

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE
ESPÉCIES DE *Phyllanthus* UTILIZANDO TÉCNICAS
HIFENADAS”**

Ricardo da Fontoura Sprenger

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ORGÂNICA

Orientadora: Quezia Bezerra Cass

*** bolsista: FAPESP**

**São Carlos/SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S768d Sprenger, Ricardo da Fontoura
Diferenciação e caracterização química de espécies
de *Phyllanthus* utilizando técnicas hífenadas /
Ricardo da Fontoura Sprenger. -- São Carlos :
UFSCar, 2017.
138 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Quebra-pedra. 2. Metabólitos secundários. 3.
Cromatografia líquida. 4. Espectrometria de massas.
5. Ressonância magnética nuclear. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ricardo da Fontoura Sprenger, realizada em 15/01/2016:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes
FCFRP/USP

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
UNESP

Prof. Dr. Tiago Venâncio
UFSCar

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Quezia Bezerra Cass pelas valiosas discussões e orientações claras que tornaram possível a conclusão desse trabalho. Agradeço também a meu coorientador Antonio Gilberto Ferreira pela ajuda prestada na realização de experimentos e discussão de resultados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo 2011/11021-3), bem como, ao recursos destinados para aquisição de equipamentos extensivamente utilizados nesse trabalho (Proc. PROEM 2004/08545-7 e 2014/50244-6). Aos outros órgãos de fomento CNPq e CAPES pelo aporte financeiro ao grupo de pesquisa.

Ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, especialmente a Luciana Vizzoto e Sérgio Scherrer Thomasi pela prontidão em realizar os experimentos necessários para esse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos os amigos que pertencem ou pertenceram ao Núcleo de Pesquisa em Cromatografia Separare pelo apoio, bom companheirismo e discussões construtivas.

Aos meus familiares, os quais amo muito, pela paciência, carinho e incentivo. Especialmente meu pai, Wilder Sprenger, que me apoiou muito durante o curso de doutorado.

À minha namorada Bruna Natania Ferreira por todo o amor, carinho e compreensão.

Enfim a todos os amigos, que aqui me furto de mencioná-los por nome para não omitir, por um lapso memória, a todos pelo apoio moral, convívio e prestimosa amizade.

LISTA DE ABREVIATURAS

CPQBA-UNICAMP - Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas

DAD - "Diode Array Detector", Detector de Arranjo de Diodos

EI - "Electronic Impact", Impacto Eletrônico

ESI - "Electrospray Source Ionization", Fonte de Ionização por Electrospray

IT - "Ion Trap", Armadilha de Íons

LC - "Liquid Chromatography", Cromatografia Líquida

LC-DAD-MS - "Liquid Chromatography with Diode Array Detector coupled with Mass spectrometry", Cromatografia Líquida com Detector de Arranjo de Diodos acoplado a Espectrometria de Massas.

LC-SPE-NMR - "Liquid Chromatography coupled with Nuclear Magnetic Resonance with automated Solid Phase Extraction system as interface", Cromatografia Líquida acoplada a Ressonância Magnética Nuclear com sistema automatizado de Extração em Fase Sólida como interface.

LIT - "Linear Ion Trap", Armadilha de Íons Linear

LTQ-OrbiTrap - "Linear Triple Quadrupole-OrbiTrap", Triplo Quadrupolo Linear OrbiTrap

HPLC - "High-Performance Liquid Chromatography", Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MS - "Mass spectrometry", Espectrometria de Massas

NMR - "Nuclear Magnetic Resonance", Ressonância Magnética Nuclear

QqQ - Triplo Quadrupolo

QqLIT - "Quadrupole/Linear Ion Trap", Quadrupolo/Armadilha de Íons Linear

QqToF - "Quadrupole/Time-of-Flight", Quadrupolo/Tempo de Voo

SPE - "Solid Phase Extraction", Extração em Fase Sólida

UHPLC - "Ultra High Performance Liquid Chromatography", Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.1 - Classes de compostos geralmente extraídos por solvente. Adaptada a partir de Cechinel e Yunes, 1998 e Pereira, 2012.....	3
TABELA 1.2 - Principais características morfológicas para diferenciação das espécies oficiais de <i>Phyllanthus</i> no Brasil.....	14
TABELA 2.1 - Amostras comerciais de quebra-pedra.....	22
TABELA 2.2 - Lista de compostos identificados por espécie estudada.....	27
TABELA 3.1 - Condições avaliadas nas etapas de triagem e otimização.....	38
TABELA 3.2 - Melhor condição cromatográfica proposta pelo software Fusion AE™	43
TABELA 3.3 - Parâmetros que controlam a seleção dos íons por FMF.....	46
TABELA 3.4 - Relação de íons no modo negativo de ionização responsáveis pela diferenciação das espécies determinados por PCA.....	56
TABELA 3.5 - Relação de compostos identificados nas 6 espécies de <i>Phyllanthus</i>	110
TABELA 4.1 - Programação para coleta de frações por LC-SPE.....	116
TABELA 5.1 - Relação de todos os compostos identificados nos capítulos 2, 3 e 4.	128

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 - Cromatogramas do pico base de extrato de <i>P. caroliniensis</i> cultivada em diferentes localidades.....	24
FIGURA 2.2 - Cromatogramas do pico base de extrato de <i>P. niruri</i> cultivada em diferentes localidades.....	25
FIGURA 2.3 - Cromatogramas do pico base de extrato de <i>P. stipulatus</i> cultivada em diferentes localidades.....	25
FIGURA 2.4 - Cromatogramas do pico base de extrato de <i>P. tenellus</i> cultivada em diferentes localidades.....	26
FIGURA 2.5 - Compostos inferidos presentes nas espécies de <i>Phyllanthus</i>	28
FIGURA 2.6 - Espectro ESI(+) IT-MS ² (1V) do composto 1 (corilagina) de <i>m/z</i> 657,2.....	28
FIGURA 2.7 - Espectro ESI(-) IT-MS ² (1V) do composto 1 (corilagina) de <i>m/z</i> 633,5.....	29
FIGURA 2.8 - Espectro ESI(+) IT-MS ² (1V) do composto 12 (astragalina) de <i>m/z</i> 449,57.....	30
FIGURA 2.9 - Espectro ESI(-) IT-MS ² (1V) do composto 12 (astragalina) de <i>m/z</i> 447,14.....	30
FIGURA 2.10 - Cromatogramas de íons extraídos dos marcadores químicos selecionados a partir de amostras autênticas fornecidas pelo CPQBA.....	33
FIGURA 3.1 - Superfície de resposta obtida na etapa de triagem.....	41
FIGURA 3.2 - Superfície de resposta obtida na etapa de otimização.....	42
FIGURA 3.3 - Superfície de resposta obtida na etapa de otimização.....	43
FIGURA 3.4 - Perfil cromatográfico do extrato etanólico de <i>P. niruri</i> (Acquity HSS T3 (100 x 2.1 mm; 1.8 µm); A: Ácido fórmico pH 2.1, B: Metanol; eluição gradiente: 0 - 1,34min (5% B); 1,34 - 14,5 min (5-60,9% B).....	44
FIGURA 3.5 - Gráfico de influências do modelo de PCA para extratos de <i>Phyllanthus</i> com todas as amostras.....	48
FIGURA 3.6 - Explicação dos termos distância do modelo (<i>Dm</i>) e distância do centro (<i>Dc</i>).....	49
FIGURA 3.7: Gráfico de influências do modelo de PCA para extratos de <i>Phyllanthus</i> após retirada de amostras discrepantes.....	50
FIGURA 3.8 - Gráfico de declividade de fatores pela porcentagem de variância.....	51
FIGURA 3.9 - Gráfico de "scores" (A) e "loadings" (B) (PC1 x PC2).....	52
FIGURA 3.10 - Gráficos de visualização de "scores" obtidos a partir dos extratos de <i>Phyllanthus</i>	53
FIGURA 3.11 - Gráfico de "scores" e "loadings" (PC 3 x PC 5).....	54
FIGURA 3.12 - Gráfico de "scores" e "loadings". A - PC3 x PC4; B - PC1 x PC2; C - PC2 x PC3; D -PC4 x PC5.....	55
FIGURA 3.13 - Cromatogramas dos picos base dos extratos das 6 espécies de <i>Phyllanthus</i>	57
FIGURA 3.14 - Estrutura química do composto ácido trans-3-p-cumarilquinico.....	58
FIGURA 3.15 - Cromatograma do íon extraído de <i>m/z</i> 337,093 referente ao composto 1.....	58
FIGURA 3.16 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 1 (ácido trans-3-p-cumarilquinico) de <i>m/z</i> 337,0769.....	59
FIGURA 3.17- Espectro de UV do composto 1 (ácido trans-3-p-cumarilquinico).....	59
FIGURA 3.18 - Estruturas químicas de alguns taninos hidrolisáveis importantes na diferenciação das espécies.....	60
FIGURA 3.19 - Cromatograma do íon extraído de <i>m/z</i> 785,084 referente ao	

composto 2.....	61
FIGURA 3.20 - Cromatograma do íon extraído de m/z 953,092 referente ao composto 3.....	61
FIGURA 3.21 - Cromatograma do íon extraído de m/z 719,126 referente ao composto 21.....	61
FIGURA 3.22 - Cromatograma do íon extraído de m/z 871,137 referente ao composto 22.....	62
FIGURA 3.23 - Notação de fragmentação para taninos hidrolisáveis (ilustrado em corilagina).....	63
FIGURA 3.24 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 2 (1,3-digaloil-4,6-hexahidroxidifenoilglucose) de m/z 785,0433.....	64
FIGURA 3.25 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 3 (ácido geraniínico) de m/z 953,0902.....	64
FIGURA 3.26 - Rotas de fragmentação do ácido geraniínico.....	65
FIGURA 3.27 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 21 (pinocembrina-7-O-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose) de m/z 721,1226.....	66
FIGURA 3.28 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 22 (pinocembrina-7-O-[3''-O-galoil-4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose) de m/z 873,1156. Legenda: pin = pinocembrina; elag = ácido elágico; gal = ácido gálico.....	67
FIGURA 3.29 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 21 (pinocembrina-7-O-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose) de m/z 719,1242.....	67
FIGURA 3.30 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto 22 (pinocembrina-7-O-[3''-O-galoil-4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose) de m/z 871,1371.....	67
FIGURA 3.31: Cromatograma do íon extraído de m/z 979,106 referente ao composto 13.....	68
FIGURA 3.32: Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 13 de m/z 979,1064.....	68
FIGURA 3.33: Notação de fragmentação de flavonoides (ilustrado em canferol-7-O-rutinosídeo).....	69
FIGURA 3.34 - Flavonóis monoglicosilados presentes nas espécies de <i>Phyllanthus</i>	71
FIGURA 3.35 - Cromatograma do íon extraído de m/z 463,088 referente ao composto 10.....	71
FIGURA 3.36 - Cromatograma do íon extraído de m/z 477,067 referente ao composto 11.....	71
FIGURA 3.37 - Cromatograma do íon extraído de m/z 447,093 referente ao composto 15.....	72
FIGURA 3.38 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 10 (miricitrina) de m/z 465,1026.....	73
FIGURA 3.39 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 15 (quercitrina) de m/z 449,1036.....	73
FIGURA 3.40 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto 10 (miricitrina) de m/z 463,3767.....	73
FIGURA 3.41 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto 15 (quercitrina) de m/z 447,0949.....	74
FIGURA 3.42 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 11 (miquéalina) de m/z 479,0777.....	74
FIGURA 3.43 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 11 (miquéalina) de m/z 477,0667.....	74

FIGURA 3.44 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 11 (miquelialina) de m/z 477.0686.....	75
FIGURA 3.45 - Outros flavonóis O-monoglicosilados encontrados em <i>Phyllanthus</i> ..	75
FIGURA 3.46 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto miricetina-3-O-glucosídeo de m/z 481.0964.....	76
FIGURA 3.47 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto isoquercitrina de m/z 465.0951.....	76
FIGURA 3.48 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto miricetina-3-O-glucosídeo de m/z 479.0841.....	77
FIGURA 3.49 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto isoquercitrina de m/z 463.0888.....	77
FIGURA 3.50 - Flavonóis diglicosilados presentes nas espécies de <i>Phyllanthus</i>	78
FIGURA 3.51: Cromatograma do íon extraído de m/z 625,141 referente ao composto 7.....	78
FIGURA 3.52: Cromatograma do íon extraído de m/z 609,146 referente ao composto 12a e 12b.....	78
FIGURA 3.53: Cromatograma do íon extraído de m/z 593,151 referente ao composto 16.....	79
FIGURA 3.54 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 7 (quercetina-3-O-gentibiosídeo) de m/z 627,1462.....	79
FIGURA 3.55 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 12a (rutina) de m/z 611,1538.....	79
FIGURA 3.56 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 12b (canferol-3-O-gentibiosídeo) de m/z 611,1599.....	80
FIGURA 3.57 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 16 (canferol-3-O-rutinosídeo) de m/z 595,1720.....	80
FIGURA 3.58 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 7 (quercetina-3-O-gentibiosídeo) de m/z 625,1393.....	81
FIGURA 3.59 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 12a (rutina) de m/z 609,1357.....	82
FIGURA 3.60 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 12b (canferol-3-O-gentibiosídeo) de m/z 609,1462.....	82
FIGURA 3.61 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 16 (canferol-3-O-rutinosídeo) de m/z 625,1393.....	82
FIGURA 3.62 - Flavonas C-glicosiladas presentes nas espécies de <i>Phyllanthus</i>	84
FIGURA 3.63 -Flavanonas C-glicosiladas presentes nas espécies de <i>Phyllanthus</i> ..	84
FIGURA 3.64 - Cromatograma do íon extraído de m/z 447,093 referente ao composto 5.....	85
FIGURA 3.65 - Cromatograma do íon extraído de m/z 431,099 referente ao composto 8.....	85
FIGURA 3.66 - Espectros MS/MS do composto 5 (orientina) de m/z 449. A - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(+) IT MS2 (1V).....	86
FIGURA 3.67 - Espectros MS/MS do composto 8 (vitexina) de m/z 433. A - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(+) IT MS2 (1V).....	87
FIGURA 3.68 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 5 (orientina) de m/z 449.1004.....	87
FIGURA 3.69 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 8 (vitexina) de m/z 433.0982.....	88
FIGURA 3.70 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (50eV) do composto 5 (orientina) de m/z 449.1056.....	88

