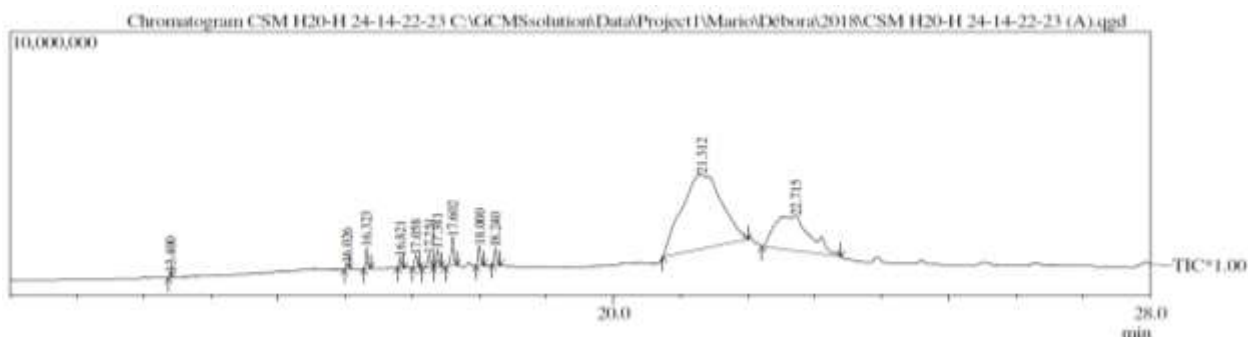
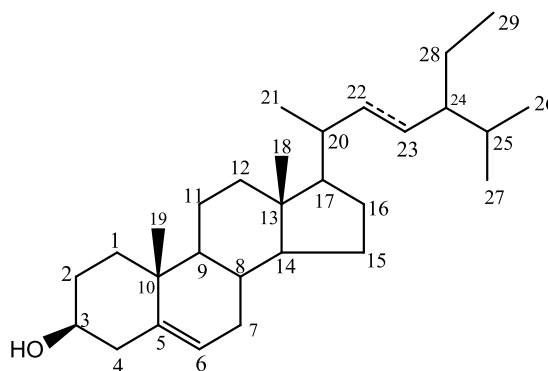


Figura 35. Cromatograma da fração CSMH₂O-H 24-26.

Tabela 19. Substâncias identificadas por CG-EM na fração CSMH₂O-H 24-26.

	tr	Substâncias identificadas	Similaridade biblioteca	Porcentagem
20	21.312	Sitosterol	95	65.03
21	21.715	Estigmasterol	88	26.32

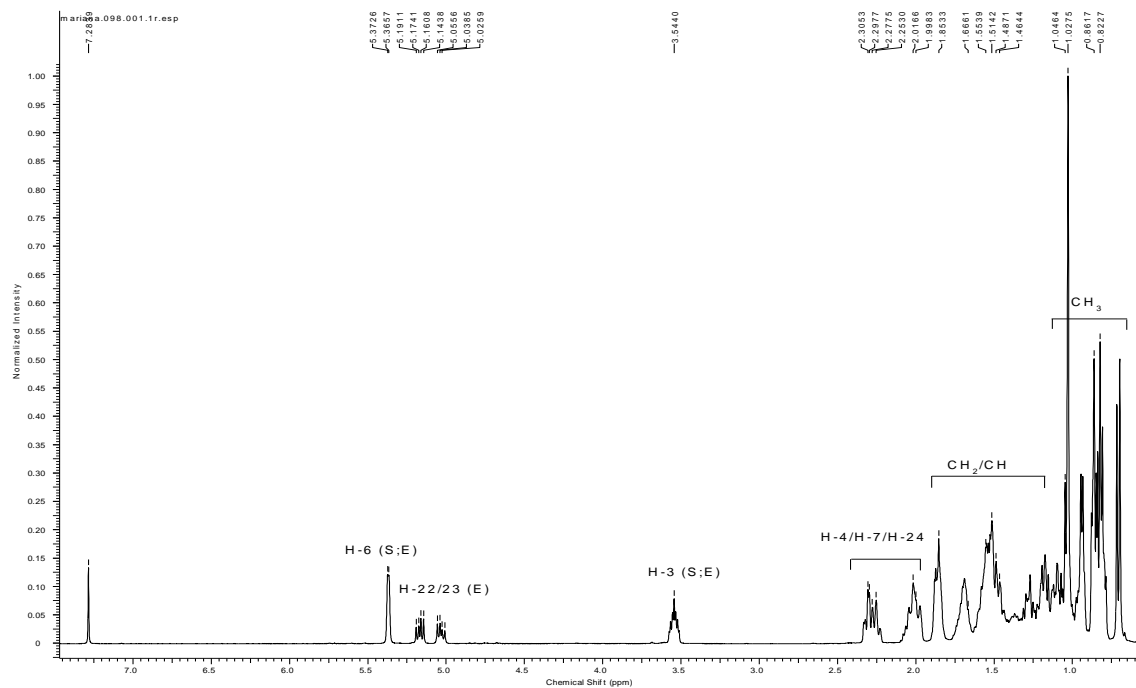


20. Sitosterol: 22,23-diidro
 21. Estigmasterol: $\Delta^{22,23}$

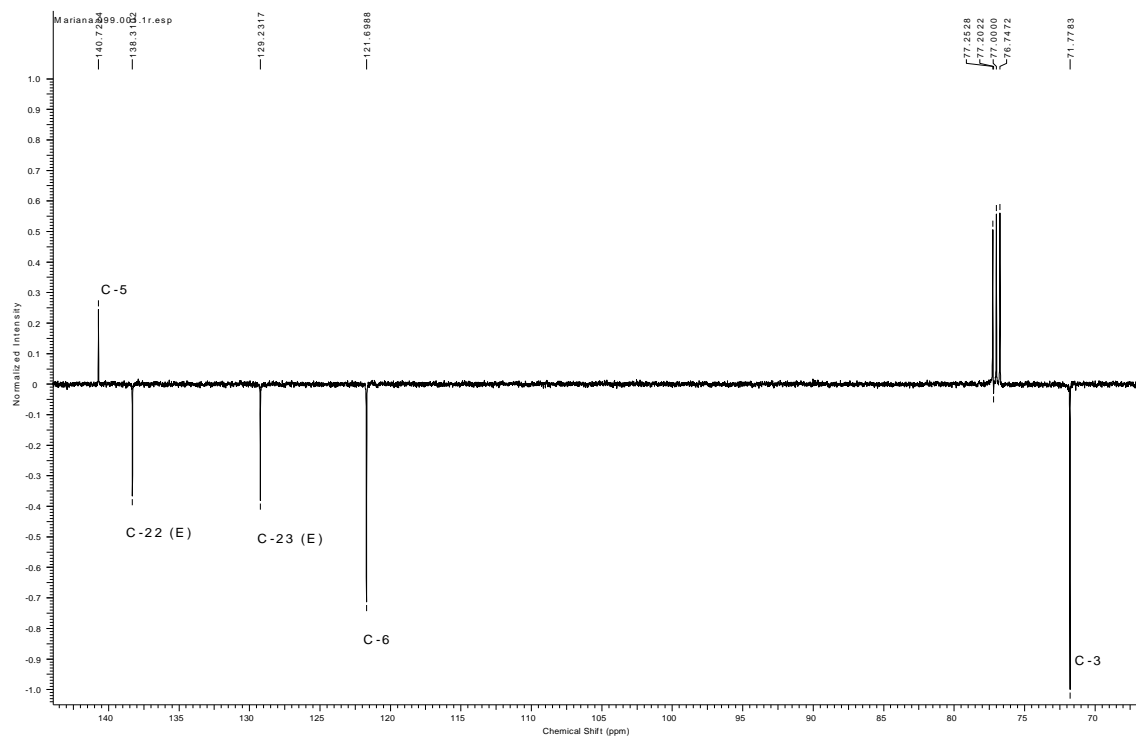
Tabela 20. Dados de RMN ¹H e ¹³C da substância 20 e 21 em comparação com os dados obtidos por PATEH et al., 2008 e POUCHERT et al., 1993.

	Substância (20) (CDCl ₃)		Substância (21) (CDCl ₃)		Sitosterol	Estigmasterol
	δ_C	δ_H (mult. J)	δ_C	δ_H (mult. J)	δ_C	δ_C
C						
5	140,74	-	140,74	-	140,73	140,73

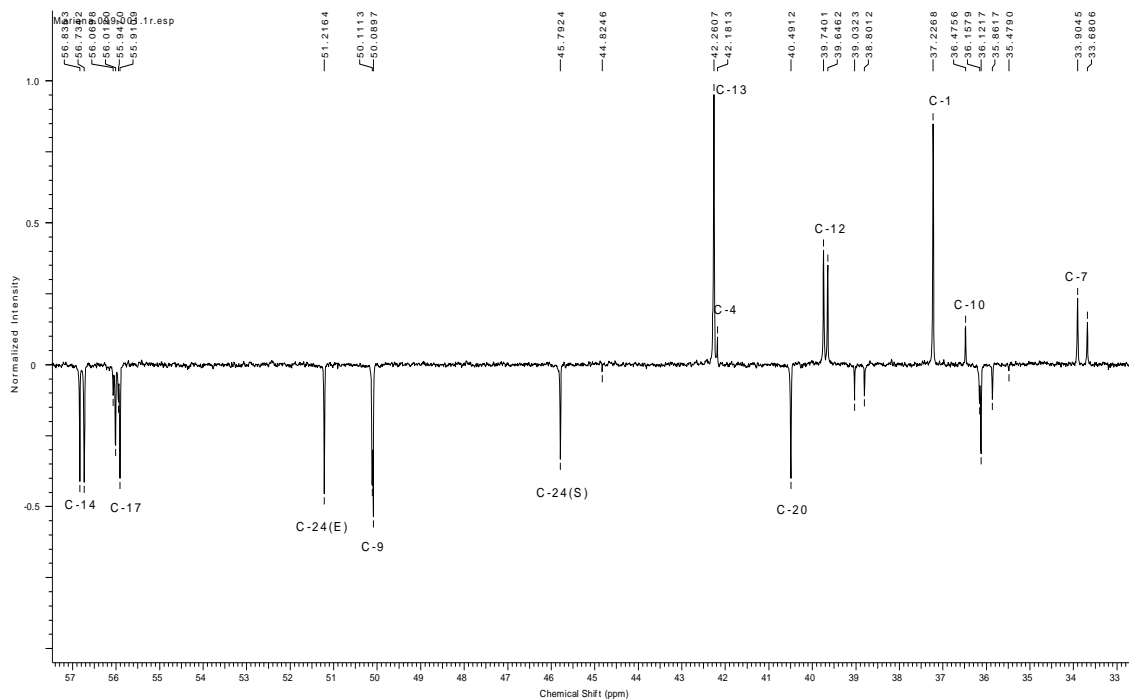
10	36,1	-	36,1	-	36,1	36,1
13	42,31	-	42,31	-	42,2	42,2
CH						
3	71,78	3,50	71,78	3,50	71,77	71,77
6	121,69	5,35 (s)	121,69	5,35 (s)	121,69	121,69
8	31,86		31,86		31,88	31,88
9	50,12		50,12		50,11	50,09
14	56,85		56,85		56,73	56,83
17	56,1		56,1		56,0	56,0
20	39,67		39,67		40,0	40,0
22	-	-	138,29	5,13 dd	-	138,31
23	-	-	129,26	5,03 dd	-	129,23
24	45,89		51,22		45,79	51,21
25	29,15		31,89		29,10	31,88
CH₂						
1	37,25		37,25		37,22	37,22
2	31,6		31,6		31,6	31,6
4	41,96		41,96		42,1	42,1
7	33,9		33,9		33,9	33,9
11	21,2		21,2		21,2	21,2
12	39,76		39,76		39,74	39,74
15	24,35		24,35		24,34	24,34
16	28,9		28,9		28,9	28,9
22	31,89		-	-	31,86	-
23	26,07		-	-	26,01	-
28	23,05		25,39		23,02	25,39
CH₃						
18	12,23		12,23		12,24	12,24
19	19,37		19,37		19,38	19,38
21	18,76		20,5		18,75	20,5
26	19,80		21,28		19,8	21,2
27	19,3		19,3		19,0	19,0
29	11,9		11,9		11,9	11,9



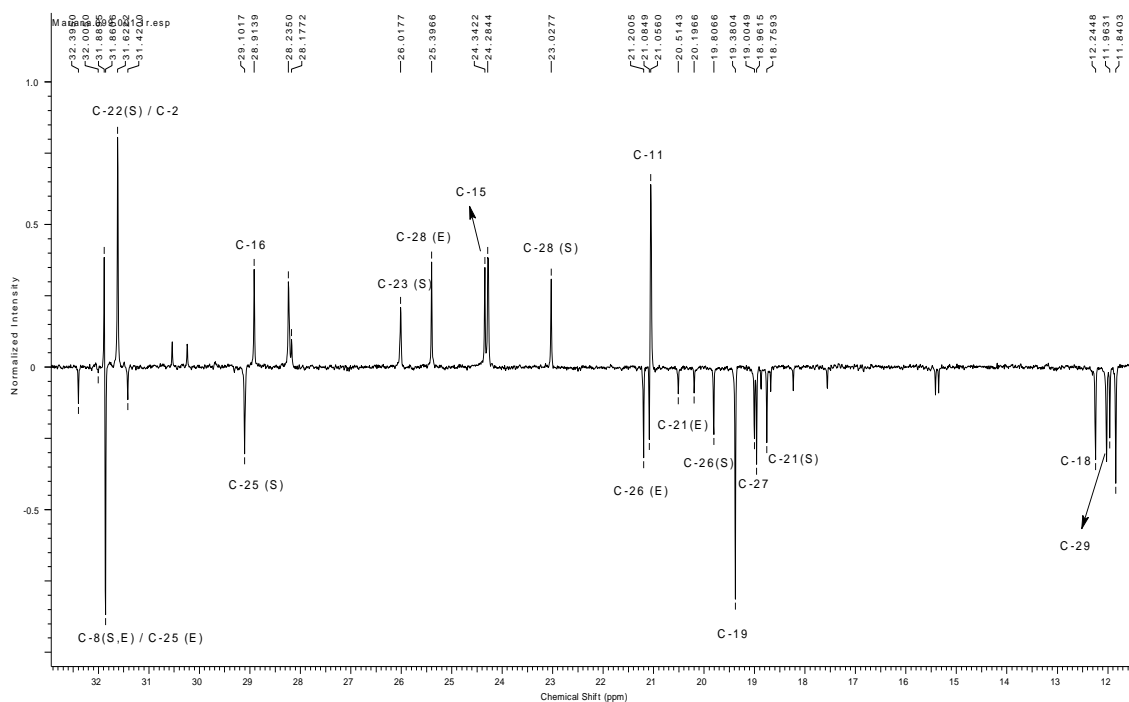
Espectro 49. Espectro de RMN ¹H da fração CSMH₂O-H 24-26.



Espectro 50. Expansão do espectro de RMN ¹³C- DEPTQ (150-60 ppm) da fração CSMH₂O-H 24-26.



Espectro 51. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (125 MHz; CDCl_3) da fração $\text{CSMH}_2\text{O-H}$ 24-26.



Espectro 52. Expansão do espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (125 MHz; CDCl_3) da fração $\text{CSMH}_2\text{O-H}$ 24-26.

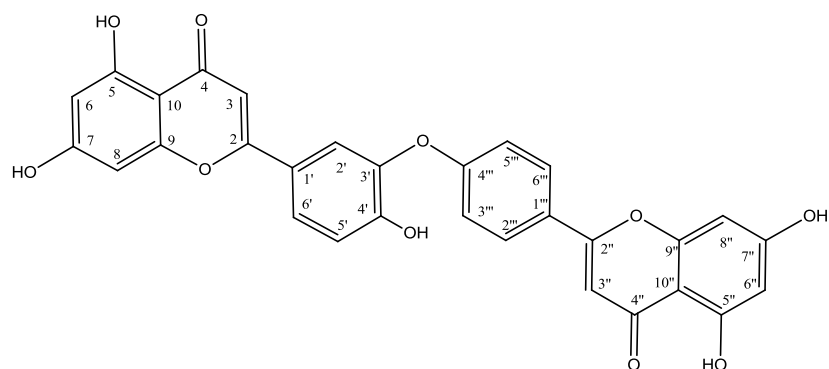
4.5.4. Identificação de Ochnaflavona (22) em CSMH₂O- D 3/41-42

A fração CSMH₂O- D 23/41-42 apresentou-se com uma cor castanha e solúvel em metanol. O espectro de RMN ¹H (**Espectro 53, Página 105**) demonstrou sinais compatíveis com estrutura de biflavonoide pela quantidade de sinais e a identificação de dois sistemas, um AA'BB' e outro ABC em anel aromático. O sistema AA'BB' apresentou um par de dubletos em δ_H 7,02 e 8,04 com $J= 8,5$ Hz, atribuídos aos hidrogênios H-2''/6'' e H-3''/5'', respectivamente, a interação entre eles também pode ser observada no experimento COSY (**Espectro 55, Página 106**). O sistema ABC foi determinado pelos sinais em δ_H 7,87 (s, H-2'), 7,89 (d, 8,8 Hz, H-6') e 7,13 (d, 8,8 Hz, H-5'), cujo espectro COSY apresentou sinais de interação entre os mesmos. Foi observado sinal em δ_H 6,85 (s) relativo aos hidrogênios H-3 e H-3''. O deslocamento químico δ_H 6,18 (d, 3,75 Hz), foi atribuído aos H-6 e H-6''. O singlete em δ_H 6,48 foi atribuído a H-8 e H-8''. Em δ_H 12,94 e 12,87 referentes aos sinais compatíveis com hidrogênio de hidroxilas queladas HO-5'' e HO-5.

O experimento NOESY permitiu verificarmos a interação espacial entre hidrogênios H-3 e o sistema ABC (**Espectro 59, Página 110**), o nOe foi observado entre os sinais em δ_H 6,85 (s) (H-3) e o 7,89 (dd, H-6') e 7,87 (d, H-2') permitiu propor o esqueleto da flavona com sistema ABC no anel B; Também houve nOe entre δ_H 6,85 (H-3) e o duplete, 8,5 Hz, em 7,02 ppm (2''; 6'') da outra flavona com sistema AA'BB' no anel B.

O espectro de RMN ¹³C (**Espectro 54, Página 106**) mostrou sinais compatíveis com um biflavonoide formado por duas unidades flavona, com ligação C-O-C entre os monômeros. Os sinais em δ_C 181,70 (C-4) e 181,76 (C-4'') são sinais característicos de carbonila, a atribuição de sinais para cada unidade de flavona foi feita pela análise no mapa de contorno HMBC, que demonstra a relação entre o H-3 com C-4 (**Espectro 57, Página 108**), uma vez que na estrutura de flavona, a carbonila encontra-se conjugada com a ligação dupla nos carbonos C-2 e C-3. Os sinais δ_C 161,4, 164,41, 161,85, 161,4 e 164,67 foram atribuídos a carbonos de sistema aromático ligados a hidroxila C-5, C-7, C-4', C-5'' e C-7'', respectivamente. Em δ_C 128,42 (C-2''/6'') e 116,06 (C-3''/5'') foram observados os carbonos do anel B com sistema AA'BB'. Aos carbonos C-6'', C-8'', C-3'', C-1'' e C-10'' foram atribuídos aos sinais δ_C 98,93; 94,11; 103,96; 124,27 e 103,65, respectivamente. Foi observado um sistema ABC com os sinais em δ_C 121,22; 118,17 e 125,43 conferidos aos carbonos C-2', C-5' e C-6'. Os demais sinais característicos da flavona com sistema ABC foram observados em δ_C 163,04; 103,96; 99,05; 94,11; 103,65; 124,27 e atribuídos aos carbonos C-2, C-3, C-6, C-8, C-10 e C-1', respectivamente.

Através dessas análises e comparação com os dados obtidos por Son e colaboradores (1992) foi possível propor a estrutura de biflavonoides conhecido como ochnaflavona, isolado em várias espécies do gênero *Ochna*.



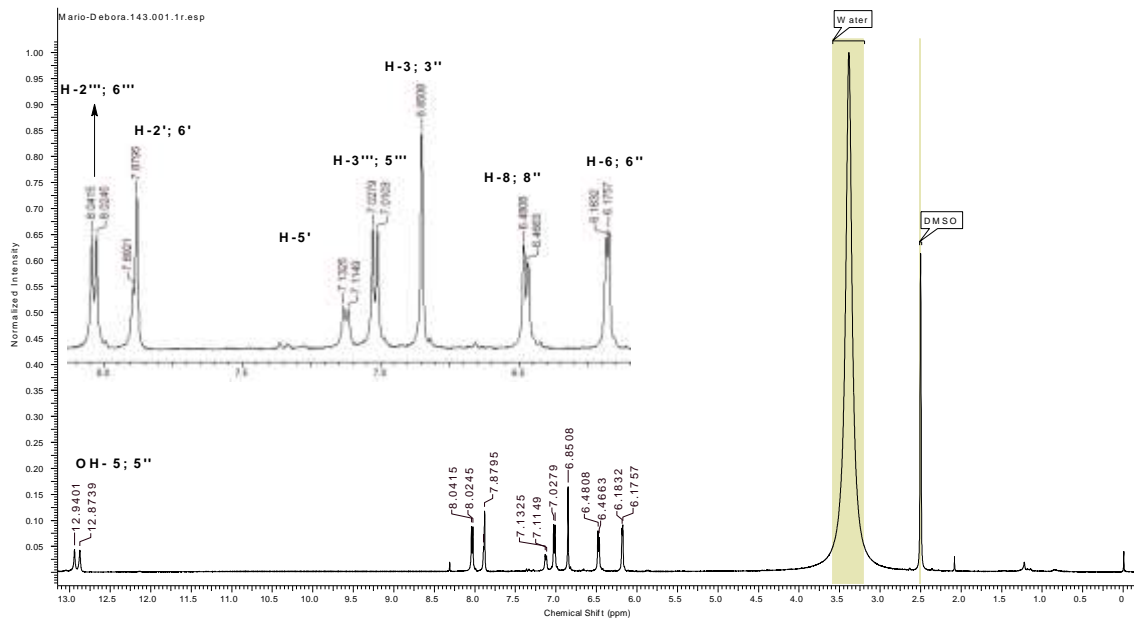
Ochnaflavona (22)

Tabela 21. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 22 em comparação com dados da ochnaflavona (SON et al., 1992).

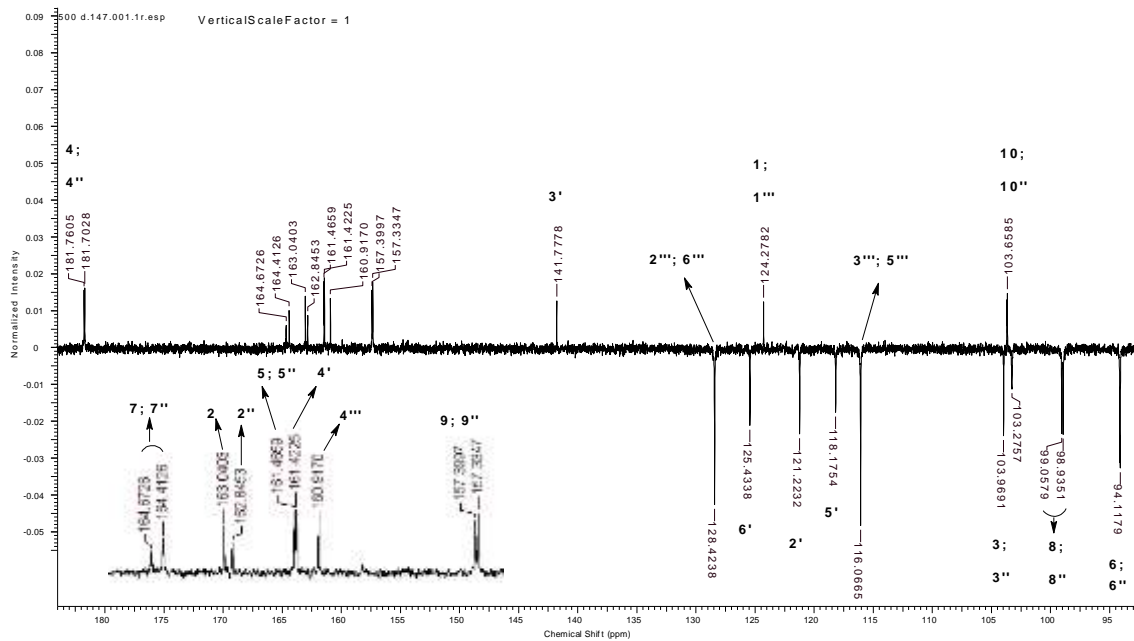
	Substância 22 (DMSO)		J^2	J^3	Ochnaflavona (300MHz, DMSO)
	δ_C	δ_H (mult. J)			δ_C
2	163,04	-			163,0
3	103,96	6,85 (s)	2; 4	10; 1'	103,6
4	181,70	-			181,7
5	161,4	-			161,4
6	99,05	6,18 (d; 3.75Hz)	7	8; 10	98,9
7	164,41	-			164,1
8	94,11	6,48 (d; 3.75Hz)	7; 9	6; 10	94,0
9	157,3	-			157,4
10	103,65	-			103,7
1'	124,27	-			122,3
2'	121,22	7,87 (s)	1	6'	121,2
3'	141,77	-			141,6
4'	161,85	-			153,2
5'	118,17	7,13 (d; 8,8 Hz)		1'; 3'	117,2
6'	125,43	7,89 (d; 8,8 Hz)	1'		125,3
2''	162,84	-			162,6
3''	103,96	6.85 (s)	2; 4	10; 1'	104,0
4''	181,76	-			181,7
5''	161,4	-			161,4
6''	98,93	6,18 (d; 3,75Hz)	7''	8''; 10''	98,9
7''	164,67	-			164,2
8''	94,11	6,48 (d; 3,75Hz)	7; 9	6; 10	94,0
9''	157,3	-			157,3
10''	103,65	-			103,8
1'''	124,27	-			124,4
2'''	128,42	7,02 (d; 8,5Hz)		2''; 4'''	128,4
3'''	116,06	8,04 (d; 8,5Hz)	4'''	1'''	116,1
4'''	160,91	-			160,7
5'''	116,06	7,02 (d; 8,5Hz)			116,1
6'''	128,42	8,04 (d; 8,5Hz)			128,4

OH-
OH-

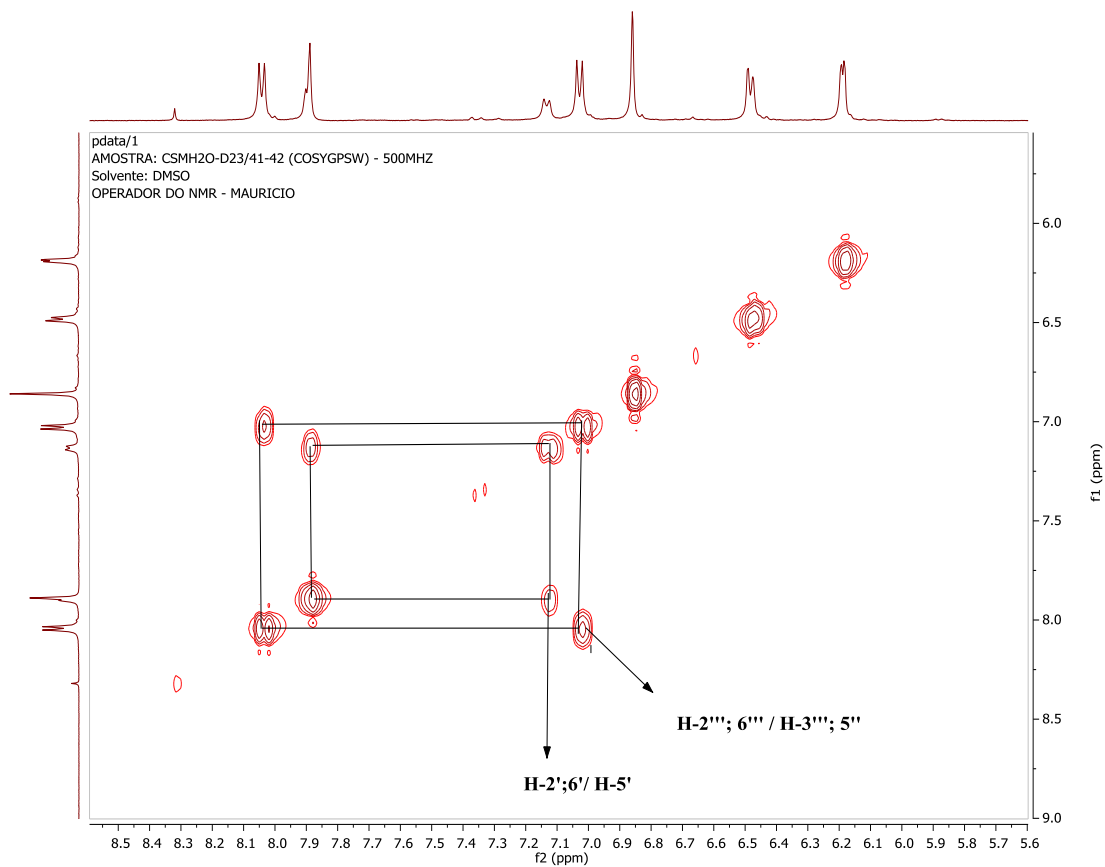
12,94 (s)
12,87 (s)



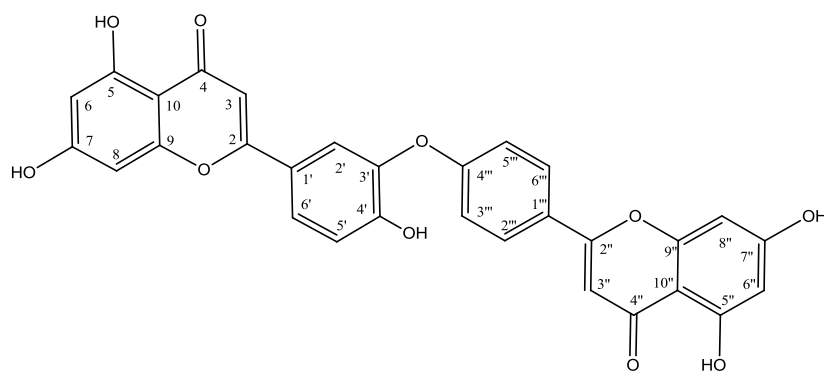
Espectro 53. Espectro de RMN¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 22.

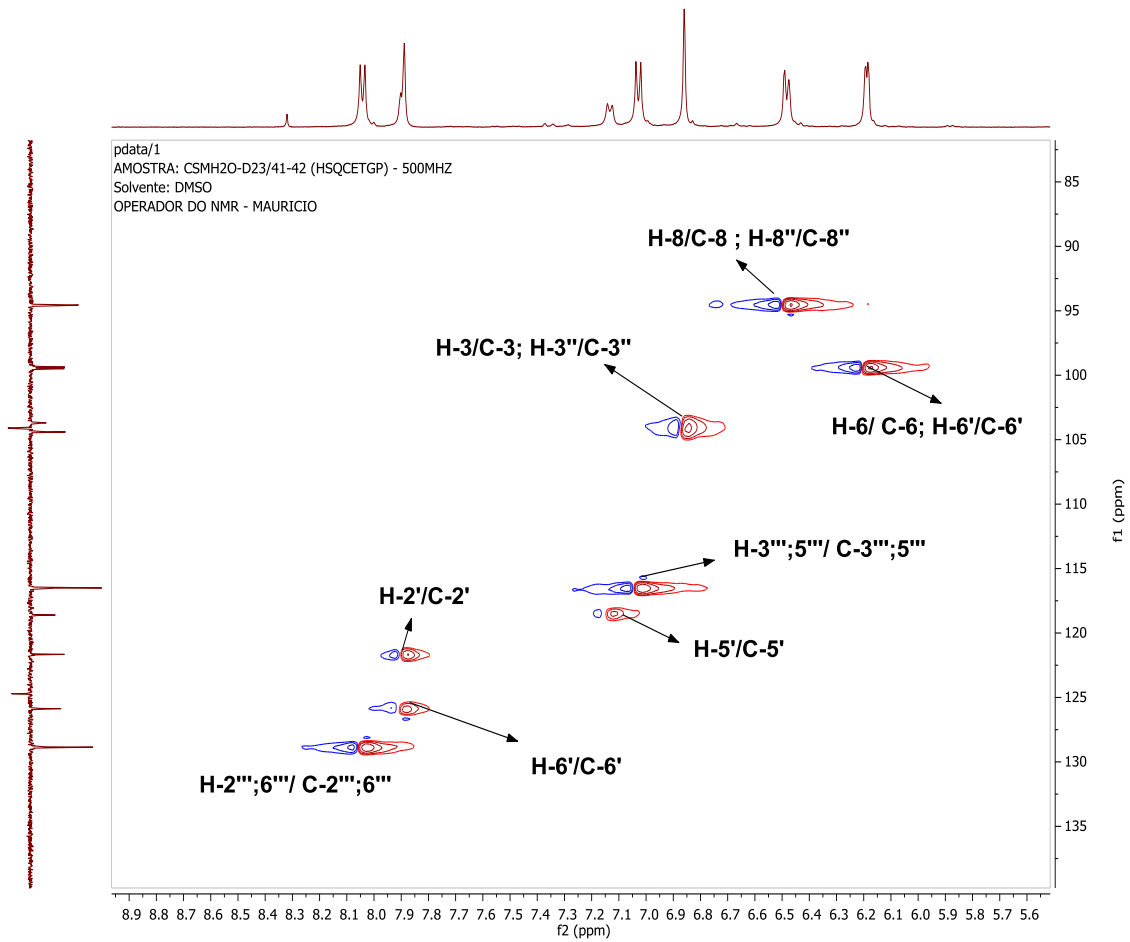


Espectro 54. Espectro de RMN¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 22.

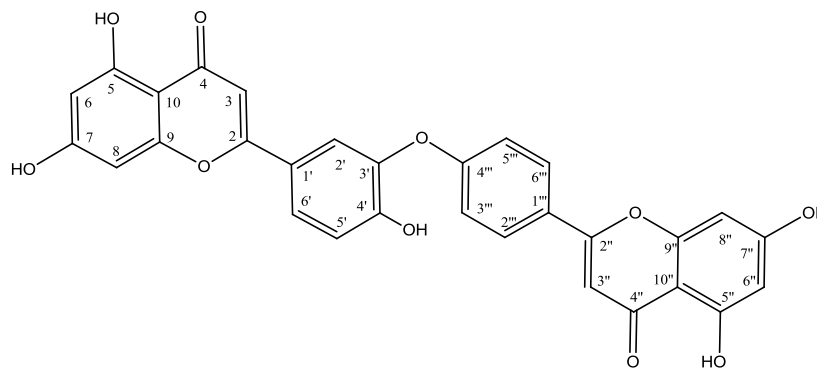


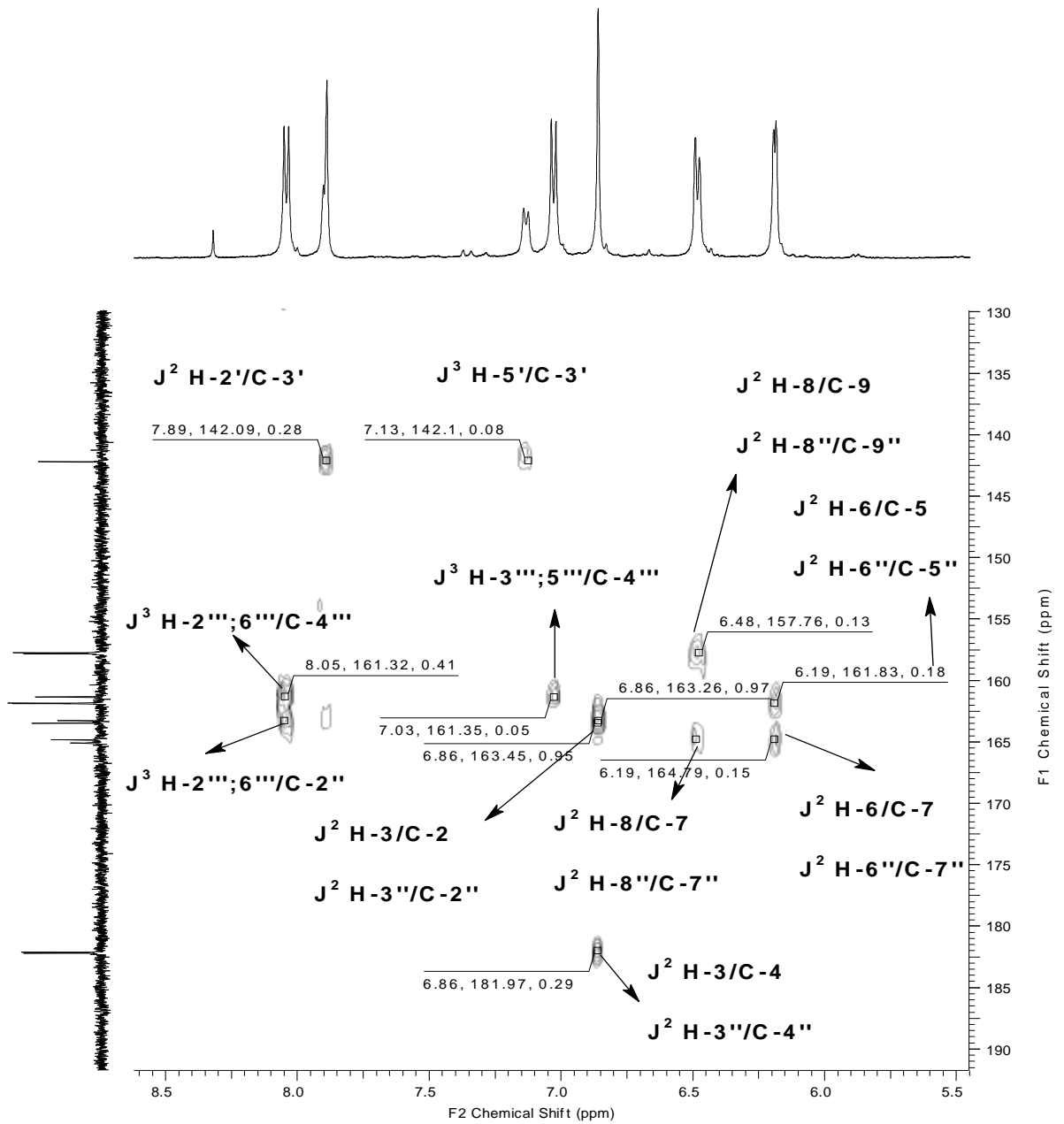
Espectro 55. Mapa de contorno RMN- COSY (125/125 MHz, DMSO-d₆) da substância 22.



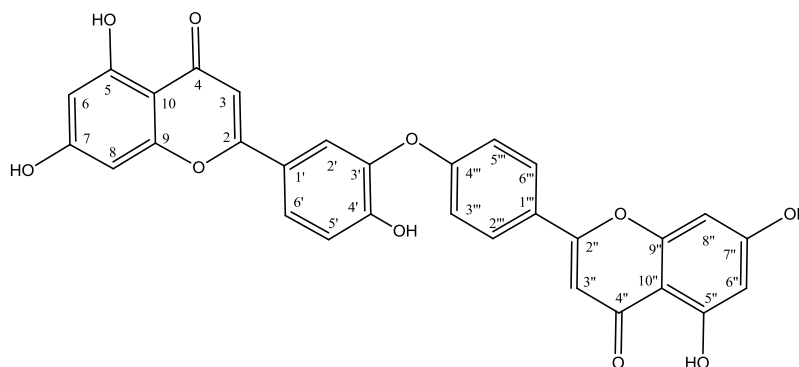


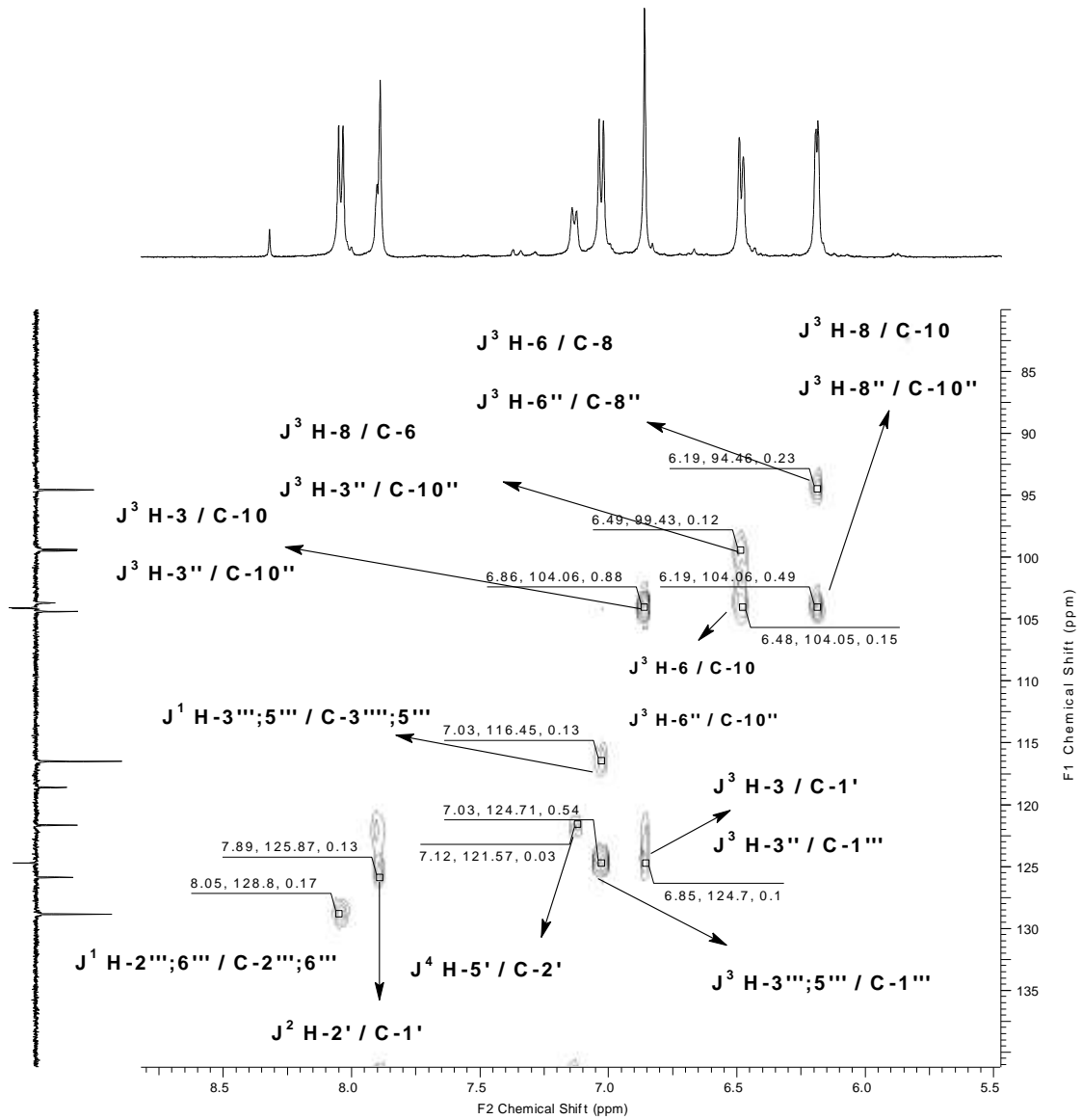
Espectro 56. Mapa de contorno RMN- HSQC (500/125 MHz, DMSO- d_6) da substância 22.



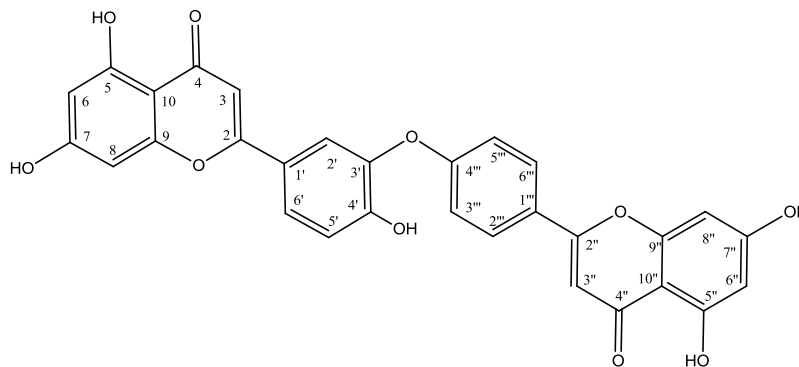


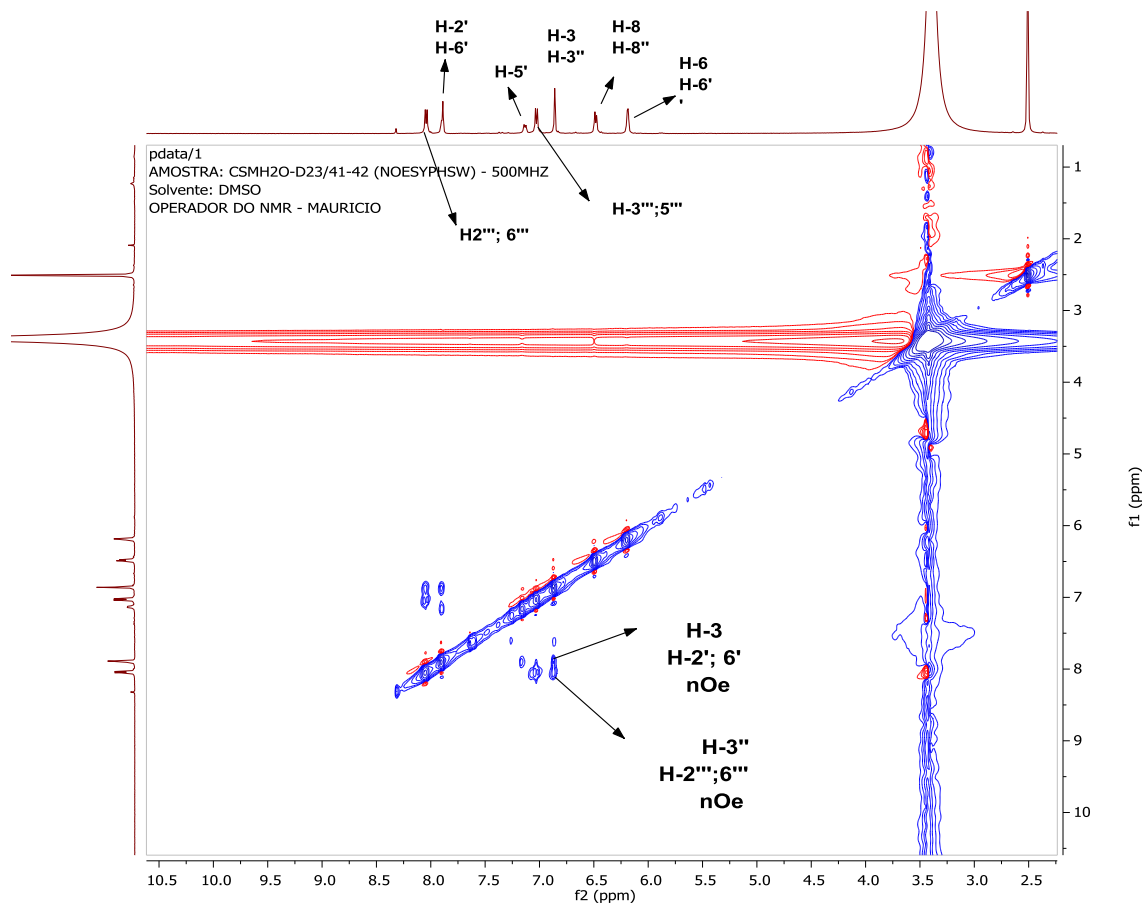
Espectro 57. Mapa de contorno RMN- HMBC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância 22.