FIGURA 3.71 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (50eV) do composto 8 (vitexina) de m/z 433.1101.....	88
FIGURA 3.72 - Espectros MS/MS do composto 5 (orientina) de m/z 449. A - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(-) IT MS2 (1V).....	89
FIGURA 3.73 - Espectros MS/MS do composto 8 (vitexina) de m/z 449. A - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(-) IT MS2 (1V).....	90
FIGURA 3.74 - Cromatograma do íon extraído de m/z 433,125 referente ao composto 4.....	91
Figura 3.75 - Cromatograma do íon extraído de m/z 475,114 referente ao composto 14.....	91
FIGURA 3.76 - Cromatograma do íon extraído de m/z 517,135 referente ao composto 17.....	91
FIGURA 3.77 - Cromatograma do íon extraído de m/z 575,141 referente ao composto 19.....	92
FIGURA 3.78 - Cromatograma do íon extraído de m/z 559,146 referente ao composto 20.....	92
FIGURA 3.79 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 4 (naringenina-8-C-glucosídeo) de m/z 435.1324.....	93
FIGURA 3.80 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 14 (naringenina-8-C-6"-O-acetilglucosídeo) de m/z 477,1309.....	93
FIGURA 3.81 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 17 (naringenina-8-C-4",6"-O-diacetilglucosídeo) de m/z 519,1395.....	94
FIGURA 3.82 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 19 (eridictiol-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 519,1395.....	94
FIGURA 3.83 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 20 (naringenina-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 519,1395.....	94
FIGURA 3.84 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 4 (naringenina-8-C-glucosídeo) de m/z 433,1137.....	95
FIGURA 3.85 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 14 (naringenina-8-C-6"-O-acetilglucosídeo) de m/z 475,1250.....	95
FIGURA 3.86 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 17 (naringenina-8-C-4",6"-O-diacetilglucosídeo) de m/z 517,1352.....	96
FIGURA 3.87 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 19 (eridictiol-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 575,1409.....	96
FIGURA 3.88 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 20 (naringenina-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 559,1452.....	96
FIGURA 3.89 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 4 (naringenina-8-C-glucosídeo) de m/z 433,1147.....	97
FIGURA 3.90 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 14 (naringenina-8-C-6"-O-acetilglucosídeo) de m/z 475,1267.....	97
FIGURA 3.91 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 17 (naringenina-8-C-4",6"-O-diacetilglucosídeo) de m/z 517,1365.....	97
FIGURA 3.92 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 19 (eridictiol-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 575,1418.....	98
FIGURA 3.93 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 20 (naringenina-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 559,1470.....	98
FIGURA 3.94 - Rota de fragmentação de flavanonas C-glicosiladas com acetilação na posição 2".....	99
FIGURA 3.95 - Estrutura química das flavonas O,C-diglicosiladas presentes em <i>P. niruri</i>	101

FIGURA 3.96 - Cromatograma do íon extraído de m/z 593,151 referente ao composto 6.....	101
FIGURA 3.97 - Cromatograma do íon extraído de m/z 577,157 referente ao composto 9.....	102
FIGURA 3.98 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (30eV) do composto 6 (orientina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 595,1610.....	102
FIGURA 3.99 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (30eV) do composto 8 (vitexina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 579,1718.....	103
FIGURA 3.100 - Espectro ESI(+) IT-MS ² (1V) do composto 6 (orientina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 595,5.....	103
FIGURA 3.101 - Espectro ESI(+) IT-MS ² (1V) do composto 8 (vitexina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 579,4.....	103
FIGURA 3.102 - Espectro ESI(+) IT-MS ³ (1V) do composto 6 (orientina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 595.4 → 449.3.....	104
FIGURA 3.103 - Espectro ESI(+) IT-MS ³ (1V) do composto 8 (vitexina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 579.5 → 433.3.....	104
FIGURA 3.104 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 6 (orientina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 595.1608.....	104
FIGURA 3.105 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 9 (vitexina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 579.1684.....	105
FIGURA 3.106 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 6 (orientina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 593.1469.....	105
FIGURA 3.107 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 9 (vitexina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 577.1565.....	106
FIGURA 3.108 - Flavona C-glicosilada acilada identificada em <i>P. niruri</i>	106
FIGURA 3.109 - Cromatograma do íon extraído de m/z 583,109 referente ao composto 18.....	107
FIGURA 3.110 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 18 (luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil) de m/z 585,1186.....	107
FIGURA 3.111 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 18 (luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil) de m/z 583,1905.....	108
FIGURA 3.112 - Gráfico ilustrativo das áreas dos compostos identificados por espécie.....	111
FIGURA 4.1 - Cromatograma do extrato de <i>P. tenellus</i> . Os números 1 a 11 indicam as bandas cromatográficas que foram coletadas em SPE.....	118

RESUMO

DIFERENCIAÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus* UTILIZANDO TÉCNICAS HIFENADAS. Diversas espécies pertencentes ao gênero *Phyllanthus* são amplamente empregadas na medicina tradicional, mesmo assim poucos trabalhos são reportados na literatura para algumas espécies como: *P. tenellus*, *P. caroliniensis* e *P. stipulatus*. Ademais, os métodos oficiais de controle de qualidade, especialmente os relacionados a autenticidade vegetal, são pouco específicos para as espécies em análise. Desse modo, este trabalho reporta a caracterização química “online” de extratos etanólicos de seis espécies de *Phyllanthus* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia líquida hifenada a ressonância magnética nuclear utilizando sistema automatizado de extração em fase sólida como interface (LC-SPE-NMR). O capítulo 2 discute a classificação de amostras comerciais de *Phyllanthus* adquiridas em diversos municípios brasileiros. A identificação de diversos marcadores químicos a partir de amostras autênticas de cada espécie possibilitou a classificação das amostras comerciais. Os resultados obtidos demonstraram que estas são empregadas incorretamente, em discordância com o especificado em seus rótulos que as classificavam como *P. niruri*, a maioria das amostras avaliadas eram *P. tenellus*. Nenhuma foi classificada como *P. niruri*. O capítulo 3 discute o uso de métodos estatísticos tanto no desenvolvimento do método cromatográfico quanto no tratamento dos dados de MS. O desenvolvimento do método foi realizado por meio de planejamento experimental resultando em método rápido e com elevado número de bandas cromatográficas. A análise estatística utilizando modelo de análise de componentes principais (PCA) permitiu a inequívoca diferenciação das espécies e apontou para dezenas de compostos responsáveis por tal. Através da interpretação dos dados de massas utilizando os analisadores de massas QqToF e IT, 22 compostos foram identificados, alguns dos quais nunca relatados na literatura. O capítulo 4 descreve os resultados obtidos por LC-SPE-NMR para identificação inequívoca de metabólitos secundários presente no extrato etanólico de *P. tenellus*. A utilização de interface automatizada de SPE facilitou o isolamento dos compostos de interesse, eliminando a necessidade de utilização de cromatografia semi-preparativa. A interpretação dos espectros de NMR possibilitou a identificação de 8 compostos confirmando as estruturas postuladas por LC-MS.

ABSTRACT

CHEMICAL DIFFERENTIATION OF *Phyllanthus* SPECIES USING HYPHENATED TECHNIQUES. Several species of *Phyllanthus* genus are widely used in popular medicine, even though very few phytochemical reports on species such as: *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* and *P. tenellus* are found in the literature. Furthermore, the official reference quality control methods, especially those related with authenticity assessment, are nonspecific for the species under analysis. Thereby, this work reports on the online chemical characterization of the ethanolic extract of six *Phyllanthus* species by liquid chromatography hyphenated to mass spectrometry (LC-MS) and liquid chromatography hyphenated to nuclear magnetic spectroscopy using automated solid phase extraction system, as interface (LC-SPE-NMR). The chapter 2 discusses the classification of commercial *Phyllanthus* samples acquired from different establishments in several Brazilian municipalities. The identification of various chemical markers from authentic samples of each species allowed the classification of commercial samples. The obtained results showed that they were misused, in spite of their labels nominating them as *P. niruri*, the majority of the tested samples were *P. tenellus*. None was classified as *P. niruri*. Chapter 3 discusses the use of statistical models for the chromatographic method development and also for the handling of MS data. Development of the method was carried out by experimental design furnishing chromatographic runs with short analysis time and high number of chromatographic bands. Statistical analysis using principal component analysis (PCA) allowed the unmistakable differentiation of species and pointed out to several of compounds responsible for this. Through the interpretation of the MS/MS data, using the mass analyzers QqToF and IT-MS, 22 compounds had their chemical structure elucidated, some of which have never been reported in the literature. Chapter 4 describes the results obtained by LC-SPE-NMR for the unequivocal structural elucidation of the secondary metabolites of the ethanolic extract of *P. tenellus*. The use of automated SPE interface facilitated the isolation of the compounds of interest, eliminating the need of using semi-preparative chromatography. The interpretation of NMR spectra enabled the identification of 9 compounds confirming the structures inferred by LC-MS.

SUMÁRIO

1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	1
1.1 - DESREPLICAÇÃO.....	2
1.1.1 - Etapas Preliminares.....	2
1.1.2 - Etapa Analítica.....	3
1.1.3 - Etapa de Interpretação.....	5
1.2 - TÉCNICAS HIFENADAS.....	6
1.2.1 - LC-DAD.....	6
1.2.2 - LC-MS.....	7
1.2.3 - LC-NMR.....	9
1.3 - OBJETO DE ESTUDO.....	12
1.3.1 - Aspectos Botânicos.....	13
1.3.2 - Aplicações Terapêuticas e Estudos Farmacológicos.....	14
1.3.2.1 - Experimentação <i>in vitro</i>	15
1.3.2.2 - Estudos Pré-Clínicos.....	16
1.3.2.3 - Estudos Clínicos.....	17
1.3.3 - Aspectos Químicos de <i>Phyllanthus</i>	18
1.3.4 - Autenticidade Vegetal e Métodos Oficiais.....	18
1.4 - OBJETIVOS.....	19
2 - VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE VEGETAL POR PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL.....	20
2.1 - INTRODUÇÃO.....	20
2.2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1 - Material Vegetal.....	21
2.2.2 - Procedimento de Extração e Preparo de Amostra.....	22
2.2.3 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas	23
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24

2.3.1 - Amostras autênticas.....	24
2.3.2 - Amostras Comerciais.....	30
2.4 - CONCLUSÃO.....	34
3 - DESENVOLVIMENTO MULTIVARIADO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESTUDO ESTATÍSTICO PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Phyllanthus</i>.....	36
3.1 - INTRODUÇÃO.....	36
3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.2.1 - Material Vegetal e Extração.....	37
3.2.2 - Desenvolvimento de Perfil Cromatográfico por UHPLC utilizando planejamento experimental “Quality by design”.....	37
3.2.3 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas.....	38
3.2.4 - Análise Multivariada dos Dados de LC-MS.....	39
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.3.1 - Planejamento Experimental no Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos.....	40
3.3.2 - Análise Multivariada dos Dados.....	45
3.3.2.1 - Organização e Pré-Tratamento dos Dados.....	45
3.3.2.2 - Análise de Componentes Principais (PCA).....	47
3.3.3 - Interpretação dos Dados de LC-MS/MS.....	56
3.3.3.1 - Ácido 3-p-cumarilquínico.....	57
3.3.3.2 - Taninos Hidrolisáveis.....	59
3.3.3.3 - Flavonoides.....	68
3.3.3.3.1 - <i>Flavonoides O-glicosilados</i>	69
3.3.3.3.2 - <i>Flavonoides C-Glicosilados</i>	82
3.3.3.3.3 - <i>Flavonas-O,C-diglicosiladas</i>	100
3.3.3.3.4 - <i>Flavona C-glicosilada Acilada</i>	106
3.3.3.3.5 - <i>Composto Não Identificado</i>	108

3.3.4 - Resultados dos Experimentos de Caracterização Química das Espécies de <i>Phyllanthus</i> Estudadas.....	108
3.4 - CONCLUSÃO.....	112
4 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE <i>Phyllanthus tenellus</i> POR LC-SPE-NMR e LC-MS.....	114
4.1 - INTRODUÇÃO.....	114
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	115
4.2.1 - Material Vegetal e Extração.....	115
4.2.2 - Cromatografia Líquida Hifenada a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	115
4.2.3 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas.....	116
4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
4.4 - CONCLUSÃO.....	125
5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
REFERÊNCIAS.....	129
APÊNDICE 2	
APÊNDICE 3	
APÊNDICE 4	
APÊNDICE 5	
APÊNDICE 6	
APÊNDICE 7	
APÊNDICE 8	
APÊNDICE 9	

CAPÍTULO 1

1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O reino vegetal sempre teve grande importância na medicina tradicional de diversas culturas ^{1,2}, o que conseqüentemente motiva interesse científico e grande volume de pesquisas. Pesquisas envolvendo plantas medicinais são bastante amplas, envolvendo diversos campos como fitoquímica, fitoterapia, fitofarmacologia, fisiologia vegetal, ecologia vegetal e outros. Dentre estas a fitoquímica tem grande importância, pois relaciona-se com a caracterização química de metabólitos presentes na complexa matriz que se constitui uma planta. Dessa forma, a fitoquímica não pode ser um campo isolado pois a identificação de novos compostos pode estar relacionada a diversos outros aspectos como terapêuticos, fisiológicos, ecológicos e demais.