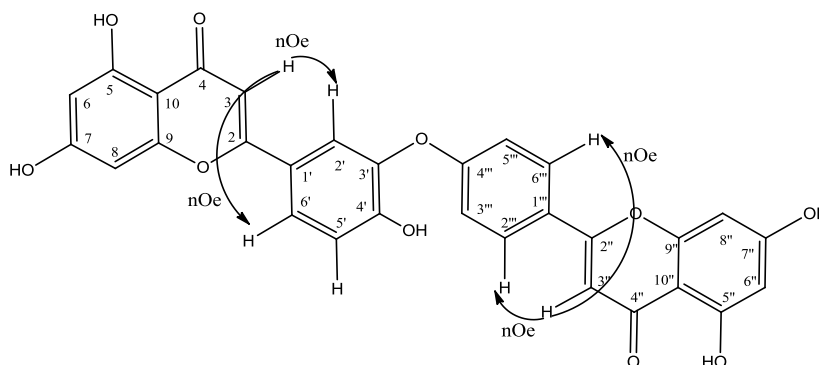


Espectro 58. Mapa de contorno RMN- HMBC (500/125 MHz, DMSO-d₆) da substância 22.





Espectro 59. Expansão do espectro NOEDIF (500 MHz; DMSO- d_6) da substância 22.



4.5.5 Identificação de Catequina (23) e Epicatequina (24) em CSMH₂O-A 24-26

A substâncias **23** e **24** foram isoladas por cromatografia em Sephadex LH20, identificadas por RMN ^1H e ^{13}C (Espectros 60-68). O espectro de RMN ^1H apresentou sinais característicos com o de esqueleto de catequina. Pela quantidade de sinais logo percebeu-se que se tratava de uma mistura.

Os sinais que distinguem as duas substâncias foram assinalados nos espectros de RMN ^1H 61 e 62 (Páginas 113 e 114), com a letra (C) para Catequina, substância nº 23, e (E) para a Epicatequina, substância nº 24. Foram observados sinais típicos de anel trissubstituído, em δ_{H} 6,73(*d*, H-6'), 7,84 (*d*, H-2') e 6,75 (*d*, H-5'), comuns às duas substâncias. A diferenciação entre

elas já pode ser observada no deslocamento químico do H-2, 4,57 (*d*, 9,4Hz) para C e 4,81 (*d*) para E, em função da sobreposição do sinal da água não foi possível calcular a constante de acoplamento. Os deslocamentos atribuídos aos H-3(C) e H-3(E) são respectivamente 3,98 (*m*) e 4,17 (*m*). Os hidrogênios diastereotópicos H-4(C) apresentam deslocamento químico em 2,50 e 2,87, a correlação entre eles foi detectado no experimento de COSY (**Espectro 66, Página 116**), a mesma correlação para H-4(E), com valores δ_H 2,75 e 2,83, foi detectada no mesmo experimento. Em δ_H 5,86 (*d*) e 6,84 (*d*) foram atribuídos a H-8 e H-6, respectivamente.

Os sinais em δ_C 120,19 (C-6'), 116,23 (C-5') e 115,38 (C-2') são típicos de sistema ABC e foram atribuídos aos carbonos do anel B da catequina (**23**). Cinco sinais referentes a carbono quaternários foram observados em δ_C 157,69 (C-5); 157,92 (C-7); 157,01 (C-9); 145,88 (C-3') e 146,36 (C-4'), os mesmos foram atribuídos aos carbonos de sistema aromático, sustentando grupos hidroxilas. Outros dois carbonos quaternários, não oxigenados, foram identificados em δ_C 132,29 (C-1') e 100,95 (C-10). Os carbonos metínicos com deslocamentos δ_C 82,95 (C-2) e 68,92 (C-3) oxigenados. Outros dois metínicos, não oxigenados, do anel A δ_C 96,41 (C-6) e 95,63 (C-8). O carbono metilênico C-4 com deslocamento químico em 28,64 ppm.

Os sinais em 119,52 (C-6'), 116,04 (C-5') e 115,43 (C-2') caracterizam o sistema ABC da epicatequina (**24**). Cinco sinais referentes a carbono quaternários de sistema aromático da epicatequina (**24**) foram observados em δ_C 157,75 (C-5); 158,10 (C-7), 157,47 (C-9), 100,21 (C-10), 146,04 (C-3') e 146,33 (C-4'). Outros dois carbonos quaternários foram identificados pelos sinais em δ_C 132,39 (C-1) e 100,21 (C-10). Os carbonos metínicos de sistemas aromáticos estão representados pelos sinais em δ_C 96,52 (C-6) e 96,02 (C-8). Os carbonos metínicos oxigenados do anel C com os sinais em δ_C 79,92 (C-2) e 67,60 (C-3), e o carbono metilênico C-4 com deslocamento químico em 28,64 ppm. Os deslocamentos químicos podem ser verificados nos espectros 19, 20, 21 e 22.

A interpretação do experimento de HSQC (**Espectro 67, Página 117**) e HMBC (**Espectro 68, Página 118**) permitiram confirmar as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos pertencentes a cada uma das substâncias. Os dados espectrais e a comparação com os dados da literatura estão descritos nas **Tabelas 22 e 23 (Páginas 111 e 112)**.

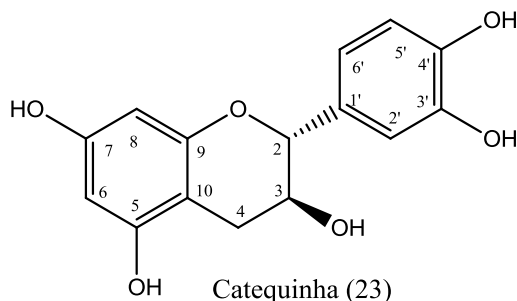


Tabela 22. Dados de RMN 1H e ^{13}C da substância 23 em comparação com dados da literatura para catequina (LU & FOO, 1999).

	Substância 23 (MeOD)			Catequina (C ₃ H ₆ O)
δ_C	δ_H (mult. J)	J ²	J ³	δ_C

2	82,95	4,57 (d; 9,4Hz)	3; 1'	4; 2'; 6';9	82,56
3	68,92	3,98 (m)	2	10; 1'	68,33
4	28,64	2,50 (dd; 16.08 Hz) 2,87 (m; 16.08 Hz)	3; 10	2; 9	28,66
5	157,69	-			157,14
6	96,41	5,93	7	8; 10	96,17
7	157,92	-			157,63
8	95,63	5,86 (d; 2.24 Hz)	9	6; 10	95,45
9	157,01	-			156,82
10	100,95	-			100,60
1'	132,29	-			132,09
2'	115,38	6,84 (d; 1.76 Hz)	3'	2; 6'	115,20
3'	145,88	-			145,58
4'	146,36	-			145,64
5'	116,23	6,75 (sl)			115,33
6'	120,19	6,73 (d; 1.76 Hz)		2; 2'	120,04

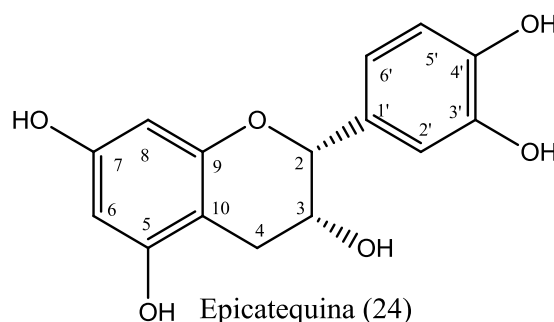
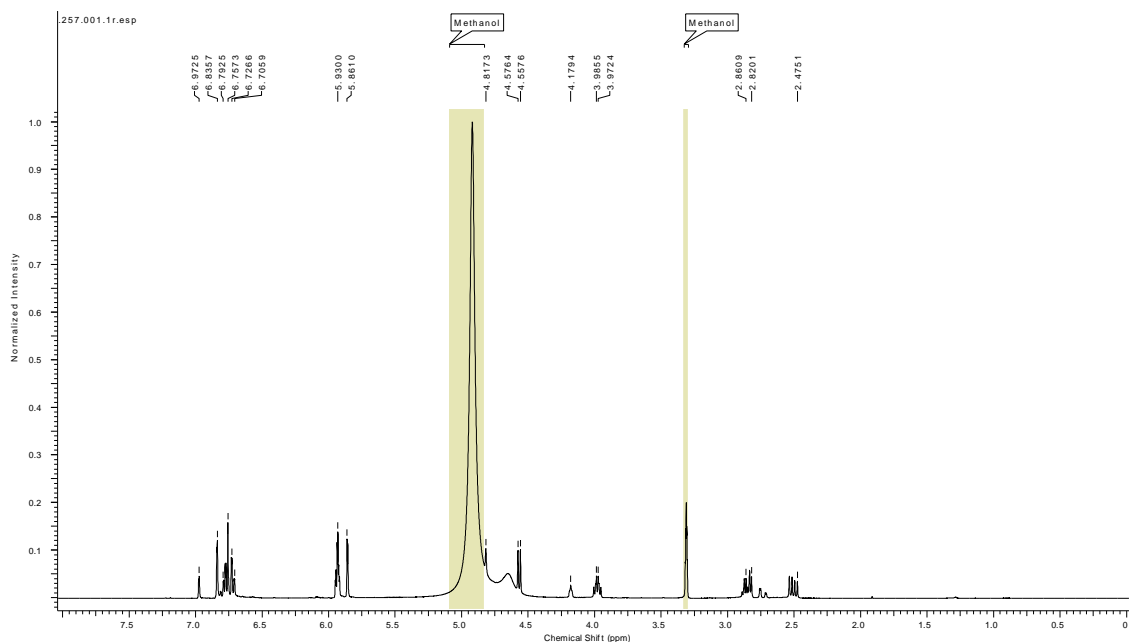


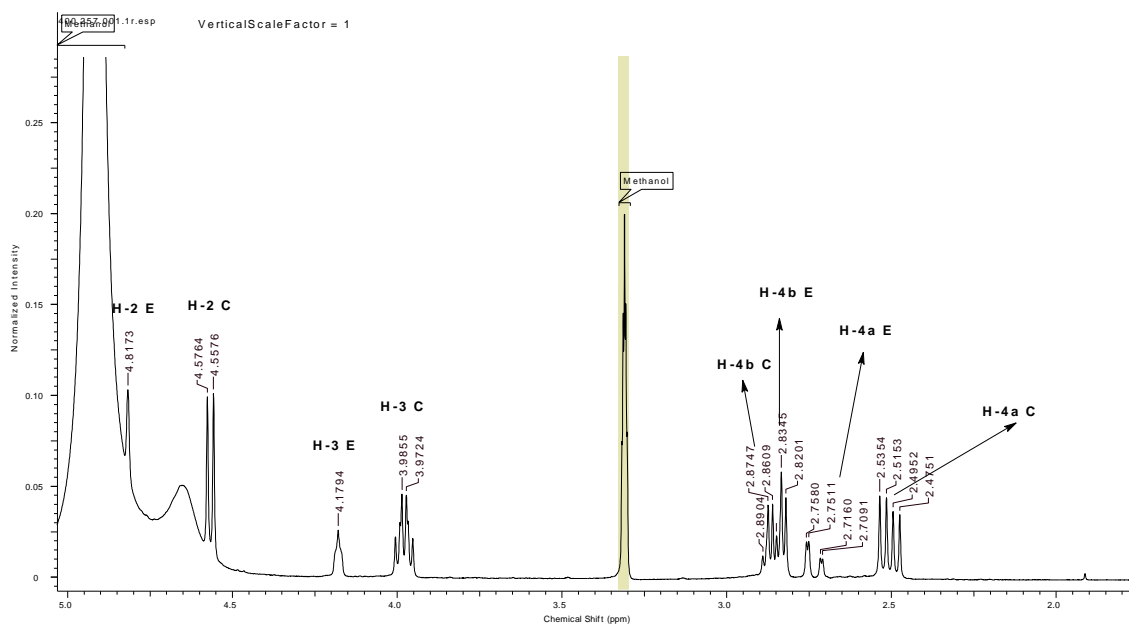
Tabela 23. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância **24** em comparação com dados da literatura para epicatequina (LU & FOO, 1999).

	Substância 24 (MeOD)				Epicatequina (C ₃ H ₆ O)
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	J ²	J ³	δ_{C}
2	79,98	4.81 (d)	1'	2'; 6'	79,05
3	67,60	4.17 (m)			66,59
4	29,38	2.75 (dd; 16.8 Hz) 2.83 (dd; 16.8 Hz)	3; 10	2; 9	28,48
5	157,75	-			157,01
6	96,52	5.93	7	8; 10	96,07
7	158,10	-			157,20
8	96,02	5.86 (d; 2.24 Hz)	9	6; 10	95,35
9	157,47	-			156,62
10	100,21	-			99,58
1'	132,39	-			131,66

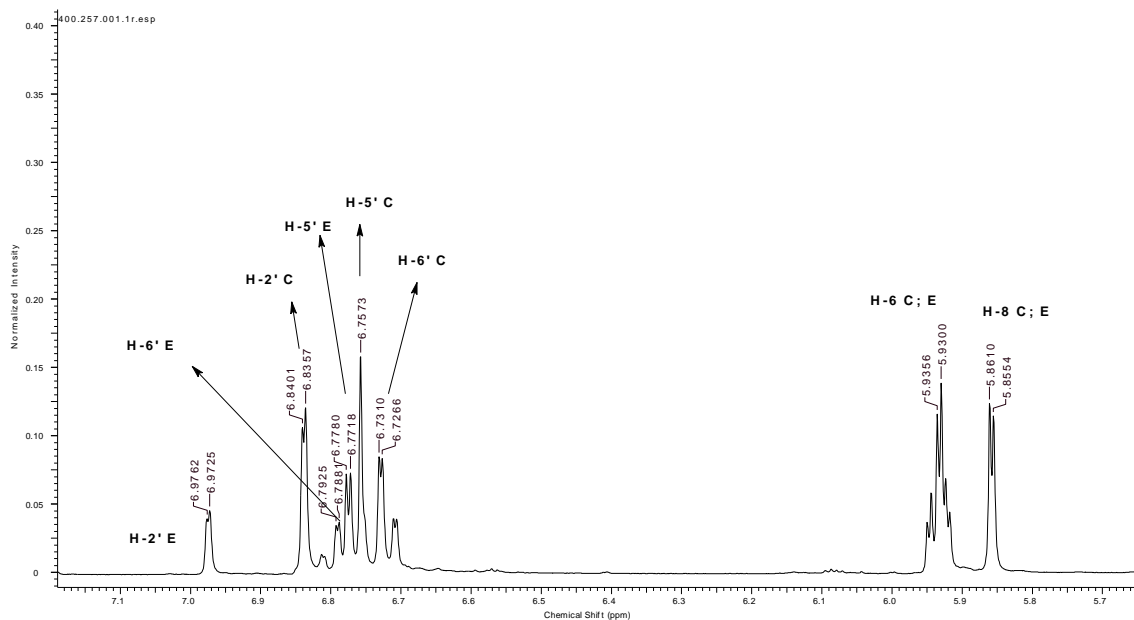
2'	115,43	6.97 (d; 1.48)	3'	2; 6'	115,05
3'	146,04	-			144,93
4'	146,33	-			145,07
5'	116,04	6.77 (d; 2.48)		1'; 3'	115,50
6'	119.52	6.79 (d; 1.76)			119,05



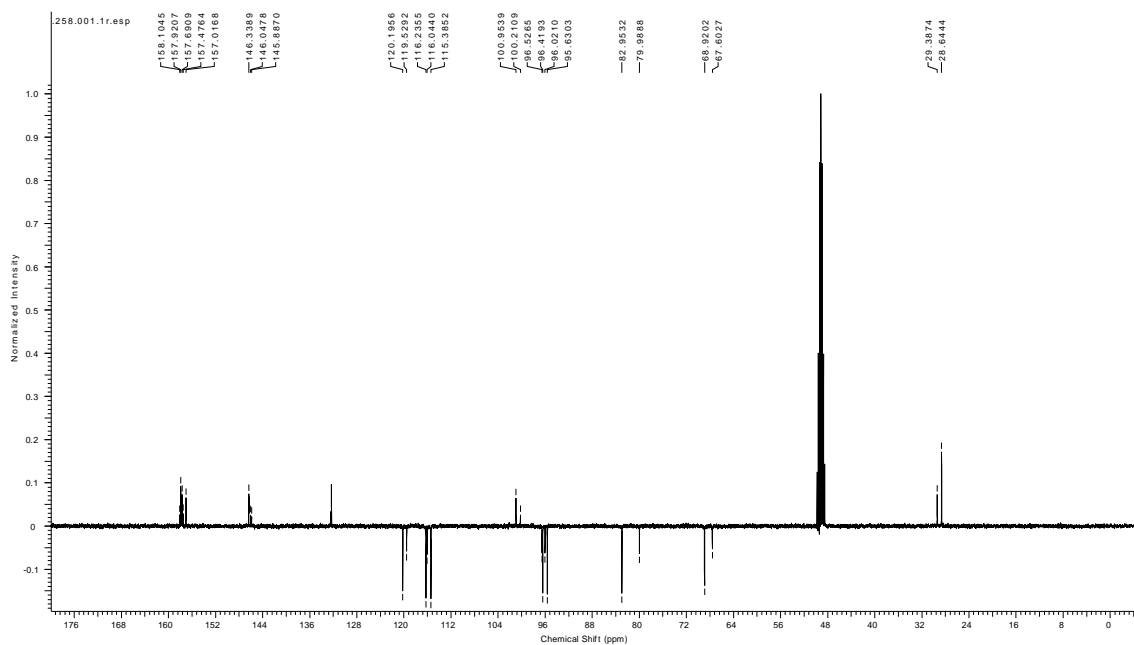
Espectro 60. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância 23 e 24.



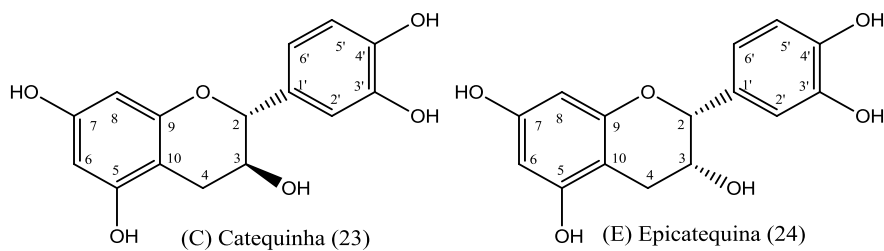
Espectro 61. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.

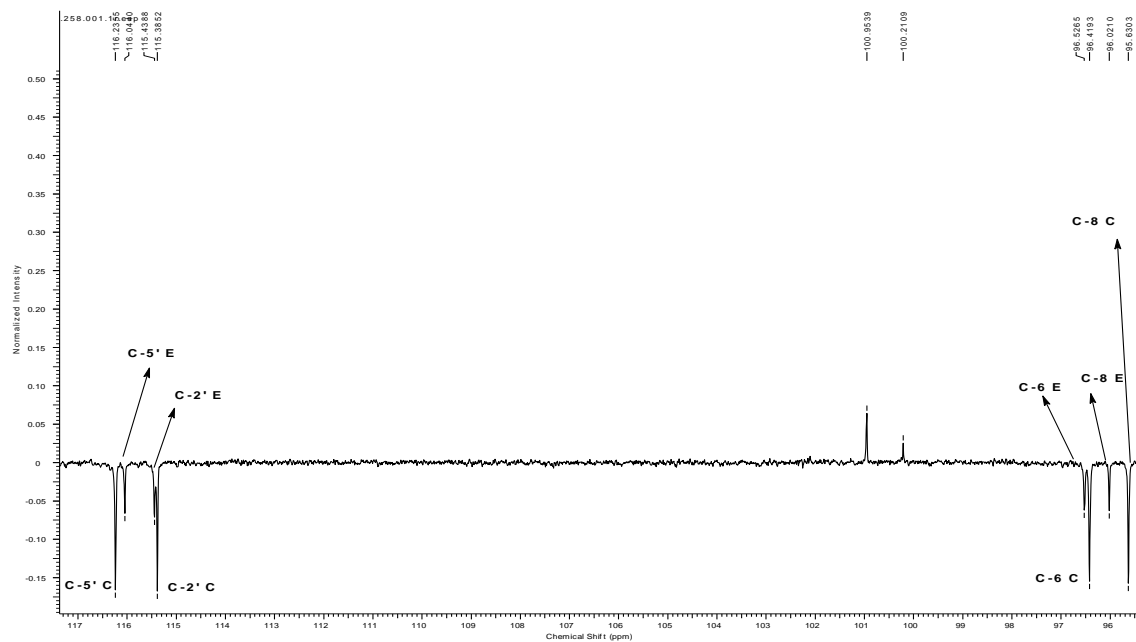


Espectro 62. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.

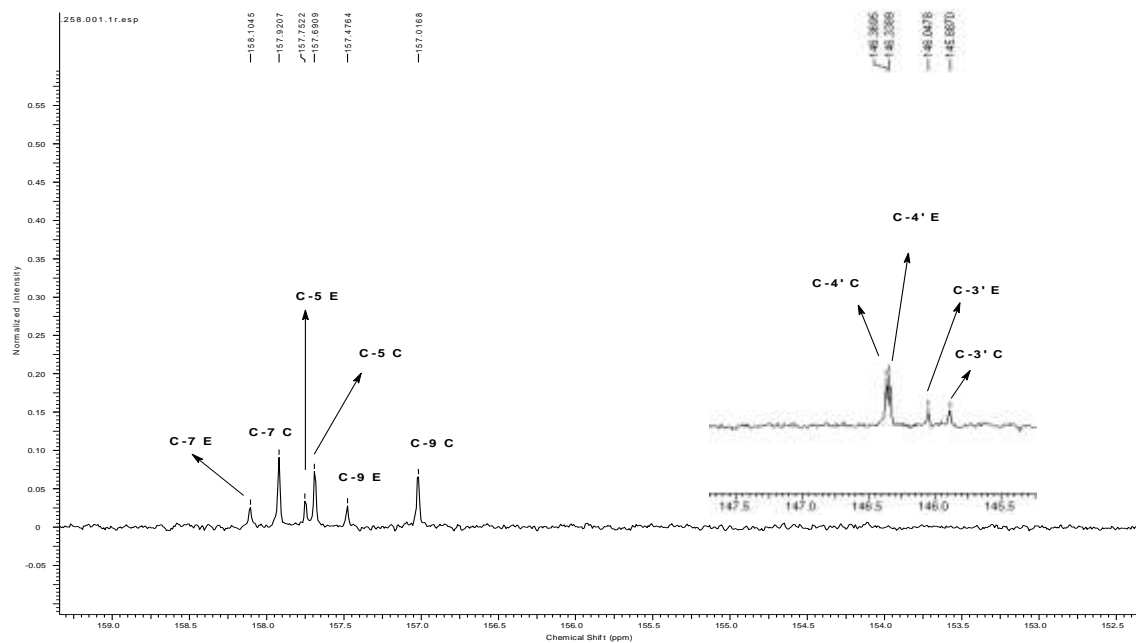


Espectro 63. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.