A descoberta de compostos inéditos atualmente não é uma tarefa fácil, sobretudo em vista do grande número de compostos já isolados. A abordagem clássica empregada em produtos naturais, de isolamento, purificação e identificação através de técnicas espectroscópicas, é um trabalho demorado e árduo e que requer grande quantidade de material vegetal, além de consumir grandes volumes de solventes orgânicos. Além disso, não raro conduz a resultados pouco satisfatórios, como o isolamento de compostos conhecidos e/ou sem atividade terapêutica ³.

Uma abordagem alternativa que evita o isolamento de compostos de pouco interesse se denomina desreplicação. Tal termo relaciona-se à identificação suficiente (completa ou parcial) de substâncias presentes em extratos brutos ou frações de produtos naturais por meio de perfis cromatográficos ^{4,5}. A identificação dos compostos é possível devido à hifenação da cromatografia líquida (LC) a técnicas de identificação de compostos orgânicos. Seguidos avanços tecnológicos em cromatografia e espectroscopia, principalmente em relação à instrumentação e automação, têm aumentado significativamente a utilização dessa abordagem. As técnicas hifenadas mais amplamente utilizadas são cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas (LC-DAD-MS) e cromatografia líquida hifenada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (LC-SPE-NMR) ³.

O uso de perfis cromatográficos aliado a tais técnicas espectroscópicas e espectrométricas também pode ser utilizado no controle de qualidade de fitoterápicos, especialmente na determinação da autenticidade das espécies vegetais.

1.1 - DESREPLICAÇÃO

A desrepliação é um atalho na descoberta de compostos inéditos e/ou bioativos, no entanto, tal abordagem requer bom planejamento e conhecimento prévio da amostra vegetal. Trabalhos de desrepliação envolvem etapas anteriores e posteriores à análise propriamente dita, como as descritas abaixo.

1.1.1 - Etapas Preliminares

O primeiro passo constitui-se em boa revisão bibliográfica para verificar quais classes de compostos são mais comuns na espécie, gênero ou até família. Se existem estudos que correlacionem a espécie e, principalmente, compostos isolados a determinada atividade biológica. Enfim, se a espécie vegetal em questão é uma boa candidata para encontrar compostos de interesse ⁶.

A partir dessas informações planeja-se o modo de extração. O preparo do extrato vegetal é um ponto primordial, uma vez que as amostras vegetais são matrizes complexas e os metabólitos de interesse como flavonoides, taninos, antraquinonas, cumarinas, terpenos, saponinas e alcaloides, os quais comumente estão relacionados a atividade biológica, encontram-se em concentrações inferiores a macromoléculas como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos.

De modo geral os extratos utilizados em estudo de desrepliação são aqueles mais abrangentes, mais representativos da totalidade dos compostos da espécie vegetal. Além disso, os processos extrativos a frio normalmente são preferíveis, pois preservam a integridade dos compostos presentes no extrato ³, sendo comuns métodos de maceração e maceração sob agitação. Os solventes de extração como metanol e etanol são muito utilizados, visto que possibilitam a extração de diversas classes de compostos em quantidades maximizadas ^{7,8}. No entanto, a grande diversidade de classes de compostos, por vezes presentes em

produtos naturais com distintas propriedades de polaridade, características ácido-base e massa molar, requerem a utilização de solventes mais específicos que direcionem quais classes de compostos serão extraídos e em qual extensão^{9,10}. Solventes de diferentes polaridades podem ser utilizados quando se deseja classes específicas de compostos, como demonstrado na TABELA 1.1.

TABELA 1.1 - Classes de compostos geralmente extraídos por solvente. Adaptada a partir de Cechinel e Yunes, 1998¹¹ e Pereira, 2012.¹².

Solventes	Classe de metabólitos secundários
Éter de petróleo e hexano	Lipídeos, ceras, pigmentos furanocumarinas
Tolueno, diclorometano e clorofórmio	Alcaloides (base livre), antraquinonas livres, óleos voláteis e glicosídeos cardiotônicos
Aceto de etila e n-butanol	Flavonoides, cumarinas
Etanol e metanol	Heterosídeos em geral
Misturas hidroalcoólicas	Agliconas, ceras, sapogeninas, iridoídeos e sesquiterpenos
Água	Saponinas e taninos
Água acidificada	Alcaloides na forma de sal
Água alcalinizada	Saponinas

Por vezes somente o processo extrativo não é suficiente para a seleção dos compostos de interesse e retirada de interferentes, sendo necessário um passo posterior de fracionamento. O fracionamento pode ser realizado por técnicas de extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e cromatografia de contracorrente (CCC). Dentre essas a mais utilizada é SPE em face de suas vantagens, como maior recuperação, pré-concentração eficaz, menor quantidade de solvente orgânico, facilidade de operação e maior possibilidade de automação¹³. Tratamentos por SPE são aplicados em trabalhos de desreplicação especialmente na remoção de clorofila.

1.1.2 - Etapa Analítica

Desreplicação usualmente envolve a utilização de técnicas

cromatográficas como cromatografia gasosa (GC)¹⁴⁻¹⁶ ou cromatografia líquida (LC), a saber cromatografia em camada delgada (TLC)^{17,18}, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de ultraeficiência (UHPLC)^{7,19}. Destacam-se as duas últimas devido à capacidade de propiciar análises rápidas com alta resolução, precisão, exatidão e robustez^{20,21}. Elas apresentam grande versatilidade possibilitando a separação de ampla variedade de compostos com propriedades físico-química distintas, em face da possibilidade de utilização de diferentes modos de eluição e disponibilidade de grande diversidade de fases estacionárias^{22,23}.

Ademais, análises rápidas minimizam custos operacionais, maximizam o aproveitamento de recursos técnicos e humanos e privilegiam a sustentabilidade em consonância aos conceitos de química verde³.

Como explicado acima, plantas medicinais são matrizes complexas e os métodos de extração geralmente empregados são bastante abrangentes, de modo que é necessário o desenvolvimento de um método cromatográfico representativo da totalidade dos compostos químicos presentes na amostra e com alta eficiência de separação. A obtenção de tais métodos não consiste em tarefa de fácil realização, no entanto a disponibilidade de grande variedade de fases estacionárias derivadas aliada a novas tecnologias na confecção destas, reduzindo significativamente o tamanho das partículas, tem facilitado o desenvolvimento de análises cromatográficas rápidas com ganho de eficiência e resolução cromatográfica^{24,25}.

A obtenção de métodos rápidos, de alta eficiência e resolução exigem, sem dúvida, desenvolvimento adequado e racional. Comumente utiliza-se uma abordagem univariada, a qual consiste na alteração de uma única variável cromatográfica por vez verificando seu impacto na separação. Ao descobrir a melhor condição para determinada variável, verifica-se a próxima e assim por diante. Essa abordagem não raro leva a métodos cromatográficos com baixa eficiência e/ou resolução. Uma alternativa é a utilização de planejamento experimental, a qual permite alteração conjunta de diversas variáveis cromatográficas, avaliando as suas interações. Existem hoje alguns programas computacionais que permitem a automação do planejamento experimental e a análise multivariada dos resultados, o que facilita o desenvolvimento, mas não exclui a necessidade de conhecimento cromatográfico²⁶.

Os avanços tecnológicos aliados ao racional desenvolvimento de métodos cromatográficos possibilitam a obtenção de perfis cromatográficos com elevado número de bandas cromatográficas, que somadas às técnicas de espectrométricas de detecção possibilitam a identificação “*online*” de ampla variedade de compostos, inclusive isóbaros e diastereoisômeros.

Dentre as técnicas de identificação comumente acopladas a cromatografia líquida estão a espectrofotometria de UV, espectrometria de massas (MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR). A identificação “*online*” dos metabólitos secundários é obtida por meio da interpretação dos diferentes dados espectrais. Uma abordagem utilizada consiste na caracterização preliminar dos metabólitos por meio da interpretação dos dados do MS (razão massa/carga (m/z) e perfil de fragmentação) e espectros de absorção no ultravioleta (UV). Em etapa seguinte, análises por LC-NMR são empregadas visando informações estruturais mais detalhadas daqueles compostos não identificados satisfatoriamente pelas informações de UV e MS ou daqueles que apresentaram atividade em ensaios biológicos.

Embora as técnicas espectroscópicas acima sejam as mais empregadas, existem trabalhos de hifenação de LC à espectroscopia de infravermelho (IR) ^{27,28} e ao dicroísmo circular (CD) ^{29,30}, que também fornecem informações estruturais importantes.

1.1.3 - Etapa de Interpretação

A espectrometria de massas é uma das principais ferramentas utilizadas na identificação de compostos em produtos naturais. No entanto, o trabalho de interpretação dos dados de MS/MS, especialmente para novos compostos, é sobretudo desafiador. Nesse sentido, o uso de bibliotecas de espectros de massas facilitam em muito esse trabalho. Existem extensas bibliotecas de espectros para ionização eletrônica (EI), usado em GC-MS. Todavia, o acoplamento de LC com MS é realizado utilizando-se interfaces brandas de ionização, como electrospray (ESI) ou fonte de ionização a pressão atmosférica (APCI). Ademais, em espectrometria de massas sequencial os espectros de fragmentação são obtidos por dissociação induzida por colisão (CID), os quais não

são comparáveis aos espectros por ionização eletrônica (EI) ³¹. As bibliotecas por CID são poucas e pequenas quando comparadas às bibliotecas de EI. Como exemplo, a NIST, a mais extensa biblioteca, apresenta para EI espectros de 242.466 compostos químicos, enquanto que a biblioteca de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) apresenta 193.119 espectros para somente 8.351 moléculas ³². A MASSBANK, outra base de dados, compartilha gratuitamente os dados de espectrometria de massas fornecidos pela comunidade científica e apresenta atualmente um total de 41.092 espectros, incluindo espectros de EI e MS/MS ³³. Apesar do aumento constante dessas bases de dados, a cobertura destas bibliotecas está longe de cobrir a imensidão de compostos existentes. A utilização dessas bibliotecas também é limitada devido a grande quantidade de variáveis experimentais como tipo de analisadores, tipo de gás de colisão, energia colisão e outras que diminuem a reprodutibilidade dos espectros obtidos, dificultando a interpretação dos dados. Nesse sentido existem softwares que buscam em bibliotecas de compostos como KEGG ³⁴, PubChem ³⁵ e ChemSpider ³⁶ substâncias químicas de mesma massa exata do íon precursor e comparam os espectros experimentais com espectros preditos por algoritmos computacionais, elencando os possíveis compostos por similaridade ³⁷. O inconveniente dessas ferramentas é que sua utilidade está restrita aos analisadores de massa de alta resolução e nem sempre suas predições são exatas, embora sejam guias interessantes na elucidação estrutural.

1.2 - TÉCNICAS HIFENADAS

A cromatografia líquida hifenada a técnicas de identificação como DAD, MS e NMR são as principais técnicas espectroscópicas utilizadas em trabalhos de desreplicação, assim, nas seções abaixo serão abordadas as peculiaridades, limitações e vantagens de cada técnica especialmente para identificação "*online*" de metabólitos secundários.

1.2.1 - LC-DAD

O DAD é um dos detectores mais amplamente utilizados em LC. Na

identificação "*online*" de metabólitos secundários seu emprego isolado não fornece informações suficientes para identificação de compostos, no entanto, são geralmente utilizados de forma hifenada a outros detectores, como em LC-DAD-MS e LC-DAD-NMR. Espectros de UV auxiliam na identificação de grupos cromóforos típicos de diversas classes de metabólitos secundários presentes em produtos naturais. Adicionalmente, a utilização de LC-DAD com derivação pós-coluna pela adição de reagentes de deslocamento, como base fraca de acetato de sódio e soluções neutra e ácida de cloreto de alumínio, auxilia na determinação da posição de substituintes na molécula, como a localização de grupos hidroxilas em polifenóis^{31,38}.