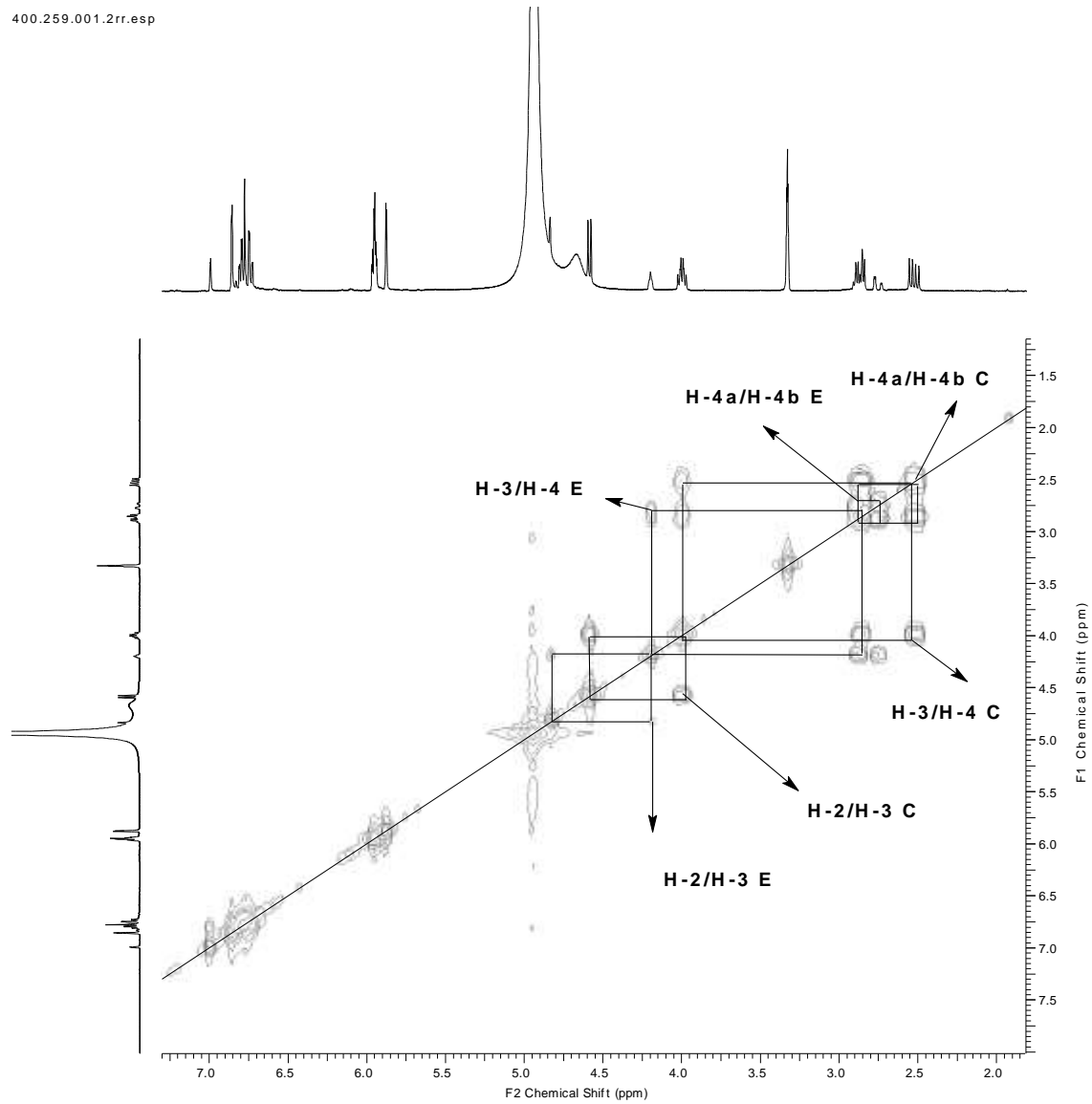




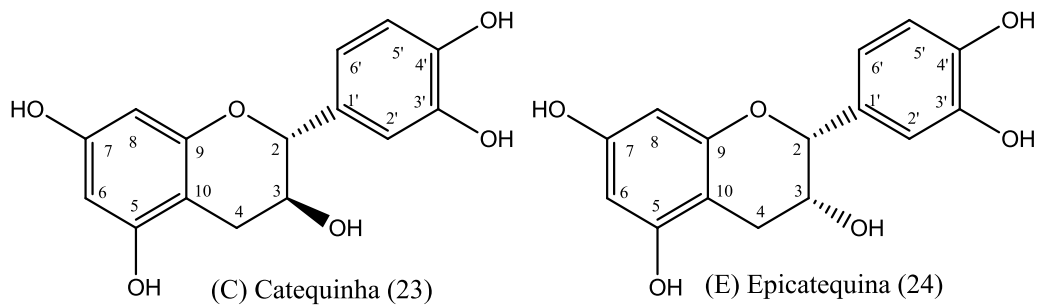
Espectro 64. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.



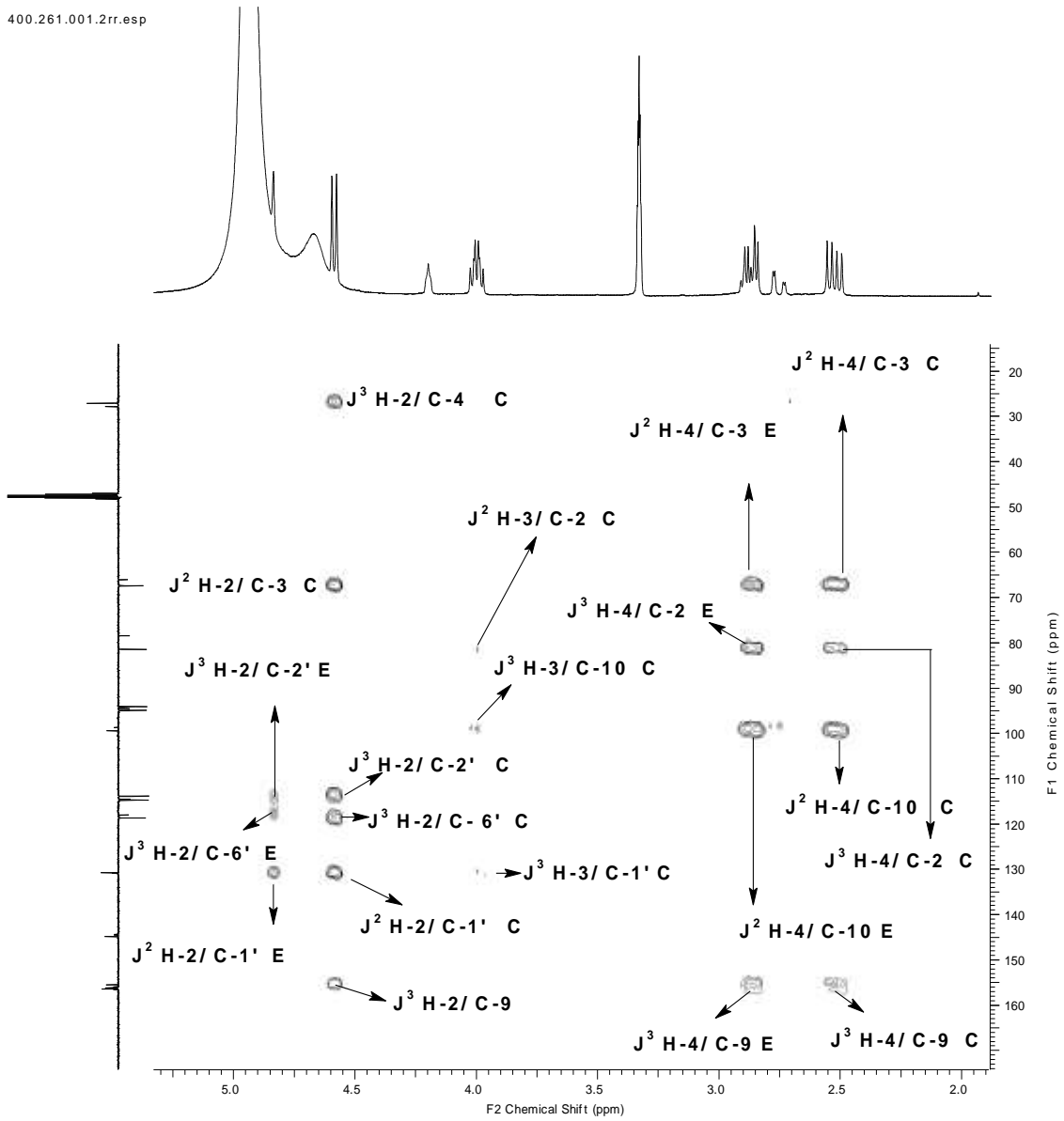
Espectro 65. Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.



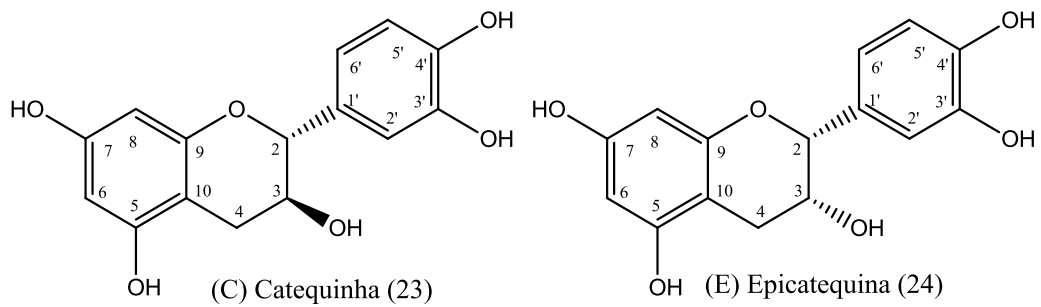
Espectro 66. Mapa de contorno COSY (500 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.

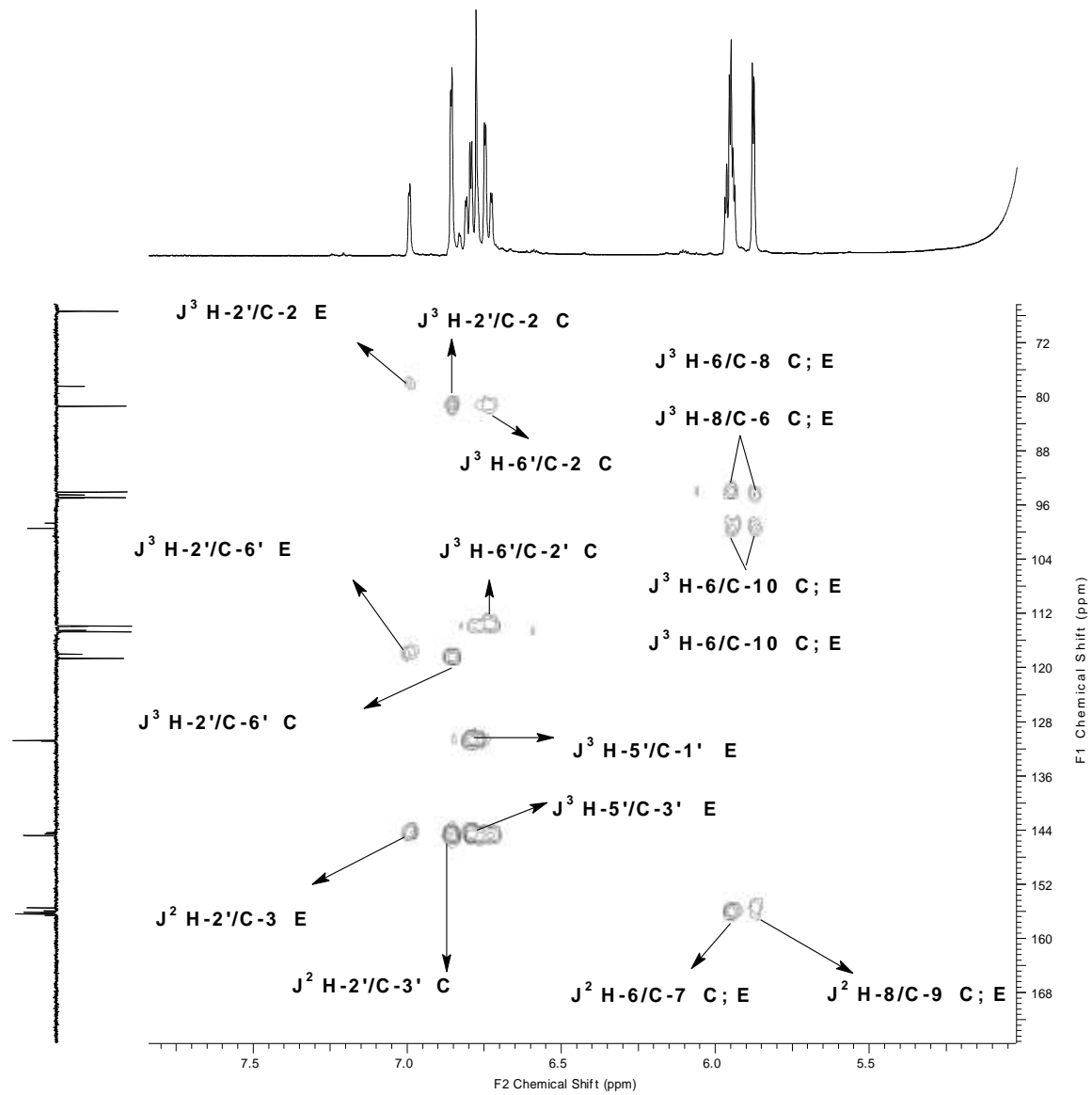


400.261.001.2rr.esp

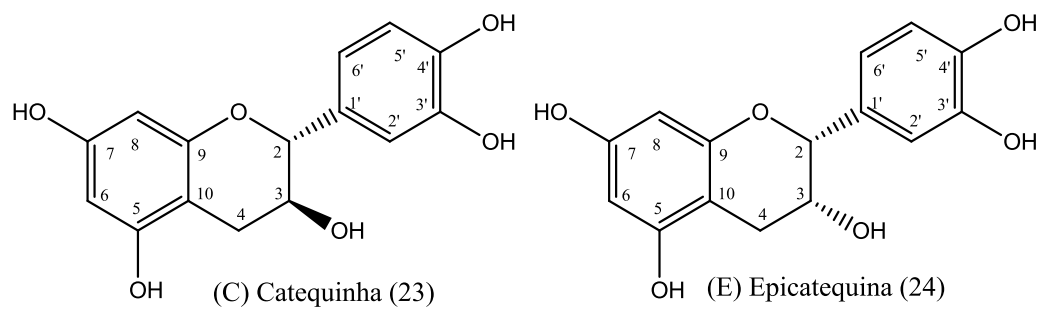


Espectro 67. Mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.





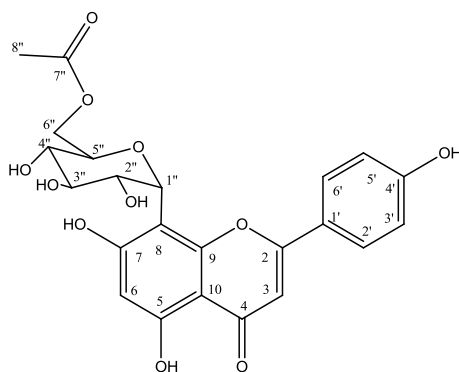
Espectro 68. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, MeOD) das substâncias 23 e 24.



4.5.6. Identificação da 6''-O-acetil-vitexin (25) de CSMH₂O-A

O espectro de RMN ¹H (**Espectro 69**) apresentou sinais característicos de flavonoide contendo um glicosídeo. Em δ_H 6,63 e 6,24 foram observados dois singletos típicos de H-3 e H-6 de esqueleto de flavona, respectivamente. Os sinais em δ_H 8,06 (d, 8,5 Hz) e 6,97 (d, 8,5 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do sistema AA'BB' do anel B, H-2';6' e H-3'5', respectivamente, as interações puderam ser observadas também no experimento COSY (**Espectro 71, Página 121**). Um singlete intenso observado em d_H 1,80 foi atribuído aos hidrogênios de metila (H-8'') podendo ser de uma unidade de acetato. Foram observados sinais característicos de carboidratos, em δ_H 5,08 (*sl*, H-1''); 5,53 (*m*, H-2''); 3,72 (*m*, H-3''); 3,72 (*m*, H-4'') 3,52(*m*, H-5''), 3,99 e 3,85 (*m*, H-6''); os valores informados estão de acordo com uma unidade glicosídica ligada ao esqueleto da flavona. A ausência do sinal típico de H-8 no anel A, permitiu propor que nesta posição esteja sustentando o carboidrato. Os valores de deslocamentos químicos de carbono (**Tabela 24, Espectro 70, Páginas 120 e 121**) correlacionados com os respectivos hidrogênios através do espectro HSQC (**Espectro 72 e 73, Páginas 122 e 123**) permitiu propor se tratar de um sistema C-glicosídeo. Em δ_C 99,12 (C-6) existe um sinal de carbono ligado ao hidrogênio com valor de δ_H 6,24. O sinal em 103,74 foi atribuído ao C-8, o aumento no deslocamento químico é o esperado para uma ligação C-glicosídeo com uma unidade de glicose, compatível com a correlação entre os δ_{CH} 73,14 e δ_H 5,08. O valor dos deslocamentos químicos do CH₂-6'' (δ_C 63,05) e H-6'' (δ_H 3,99; 3,85) são compatíveis para a localização de substituinte em 6''. A presença de sinais em δ_C 172,08 (O-C=O) e 20,69 (CH₃) permitiu propor a presença de um grupo acetila ligada ao C-6'' do carboidrato. As informações de RMN ¹H e ¹³C foram comparadas com os dados obtidos por Oh & Kim (1993), que identificou a 6''-O-acetil-vitexina em *Crataegus pinnatifida* (Rosaceae).

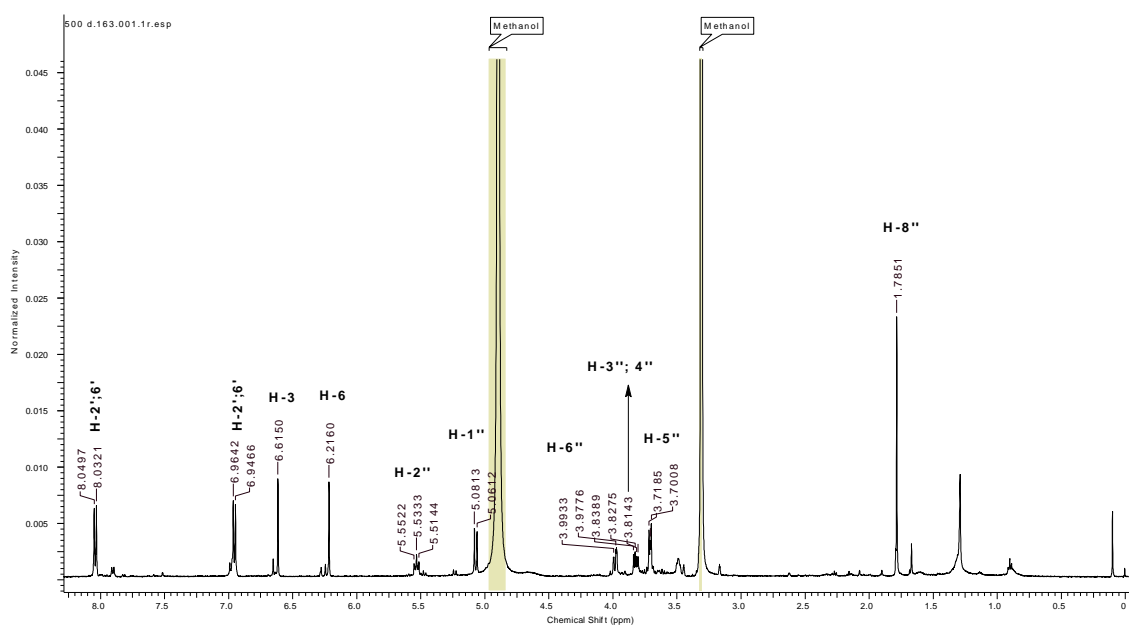
A substância **25** foi analisada por espectrometria de massa (EM-IES). O espectro de EM/EM (**Espectro 76, Página 126**) realizado em modo negativo, mostrou um pico m/z 473.1136 [M-H] sendo este reconhecido como o íon molecular menos uma unidade com a perda de um H O valor do íon molecular (m/z 474) é compatível com a fórmula molecular C₂₃H₂₂O₁₀. O **Esquema 17 (Página 126)** demonstra proposta de fragmentações para justificar os principais picos detectados no espectro de massas (EM/EM) para a substância 25. Essa análise de massas contribuiu muito para a decisão das propostas com análise de RMN. Todos esses dados conduziram à proposta da estrutura da substância 25 como sendo a 6''-O-acetil-vitexina.



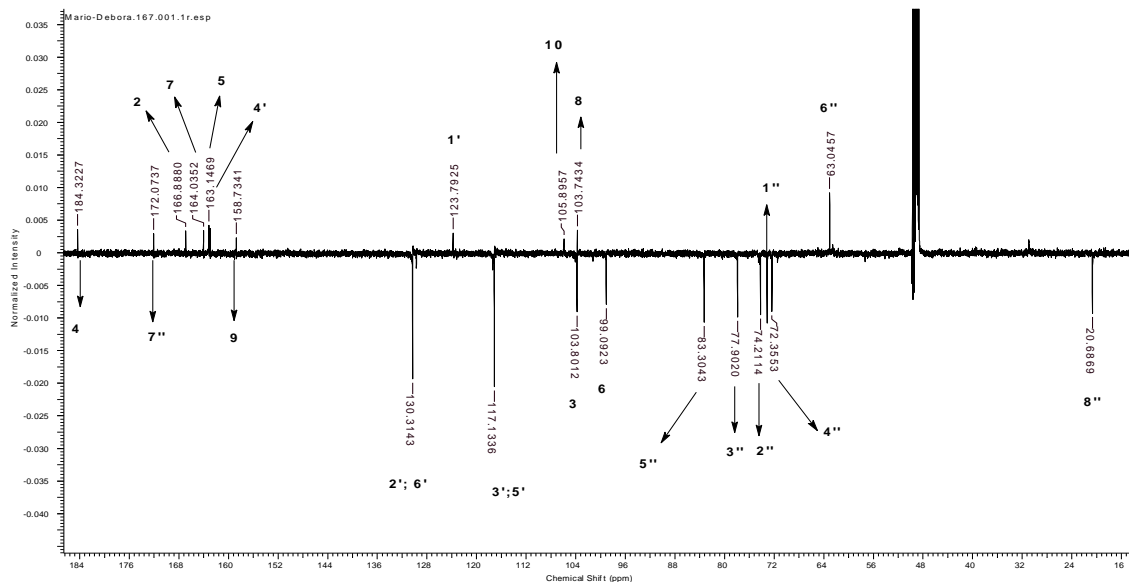
25: 6''-O-acetil-vitexina

Tabela 24. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância 25 em comparação com dados da literatura para 6''-*O*-acetil-vitexina (OH & KIM, 1993).