1.2.2 - LC-MS

A espectrometria de massas fornece muitas informações estruturais que permitem sobretudo a identificação de compostos já conhecidos, todavia não conduz a uma caracterização inequívoca, havendo, muitas vezes, dúvidas sobre aspectos estruturais como posição de substituinte, insaturações e configuração³⁹.

Existe atualmente grande diversidade de analisadores de massas, no entanto para identificação "*online*" de compostos são preferíveis aqueles que apresentam as seguintes vantagens: boa detectabilidade em experimentos de íons totais, poder de resolução de massas, exatidão e capacidade de realizar experimentos de fragmentação sequencial em dois (MS^2) ou mais estágios (MS^n).

Experimentos de fragmentação sequencial podem ser realizados em vários analisadores como triplo quadrupolo (QqQ) e armadilha de íons (IT), e também em espectrômetros híbridos como quadrupolo - tempo de voo (QqToF) e QqLIT (quadrupolo – armadilha de íons linear) e LTQ-OrbiTrap⁴⁰.

Analisadores QqQ são reconhecidos por apresentarem alta detectabilidade em experimentos de MRM (monitoramento de reação múltipla) e SRM (monitoramento de reação selecionada), o que os tornam excelentes analisadores para quantificação. No entanto, não apresentam grande detectabilidade em experimentos de íons totais, o que inviabiliza a visualização geral da amostra⁴⁰. Tal limitação dificulta o emprego desse analisador na identificação "*online*", mas não exclui totalmente sua utilidade. Analisadores QqQ podem ser úteis em etapas

posteriores de ensaios de desreplicação, desde que haja conhecimento prévio das relações massa/carga (m/z) presentes no cromatograma, obtidas por meio de outro analisador de massa com boa sensibilidade em experimentos de íons totais. Selecionando esses íons, experimentos de íons produtos podem ser realizados. Outros experimentos como perda neutra e íons precursores podem fornecer importantes informações estruturais ⁴¹.

Outro tipo de espectrômetros de massas largamente utilizado são os espectrômetros de baixa resolução do tipo IT. Estes podem ser esféricos ou lineares. As vantagens destes analisadores são a capacidade de concentrar íons dentro da armadilha de íons, aumentando consideravelmente a detectabilidade em experimentos de íons totais, e a realização de fragmentações sucessivas de íons produtos, confinados na armadilha, concentrando e expondo-os novamente à colisão em fase gasosa ^{40,41}. Espectrômetros IT podem realizar fragmentações sucessivas (MS/MS, MS³, MS⁴), chegando teoricamente a fragmentações sequenciais da ordem de MS¹² ⁴². Entretanto, somente número limitado de íons pode ser analisado simultaneamente (10-30), devido à repulsão de cargas no espaço e à possibilidade de reações entre íons e moléculas, que diminuem a detectabilidade e a qualidade dos espectros de fragmentação. Outra restrição é que somente íons com m/z maiores que um terço da massa do íon precursor podem ser eficientemente retidos ⁴¹. Apesar dessas limitações, existem diversos estudos de identificação "*online*" de compostos utilizando espectrômetros IT⁴³⁻⁴⁶.

Além dos espectrômetros citados, existem os analisadores híbridos como o quadrupolo/armadilha de íons linear (QqLIT). Esta plataforma apresenta três quadrupolos, no qual o último funciona como uma armadilha de íons linear onde os íons são ejetados axialmente. Esta configuração aumenta significativamente a detectabilidade em experimentos de íons totais e íons produtos e, ao mesmo tempo, mantém as funcionalidades do triplo quadrupolo, como experimentos de MRM e perda neutra constante. A maior sensibilidade dos analisadores LIT em comparação aos IT's esféricos decorre do maior espaço para reter os íons, diminuindo a repulsão das cargas. Também os processos de isolamento e fragmentação não ocorrem todos dentro da armadilha, assim os íons de m/z menores que um terço da massa do íon precursor são analisados sem dificuldades ^{40,41}.

Neste contexto, os analisadores por tempo de voo (ToF) apresentam

diversas vantagens, como a alta resolução (aproximadamente 10.000) e exatidão (geralmente menor que 2mDa), o que permite identificar as fórmulas moleculares de cada composto presente no cromatograma. Equipamentos mais modernos podem apresentar resolução superior a 75.000 e exatidão de massa sub-ppm. Adicionalmente, experimentos de íons produtos (MS/MS) podem ser realizados por processos de ionização que causam a fragmentação na própria fonte de ionização ou utilizando analisadores híbridos como QqToF, no qual o segundo quadrupolo é a célula de colisão^{40,41}. A alta sensibilidade, poder de resolução de massas, exatidão e aquisição de espectros de fragmentação tornam os analisadores do tipo ToF muito úteis em experimentos de desreplicação.

Por último, destaca-se o espectrômetro de massas tipo OrbiTrapTM, um espectrômetro híbrido (LTQ – OrbiTrapTM) que reúne as vantagens do analisador LIT com a alta resolução e exatidão. O OrbiTrapTM apresenta alta resolução (até 150.000) e exatidão (sub-ppm), o que possibilita a identificação da fórmula molecular. O LTQ-OrbiTrap apresenta vantagens sobre o QqToF, pois apresenta maior detectabilidade, poder de resolução de massas e exatidão^{40,41}.

1.2.3 - LC-NMR

As técnicas hifenadas de LC-DAD e LC-MS sem dúvida fornecem importantes informações estruturais, contudo nem sempre propiciam uma identificação inequívoca, especialmente para compostos inéditos. Por outro lado, o NMR com sua grande diversidade de experimentos uni e bidimensionais pode fornecer informações mais completas e elucidativas^{47,48}. Outra vantagem é que o NMR é uma técnica não seletiva de detecção, ou seja, todo composto que apresentar isótopos com spin diferente de zero (no caso de LC-NMR especialmente hidrogênio) será detectado desde que em concentrações acima do limite mínimo de detecção do equipamento⁴⁷. A desvantagem reside na menor detectabilidade quando comparada às outras técnicas espectroscópicas, embora os avanços tecnológicos de magnetos supercondutores cada vez mais potentes e de criossondas tenham aumentado significativamente a detectabilidade^{47,49}. Tais avanços permitem a realização de experimentos de ¹H NMR com algumas centenas de nanogramas de amostras e poucos microgramas para experimentos mais

complexos ⁵⁰.

O fato do NMR ser uma técnica não seletiva de detecção representa um obstáculo no acoplamento do LC ao NMR. Os solventes utilizados em LC apresentam sinais muito mais intensos que os compostos analisados devido a sua maior abundância, o que requer, necessariamente, a utilização de sequência de pulsos para supressão destes sinais ³¹. A supressão dos sinais dos solventes distorce o espectro de NMR e pode suprimir sinais importantes dos compostos de interesse. Nesse sentido, podem-se usar solventes deuterados, como água, no entanto a utilização de acetonitrila e metanol deuterados na cromatografia é impeditivo devido ao alto custo. Uma abordagem para diminuir os problemas da supressão é a utilização de dois sistemas de solventes, como acetonitrila/D₂O e metanol/D₂O. Nesse caso é possível avaliar todos os sinais do NMR, pois os sinais dos solventes não deuterados apresentam deslocamentos químicos distintos ⁵¹.

A hifenação entre o LC e o NMR é realizada principalmente de 4 modos distintos que são: vazão contínua, vazão parada, armazenamento em alça de amostragem e em cartuchos de extração de fase sólida (SPE).

Em vazão contínua, a aquisição dos espectros de NMR é simultânea à corrida cromatográfica. Em face do tempo reduzido de permanência do composto na região da bobina, este modo apresenta baixa detectabilidade o que dificulta a realização de experimentos mais demorados, como heteronucleares e ¹H-NMR com analitos em baixa concentração. Ademais, em eluição gradiente ocorre a variação nos deslocamentos dos sinais do solvente, o que exige a redefinição da frequência do sinal de pré-saturação a cada intervalo de tempo. Essas limitações restringem, geralmente, a análise em vazão contínua a estudos de triagem que são seguidos por experimentos em vazão parada ⁵².

No modo de vazão parada, as bandas cromatográficas são sequencialmente transferidas para a sonda após detecção por UV ou MS, sendo o fluxo interrompido no momento em que o composto se encontra na região de detecção. Dessa forma, experimentos que demandam mais tempos podem ser executados. Todavia a interrupção temporária da vazão causa alargamento das bandas cromatográficas seguintes, diminuindo a eficiência cromatográfica e contaminando compostos com tempos de retenção próximos. O alargamento ocorre devido a difusão dos compostos e, nos casos de eluição gradiente, pela difusão das

moléculas dos solventes alterando a força do gradiente ao longo da coluna. O modo de vazão parada não exclui a necessidade de sequências de pulsos para supressão dos sinais dos solventes não deuterados, contudo, a definição da frequência do sinal de pré-saturação é mais fácil, visto que não há alteração da composição dos solventes^{47,48}.

Os modos de hifenação diretos descritos acima apresentam uma série de limitações. No intuito de contorná-las foram desenvolvidas interfaces para acoplar o LC ao NMR. Entre elas as alças de amostragem são utilizadas para armazenar os compostos separados cromatograficamente e depois transferidos para o NMR. Nesse sistema, a sonda de fluxo pode ser lavada entre os compostos analisados, evitando contaminações cruzadas⁴⁷.

O acoplamento entre o LC e o NMR também pode ser realizado por meio de uma interface automatizada de SPE. O LC-SPE-NMR apresenta como vantagem o uso exclusivo de solventes deuterados nas análises de NMR, facilitando a supressão do sinal do solvente ou até mesmo tornando-a desnecessária, e permite o acúmulo de múltiplas corridas cromatográficas concentrando os analitos, o que possibilita a aquisição de espectros de alta qualidade em pequenos intervalos de tempo. Nesse modo, os compostos não são diretamente eluídos para a sonda do NMR, mas sim a um pequeno cartucho de SPE onde o analito é retido. Os cartuchos são então secos com N₂ e os compostos são dessorvidos com solventes deuterados, como CD₃CN, CD₃OD, CDCl₃^{40,52,53}. A interface automatizada de LC-SPE-NMR utiliza cartuchos (10 x 2 mm) geralmente preenchidos por resinas poliméricas de polidivinilbenzeno ou poliestireno. O máximo de retenção com pequena largura da banda cromatográfica no topo do cartucho é o desejado. No entanto, a força da fase móvel advinda da eluição cromatográfica dificulta tal retenção, sendo necessária a diminuição da força eluotrópica da fase móvel, a qual é obtida com o auxílio de uma bomba secundária pós-coluna que opera com água a vazão três vezes acima da vazão cromatográfica. Mesmo com a diminuição da força eluotrópica, de modo geral, os cartuchos de polidivinilbenzeno/poliestireno não retêm os compostos de maior polaridade. Por outro lado, os compostos mais apolares dificilmente são dessorvidos. Assim, dependendo das propriedades químicas dos compostos em análise, é necessária a escolha de cartuchos com outras fases estacionárias, como cianopropil, etil, octil, octadecil sílicas, além de fases poliméricas de troca catiônica ou aniônica.

Nos modos indiretos de análise é comum não usar a sonda de fluxo e a dessorção dos compostos retidos são realizadas manualmente para os tubos de ressonância. Esse procedimento é realizado para haver melhor aproveitamento de tempo de máquina para outros experimentos independentes do LC, e devido à dificuldade de instalação e desinstalação constante da sonda.

Mesmo com o advento de novas tecnologias que aumentaram a detectabilidade do NMR e a utilização da interface de SPE com concentração de compostos, ainda existe a dificuldade de aliar ambas as técnicas. A sensibilidade do NMR não acompanhou os avanços tecnológicos em LC, que tendem cada vez mais a miniaturização, ou seja, menores colunas, menores partículas, menor capacidade de carga, que conseqüentemente exigem alta sensibilidade. A interface de LC-SPE-NMR ainda apresenta limitação de tempo no sistema automatizado de seleção de cartuchos de SPE, não conseguindo trocar os mesmos em velocidade suficiente para aprisionar compostos com tempos de retenção muito próximos, como acontece em UHPLC ou para separações utilizando colunas de núcleo fundido.

1.3 - OBJETO DE ESTUDO

As espécies vegetais estudadas nesse trabalho pertencem ao gênero *Phyllanthus*, sendo estas as espécies *P. amarus*, *P. caroliniensis*, *P. niruri*, *P. stipulatus*, *P. tenellus* e *P. urinaria*. A escolha dessas espécies deve-se aos seguintes aspectos:

1. Botânicos. A classificação taxonômica desse gênero é bastante complicada e sujeita a erro de interpretações;
2. Terapêuticos. As espécies pertentes ao gênero *Phyllanthus* são amplamente utilizadas na medicina tradicional, sendo relatados diversos estudos farmacológicos, principalmente no tratamento de urolitíases.
3. Fitoquímicos. A literatura fitoquímica desse gênero é extensa, no entanto existem poucos trabalhos para espécies como *P. caroliniensis*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*.
4. Oficiais. *P. niruri* e *P. tenellus* constam na farmacopeia brasileira^{54,55}, no entanto, os métodos de autenticidade vegetal são pouco específicos e

sujeitos a interpretações equivocadas.

1.3.1 - Aspectos Botânicos

Diversas espécies do gênero *Phyllanthus* são conhecidas popularmente como quebra-pedra. Este gênero faz parte da família Phyllanthaceae que abrange mais de 2000 espécies distribuídas em 59 gêneros ⁵⁶.

O gênero *Phyllanthus* é o principal da família, possuindo 750 espécies. Sua distribuição é bastante ampla, predominando em áreas tropicais, como é o caso do Brasil, onde ocorrem 107 espécies ⁵⁷⁻⁵⁹.

As espécies de quebra-pedra são especialmente conhecidas por crescerem em todo tipo de solo, como fendas de calçadas, terrenos baldios, quintais e jardins. São semiperenes, ou seja, vegetam por um período de 3 a 4 anos, crescendo especialmente nos períodos chuvosos. Seu porte geralmente é herbáceo, contudo existem algumas espécies arbóreas de pequeno porte e arbustos. De modo geral, medem cerca de 40 a 80 cm, apresentam ramificação filantoide e glabra. Possuem folhas simples, membranáceas, medindo até 1 cm de comprimento e dispostas em ramos em semelhança a folhas compostas. Suas inflorescências são cimosas, axilares, paucifloras, às vezes reduzidas a uma única flor e viradas para baixo. As flores são gamossépalas, com discos nectaríferos usualmente segmentados. Os frutos são cápsulas tricocas com aproximadamente 1 mm de diâmetro e com sementes geralmente trígonas e ornamentadas ⁵⁷⁻⁶⁰.

A classificação taxonômica desse gênero é bastante complicada e sujeita a erros de interpretação. A utilidade do uso das características das flores é limitada devido ao tamanho reduzido e pouca variação morfológica entre espécies. Dessa forma, o principal aspecto de classificação é a distribuição espacial dos ramos e das flores masculinas e femininas, aliado à morfologia das sementes, uma vez que não existem espécies com a mesma combinação de tamanho e padrão de ornamentação ⁶¹.

Conforme a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira a droga vegetal popularmente conhecida como erva-pombinha, quebra-pedra e falso-quebra-pedra é constituída por folhas e ramos secos de *Phyllanthus niruri* e suas subespécies, *Phyllanthus niruri* ssP. *niruri* L. e *Phyllanthus niruri* ssp. *lathyroides* (Kunth) G.L.

Webster, e *Phyllanthus tenellus* Roxb ^{54,55}.

As características morfológicas são os principais determinantes na distinção das duas espécies, destacando-se a forma e tamanho das folhas, características das flores e frutos além da coloração do caule^{54,55}. Na TABELA 1.2 encontram-se as principais características morfológicas para diferenciação das espécies de *Phyllanthus*.

TABELA 1.2 - Principais características morfológicas para diferenciação das espécies oficiais de *Phyllanthus* no Brasil ⁶².

	<i>P. niruri</i>	<i>P. tenellus</i>
Disposição das folhas	Imbricadas	Dísticas
Forma das folhas	Lâminas oblongo-elípticas, ápice arredondado e base assimétrica	Lâminas largo-ovaladas, ápice obtuso e base aguda
Estípulas	2 estípulas lineares-lanceoladas de 1,5 cm de altura sendo uma maior	4 estripas e triangulares de 1 mm com matizes vermelhos
Sépalas	5 sépalas longo-ovaladas e obtusas nas flores masculinas e 5 sépalas obovaladas sem margem branca nas flores femininas	5 sépalas suborbiculares nas masculinas e 5 sépalas estreito-ovaladas com margem branca nas flores femininas
Flores masculinas	3 estames e pedúnculo de 3 mm	5 estames e pedúnculo de 1 mm
Pólen	Perpolado	Esférico
Fruto	Cápsula globosa deprimida dorsiventralmente com 4 mm de diâmetro e 2 mm de altura, com sépalas e estigmas persistentes	Cápsulas triangulares
Ramo	Lisos e de coloração verde	Ramos com pelos glandulares e estrias longitudinais. A base de cada ramificação possui 3 estípulas triangulares

1.3.2 - Aplicações Terapêuticas e Estudos Farmacológicos

As espécies do gênero *Phyllanthus* são extensamente utilizadas na medicina tradicional especialmente no tratamento litíase renal e como diurético. Contudo a utilização popular de quebra-pedra não se restringe somente a tais enfermidades, sendo administrado também como analgésico, antiespasmódico, relaxante muscular e antisséptico das vias urinárias, colagogo, galactagogo, hipoglicemiante, eupépticos, antimenorrágico, antitussígeno e no tratamento de icterícia, hipertensão, cistite, hepatite B, afecções da pele, resfriados, gota, gonorreia, constipação, dispepsia e disenteria. Deve ser dito, no entanto, que não há estudos farmacológicos que comprovem todos os usos populares^{60,63-69}.

Entre os estudos farmacológicos publicados com *Phyllanthus* destacam-se as pesquisas com *P. niruri* especialmente as relacionadas à urolitíase:

1.3.2.1 - Experimentação *in vitro*

Barros *et al.*⁷⁰ analisaram o efeito do extrato aquoso de *P. niruri* sobre a cristalização *in vitro* de oxalato de cálcio em urina de ratos e humanos. Embora o extrato de *P. niruri* não tenha inibido a precipitação e formado ainda mais cristais, os mesmos foram significativamente menores. A agregação e o crescimento de cristais após 24 horas de cristalização foram inibidos demonstrando que o extrato de *Phyllanthus* provavelmente interfere nos estágios iniciais da formação dos cálculos podendo assim representar uma alternativa no tratamento e/ou prevenção de urolitíase.

Murugaiyah e Chan⁷¹ avaliaram a atividade inibitória de extrato metanólico de *P. niruri* e suas subfrações sobre xantina oxidase. O extrato inibiu moderadamente a xantina oxidase, apresentado uma concentração inibitória (IC₅₀) de 39,39 µg/mL. O fracionamento do extrato metanólico aumentou a atividade inibitória, ficando as frações 3 e 4 com atividade inibitória de 59,1 e 65,0% respectivamente.

Rodgers *et al.*⁷² avaliaram o efeito do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* (7,5 mg/mL) sobre a cristalização de oxalato de cálcio em urina sintética, incubadas por 2 horas a 37 °C. A cristalização foi monitorada levando em conta os fatores taxa de nucleação e crescimento, e tamanho dos cristais de oxalato de

cálcio. A presença de extrato de *P. niruri* não reduziu o tamanho dos cristais, contudo diminuiu a taxa de crescimento dos cristais e aumentou a velocidade de nucleação. Este último efeito se constitui um mecanismo de proteção, pois diminui a saturação pela rápida formação de pequenos cristais. Ramsout *et al.* ⁷³ em estudo similar com *P. niruri*, usando tanto urina sintética como real, observaram que a redução na taxa de crescimento e menores quantidades de agregados de cristais ocorreram somente em urina sintética. Assim, estes autores sugerem dessa forma cuidado ao extrapolar os resultados da urina sintética para condições clínicas.

1.3.2.2 - Estudos Pré-Clínicos

Freitas *et al.* ⁷⁴ verificaram inibição na formação de cristais ao avaliarem urolitíase induzida por oxalato de cálcio em ratos tratados com o extrato aquoso de *P. niruri* (1,25 mg/mL por 42 dias). Verificou-se que não houve alteração na excreção de cálcio e oxalato. Assim, sugeriram que o extrato de *P. niruri* não interfere no transporte tubular destas substâncias, de modo que a inibição da cristalização independente dos elementos litogênicos. Não houve alteração também na excreção de citrato e magnésio, indicando que o efeito antilítogênico não é mediado por esses inibidores.

Murugaiyah e Chan ⁷¹ avaliaram o efeito do extrato metanólico de *P. niruri* sobre a excreção de ácido úrico em ratos com hiperuricemia. O trabalho demonstrou que o extrato de *P. niruri*, quando administrado intraperitonealmente, aumentou 1,69 vezes a excreção de ácido úrico, enquanto que as lignanas isoladas do extrato, filantina, hipofilantina e filtetralina, aumentaram a excreção de ácido úrico em uma razão de 2,51, bem como aumentaram a depuração 11 vezes, quando comparados aos ratos controles. As lignanas apresentaram também fraca inibição *in vivo* da xantina oxidase (10 mg/Kg). Os autores concluíram que o efeito do extrato de *P. niruri* deve-se principalmente a atividade uricosúrica e parcialmente pela inibição da xantina oxidase, enquanto que o efeito das lignanas deve-se exclusivamente a ação uricosúrica.

Barros *et al.* ⁷⁵ avaliaram o efeito do extrato aquoso de *P. niruri* em cálculos pré-formados induzidos pela introdução de oxalato de cálcio na bexiga de ratos. O tratamento com extrato de *Phyllanthus* (5 mg/rato/dia) foi iniciado

imediatamente ou depois de 30 dias. Os animais foram sacrificados 50 ou 70 dias depois da cirurgia inicial, e a análise dos cálculos nos animais tratados precocemente demonstrou redução significativa no número (75%, $p < 0,05$) e na massa (65%, $p < 0,05$) dos mesmos. O tratamento iniciado após 30 dias, embora não tenha evitado o crescimento dos cálculos modificou o aspecto dos mesmos, pois aparentavam-se mais suaves e homogêneos quando comparados com os cálculos espinhosos presentes nos animais não tratados. Análises por difração de raio-X demonstraram que não houve alterações na composição da estrutura cristalina dos cálculos, sugerindo que o extrato interfere no arranjo cristalino, modificando as interações cristal matriz. Os resultados obtidos sugerem um grande potencial terapêutico da espécie *P. niruri* no tratamento de casos de urolitíase por deposição de oxalato de cálcio.

1.3.2.3 - Estudos Clínicos

Nishiura *et al.*⁷⁶ realizaram estudos clínicos em pacientes com cálculos renais de ambos os sexos (39 homens e 30 mulheres) e com idade de 38 ± 8 anos. Esses foram tratados com cápsulas de extrato aquosos liofilizados (cápsulas de 450 mg contendo 2% do extrato, três vezes ao dia) durante 3 meses. Os pacientes foram avaliados a cada 24 horas, analisando os seguintes parâmetros bioquímicos: cálcio, ácido úrico, sódio e potássio séricos, e cálcio, ácido úrico, citrato, magnésio, oxalato, sódio e potássio urinários. Os cálculos renais foram diagnosticados por ultrassonografia renal e raios-X abdominal. Observou-se o controle da hipercalcúria e leve redução de magnésio na urina, mas a quantidade e tamanho dos cálculos não sofreram nenhuma alteração, bem como os parâmetros urinários. Os pesquisadores concluíram que o tempo de estudo relativamente curto e o número pequeno de pacientes podem ter contribuído para os resultados negativos.

Micali *et al.*⁷⁷, avaliaram 150 pacientes com cálculo renal de 25 mm, compostos por oxalato de cálcio. Todos foram submetidos de uma a três sessões de litotripsia. O extrato de *P. niruri* (2 mg por dia) foi administrado diariamente por pelo menos 3 meses, em 52% dos pacientes. Os resultados radiográficos e ultrassonográficos não evidenciaram durante o período do estudo (180 dias) qualquer diferença no tamanho dos cálculos em comparação com o grupo controle.

Os estudos *in vitro* e pré-clínicos embora tenham apresentado resultados exitosos, não se reproduziram nos ensaios clínicos, demonstrando claramente a necessidade de estudos adicionais, de modo a comprovar a eficácia do extrato *P. niruri* no tratamento de urolitíases.

1.3.3 - Aspectos Químicos de *Phyllanthus*

A literatura fitoquímica de *Phyllanthus* é bastante vasta, no entanto algumas espécies do gênero, como *P. tenellus*, constante na Farmacopeia Brasileira⁵⁵, carecem de informações. Dentre as classes de compostos mais isolados do gênero destacam-se os alcaloides, flavonoides, taninos e lignanas. Trabalhos de revisão como os de Calixto⁷⁸, Bagalkotkar⁷⁹, Patel⁸⁰, Qi⁸¹ e Sarin⁸² fornecem importantes informações sobre os metabólitos secundários presentes em *Phyllanthus*.


1.3.4 - Autenticidade Vegetal e Métodos Oficiais

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição^{54,55} preconiza a diferenciação das espécies por determinação colorimétrica de teor de taninos totais (mínimo de 6,5% para *P. niruri* e mínimo de 9,0% para *P. tenellus*) e quantificação de ácido gálico por LC-UV após hidrólise dos taninos presentes no extrato (0,15% para *P. niruri* e 0,12% para *P. tenellus*). Preconiza-se também a identificação das espécies por cromatografia por camada delgada (TLC), diferenciando as espécies principalmente pela presença de vitexina-2"-O-ramnosídeo em *P. niruri* e rutina em *P. tenellus*. No entanto, métodos de quantificação de taninos totais e ácido gálico são pouco específicos, visto os primeiros serem uma classe química de metabólitos secundários de ampla distribuição, bem como por não levarem em conta a grande variação no conteúdo de taninos em virtude de diferentes condições ambientais⁸³. A diferenciação entre as duas amostras autênticas das espécies oficiais de *Phyllanthus* embora possa ser feita por TLC não serve para autenticá-las, pois essa técnica é incapaz de diferenciá-las de outras espécies do mesmo gênero e até mesmo de outros gêneros.