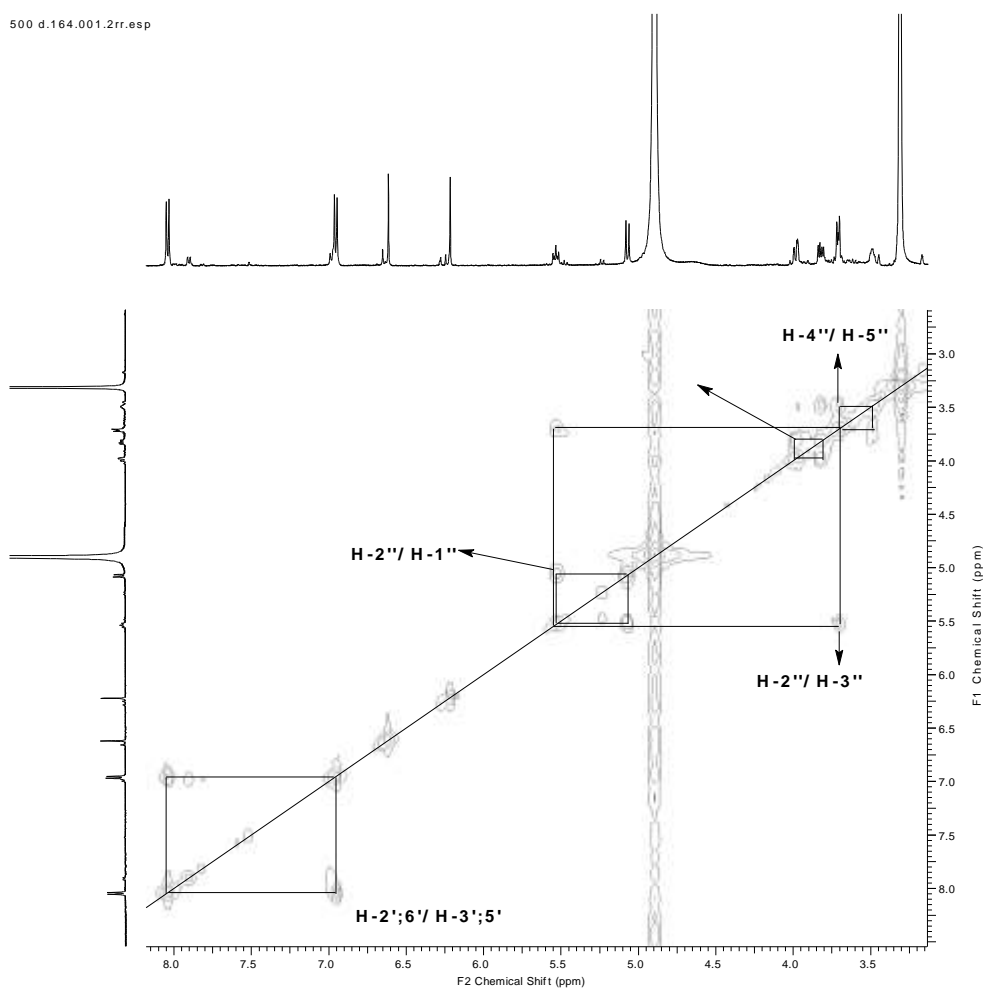
	Substância 25 (MeOD)			6''- <i>O</i> -acetil-vitexina (200 MHz; DMSO- d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult. <i>J</i>)	J^2	J^3	δ_{C}
2	166.85	-			164.0
3	103.78	6.63	2; 4	10; 1'	102.7
4	184.30	-			182.2
5	163.12	-			160.8
6	99.12	6.24		8; 10	98.4
7	164.11	-			162.8
8	103.74	-			104.3
9	158.72	-			156.2
10	105.86	-			104.3
1'	123.78	-			121.8
2' e 6'	130.29	8.06 (d, 8,5Hz)	1'	2; 4'	128.7
3' e 5'	117.12	6.97 (d, 8,5 Hz)	4'	1'	116.1
4'	162.93	-			161.3
1''	73.14	5.08 (d; 10,05 Hz)	8; 2''	7; 9; 3''; 5''	73.8
2''	74.21	5.53 (m)	3''		70.9
3''	77.90	3.72	4''		78.6
4''	72.36	3.72	3''		70.5
5''	83.28	3.52			79.7
6''	63.05	3.99; 3.85			64.2
7''	172.08	-			170.5
8''	20.69	1.80	7''		20.8



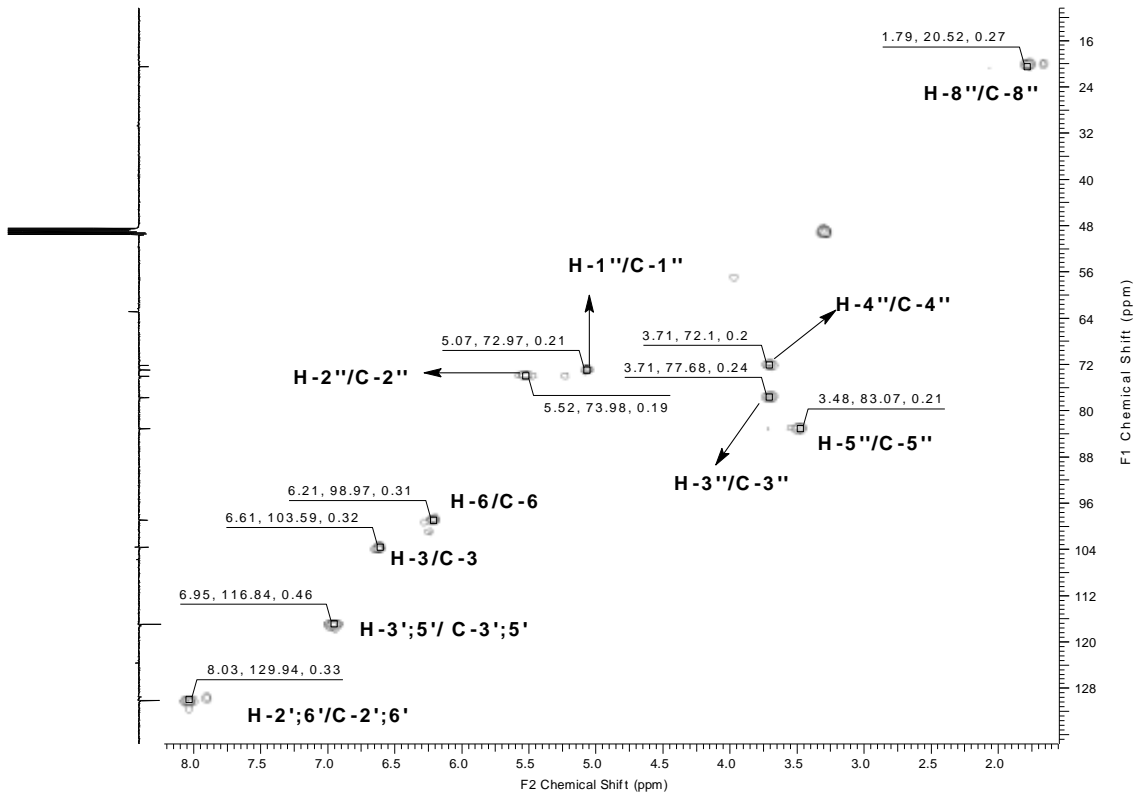
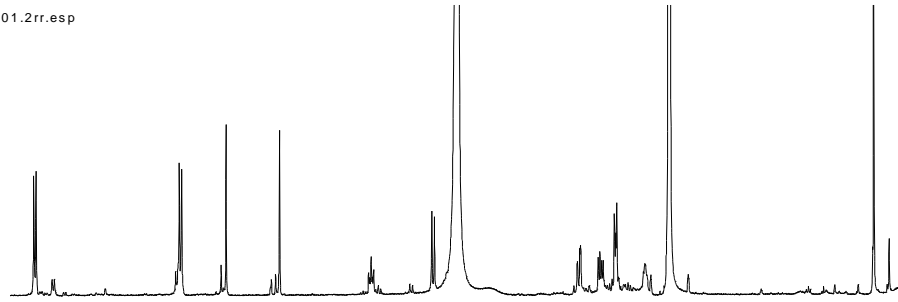
Espectro 69. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, MeOD) da substância 25.



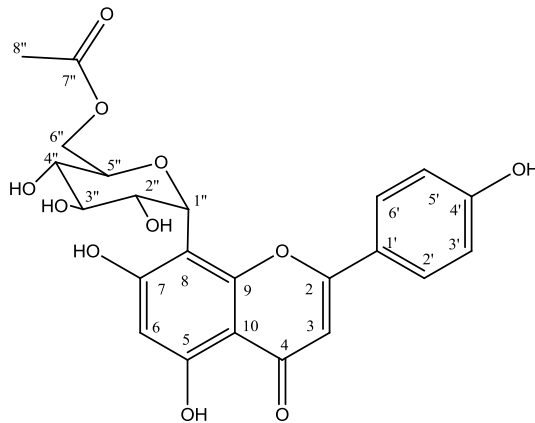
Espectro 70. Espectro de RMN ^{13}C - DEPTQ (125MHz, MeOD) da substância 25.



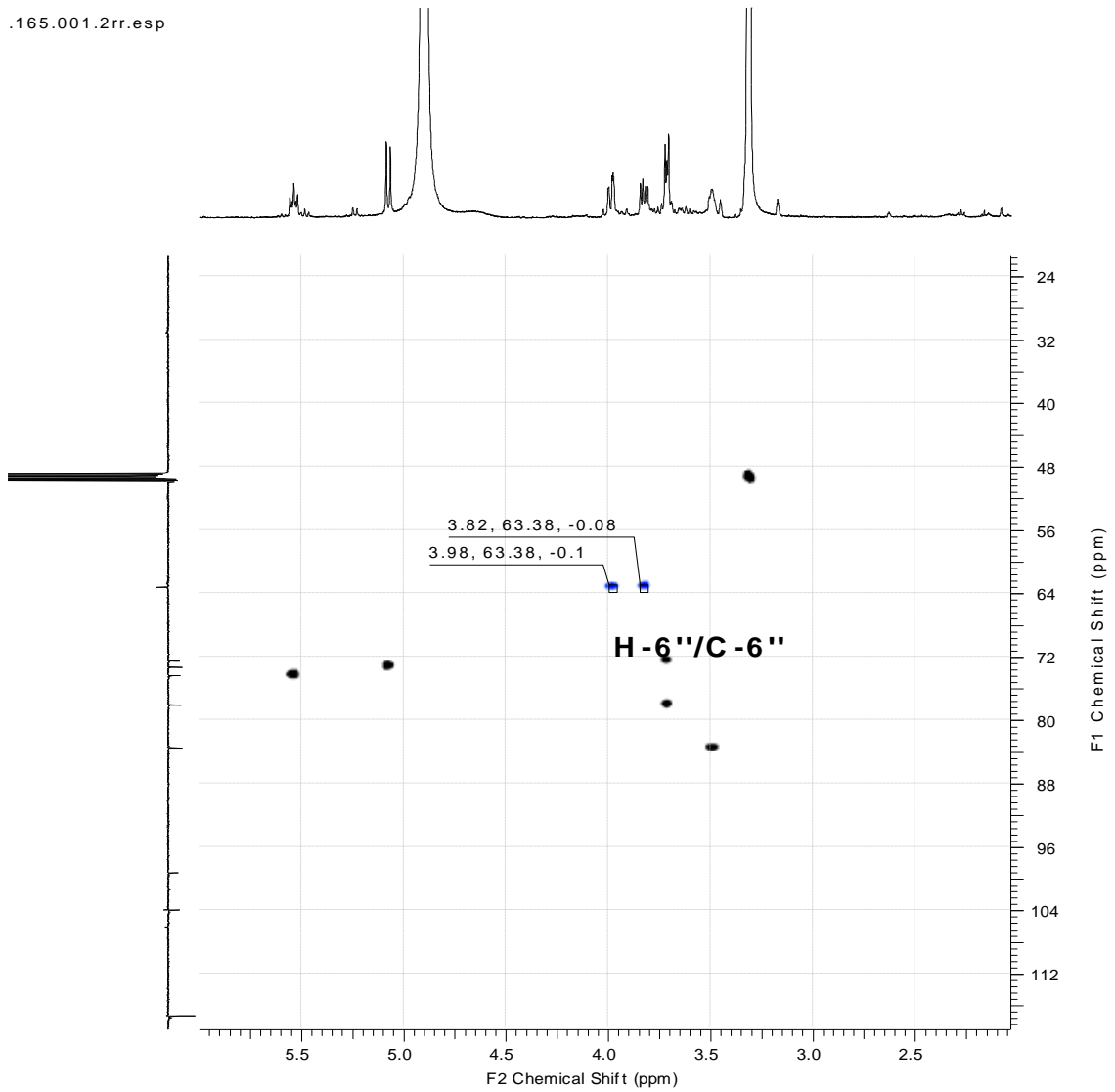
Espectro 71. Mapa de contorno de COSY (500 MHz, MeOD) da substância 25.



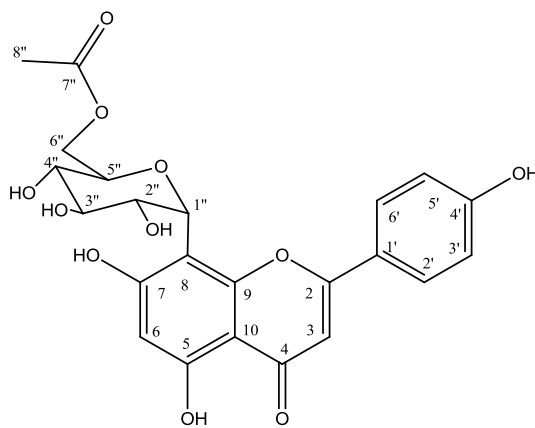
Espectro 72. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.



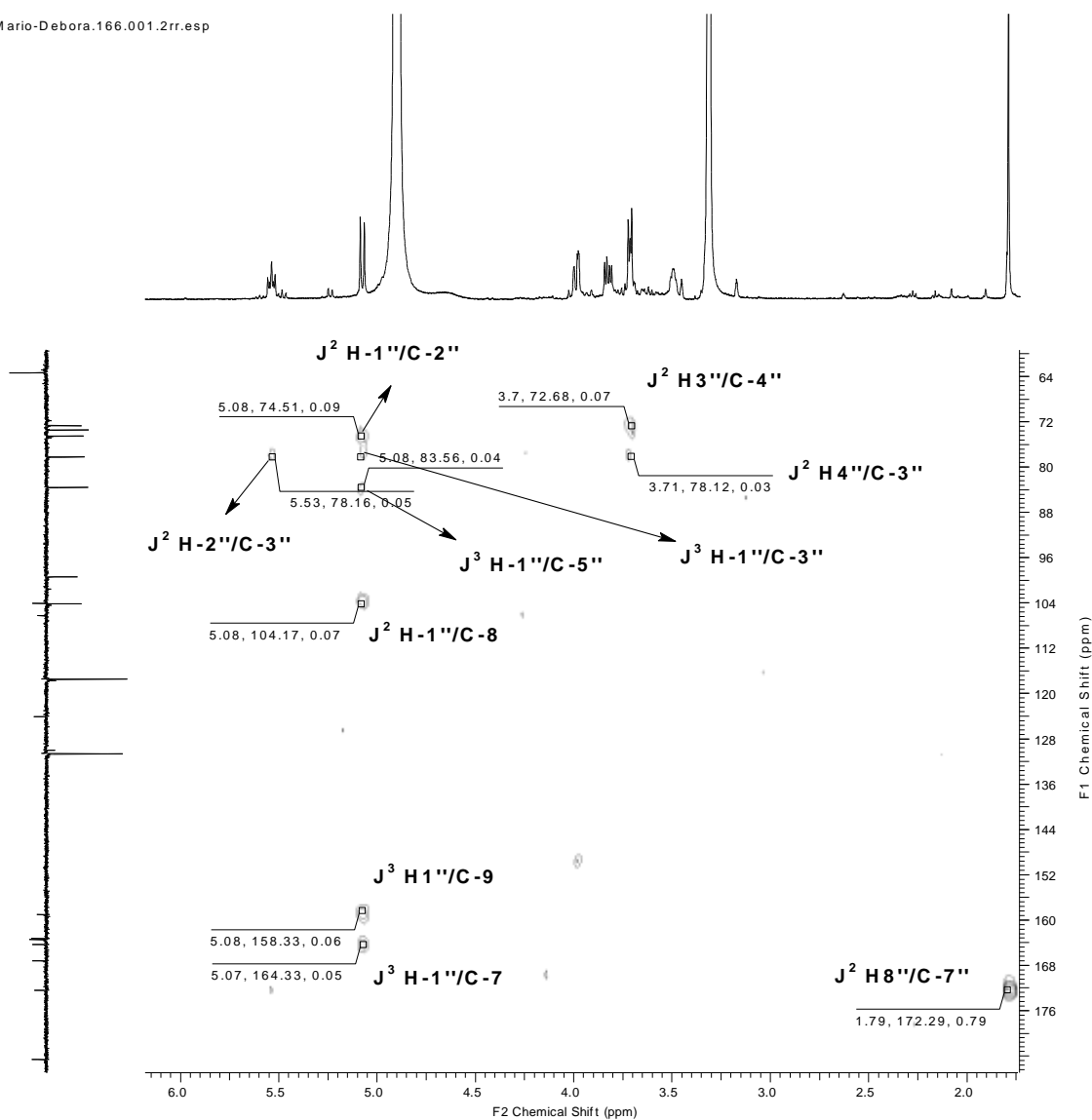
.165.001.2rr.esp



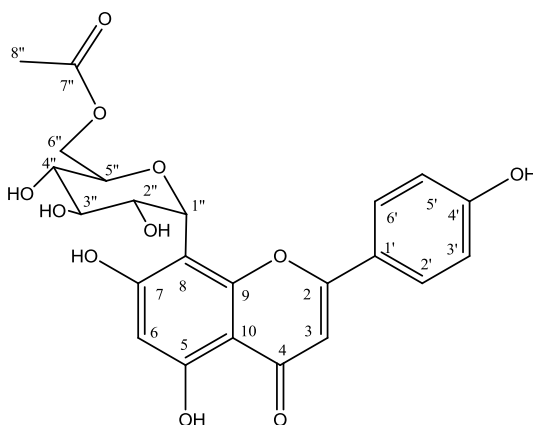
Espectro 73. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.

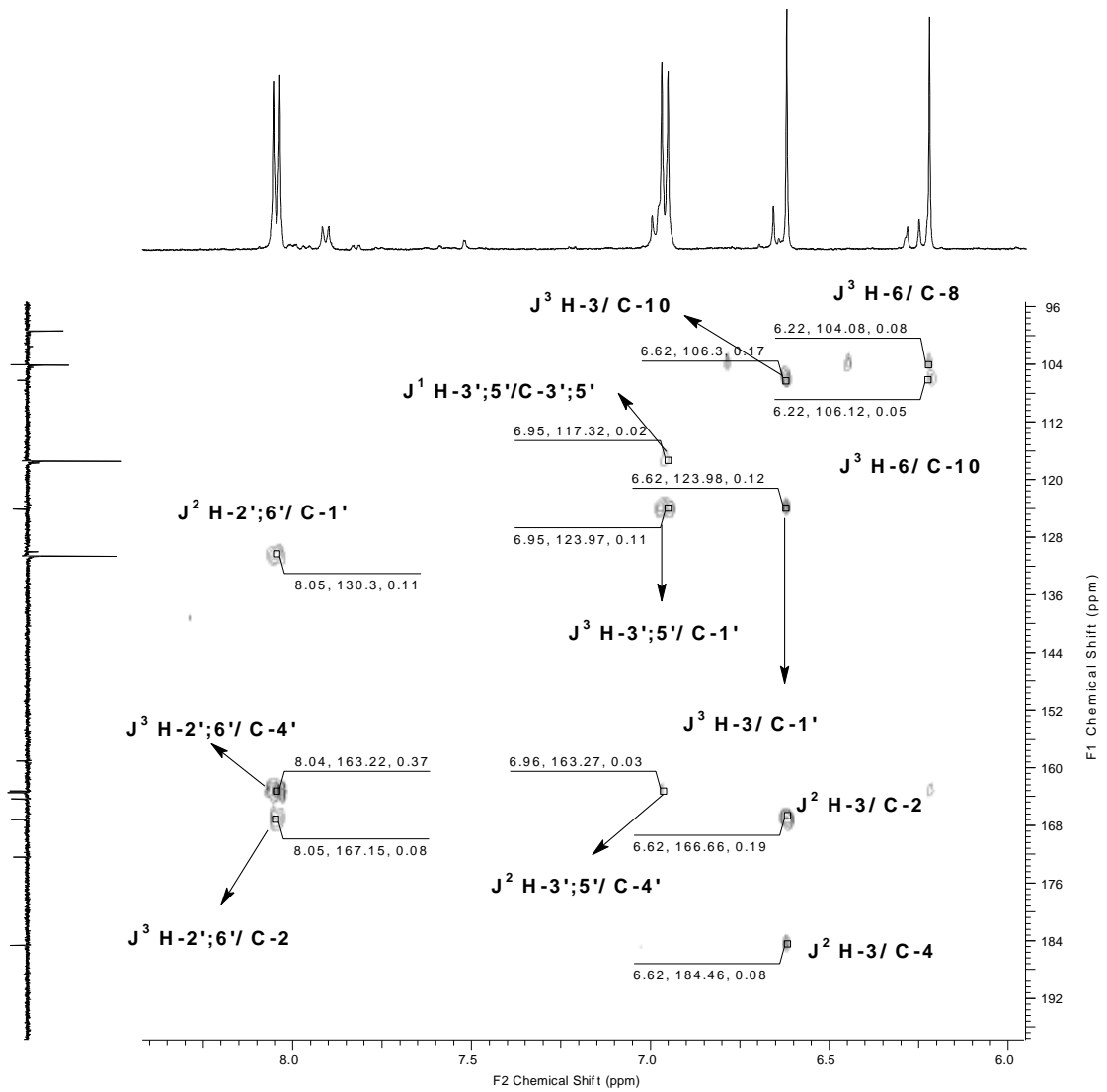


Mario-Debora.166.001.2rr.esp

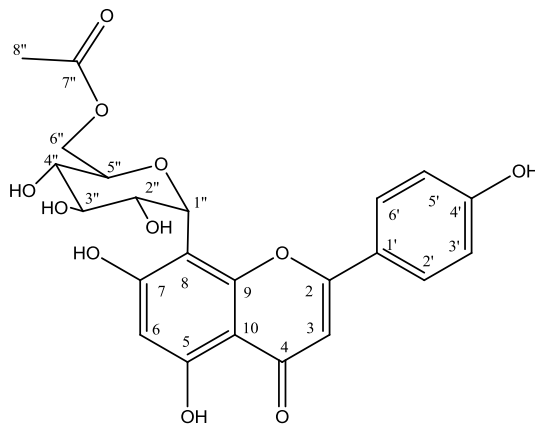


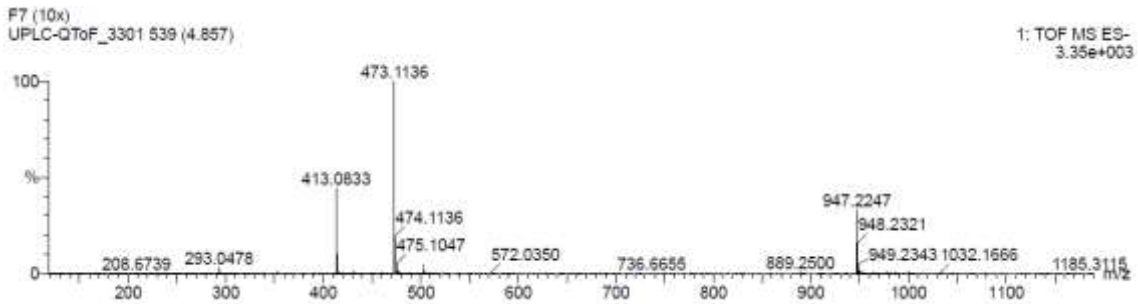
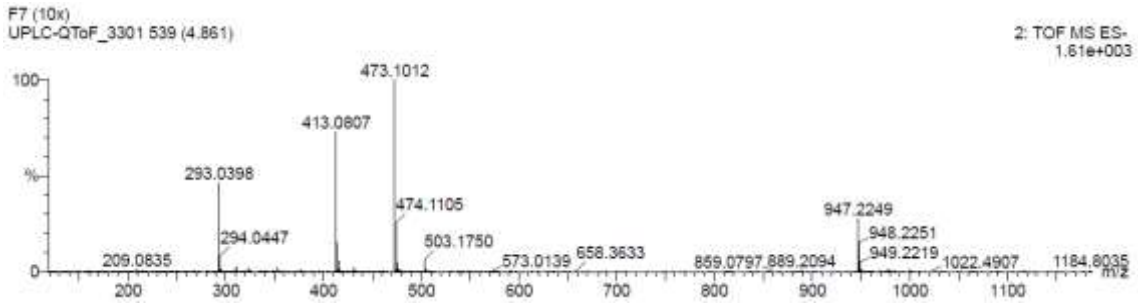
Espectro 74. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.



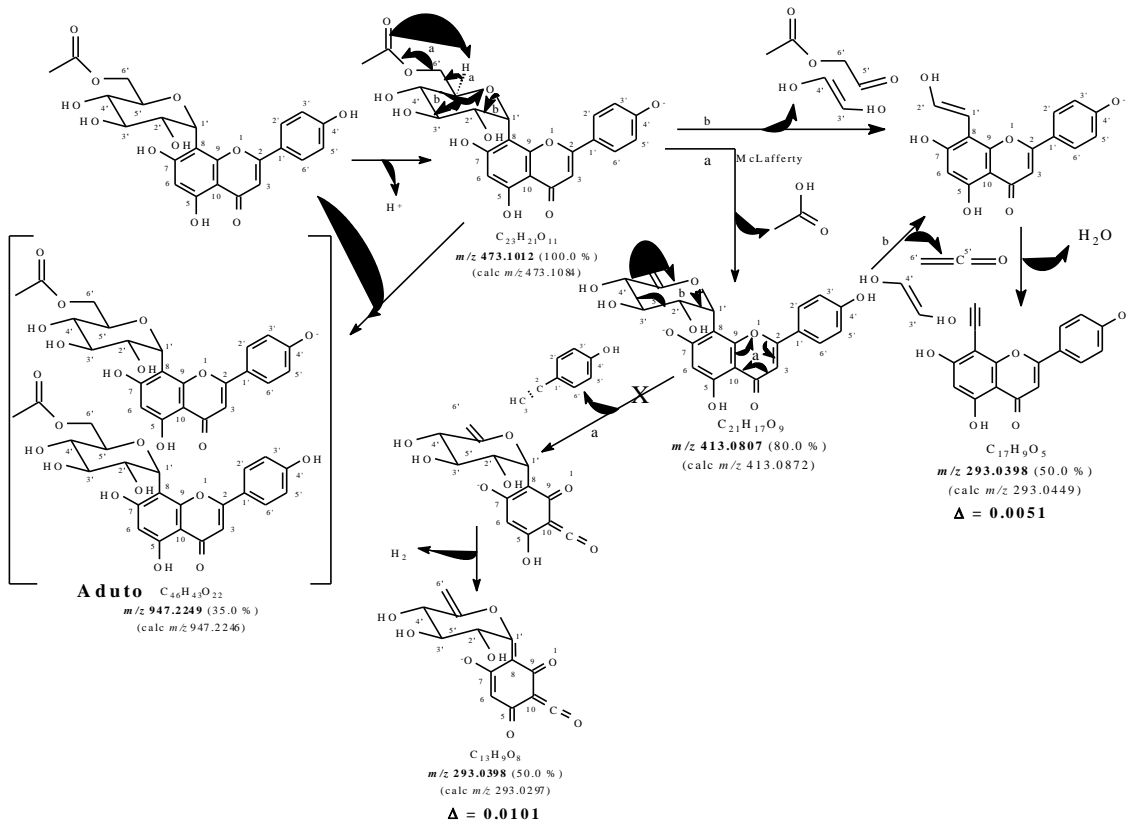


Espectro 75. Mapa de contorno HSQC (500 MHz, MeOD) da substância 25.