1.4 - OBJETIVOS

O presente trabalho ~~embora esteja dividido em capítulos apresenta um~~ objetivo principal, a ~~saber a~~ identificação de marcadores químicos característicos que permitam distinguir as espécies de *Phyllanthus* avaliadas. Técnicas hífenadas de cromatografia líquida e espectrometria de massas foram a principal ferramenta empregada para alcançar tal resultado. A partir dos dados obtidos alguns compostos foram isolados e identificados por NMR, utilizando método automatizado de LC-SPE-NMR. O termo desreplicação se aplica notoriamente a essa etapa do trabalho, na qual a interpretação preliminar por meio da interpretação dos dados de LC-MS guiou o isolamento e caracterização por NMR dos compostos mais interessantes, principalmente aqueles inéditos.

Outro importante objetivo foi ampliar a literatura fitoquímica de algumas espécies de *Phyllanthus* pouco estudadas, mas de ampla distribuição no território nacional como *P. tenellus*, *P. caroliniensis* e *P. stipulatus*.

 O capítulo 2 apresenta como objetivo a classificação de amostras comerciais de quebra-pedra adquiridas em diversos municípios brasileiros, a partir de marcadores químicos identificados em amostras de *Phyllanthus* autênticas.

O Capítulo 3, por outro lado, tem como **objetivo** uma abordagem estatística desde o desenvolvimento do método cromatográfico até a análise dos dados de LC-MS. O método cromatográfico foi desenvolvido utilizando planejamento experimental, enquanto que a diferenciação das espécies e seus marcadores foram definidos utilizando análise estatística denominada PCA.

Por fim, o capítulo 4 aborda a identificação inequívoca utilizando LC-SPE-NMR dos metabólitos secundários da espécie *P. tenellus*.

CAPÍTULO 2

2 - VERIFICAÇÃO DE AUTENTICIDADE VEGETAL POR PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

2.1 - INTRODUÇÃO

O controle de qualidade químico de espécies vegetais não se constitui em tarefa simples, pois apresenta diversos desafios. O primeiro relaciona-se a grande variação química em face de fatores como sazonalidade, ciclo circadiano, etapa de desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica e nutricional, radiação ultravioleta, altitude, poluição atmosférica, estímulos mecânicos, patógenos e outros⁸³. Outro desafio é a grande complexidade química inerente às espécies vegetais, sendo muitas vezes os metabólitos secundários de certas ervas medicinais pouco estabelecidos, sobretudo os princípios ativos^{84,85}.

A etapa inicial no controle de qualidade de fitoterápicos é a verificação da autenticidade do material vegetal, a qual pode ser realizada através de identificação taxonômica, no entanto esta identificação é bastante laboriosa, de difícil interpretação e sujeita a equívocos, ademais nem sempre o fabricante de um produto fitoterápico recebe o material vegetal íntegro, mas sim pulverizado, o que impossibilita esta identificação. A autenticidade do material vegetal pode ser avaliada também por meios químicos, especialmente através da análise de perfis químicos, havendo diversos trabalhos que relatam com sucesso a determinação da autenticidade vegetal por meio perfis cromatográficos⁸⁶⁻⁸⁹.

O perfil cromatográfico é uma ferramenta bastante útil, pois permite analisar a amostra em sua totalidade estabelecendo parâmetros comparativos de semelhanças e diferenças de espécies vegetais submetidas ao mesmo procedimento de extração e análise⁹⁰. Estabelece-se, assim, a qualidade de uma amostra levando em conta a sua complexidade e não somente a concentração de determinado marcador^{57,86}.

A utilização de perfis cromatográficos utilizando técnicas hífenadas é

uma ferramenta poderosa, pois permite a identificação "online" de marcadores químicos para classificação das espécies.

Assim, esse trabalho explora a comparação qualitativa dos perfis cromatográficos de 4 espécies de *Phyllanthus* (*P. caroliniensis*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus*), a partir de amostras autênticas de localidades e tempo de desenvolvimento vegetal diferentes. O conhecimento fitoquímico obtido da análise desses dados foi utilizado para classificar amostras comerciais obtidas de diversas localidades do Brasil.

2.2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 - Material Vegetal

Todo o material vegetal utilizado nesse trabalho foi obtido em trabalho desenvolvido por Martins^{57,86}. As amostras vegetais autênticas de quatro espécies cultivadas de *Phyllanthus* foram fornecidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil) e pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar, São Carlos, São Paulo, Brasil). As amostras foram coletadas em 4 diferentes períodos: Janeiro de 2007 (amostras de Campinas) e Janeiro, Abril e outubro de 2008 (amostras de São Carlos). As amostras utilizadas foram: *P. niruri* L., *P. tenellus* Roxb., *P. caroliniensis* Walt., *P. stipulatus* (Raf.) Webster. As espécies cultivadas em São Carlos foram plantadas a partir de sementes selecionadas de cada espécie fornecidas pelo CPQBA. As espécies foram identificadas e catalogadas no herbário da Universidade Estadual de Campinas. Depois de cada coleta, as partes aéreas foram secas por 7 dias a 40 °C, trituradas e a granulometria padronizada (60 mesh).

Amostras comerciais de quebra-pedra adquiridas de comércios (farmácias, feiras livres, ervanarias) de diferentes localidades do Brasil também foram utilizadas. As 20 amostras consistiam em material triturado e seco comumente utilizado no preparo de chás (TABELA 2.1).

TABELA 2.1 - Amostras comerciais de quebra-pedra^{57,86}.

Amostras	Origem*	Aquisição	Observação
Chá 3	Campo Largo/PR	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
Chá 4	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Feira livre
Chá 5	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Mercado Municipal
Chá 6	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
Chá 7	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Mercado Municipal
Chá 8	Piracicaba/SP	Barra Bonita/SP	Farmácia de manipulação
Chá 9	Chapecó/SC	Florianópolis/SC	Farmácia de manipulação
Chá 10	Mandirituba/PR	Maringá/PR	Farmácia de manipulação
Chá 11	Maringá/PR	Maringá/PR	Farmácia homeopática
Chá 12	Campo Largo/PR	Maringá/PR	Farmácia de manipulação
Chá 13	Campo Largo/PR	Maringá/PR	Farmácia de manipulação
Chá 14	Maringá/PR	Maringá/PR	Farmácia homeopática
Chá 15	Curitiba/PR	Curitiba/PR	Farmácia de manipulação
Chá 17	Campinas/SP	Campinas/SP	Ervanaria
Chá 18	Piracicaba/SP	Piracicaba/SP	Farmácia de manipulação
Chá 19	Franca/SP	Franca/SP	Ervanaria
Chá 20	Catanduva/SP	Catanduva/SP	Farmácia de manipulação
Chá 21	Botucatu/SP	Botucatu/SP	Farmácia de manipulação
Chá 22	Recife/PE	Recife/PE	Mercado Municipal
Chá 23	Aracaju/SE	Aracaju/SE	Mercado Municipal

2.2.2 - Procedimento de Extração e Preparo de Amostra

As amostras secas e trituradas (500 mg) foram pesadas e extraídas com 5 mL de etanol em tubos cônicos de 50 mL utilizando homogenizador Ultraturrax® na velocidade 5 do equipamento por 5 minutos. Após a extração a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 12500 x g, separando-se o sobrenadante. O procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante foi então transferido para tubo de ensaio e o solvente evaporado em Speed-Vac®. O extrato foi transferido para frasco de vidro tampado, identificado, pesado e mantido em freezer a -20°C.

2.2.3 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

O sistema de LC (Shimadzu Kioto, Japão) consiste em duas bombas LC-20AD, sendo uma delas equipada com válvula solenoide de quatro linhas, autoinjeter SIL-20A com alça de amostragem de 500 μL , degaseificador DGU-20A5, forno CTO-20A e controladora CBM 20A. As análises foram realizadas utilizando coluna Sulpelco® Ascentis Express C₁₈ de núcleo fundido (2,7; 10 x 0,21 cm). O detector de UV (Shimadzu SPD 20A) a 254 e 275 nm foi utilizado. As fases móveis utilizadas foram: solvente A - água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) e B - metanol. Perfil do gradiente: 0-30 min, 5-60,9% B; 30-40 min, 60,9-100% B. Vazão 0,30 mL/min. Temperatura do forno: 50 °C. A coluna foi submetida a limpeza com 100% B por 5 minutos e recondicionada nas condições iniciais por 5 minutos. Foram injetados 3 μL de extrato a 1 mg.mL⁻¹, solubilizados em água/etanol (70:30, v/v).

O sistema de LC foi acoplado ao espectrômetro de massas IT Esquire 6000 (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) equipado com fonte de ionização ESI.

Para as análises de MS, a vazão da fase móvel foi dividida utilizando conector tipo T, direcionando uma vazão de 50 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ para fonte ESI. O processamento dos dados foi realizada com o *software* Data Analysis software (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha).

As condições do espectrômetro de massas para análise foram: pressão do nebulizador (*nebulizer*) 20,0 psi, vazão do gás de secagem (*dry gas*) 6 L/min, temperatura de secagem (*dry temp.*) de 325 °C e condições otimizadas para uma relação massa/carga de 700 *m/z* (smart parameter settings ligado).

Inicialmente foram realizados experimentos de íons totais no modo positivo e negativo de ionização, em uma faixa de relação massa carga de 50 a 1500 *m/z*. Posteriormente, realizou-se análises de fragmentação utilizando auto-MS² e MS³ no modo positivo e negativo de ionização, no qual o instrumento analisa o espectro e determina os íons que serão fragmentados, a partir da intensidade determinada (*threshold*) de 10000. A amplitude de fragmentação utilizada foi de 1 V.

2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 - Amostras autênticas

A partir do material vegetal autêntico e devidamente identificado (seção 2.2.1) foi inicialmente realizado ensaios de íons totais com a finalidade de verificar as diferenças entre as 4 espécies e também averiguar se haviam maiores diferenças de composição química dos extratos de mesma espécie, mas cultivadas em diferentes localidades e com tempos de desenvolvimento vegetal distintos. As amostras de mesma espécie fornecidas tanto pelo CPQBA quanto pela UFSCar independente do estágio apresentaram cromatogramas com alta similaridade como demonstrado nas FIGURAS 2.1-2.4.

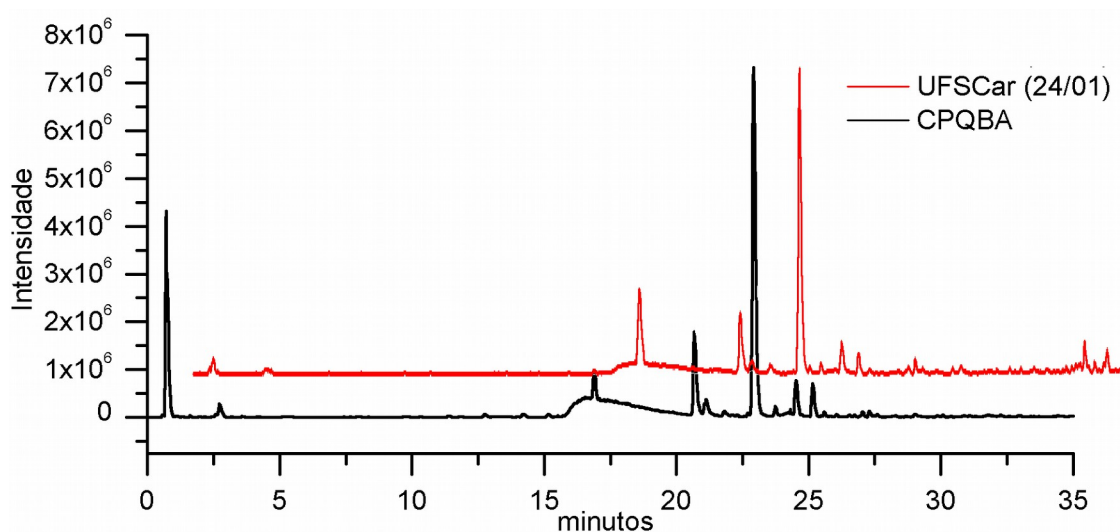


FIGURA 2.1 - Cromatogramas do pico base de extrato de *P. caroliniensis* cultivada em diferentes localidades.