Espectro 76. Espectros de EM-IES $[M-H]^-$ da 6''-*O*-acetil-vitexina.



Esquema 17. Proposta de fragmentação para a 6''-*O*-acetil-vitexina baseados nos íons presentes no espectro de alta resolução.

3.5.7. Identificação da vitexina (26) e da orintina (27) em CSMH₂O-A 35/29-31

As substâncias presentes na fração CSMH₂O-A 35/29-31 foram identificadas em mistura. O perfil da amostra foi analisado por CLAE-UV, vide o cromatograma apresentado na **Figura 36**.

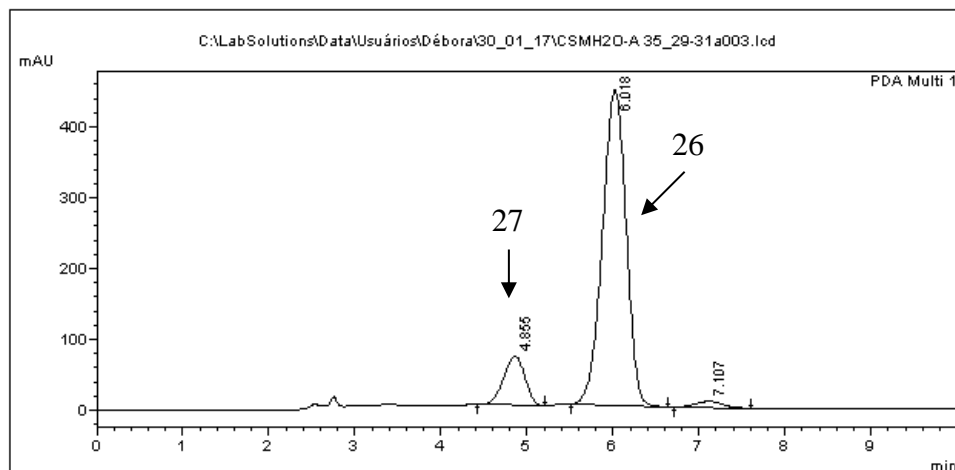


Figura 36. Cromatograma da fração CSMH₂O-A 35/29-31.

A identificação dos dois metabólitos principais presentes na fração foi por análise de RMN ¹H e ¹³C. O espectro de RMN ¹H (**Espectro 77, Página 130**) apresentou sinais característicos de flavonoide com uma glicose ligada. A integração no espectro RMN ¹H demonstra que a vitexina (**26**) encontra-se em maior concentração quando comparada à orientina (**27**), evidência também verificada no cromatograma (**Figura 36**).

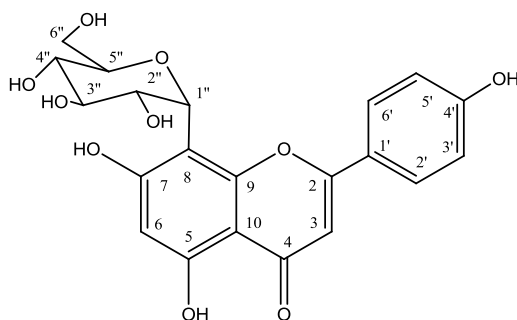
A interpretação do espectro de RMN ¹H (**Espectro 77 e 78, Página 130**) permitiu identificar sinais em δ_H 6,57 e 6,42 que podem ser propostos como os singletos típicos de H-3 de esqueleto de flavona, respectivamente, para substâncias **26** e **27**. Em δ_H 7,95 e 6,87 foram atribuídos aos hidrogênios do sistema AA'BB' do anel B, H-2'; 6' e H-3'; 5', respectivamente, para a substância **26**. Já os deslocamentos 6,73 e 7,42 (d, 8,5Hz) correspondem ao sistema "ABC" da substância **27**.

Foram observados sinais característicos de carboidratos, em δ_H 4,71 (*s*, H-1''); 3,84 (*s*, H-2''); 3,25 (*m*, H-3''); 3,29 (*m*, H-4'') 3,20 (*m*, H-5''), 3,73 e 3,30 (*m*, H-6'') cujos valores estão de acordo com uma unidade glicosídica ligada ao esqueleto de flavona. A ausência do sinal típico de H-8 levou a concluir que a conexão do açúcar se encontram nessa posição, o valor em δ_H (4,72 ppm, H-1'') que está ligado ao carbono com δ_C 73,80, permite a proposta de sistema com ligação C-glicosídeo. Esta informação foi tirada com base na análise do experimento de HSQC que correlaciona os hidrogênios aos devidos carbonos (**Espectro 81, Página 132**). Com esse experimento tornou-se possível correlacionar os deslocamentos químicos dos hidrogênios da unidade glicosídica com seus respectivos carbonos. Os deslocamentos químicos de ¹³C para cada molécula são apresentados na **Tabela 25 e 26 9 (Página 128 e 129)**. Em função da pouca massa da amostra e da mistura de três substâncias,

como demonstrado no cromatograma da **Figura 36 (Página 127)**, os carbonos quaternários oxigenados que deveriam ser observados entre 140 e 160 ppm não foram detectados.

Os deslocamentos químicos de ^{13}C (**Espectro 79 e 80, Página 131**) detectados caracterizam o sistema AA'BB' da vitexina pelos sinais δ_c 128,49 (2';6') e δ_c 115,79 (3';5'), ao C-1' foi atribuído o sinal em 121,87 ppm, o deslocamento de C-4' não foi detectado. O anel B da orientina é caracterizado pelos sinais em 121,87 (C-1'), 119,39 (C-6'), 115,44 (C-5') e 112,48 ppm (C-2'), os deslocamentos de C-3' e 4' não foram detectados.

Os carbonos detectados na região de 60 a 85 ppm correspondem aos carbonos da glicose, δ_c 61,46 (C-6''), δ_c 70,71 (C-4''), δ_c 78,94 (C-3'') e δ_c 81,65 (C-5''). O valor de C-1'' foi mensurado através do experimento de HSQC (**Espectro 81, Página 132**). Nele observa-se a correlação a uma ligação entre o sinal do hidrogênio e seu respectivo carbono, o singlete em 4,72 ppm está correlacionado diretamente com o δ_c 73,8, que corresponde ao valor esperado para o carbono metínico glicose ligada ao flavonoide por uma ligação C-C. As informações de RMN ^1H e ^{13}C foram comparadas com os dados obtidos por Krafczyk & Glomb (2008) feito em DMSO-D₆ a 500MHz.

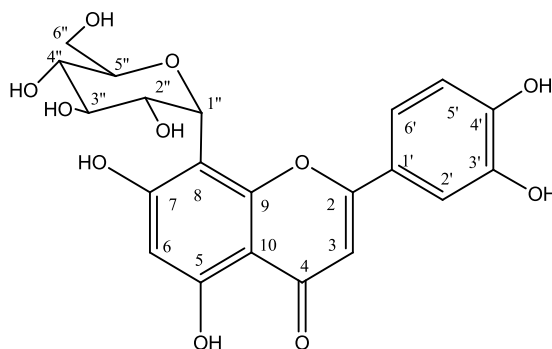


26: Vitexina

Tabela 25. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância (26) em comparação com dados da vitexina (KRAFCHYK & GLOMB, 2008).

	Substância 26 (DMSO-D ₆)		Vitexina (DMSO-D ₆)
	δ_c	δ_H (mult. J)	δ_c
2	160,74	-	163,91
3	101,83	6,57 (s)	102,41
4	181,10	-	182,06
5		-	160,35
6		5,92 (s)	98,10
7		-	162,51
8	104,70	-	104,60
9		-	155,96
10	104,94	-	104,58
1'	121,87	-	121,57
2'	128,49	7,95 (d; 8,0 Hz)	128,92
3'	115,79	6,87 (d; 8,0 Hz)	115,77
4'		-	161,10
5'	115,79	6,87 (d; 8,0 Hz)	115,79

6'	128,49	7,95 (d; 8,0 Hz)	128,92
Gli			
1''	73,80	4,72 (sl)	73,34
2''	71,15	3,86	70,80
3''	78,94	3,33	78,63
4''	70,71	3,30	70,51
5''	81,65	3,25	81,81
6''	61,44	3,5; 3,73 (dd)	61,26

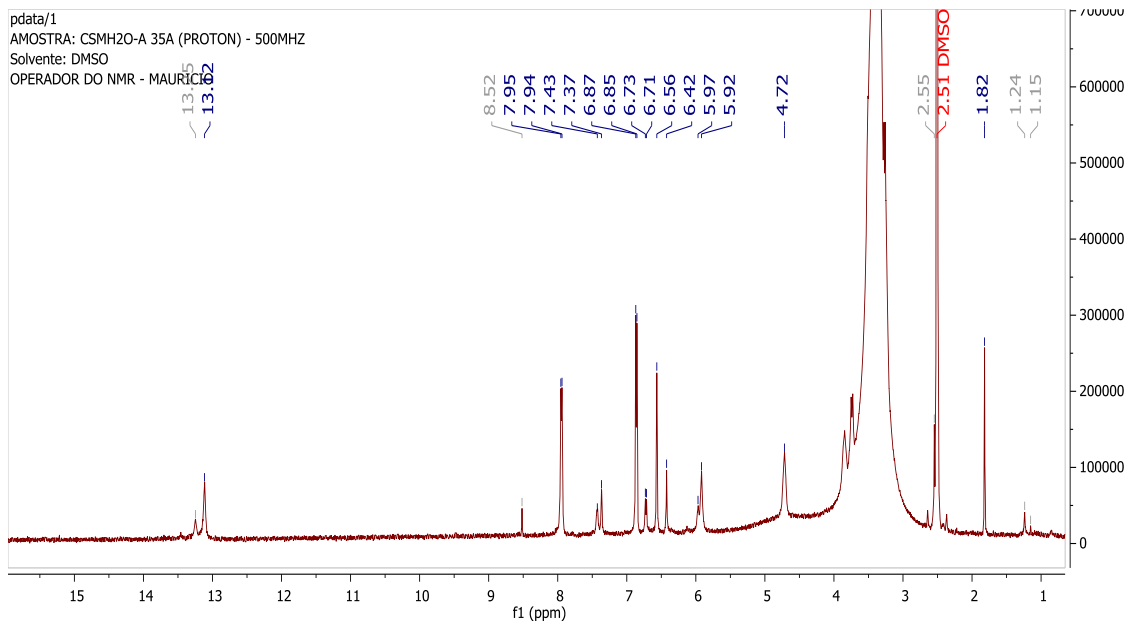


27: Orientina

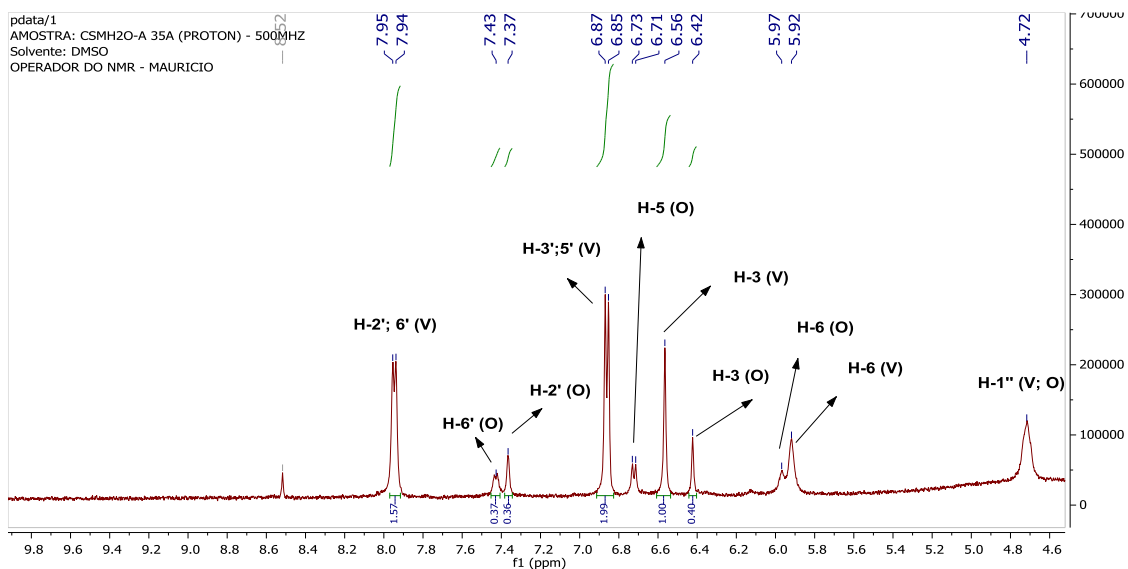
Tabela 26. Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância (27) em comparação com dados da vitexina (KRAFCZYK & GLOMB, 2008).

	Substância 27 (DMSO- d_6)		Orientina (DMSO- d_6)
	δ_{C}	δ_{H} (mult. J)	δ_{C}
2		-	164,05
3	100,98	6,42(s)	102,36
4		-	181,98
5		-	162,50
6		5,97 (s)	98,06
7		-	160,34
8	104,70	-	104,51
9		-	156,95
10	105,39	-	103,99
1'	121,87	-	122,98
2'	112,48	7,36 (sl)	114,04
3'		-	145,77
4'		-	149,77
5'	115,44	6,73 (d; 8,5 Hz)	115,61
6'	119,39	7,44 (dd)	119,32
Gli			
1''	73,80	4,72 (sl)	73,35
2''	71,15	3,86	70,73
3''	78,94	3,33	78,78

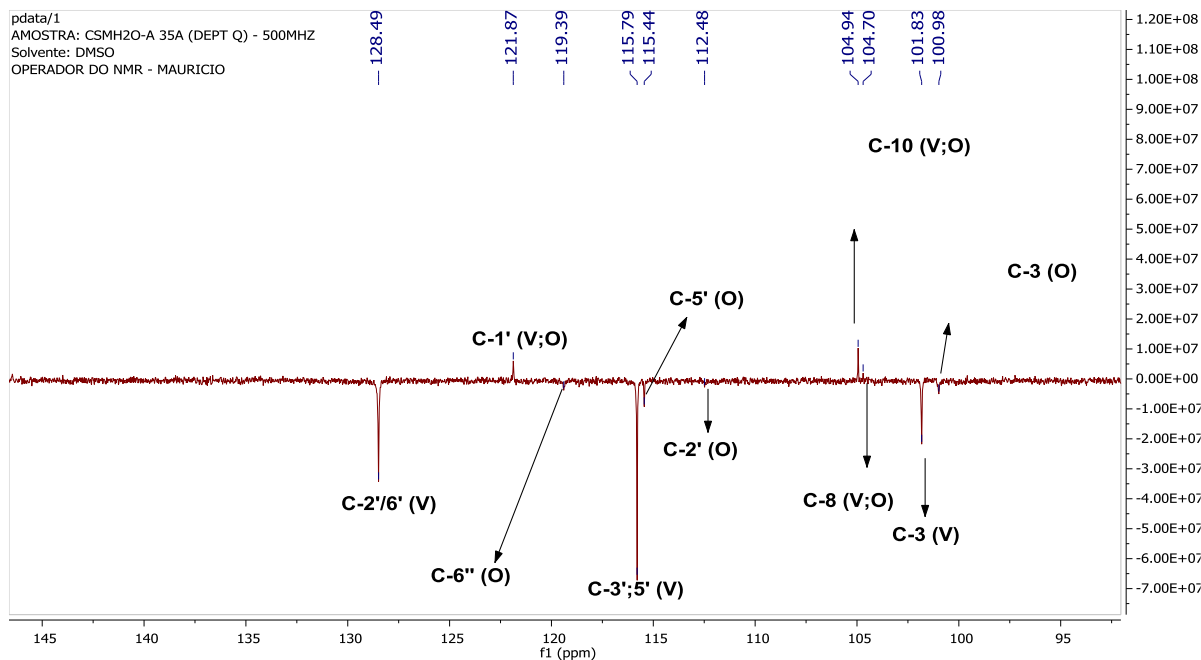
4''	70,71	3,30	70,66
5''	81,65	3,25	81,96
6''	61,46	3,5; 3,73 (dd)	61,60



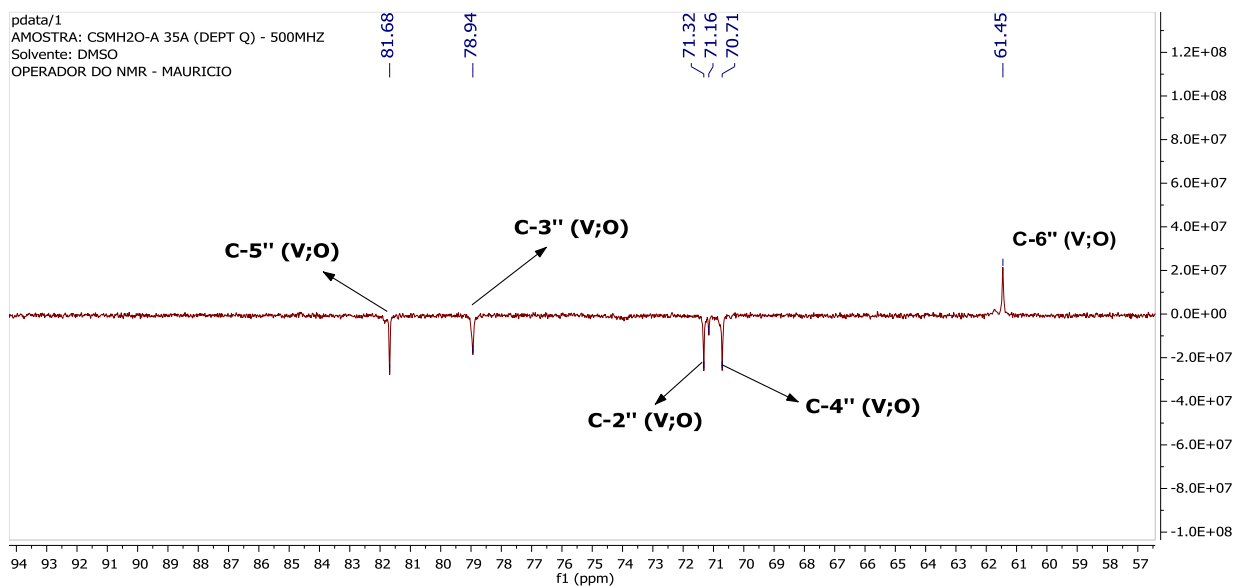
Espectro 77. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 26 e 27.



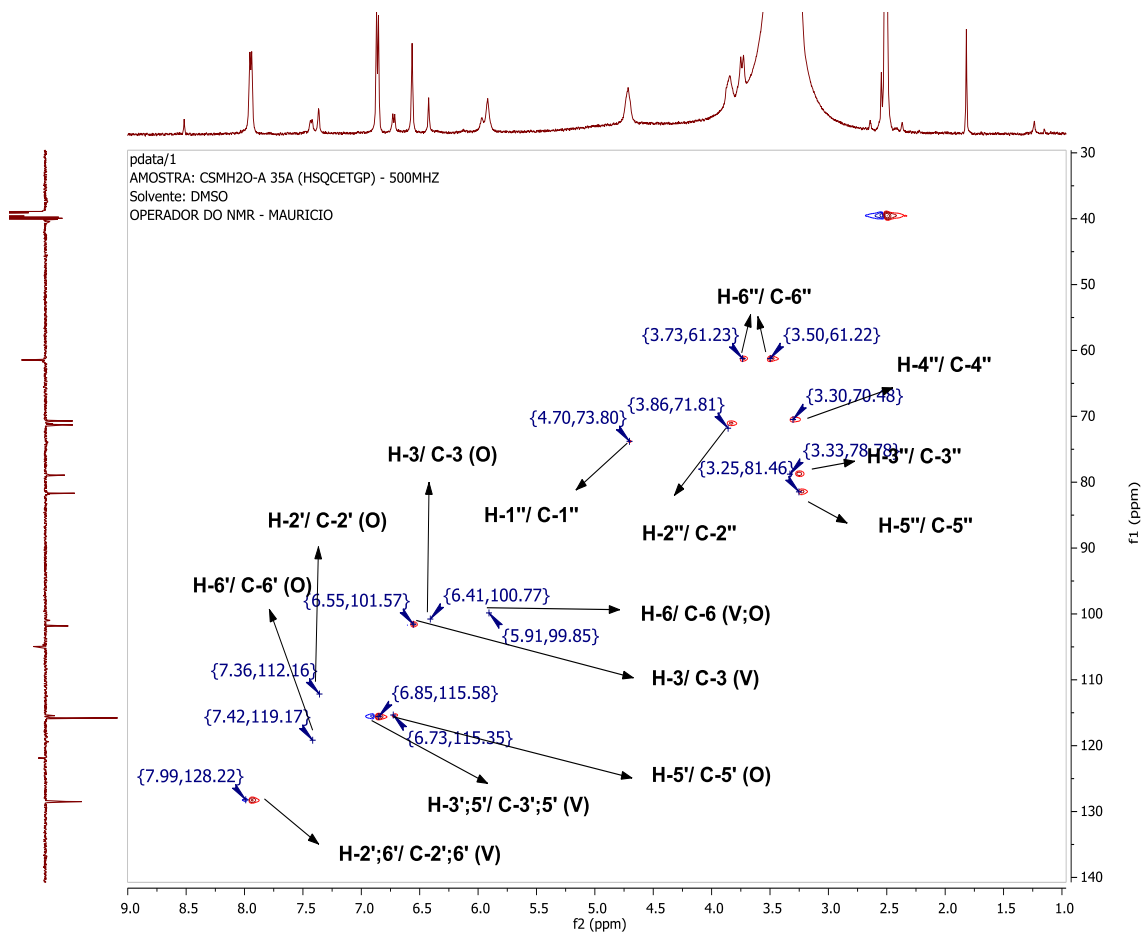
Espectro 78. Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 26 e 27.



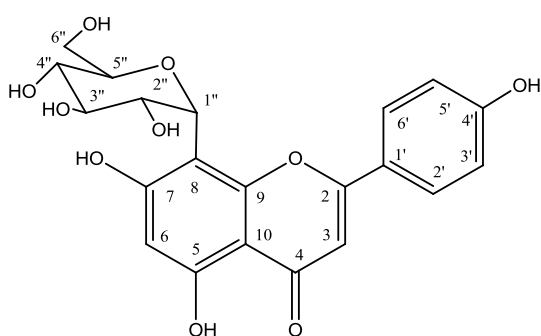
Espectro 79. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT (125 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 26 e 27.



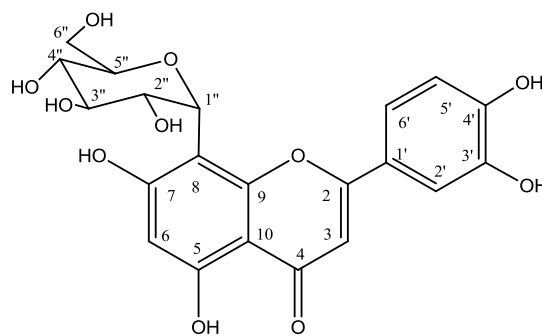
Espectro 80. Expansão do espectro de RMN ^{13}C -DEPT (125 MHz, DMSO- d_6) das substâncias 26 e 27.