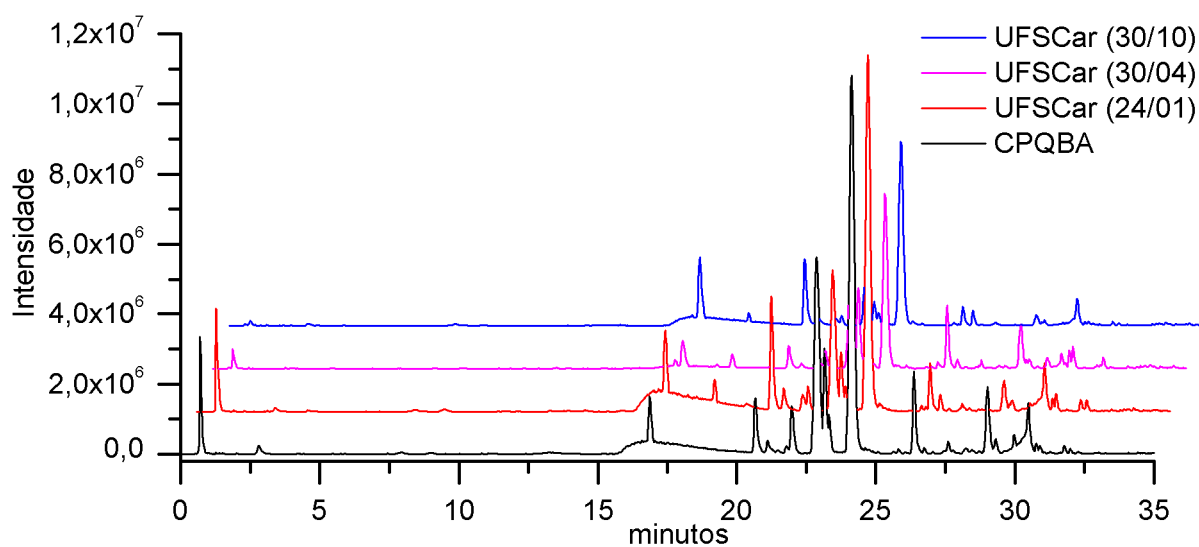


FIGURA 2.2 - Cromatogramas do pico base de extrato de *P. niruri* cultivada em diferentes localidades.

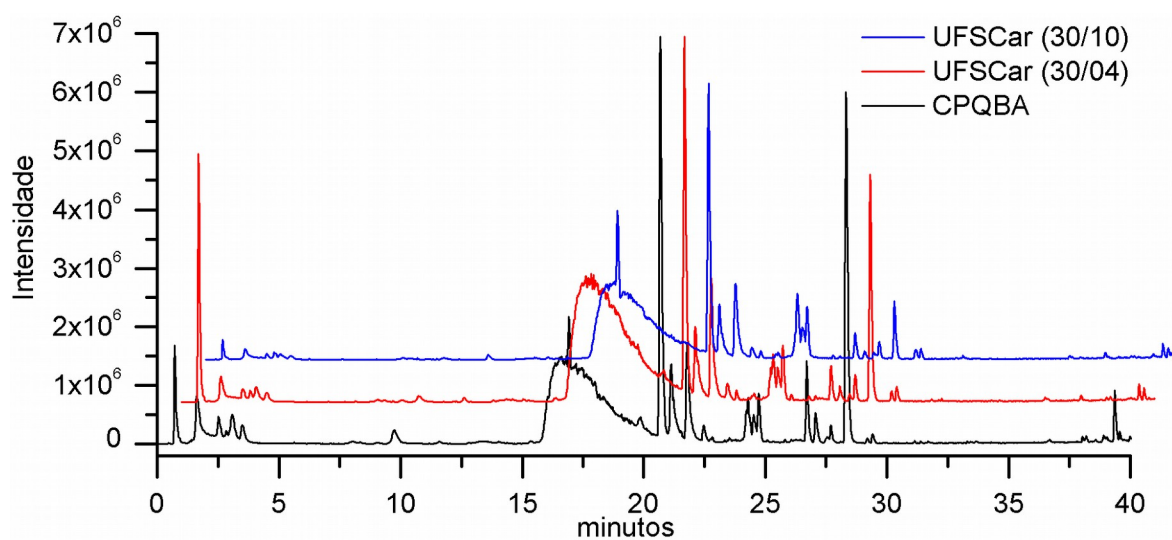


FIGURA 2.3 - Cromatogramas do pico base de extrato de *P. stipulatus* cultivada em diferentes localidades.

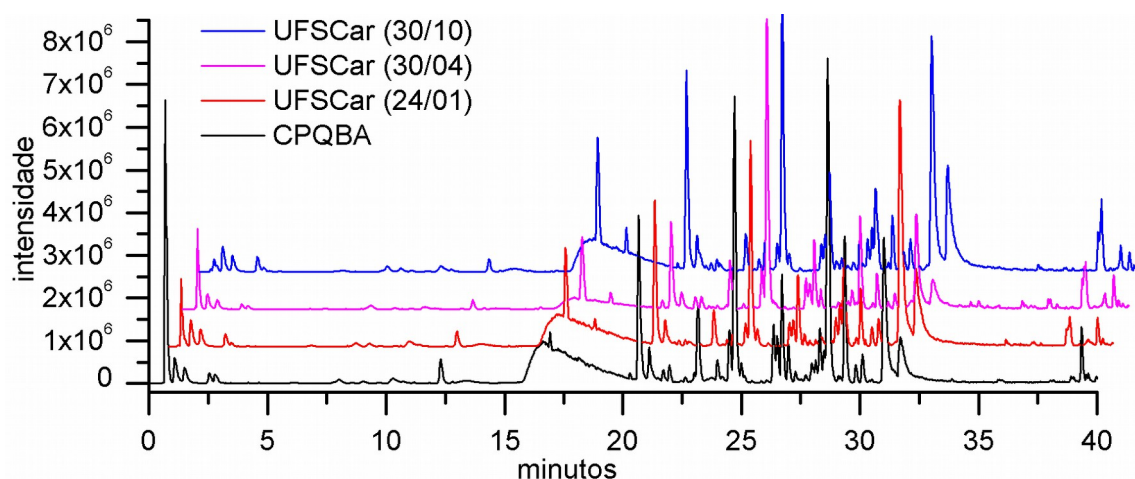


FIGURA 2.4 - Cromatogramas do pico base de extrato de *P. tenellus* cultivada em diferentes localidades.

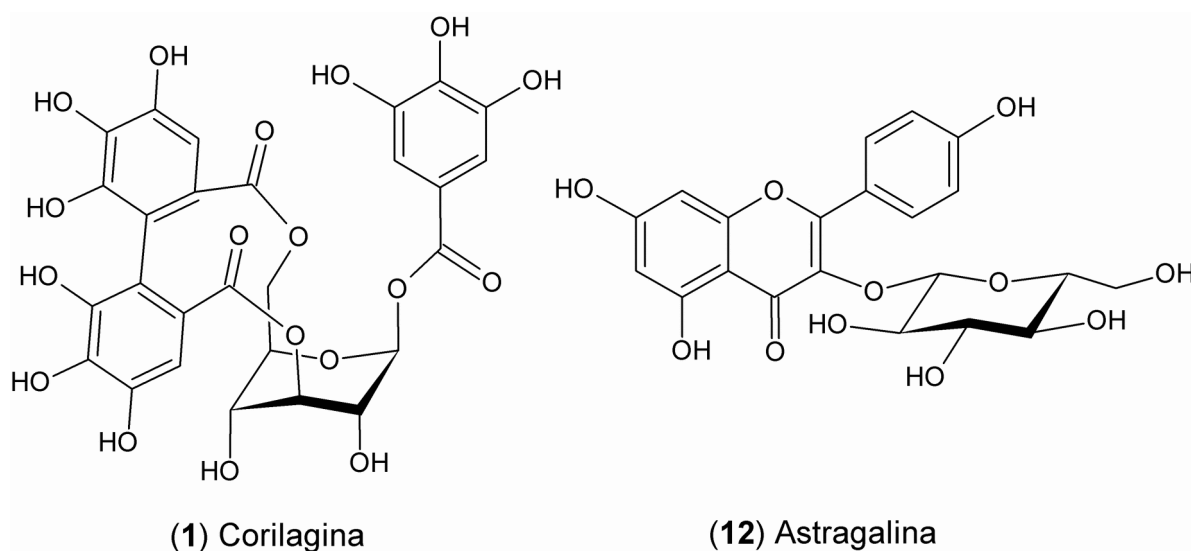
Após visualizar as diferenças nos perfis cromatográficos de cada espécie realizou-se uma busca qualitativa dos compostos responsáveis por tal distinção. Tal busca resultou no levantamento de 27 íons considerados importantes, sendo a estrutura química de 20 compostos inferida por espectrometria de massas sequencial utilizando LC-ITMS (TABELA 2.2). Em trabalho anterior realizado com extratos aquosos das espécies de *P. amarus*, *P. niruri*, *P. stipulatus* e *P. tenellus* encontrou-se 8 compostos em comum com os descritos na tabela abaixo⁴⁶.

TABELA 2.2 - Lista de compostos identificados por espécie estudada.

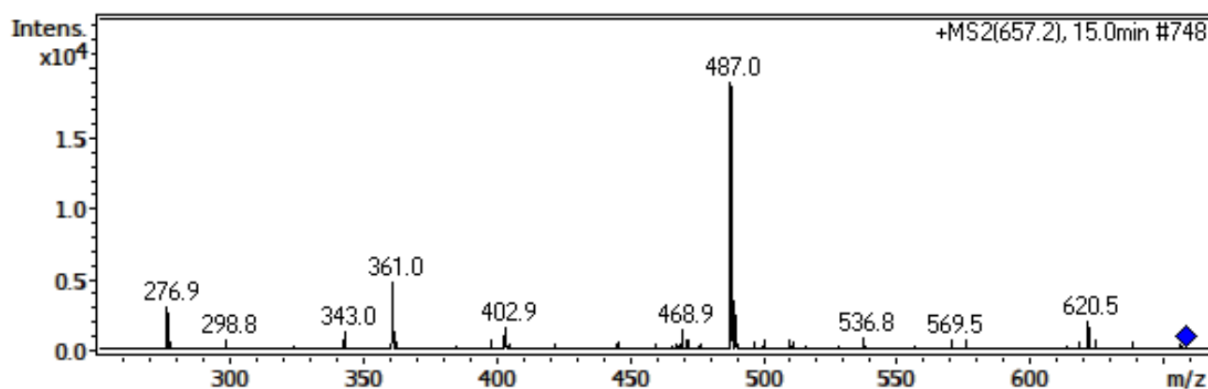
N°	t_R	Composto	Pc	Pn	Ps	Pt
1	15,6	Corilagina	X	X	X	X
2	21,3	Orientina		X		
3	22,2	Quercetina-3-O-gentibiosídeo	X			
4	22,3	Orientina-2"-O-ramnosídeo		X		
5	22,6	Miricitrina		X		X
6	22,7	Vitexina		X		
7	23,6	Vitexina-2"-O-ramnosídeo		X		
8	24,2	Miquealina			X	
9	24,6	Rutina			X	X
10	24,6	Canferol-3-O-gentibiosídeo	X			
11	26,1	Quercitrina		X		X
12	26,7	Astragalina		X		X
13	26,9	Naringenina-8-C-6"-acetilglucosídeo			X	
14	26,9	Canferol-3-O-rutinosídeo				X
15	28,6	Naringenina 8-C-4",6"-diacetilglucosídeo			X	
16	28,9	Eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo				X
17	28,9	Luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil		X		
18	29,6	Naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo				X
19	31,5	Pinocembrina-7-O-[4",6"-HHDP]-glucose				X
20	32,2	Pinocembrina-7-O-[3"-O-galoil-4",6"-HHDP]-glucose				X

Legenda: HHDP = hexahidroxidifenoil

A discussão acerca da interpretação dos dados de fragmentação encontra-se na sessão 3.3.3. Essa seção aborda de modo aprofundado os dados de MS/MS principalmente por UHPLC-QqToF, embora às vezes se mencione os dados obtidos por ITMS. Devido a grande semelhança dos dados por ITMS e QqToF, decidiu-se não repetir aqui tal discussão. Nesse capítulo reporta-se somente os dados de LC-MS/MS de dois compostos não abordados na seção 3.3.3, a saber o composto **1** (corilagina) e o **12** (astragalina) (FIGURA 2.5).

FIGURA 2.5 - Compostos inferidos presentes nas espécies de *Phyllanthus*

A corilagina constitui-se em metabólito secundário amplamente presente no gênero *Phyllanthus*, sendo reportado por diversos autores^{46,57,91,92}. No modo positivo de ionização, como esperado, não foi observado o íon de m/z 635, uma vez que o íon $[M+H]^+$ comumente não é visualizado em taninos hidrolisáveis. Todavia, o íon aduto de sódio $[M+Na]^+$ de m/z 657 ao ser fragmentado revelou perda neutra de 170 Da resultante da eliminação de ácido gálico⁹³ (FIGURA 2.6).

FIGURA 2.6 - Espectro ESI(+)-IT-MS² (1V) do composto 1 (corilagina) de m/z 657,2.

No modo negativo de ionização, por outro lado, foi possível observar o íon $[M-H]^-$ de m/z 633. O espectro de fragmentação desse íon (FIGURA 2.7) originou os íons produtos de m/z 463 e 301, concernente a perda de ácido gálico e a ácido elágico, respectivamente.