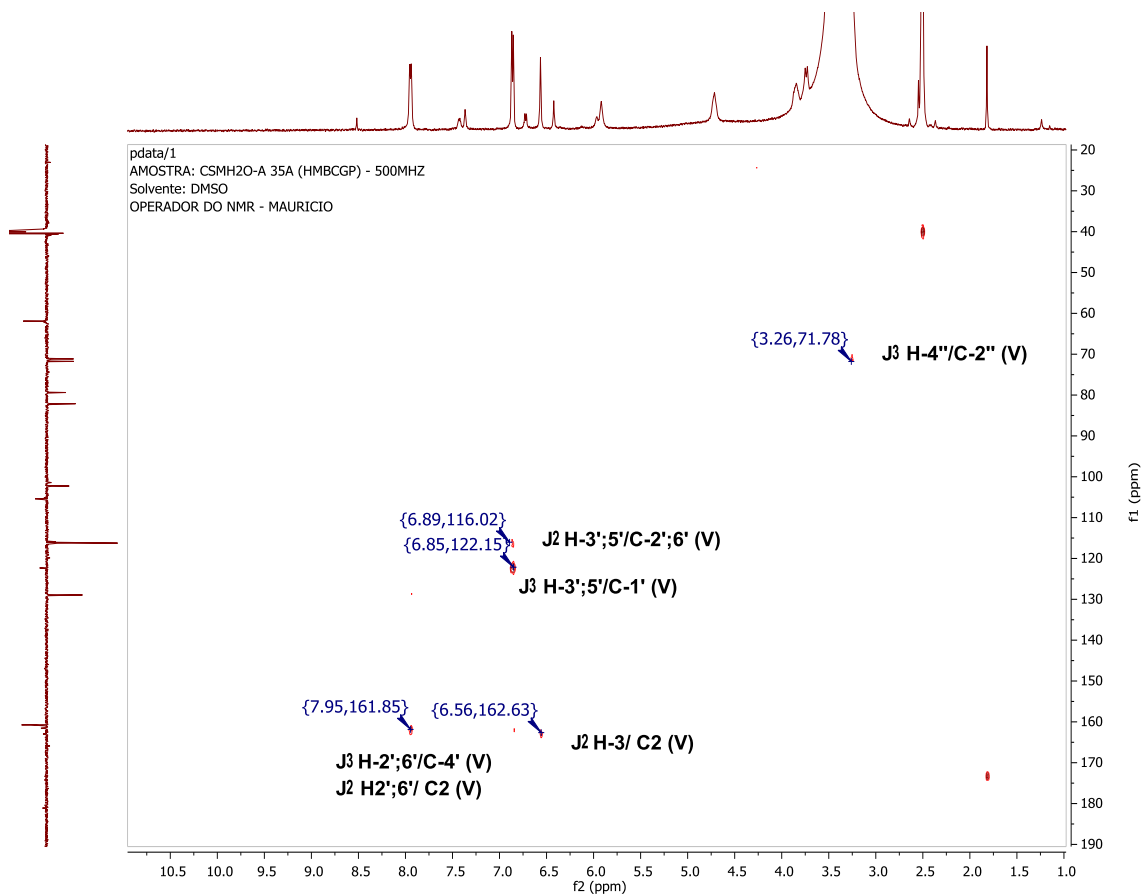
Espectro 81. Mapa de contorno HSQC (500/ 125 MHz, DMSO-d₆) das substâncias 26 e 27.



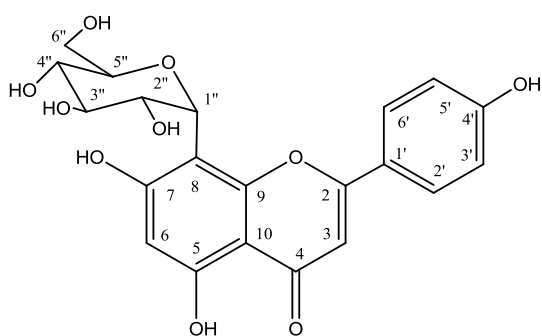
26: Vitexina



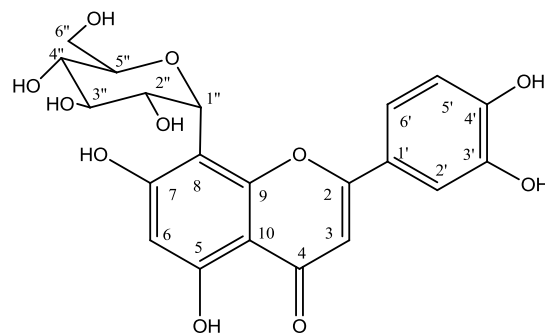
27: Orientina



Espectro 82. Mapa de contorno HMBC (500/ 125 MHz, DMSO-d₆) das substâncias 26 e 27



26: Vitexina



27: Orientina

4.5.8. Resultados da influência sobre a tirosinase

A solubilidade em DMSO da partição diclorometano e do biflavonoide, oriundo da mesma partição, apresentou certa limitação, desta forma foi possível testar as seguintes concentrações: partição diclorometano ($133 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o biflavonoide ochnaflavona ($333 \mu\text{M}$). Utilizando estas concentrações obtivemos ação inibitória da atividade da tirosinase em 20% para a partição e 2,0% para a biflavonoide. Por outro lado, extrato de acetato de etila ($666 \mu\text{g mL}^{-1}$), \pm catequinas (catequina e epicatequina - $800 \mu\text{M}$) aumentaram a atividade da tirosinase em 104% e 384%, respectivamente.

Como pode ser visto na **Figura 37**, as catequinas podem ativar significativamente a tirosinase de maneira dose-dependente. Assim, o extrato de acetato de etila de *C. spathulata* (rico em catequinas) e a mistura de catequinas poderiam ser usadas como um potencial tratamento para a doença de hipopigmentação causada pela ação fracassada da enzima tirosinase.

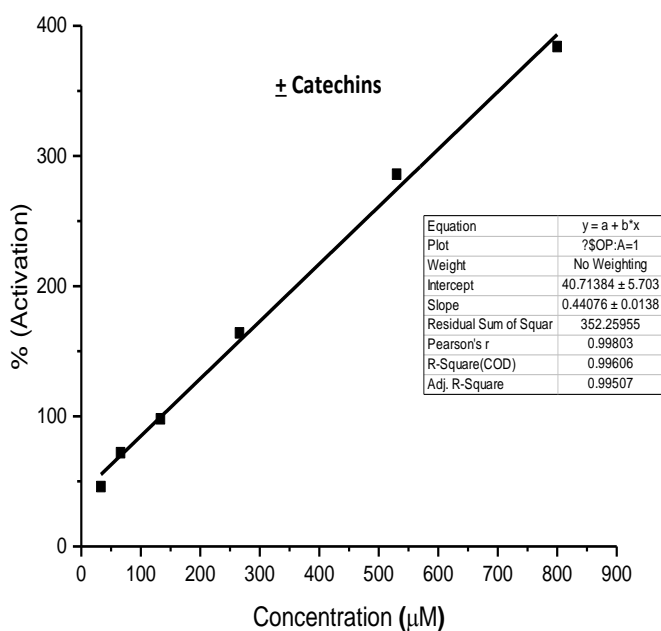


Figura 37. Efeitos de ativação dose-dependente das catequinas sobre a ação da tirosinase.

As variações dos valores de K_m e V_m para os ativadores de tirosinase não foram descritas na literatura, então uma experiência semelhante ao método de Lineweaver-Bruk foi aplicada para determinar o mecanismo de ativação das catequinas.

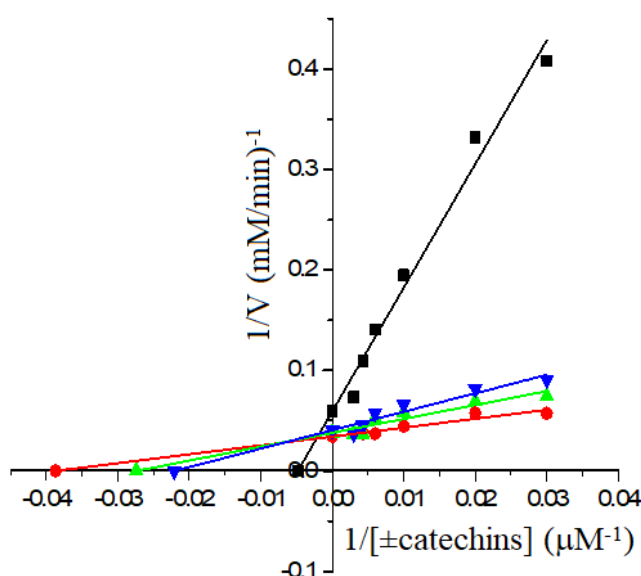


Figura 38. Experiência semelhante ao método de Lineweaver-Bruk para avaliar K_m e V_m em ensaio de tirosinase. O substrato foi a mistura de catequina e epicatequina, e as concentrações de L-DOPA para cada etapa foram 0 (■), 167 (▼), 233 (▲) and 333 (●) μM .

O gráfico da **Figura 38** e os resultados da **Tabela 27** revelaram que K_m diminui, V_{\max} aumenta e a relação K_m/V_m diminuiu na presença de L-DOPA.

Tabela 27: Velocidade constante e máxima de Michaelis para atividade de tirosinase na presença de \pm catequina.

[L-DOPA (μM)]	K_m	V_m	K_m/V_m
0	220	16,8	11,9
167	45,4	24,8	3,6
233	37,0	26,4	1,4
333	25,6	29,2	0,87

A constante de Michaelis (K_m) é a concentração de substrato, na qual a taxa de reação corresponde à metade da velocidade máxima. Portanto, se houver um aumento na atividade catalítica da enzima na presença de baixas concentrações de substâncias, que também apresentam afinidade pelo seu sítio ativo, indica um efeito competitivo desses compostos no sítio ativo da enzima. As catequinas demonstraram ser um substrato preferencial quando comparada a presença de L-DOPA.

4.6. CONSIDERAÇÕES

Os estudos botânicos sobre o gênero *Cespedesia* ratificam a existência de um único exemplar, a *Cespedesia spathulata*. A espécie apresenta características estruturais que a distinguem de todos os outros exemplares dos demais gêneros que também pertencem a família Ochnaceae, justificam assim a existência do um gênero monoespecífico. A análise genética das

espécies da família Ochnaceae estão representadas por cladograma proposto por Matthews e colaboradores (2012) onde apontam a proximidade entre *Cespedesia spathulata* com o gênero *Sauvagesia*.

No estudo fitoquímico realizado neste trabalho é possível detectar outros pontos que corroboram com a aproximação destes gêneros, a similaridade entre os metabólitos secundário biossintetizados por *C. spathulata* e os já identificados em *Sauvagesia*. Podemos destacar as flavonas vitexina (26) e orientina (27), presentes em ambos gêneros, a outra flavona identificada a 6''-acetil-vitexina (25) demonstram um padrão de substituição com unidades C-glicosidados, condição não frequente em espécies de outros gêneros de Ochnaceae. Os esteroides sitosterol (20) e estigmasterol (21) também estão presentes em ambos os gêneros.

Ao todo foram identificadas 27 substâncias, considerando as substâncias já mencionadas na literatura, foi possível incorporar mais 26 substâncias como constituintes dessa planta. Foram identificados treze ésteres graxos (1-13). As substâncias (Z) 7-hexadecenal (14), hexadecil (4-metil-1-pentila) oxalato (15), 4-heptil- γ -lactona (16), Fitol (17), 2-(5-oxohexil)ciclopentanona (18) e decanodiato de 2-etil-hexila (19). O biflavonoide ochnaflavona (22) que já havia sido indentificada na espécie. As flavan-3-ol catequina (23) e epicatequina (24).

As diferentes partições obtidas das folhas de *C. spathulata* apresenta atividade de inibição baixa a moderada (CSMH₂O-D e ochnaflavona) e se mostraram ativadoras da enzima tirosinase (CSMH₂O-A e a mistura de catequina e epicatequina). No modelo competitivo as catequinas demonstraram ser um substrato mais interessante à enzima que a própria L-DOPA. Este experimento nos possibilita indicar a ação do produto natural como uma ferramenta que pode ser utilizada no tratamento de problemas como a hipopigmentação.

5. CONCLUSÕES

Este estudo permitiu identificar 46 substâncias e ampliar o conhecimento sobre a composição química do gênero *Urochloa* (Poaceae) e do *Cespedesia* (Ochnaceae). O uso de metodologias clássicas permitiu a identificação de 8 substâncias em *U. ruzizensis* e com o uso da técnica de desreplicação aplicamos o conhecimento em mais 7 substâncias. A mesma técnica permitiu identificar 5 outras substâncias, não antes identificadas no trabalho prévio de isolamento e identificação realizado por Oliveira e colaboradores (2017). Com relação a espécie *Cespedesia spathulata* foram identificadas 27 substâncias, 26 delas isolados pela primeira vez na espécie.

O processo de desreplicação permitiu ainda demonstrarmos a similaridade entre quatro espécies do gênero *Urochloa* (*U. hudicola*, *U. ruzizensis*, *U. brizantha* e *U. decumbens*) pela análise das informações obtidas e comparação da literatura. Dentre flavonoides C-glicosilados, isoschaftosideo, carlinosideo e schaftosideo, identificados em *U. ruzizensis*, os dois últimos também estão presentes em *U. brizantha* e *U. decumbens* (PEREZ et al., 2016).

Dando destaque à presença das saponinas, classe de metabólitos responsáveis pelos efeitos fotossensibilizante e pela alelopatia na germinação de grãos, (TOKARNIA, 2012; NEPOMUCENO et al., 2017) vemos que em todas as quatro espécies existem a saponina protodioscina; dioscina está presente nas três espécies *U. humidicola*, *U. ruzizensis* e *U.*

decumbens; collettinsídeo III presente em *U. ruziziensis* e *U. decumbens*; penogenina-3 β -O- β -D-glicopiranosil-[(2-1)-O- α -L-ramnopiranosil-(4-1)-O- α -L-ramnopiranosil] foi identificada na espécie *U. humidicola* e *U. ruziziensis*; as saponinas solanigrósido H, pariphyllin A e 3-O- β -D-glicopiranosil-(1-4)- α -L-ramnopiranosil-(1-4)- β -D-glicopiranosil-(1-4)-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)]- β -D-glicopiranosídeo- espirosta-5-eno são apresentadas pela primeira vez na espécie *U. humidicola*.

O estudo fitoquímico realizado com a espécie *Cespedesia spathulata* permitiu a descoberta de substâncias pertencentes a outras classes além do biflavonoide já identificado, ochnaflavona. A semelhança com o gênero *Sauvagesia* também pode ser verificada pela identificação de flavonoides C-glicosilados como a 6''-O-acetil-vitevixa, a vitexina e a orientina, as duas últimas também foram encontradas na espécie *Sauvagesia erecta*. Nos outros gêneros pertencentes à Ochnacea o padrão observado são flavonoides O-glicosilados.

O ensaio biológico realizado com constituintes de *Cespedesia spathulata*, o biflavonoide, as catequinas, e as partições confirmam a ação promotora da tirosinase. Indicando que a espécie, seu extrato e as catequinas podem ser utilizados no tratamento de alguma doença despigmentadora da pele.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALCÂNTARA, P.B. & BUFARAH, G. **Plantas forrageiras: gramíneas e leguminosas**. 4^a ed. Nobel, São Paulo, 1992.
- ALBUQUERQUE, L. R. M. Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Ouratea microdonta*, *Salvagesia erecta* e Látex de *Parahancornia amapa* e Atividades Biológica. *Tese de Doutorado*, PPGQ-UFRRJ, 2012.
- ALVARENGA, R. C.; CABEZAS, W. A. L.; CRUZ, J. C.; SANTANA, D. P. Plantas de cobertura de solo para sistema plantio direto. **Informe Agropecuário**, v. 22, n. 208, p. 25-36, 2001.
- AMADO, G. P., SILVA, C. C. B.; BARBOSA, F. M. S.; NASCIMENTO, H. H. L.; MALTA, K. C.; AZEVEDO, M. V.; LACERDA-LUCENA, P. B.; LUCENA, R. B. Surto de fotossensibilização e dermatite alérgica em ruminantes e equídeos no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n.5, p. 889-895, 2018.
- AMARAL, M.C.E. Phylogenetische systematik der Ochnaceae. **Botanische Jahrbuecher Fuer Systematik**, v. 113, n. 1, p. 105-196, 1991.
- ANUALPEC 2004. São Paulo: **Instituto FNP**, p. 376, 2004.
- BARBOSA, E. G.; PIVELLO, V. R.; MEIRELLES, S. T. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian Cerrados. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 825-831, 2008.
- BARCELLOS, A. O.; VILELA, L.; LUPINACCI, A. V. Desafios da pecuária de corte a pasto na Região do Cerrado. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, p. 40, 2001.
- BERMÚDEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; GONZÁLEZ-MUJICA, F.; DUQUE, S.; ITO, Y.; **Natural Product Communications**, v. 7, p. 973, 2012.
- BILIA R.A.; Mendez J.; Morelli I.; Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, p. 191-197, 1996.
- BOGDAN, A. V. Tropical pasture and fodder plants. **New York Longman**, p. 475, 1977.
- BORGES, L. H. A.; DOMINGUES, M.; MATTEI, S. S.; MIYAZAWA, M. K.; SINCINETTI, J. M. “Fotossensibilização secundária pela ingestão de brachiaria em bovino”. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 5, 2005.
- BOUQUET, A. **Féticheurs et Médecines Traditionnelles du Congo Brazzaville**. Paris: ORSTOM. 1969.
- BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; GARUTTI, M. B.; NOBREGA, F. N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M. C. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 39, n. 1, p. 279-281, 2009.

BURMAN, A.G.; **Nature & composition of the grass flora of Brazil**. Willdenowia, v. 15, p. 211-133, 1985.

CARNEVALE NETO F, SIQUITELLI C.D.; PILON A.C.; SILVA D.H., BOLZANI VDS, CASTRO-GAMBOA I. Dereplication of phenolic derivatives of *Qualea grandiflora* and *Qualea cordata* (Vochysiaceae) using liquid chromatography coupled with ESI-QToF-MS/MS. **J Braz Chem Soc**, v. 24, p. 758–764, 2013.

CARVALHO, M. G; OLIVEIRA, M. C. C.; WERLE, A. A.; Chemical constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n.3, p. 232-236, 2000.

CARVALHO, M. G; OLIVEIRA, M. C.; SILVA, C. J.; WERLE, A. A. New biflavonoide and other constituents from *Luxemburgia nobilis* (EICHL). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n.1, p. 119- 123, 2002.

CARVALHO, M. G.; DANIEL, J.F.S.; CARDOSO, R. S.; AGRA, M. F.; EBERLIN, M. N. Others flavonoids from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.3b, p. 634- 638, 2005.

CARVALHO, M. G.; SUZAT, L. R.; CAVATTI, L. C.; KAPLAN, M. A. C.; New flavonoids and other constituíntes from *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1423-1428, 2008 a.

CARVALHO, M. G.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; MENDES, L. S.; GUILHON, G. N. S. P.; RODRIGUES, S. T. Biflavonoid and triterpenoids isolated from the leaves of *Ouratea microdonta* Eng. (Ochnaceae). **Revista Latinoamericana de Química**, v. 36, p. 71-75, 2008 b.

CARVALHO, M. G.; SILVA, V. C.; ROCHA JUNIOR, J. G. A new derivative of dihydroochnaflavone isolated from *Luxemburgia* species (Ochnaceae) and the complete ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts assignments. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 33-35, 2009.

CECCON, G. Comunicado Técnico: Milho Safrinha com *Brachiaria*, em Consórcio. **Embrapa Agropecuária Oeste**, ISSN 1679-0472 fevereiro, 2008.

CECCON, G.; SACOMAN, A.; MATOSO, A. de O.; NUNES, A. P.; INOCÊNCIO, M. F. Consórcio de milho safrinha com *Brachiaria ruziziensis* em lavouras comerciais de agricultores, em 2008. **Embrapa Agropecuária Oeste**, 48, 2008.

CHACON, R.G.; SILVA, F.O. *Cespedesia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB24054>> (acessado em 14/05/2019).

CHACON, R. G. Ochanceae S.S. nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **UNB**, Brasília, 2011.

CHANG, T-S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

CLAYTON, W.D., RENVOIZE, S.A. Genera Graminum, Grasses of the World. **Kew Bull. Additional Series XIII**, London, p. 283–285. 1986

COLOMBO, R.; YARIWAKE, J.H.; MCCULLAGH, M. Study of C- and O-glycosylflavones in sugarcane extracts using liquid chromatography: exact mass measurement mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.3, p. 483-490, 2008.

DAHLGREN, R. M. T.; **Bot. J. Line Soc.**, v. 80, p. 2, p. 91, 1980.

DAVIS, S.D.; V.H. Heywood, O.H. MacBryde, J. Villa-Lobos & A.C. Hamilton. Centers of plant diversity: a guide & strategy for their conservation. Vol 3. **The Americas IUCN Publications**, Cam-bridge, Inglaterra. 1994.

DA SILVA, L. M. I.; DA SILVA, M. J.; ROCHA, J. S.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; OLIVEIRA, H. C. Potencial allelopathic effect of *Brachiaria decumbens* root exudates on neotropical tree seedlings. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 29, p. 177-186, 2017.

DE ARAÚJO, M.F.; DOS SANTOS, C.B.; CAVALCANTI, J.F.; PEREIRA, F.S.; MENDES, G.S.; WERLE, A.A.; ROMANOS, M.T.V.; DE CARVALHO, M.G. Proposed active compounds from *Ouratea parviflora*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2489-2493, 2011.

DE ARAÚJO, M.F.; JÚNIOR F.E.A.C.; GABRIELA ALVAREZ, M.; DURANTINI, E.N.; DE CARVALHO, M.G. Antifungal activity of extracts from two ouratea species on *Candida albicans*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 6, p. 152-155, 2013.

DWYER, J. D. The taxonomy of the genus *Sauvagesia*. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, v. 72, p. 521-540, 1945.

EPIFANIO, P. S.; DE PINHO COSTA, K. A.; DA COSTA SEVERIANO, E.; FERREIRA DE SOUZA, W.; TEIXEIRA, D. A. A.; TORRES DA SILVA, J.; DE MOURA AQUINO, M. Productive and nutritional characteristics of *Brachiaria brizantha* cultivars intercropped with *Stylosanthes* cv. Campo Grande in different forage systems. **Crop & Pasture Science**, v. 70, p. 718, 2019.

ERNST M, SILVA DB, SILVA RR, VÊNICIO RZ, LOPES NP. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. **Nat Prod Rep**, v. 31, p. 784–806 ,2014.

ESPEJO, O.; LLAVOT, J. C.; JUNG, H.; GIRAL, F. Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea composita* tubers. **Phytochemistry**, v.21, n. 2, p. 413-416, 1982.

FACCIN T. C.; RIET-CORREA F.; RODRIGUES F. S.; SANTOS A. C.; MELO G. K.A.; SILVA J. A.; Ferreira R.; Ítavo C. C. B. F.; Lemos R. A. A. Poisoning by *Brachiaria brizantha* in flocks of naïve and experienced sheep. **Toxicon**, v. 82, p. 1-8, 2014.

FELICIO, J. D.; GONÇALES, E.; BRAGGIO, M. M.; CONSTANTINO, L.; ALBASINI, A.; LINS, A. P.; **Planta Medica**, v. 61, p. 217, 1995.

FEITOZA, R.B.B.; LIMA, H.R.P.; OLIVEIRA, E.A.G.; OLIVEIRA, D.R.; MORAES, L.F.D.; OLIVEIRA, A.E.A.; CARVALHO, M.G.; Da Cunha, M. Structural and ultrastructural variations in roots of *Calopogonium mucunoides* Desv. treated with phenolic compounds from *Urochloa humidicola* (Rendle) Morrone & Zuloaga and phenolic commercial standards. **South African Journal of Botany**. v. 116, p. 142-149, 2018.

FIDELIS Q.C.; CASTRO R.N.; GUILHON G. M. S. P. ; RODRIGUES S. T. ; SALLES C. M. C. ; SALLES J.B. CARVALHO M.G. Flavonoids and Other Compounds from *Ouratea ferruginea* (Ochnaceae) as Anticancer and Chemopreventive Agents. **Molecules**, n. 17, p. 7989-8000, 2012.

FIDELIS Q. C., TEREZA A.N. RIBEIRO, T. A. N., ARAÚJO, M. F., DE CARVALHO, M. G. *Ouratea* genus: chemical and pharmacological aspects, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 1-19, 2014.

FIDELIS Q.C.; FARAONE I.; RUSSO D.; CATUNDA-JR F. E. A.; VIGNOLA L.; CARVALHO M. G.; TOMMASI N.; MILELLA L. Chemical and Biological insights of *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill.: a source of bioactive compounds with multifunctional properties. **Natural Product Research**, v. 33, n. 10, p. 1500–1503, 2019.

FRAGA, CN & FERES, F. *Luxemburgia misteriosa* (Ochnaceae), uma nova espécie da Mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. **Harvard Papers in Botany**, v. 12, p. 405-408, 2007.

FREITAS, R.S.X.; NEPOMUCENO, D. D.; MODESTO, C.E.; OLIVEIRA, D.R.; PEREIRA, T.P.; MORAIS, L.F.; ALMEIDA, J.C.C.; CARVALHO, M.G.; Caracterização de um extrato de *Urochloa humidicola* metanol como aditivo fitogênico para ruminantes. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 6, 2017.

FREITAS, L. G. L.; YOKOSUKA, A.; ARAUJO, A. L.; ALBERNAZ, T. T.; MIMAKI, Y.; HARAGUCHI, M. Costusosídeo-I e Costusosídeo-J, duas novas saponinas furostânicas da gramínea *Brachiaria humidicola*. In: **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Florianópolis - SC, 2011.

GIULLIETTI, A.M. & FORERO, E. “Workshop” Diversidade Taxonômica e Padrões de Distribuição das Angiospermas Brasileiras. **Acta Botânica Brasílica**, v. 4, n. 1, 1990.

GOODMAN R A, OLDFIELDE, ALLERHANDA. Assignments in the Natural-Abundance Carbon- 13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Chlorophylla and a Study of Segmental Motion in Neat Phytol Contribution n°. 2306 from the Department of Chemistry, Indiana University. **Bloomington**, v. 22, p. 47401, 1973.

GOPALAKRISHNAN, S.; SUBBARAO, G.; NAKAHARA, K.; YOSHIHASHI, T.; ITO, O.; MAEDA, I. ONO, H.; YOSHIDA, MI. Nitrification Inhibitors from the Root Tissues of *Brachiaria humidicola* , a Tropical Grass. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, 2007.

GOTO T, TAKAHASHI N, KATO S, EGAWA K, EBISU S, MORIYAMA T, FUSHIKI T, KAWADA T. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and regulates gene expression. Involved in lipid metabolism in PPAR α -expressing HepG2 hepatocytes. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.337, n. 2, p. 440-445, 2005.

GU H.; GOWDA G.N.; CARNEVALE NETO F.; OPP M.R.; RAFTERY D. RAMSY. Ratio analysis of mass spectrometry to improve compound identification. **Anal Chem**, v.85, p. 10771–10779, 2013.

HALABAN, R; PATTON, RS; CHENG, E; SVEDINE, S; TROMBETTA, ES; WAHL, ML; ARIYAN, S; HEBERT, DN. Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14821–14828, 2002.

JACOBS, B.F., J.D. Kingston & L.L. Jacobs. The origin of grass dominated ecosystems. **Annals of Missouri Botanical Gardens**, v. 86, p. 590-643, 1999.

JAYAKRISHNA, G.; REDDY, M.K.; JAYAPRAKASAM, B.; GUNASEKAR, D.; BLOND, A.; BODO, B. A new biflavonoid from *Ochna beddomei*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.5, p.83-87, 2003.

KELLER-GREIN, G.; MAASS, B.L.; HANSON, J. Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections. In: MILES, J. W., MAASS, B.L., DO VALLEC.B. (Eds.) *Brachiaria: Biology, Agronomy, and Improvement*. Campo Grande, BR: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria (EMBRAPA)**, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Cali, CO. p. 16-42. CIAT Publication No. 259, Cali, Colombia, p. 16-42.

KIRTIKAR K. R.; BASU B. D. *Indian Medicinal Plants*, Periodical Book Agency, New Delhi, p. 515, 1980.

KLUSMANN, C. Trees and shrubs for animal production in tropical and subtropical areas. **Plant Research and Development**, v. 27, p. 92-104, 1988.

KOBAYASI A.; KATO-NOGUCHI H. The seasonal variations of allelopathic activity and allelopathic substances in *Brachiaria brizantha*. *Botanical Studies*, v. 56, n. 25, 2015.

KONGSTAD K. T.; WUBSHET S. G.; JOHANNESSEN A.; KJELLERUP L.; WINTHER A. L.; JÄGER A. K.; STAERK D. High-Resolution Screening Combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for Identification of Fungal Plasma Membrane H⁺-ATPase Inhibitors from Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 24, p. 5595-5602, 2014.

KOPKA, J.; FERNIE, A.; WECKWERTH, W.; GIBON, Y.; STITT, M. Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. **Genome Biology**, v. 5, p. 109, 2004.

KRAFCZYK, N. & GLOMB, M.A. Characterization of Phenolic Compound in Rooibis Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p.3371, 2008.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.

LAPOINTE, S.L. Manejo de los plagas clave para forrajes de las sabanas neotropicales. **Pasturas Tropicales**, v.15, n.3, p.1-9, 1993.

LIKHITWITAYAWUID K, KAEWAMATAWONG R, RUANGRUNGSI N. Mono- and biflavonoids of *Ochna integerrima*. **Biochemistry Systematic and Ecology**, v.33, p. 527-536, 2005.

LIKHITWITAYAWUID, K.; RUNGSEKHA, R.; RUANGRUNGSI, N.; PHADUNGCHAROEN, T. Flavonoids from *Ochna integerrima*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 353-357, 2001.

LIMA, S.; FERNANDES, PEREIRA, L. S.; SOUSA, G. D.; OLIVEIRA, G. S.; JAKELAITIS, A. Suppression of *Urochloa brizantha* and *U. ruziziensis* by glyphosate underdoses. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 3, p. 581-589, 2019.

LOBSTEIN A.; WENIGER B; UM A. B.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU C.; ALZATE F. ANTON R. Polyphenols from *Cespedesia spathulata* and *Cespedesia macrophylla* (Ochnaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 229-231, 2004.

Sistema Brasileiro de Classificação de Solo. **EMBRAPA**. Brasil, p. 412, 1999.

LU, W.; BENNETT, B. D.; RABINOWITZ, J. D. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. **Journal of Chromatography B**, v. 871, n. 236, 2008.

LU, Y.; YEAP FOO, L. The polyphenol constituents of grape pomace. **Food Chemistry**, v. 65, p. 1-8, 1999.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, p. 42, Goiânia. Anais. Goiânia: UFG, SBZ, p.56-84, 2005.

MACEDO, M. C. M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 133-146, 2009.

MACIEL, M.A.M.; GOMES, F.E.S.; PINTO, A.C.; CÓLUS, I.M.S., MAGALHÃES, N. S.S.; GRYNBERGS, N.F.; ECHEVARRIA, A. Aspectos sobre Produtos Naturais na Descoberta de Novos Agentes Descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos Antitumorais e Antimutagênicos. **Revista Fitos**, v.3, n.01, 2007.

MACHADO, L. A. Z.; ASSIS, P. G. G. Produção de palha e forragem por espécies anuais e perenes em sucessão à soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 415-422, 2010.

MACHADO, L. A. Z.; LEMPP, B.; VALLE, C. B. do; JANK, L.; BATISTA, L. A. R.; POSTIGLIONI, S. R.; RESENDE, R. M. S.; FERNANDES, C. D.; VERZIGNASSI, J. R.; VALENTIM, J. F.; ASSIS, G. M. L. de; ANDRADE, C. M. S. de. Principais espécies forrageiras utilizadas em pastagens para gado de corte. **Embrapa Agropecuária Oeste**, cap. 9, p. 375-376, 2010.

MAN S.; GAO W.; ZHANG Y. JIN X.; MA C.; HUANG X.; LI Q. Characterization of steroidal saponins in saponin extract from *Paris polyphylla* by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, p.495–505, 2009.

MATTHEWS M. L.; AMARAL M. C. E.; ENDRESS P. K., Comparative floral structure and systematics in *Ochnaceae s.l.* (*Ochnaceae*, *Quiinaceae* and *Medusagynaceae*; *Malpighiales*), **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, n. 3 p. 299-392, 2012.

MESSANGA, B. B.; KIMBU, S. F.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B.; **Phytochemistry**, v. 59, p. 435, 2002.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; JUNIOR, M.C. S.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E.; **Flora Vascular do Cerrado**. In: S.M. Sano, & S.P. Almeida (eds). 1998.

MENDONÇA, V. Z.; MELLO, L. M. M.; ANDREOTTI, M.; PARIZ, C. M.; YANO, E. H.; LAGES, F. C. B. Liberação de nutrientes da palhada de forrageiras consorciadas com milho e sucessão com soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p.183-193, 2015.

MOLISH, H.; **Die Einfluss siner Pflanze auf die andere-Allelopathie**, Gustav Fischer: Jena, 1937.

MOREIRA, N.; MARTIN, C. C.; HILGERT, A. R.; TOSTES, A. R.; VIOTT, A. M. Surto de fotossensibilização hepatógena em bovinos por ingestão de de *Brachiaria decumbens* no município de Cascavel- PR. **Archives of Veterinary Science**, v. 23, n.1, p. 52-62, 2018.

MORRONE, O. & ZULOAGA, F. O. Revision de las Espécies Sudamericans Nativas e Introduzidas de Los Generos *Brachiaria* y *Urochloa* (Poaceae: Panicoidea: Paniceae). **Darwiniana**, 31 (1-4): 43-109. 1992.

NASCIMENTO, L. A. S.; GUILHON, G. M. S. P.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; MULLER, A. H.; SILVA, M. N.; RODRIGUES, S. T.; CARVALHO, M. G. Biflavones and triterpenoids isolated from *Ouratea castaneidolia* (DC.) Engl. Ochnaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 823-827, 2009.

NEPOMUCENO, M.P.; VARELA, R. M. M.; ALVES, P. L. C. A.; MARTINS, J. V. F. Períodos de dessecação de *Urochloa ruziziensis* e seu reflexo na produtividade da soja RR. **Planta Daninha**, v. 30, p. 557-565, 2012.

NEPOMUCENO, M.; CHINCHILLA, N. ; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J.M.G; LACRET R.; ALVES, P.L.C.A; MACIAS F. A. Chemical evidence for the effect of *Urochloa ruziziensis* on glyphosate-resistant soybeans. **Pest Management Science**, v. 73, p. 2071-2078, 2017.

NIELSEN K. F.; MANSSON M.; RANK, C.; FRISVAD, J. C.; LARSEN, T. O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. **J Nat Prod**, v. 74, p. 2338–2348, 2011.

NICULAU, E. S.; DE FREITAS, S. D. L.; DE SÁ, I. C. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F. Análise Quantitativa de Produtos Naturais em Plantas por CLEM. **Revista Virtual de Química**, v.8, n. 1, p. 204-230, 2016.

OGLIARI, D.; MOLOSSI, F. A.; SAVARIS, T.; WICPOLT N. S.; ZANCAN, I. GAVA, A. Intoxicação espontânea por *Brachiaria* híbrida cv mulato I em ovinos e caprinos e experimental por *Brachiaria* híbrida cv mulato II em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 2, p.229-233, 2018.

OH I. S.; KIM I. H. Pharmaco-Constituents of *Crataegus pinnatifida* var. *psilosa* Leaves (I), The Constituents from Ether Fraction. **Yakhak Hoeji**, v. 37, n.5, 1993.

OHTSUKI T.; SATO M.; KOYANO T.,B KOWITHAYAKORN T.; KAWAHARA N.; GODA Y.; ISHIBASHI M. Steroidal saponins from *Calamus insignis*, and their cell growth and cell cycle inhibitory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 659–665, 2006.

OLIVEIRA, M.C.; DE CARVALHO, M.G.; GRYNBERG, N.F.; BRIOSO, P.S. A biflavonoid from *Luxemburgia nobilis* as inhibitor of DNA topoisomerases. **Planta Medica** v. 71, n. 6, p. 561-563, 2005.

OLIVEIRA JR, R.S.; RIOS, F.A.; CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E.L., GEMELLI, A.; MARTINI, P.E. Grass straw mulching to suppress emergence and early growth of weeds. **Planta Daninha**, n.1, p. 11-17, 2014.

OLIVEIRA, A.P.P., PEREIRA, S.R., CÂNDIDO, A.C.S., LAURA, V.A., & PERES, M.T.L.P. Can Allelopathic Grasses Limit Seed Germination and Seedling Growth of Mutambo? A Test with Two Species of *Brachiaria* Grasses. **Planta Daninha**, v. 34, n. 4, p. 639-648, 2016.

OLIVEIRA, D. R.; NEPOMUCENO, D. D.; CASTRO, R. N.; BRAZ FILHO, E.; CARVALHO, M.G. Special metabolites isolated from *Urochloa humidicola* (Poaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.89 (2), p. 789-797, 2017.

OLIVEIRA P.A.; FIDELIS Q.C.; FERNANDES T. F.C.; SOUZA M. C.; COUTINHO D. M.; PRUDÊNCIO E. R.; CASTRO R.N.; RIGER C.J.; CARVALHO M.G.; MARINHO B.G. Evaluation In Vivo and In Vitro of the Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Biflavonoids From *Ouratea hexasperma* and *O. ferruginea*. **Natural Product Communications**, v. 14, n. 6, 2019.

PACIULLO D.S.C.; AROEIRA L.J.M.; ALVIM, M. J.; CARVALHO, MM. Características produtivas e qualitativas de pastagem de braquiária em monocultivo e consorciada com estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 421-426, 2003.

PALHARINI, W.G.; ALVES, M. E. S.; SANTOS, S. A.; MARSCHALL, I. R.; MARQUES, R. F.; STAUT, L. A.; CONCENÇO, G. Eficiência de supressão de plantas daninhas por *Brachiaria ruziziensis*, utilizada como cobertura do solo na entressafra de cultivos rotacionados. Jornada de Iniciação à Pesquisa da Embrapa (JIPE), **Embrapa Agropecuária Oeste/Dourados- MS**, 28 a 29 de julho, 2014.

PARIS, R. R.; ALEXIS, M. N.; FAUGERAS, G.; JACQUEMIN, H. Plants of French Guiana. V. Polyphenols of *Sauvagesia erecta* L., Ochnaceae. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v, 12 (1), p. 36-41, 1978.

PATEH, U. U., HARUNA A. K., GARBA, M., ILIYA, I., SULE, I. M., ABUBAKAR, M. S. AND AMBI A.A. Isolation of stigmaterol, β -sitosterol and 2-Hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the Rhizomes of *Stylochiton lancifolius*pyer and *Kotchy* (Araceae), **Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 19 – 25, 2008.

PENUMALA, M.; ZINKA, R. B.; SHAIK, J. B.; GANGAIAH, D.A. **BioMed Research International**, v. 1, 2017.

PEREZ A.J.; HUSSAIN S.M; PECIO Ł.; KOWALCZYK M. HERLING V.R.; STOCHMAL A. Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Based Metabolomics Reveals Key Differences between *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha*, Two Similar Pastures with Different Toxicities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.64, n. 22, p. 4686-94, 2016.

PIRES, S. V.; TAKETA, A. T. C.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Saponins and Sapogenins from *Brachiaria decumbens* Stapf. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 135-139, 2002.

PORTO, MIRNA R., SATURNINO, KLAUS C., LIMA, EDUARDO M.M., LEE, STEPHEN T., LEMOS, RICARDO A.A., MARCOLONGO-PEREIRA, CLAIRTON, RIET-CORREA, FRANKLIN, & CASTRO, MÁRCIO B. Avaliação da exposição solar na intoxicação

experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1009-1015, 2013.

POUCHERT, C. J. & BEHNKE, J. The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR spectra. 3^o edição. **AldrichChemicalCompany**, 1993.

PRACHAYASITTIKUL, S. et al. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, n.2, p. 850-867, 2009.

PUPPO, N. I. H.; Manual de Pastagens e Forrageiras: formação, conservação e utilização. **Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**. Campinas- SP. 1981.

RAO K.V.; SREERAMULU K.; VENKATA R.A.O.C.; GUNASEKAR D.; MARTIN M.T.; BODO B. Two new biflavonoids from *Ochna obtusata*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 632-634, 1997.

ROSA F.B.; RUBIN M.I.B.; MARTINS T.B.; LEMOS R.A.A.; GOMES D.C.; PUPIN R. C.; LIMA S.C.; BARROS C.S.L. Spontaneous poisoning by *Brachiaria decumbens* in goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 5, p. 389-396, 2016.

REDDY B.A.K.; REDDY N.P.; GUNASEKAR D.; BLOND A.; BODO B. Biflavonoids from *Ochna lanceolata*. **Phytochemistry Letters**, v.1, p. 27-30, 2008.

RENDLE A. B. The Classification of Flowering Plants, Cambridge University Press, London, vol. 2, 1952.

RIBEIRO R. C.; CARVALHO M. G.; MORAES M. L. L.; ROSSIELLO, R. O. P.; OLIVEIRA, D. R.; AMORIM R. M. Q.; BARBIERI JUNIOR E. Chemical Screening of *Urochloa humidicola*: Methods for Characterizing Secondary Metabolites and Allelopathic Activity on Forage Legumes. **American Journal of Plant Sciences**, v.9 n.6, 2018.

RICE, E.; **Allelopathy**, 2nd ed., Academic Press: Orlando, 1984.

SARTO, J. R. W.; NERES, M. A. S.; MONTEIRO, S. M; NATH, C. D.; SARTO, M. V. M. Chemical composition of swine wastewater, soil, and tifton 85 after 8 years of application. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 1, 259-269, 2019.

SASTRE, C. 1997. Uma Espécie Nova de Sauvagesia L.(Ochnaceae) do Campo Rupestre do Estado de Goiás. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 16, p. 71-73.

SASTRE, C. Ochnaceae in: STEYERMARK, J. A., BERRY, P.E.; YATSKIEVYCH, K. & HOLST, B.K. **Flora of the Venezuelan Guayana**, vol.7, p. 124-161, Missouri botanical Garden, Saint Louis, 2003.

SHAW, R.B. **Tropical grasslands & savannas**. In: S.W.L.J. Everett (ed). Grasses: systematics & evolution. pp 351-355. CSIRO, Melbourne, Austrália. 2000.

SHARAF M.; EL-ANSARI M.A.; SALEH N.A.M. Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 478-483, 1999.

SENDULSKY, T. Chave para identificação de *Brachiaria*. J. **Agroceres**, v. 5, n. 56, p. 4-5, 1977.

SERRÃO, E.A.D. & SIMÃO NETO, M. **Informações sobre duas espécies de gramíneas forrageiras do gênero *Brachiaria* na Amazônia: *B. decumbens* Stapf e *B. ruziziensis* Germain et Evrard**. Belém, Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, p. 31, 1971. (IPEAN. Série: Estudos sobre forrageiras na Amazônia, v.2., n.1)

SILVA, J. C.; GORENSTEIN, M. V.; LI, G. Z.; VISSERS, J. P. C.; GEROMANOS, S. J. Absolute Quantification of Proteins by LCMS^E. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144–156, 2006.

SON K. H., PARK J. O., CHUNG K. C., CHANG H. W., KIM H. P., KIM J. S., KANG S. S. Flavonoids from the Aerial Parts of *Lonicera japonica*. **Archives Pharmacal Research**, v.15 (4), p. 365-370, 1992.

SOUZA, L. S. et al. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 657-668, 2006.

STEVENS, P. F. 2001 (onwards). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 9, May 2019.

SUBBARAO, G.V.; ISHIKAWA, T.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; WANG, H.Y. & BERRY, W.L. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: A case study with *Brachiaria humidicola*. **Plant Soil**, v. 288, p.101-112, 2006.

SUFFNESS, M.; ABBOTT, B. The Utility of P388 Leukemia Compared to B16 Melanoma and Colon Carcinoma 38 for *in vivo* Screening of Plant Extracts. **Phytotherapy research**, v. 2, n. 2, 1988.

SUZART, L. R.; DANIEL, J. DE S.; DE CARVALHO, M. G.; KAPLAN, M. A. C. Biodiversidade Flavonoídica e Aspectos Farmacológicos em Espécies dos Generos *Ouratea* e *Luxemburgia* (OCHNACEAE) **Química Nova**, v.30 (4), p. 984-987, 2007.

SUZART, L. R.; FIDELIS, Q. C.; DE CARVALHO, M. G.; KAPLAN, M. A. C. Special Metabolites Isolated from Engl. (ochnaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 288-295, 2016.

TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; MARTIN, M. T.; BODO, B.; **Phytochemistry**, v. 28, p. 1557, 1989.

TIH, A.; MARTIN, M. T.; TIH, R. G.; VUIDEPOT, I.; SONDEGAM, B. L.; BODO, B.; **Phytochemistry**, v. 31, p. 3595, 1992.

TIMOSSI, P.C.; DURIGAN, J.C.; LEITE, G.J. Formação de palhada por braquiárias para adoção do sistema de plantio direto. **Bragantia**, v.66, p.617-622, 2007.

TIMOSSI P. C.; DURIGAN J. C.; LEITE G. J. Formação de palhada por braquiárias para adoção do sistema plantio direto. **Bragantia**, v.66, n.4, p.617-622, 2007.

TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F. de; BARBOSA, J.D.; Peixoto, P.V.; DÖBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2º Ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p, 2012.

TORRES, J. L. R.; PEREIRA, M. G.; FABIAN, A. J. Produção de fitomassa por plantas de cobertura e mineralização de seus resíduos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 3, p. 421-428, 2008.

VALLE, C. B. DO; EUCLIDES, V. P. B.; MACEDO, M. C. M.; Características das plantas forrageiras do gênero *Brachiaria*. **A planta forrageira no sistema de produção**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 133- 176, 2001.

VELDKAMP, J.F. Proposal to conserve the name *Brachiaria* (Trin.) Griseb. (Gramineae) with a conserved type. **Taxon**, v. 45, p. 319–320, 1996.

VIANA, P. L.; LOMBARDI, J. A. Florística e caracterização dos campos rupestres sobre canga na Serra da Calçada, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.58, n.1, p.157-177, 2007.

WANG, XIAO-X.; HE, JIU-M.; WANG, CHUN-L.; ZHANG, RUI-P.; HE, WEN-Y.; GUO, SHUN-X.; SUN, RUI-X.; ABLIZ, Z. Simultaneous Structural Identification of Natural Products in Fractions of Crude Extract of the Rare Endangered Plant *Anoectochilus roxburghii* Using ¹H NMR/RRLC-MS Parallel Dynamic Spectroscopy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 2556-2571, 2011.

WENZL, P.; CHAVES, A. L.; MAYER, J. E.; RAO, I. M.; NAIR, M. G. “Roots of nutrient-deprived *Brachiaria* species accumulate 1,3-di-o-trans-feruloylquinic acid.” **Phytochemistry**, v. 55, p. 389-395, 2000.

WHITTAKER, R. H. **Communities and Ecosystems**. Macmillan, London: Collier Macmillan, 1970.

WOLFENDER J–L, RUDAZ S.; HAE CHOI Y.; KYONG K. H. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Med Chem**, v. 20, p. 1056–1090, 2013.

YAMAMOTO, K. *Ouratea hatschbachii* (Ochnaceae): Uma Nova Espécies de Grão-Mongol, Estado de Minas Gerais. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 14, p. 33-37, 1995.

YANG JY, SANCHEZ LM, RATH CM, LIU X, BOUDREAU PD, BRUNS N, GLUKHOV E, WODTKE A, DE FELICIO R, FENNER A. Molecular networking as a dereplication strategy. **J Nat Prod**, v. 76, p. 1686–1699, 2013.

ZAPPI D. C. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Ochnaceae. **Rodriguésia**, v. 69, n. 3, p. 1279-1284, 2018.

ZHOU X.; He X.; WANG G.;GAO H.;ZHOU G.;YE W.; YAO X. Steroidal Saponins from *Solanum nigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1158-1163, 2006.

ZIELINSKA, A.; PARADOWSKA, K.; JAKOWSKI, J.; WAWER, I. ¹³C CP MAS NMR and GIAO-CHF/DFT calculation of flavonoids: Morin, kaempferol, tricetin, genistein, formononetin and 3,7-dihydroxyflavone. **Journal of Molecular Structure**, v. 873, p. 109-116, 2008.

ZINTCHEM A.A.; ATCHADÉ A.D.T.; TIH R.G.; MBAFOR J.T.; BLOND A.; PEGNYEMB D.E. Flavonoids from *Ouratea staudtii* Van Tiegh. (ex Keay) (Ochnaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 255-256, 2007.