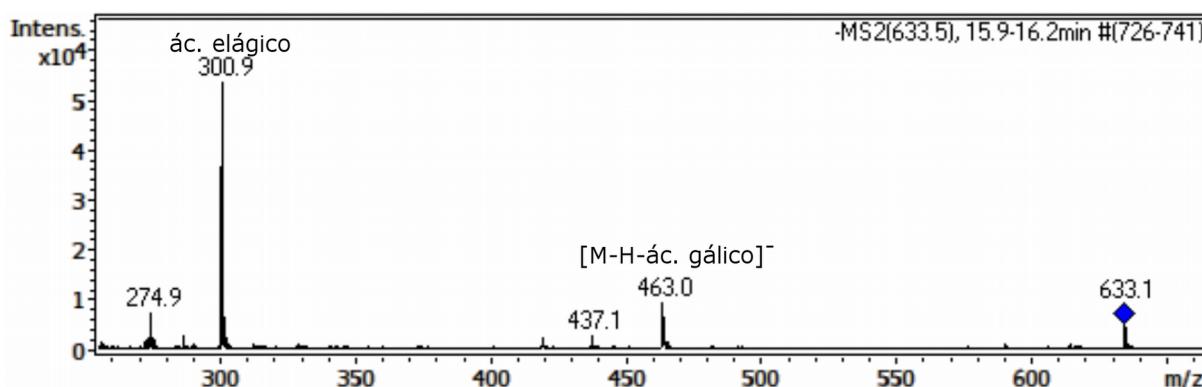


FIGURA 2.7 - Espectro ESI(-) IT-MS2 (1V) do composto 1 (corilagina) de m/z 633,5.

Em nosso trabalho anterior que identificou corilagina em extratos aquosos de *Phyllanthus* denominou-se a mesma como 1-O-galoil-3,6-hexahidroxi-difenol-glicosídeo, uma vez que não havia certeza de sua configuração relativa^{46,94}. Aqui, reporta-se esse composto como corilagina (anômero β) devido aos resultados encontrados em experimentos de NMR, dicroísmo eletrônico e vibracional circular, e cálculos teóricos que excluem a possibilidade de existência do anômero α ⁹⁵.

O composto **12** foi inferido como o flavonol 3-O-monoglicosilado astragalina e mostrou-se presente nas espécies *P. niruri* e *P. tenellus*. O espectro de fragmentação em ambos os modos de ionização revelaram a quebra Y_0 referente a perda de resíduo de glucose (FIGURA 2.8 e 2.9). A posição da glicosilação não pode ser determinada somente com os dados obtidos por IT-MS², no entanto experimentos realizados em LC-QqToF e LC-SPE-NMR corroboram com a ligação glicosídica na posição 3.

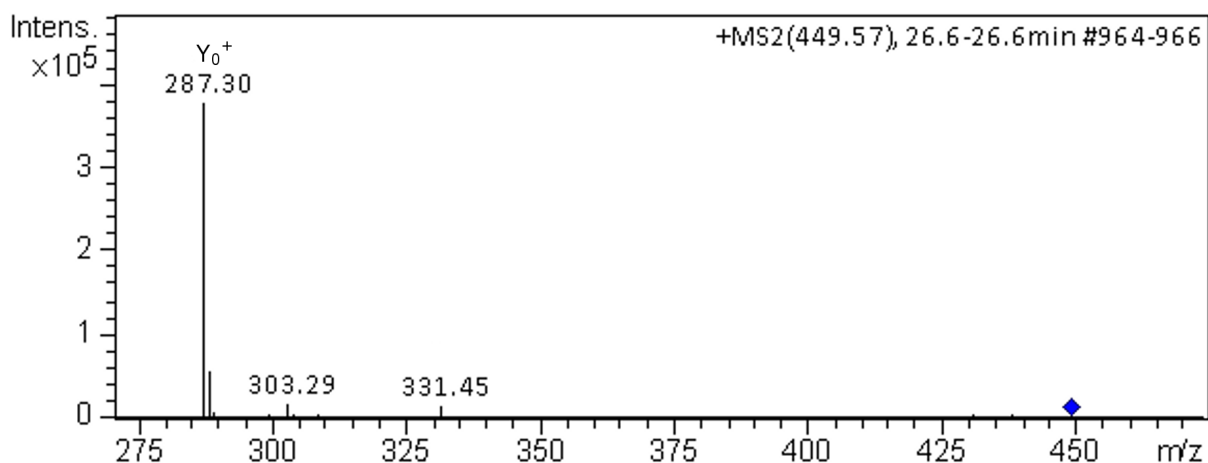


FIGURA 2.8 - Espectro ESI(+) IT-MS2 (1V) do composto 12 (astragalina) de m/z 449,57.

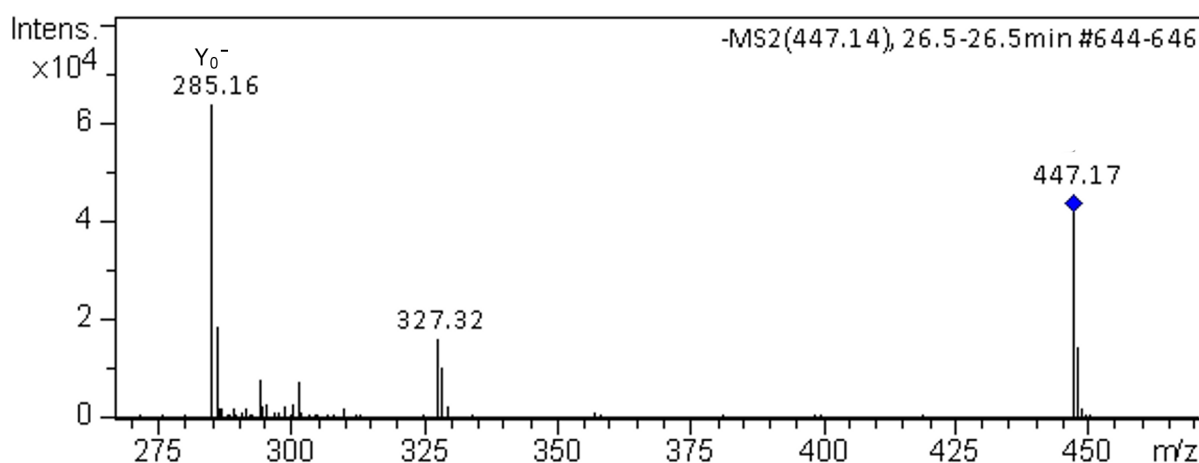


FIGURA 2.9 - Espectro ESI(-) IT-MS2 (1V) do composto 12 (astragalina) de m/z 447,14.

2.3.2 - Amostras Comerciais

Os perfis cromatográficos por LC-MS dos extratos etanólicos das amostras comerciais foram comparados com as amostras autênticas. Esta comparação foi realizada levando-se em conta os compostos exclusivos de cada espécie tal qual como listados na Tabela 2.2. Os marcadores escolhidos para as espécies foram: quercetina-3-O-gentibiosídeo para *P. caroliniensis*; orientina, orientina-2"-O-ramnosídeo, vitexina, vitexina-2"-O-ramnosídeo e luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil para *P. niruri*; miquealina, naringenina 8-C-6"-acetilglucosídeo e naringenina 8-C-4",6"-diacetilglucosídeo para *P. stipulatus*; e canferol-3-O-

rutinosídeo, eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo, naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo, pinocembrina-7-O-[4",6"-hexahidroxidifenoil]-glucose e pinocembrina-7-O-[3"-O-galoil-4",6"-hexahidroxidifenoil]-glucose para *P. tenellus*. O composto rutina foi selecionado também pois só está presente em *P. stipulatus* e *P. tenellus*. Os cromatogramas das amostras autênticas de íons extraídos foram comparados com os das amostras comerciais, buscando-se os respectivos marcadores químicos que possibilitassem a classificação das amostras (FIGURA 2.10).

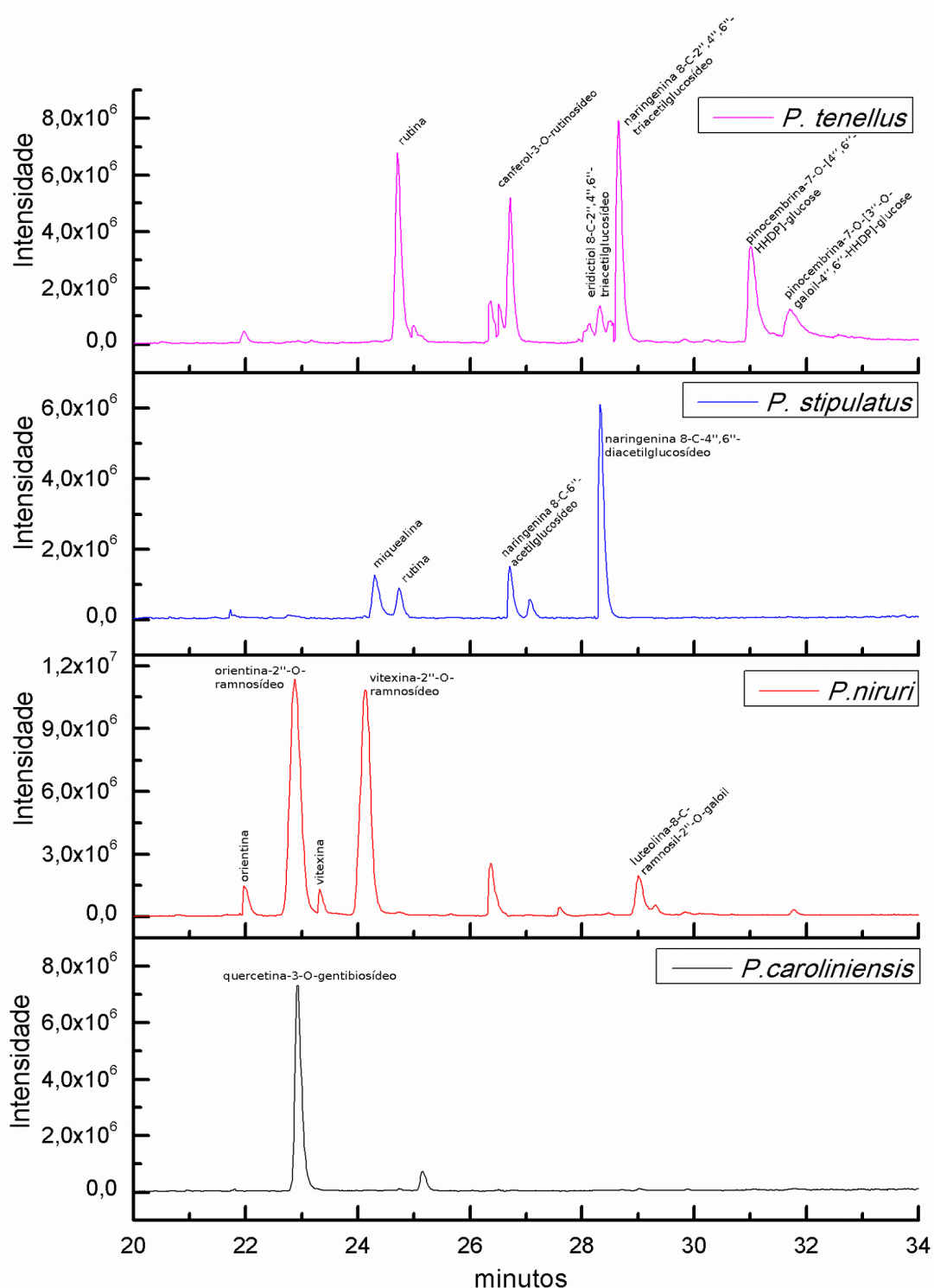


FIGURA 2.10 - Cromatogramas de íons extraídos dos marcadores químicos selecionados a partir de amostras autênticas fornecidas pelo CPQBA

Ao analisar as 20 amostras comerciais listadas na TABELA 2.1, verificou-se que a maioria das amostras embora comercializadas como *P. niruri*, apresentavam composição química muito semelhante ao extrato de *P. tenellus*. Nos experimentos de massas das amostras comerciais observou-se os compostos rutina (9), canferol-3-O-rutinosídeo (14), eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo (16), naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo (18) e pinocembrina-7-O-[4",6"-hexahidroxidifenol]-glucose (19), compostos esses característicos de *P. tenellus*. Somente as amostras comerciais 18 e 22 não foram classificadas como *P. tenellus* ou qualquer outra espécie de *Phyllanthus* avaliada, pois não apresentaram nenhuma similaridade com os extratos das espécies autênticas avaliadas. Assim, as amostras 18 e 22 podem constituir-se em adulteração ou ser outra espécie de *Phyllanthus* não abrangida nesse trabalho.

Os resultados de classificação obtidos corroboram com o trabalho efetuado por Martins *et al.*⁸⁶, que realizou extenso trabalho quimiométrico por LC-DAD de extratos aquosos de *Phyllanthus*. O diferencial desse trabalho consiste na identificação do conjunto de marcadores químicos responsáveis pela diferenciação das espécies.

É importante destacar também que a farmacopeia brasileira 5ª edição 54,55 preconiza a diferenciação das duas espécies oficiais de *Phyllanthus* (*P. niruri* e *P. tenellus*) pela presença vitexina-2"-O-ramnosídeo em *P. niruri* e rutina em *P. tenellus*. A verificação de somente um marcador químico não se constitui em parâmetro seguro de autenticidade, pois rutina é um composto de ampla distribuição no gênero *Phyllanthus*, estando presente em outras espécies como *P. stipulatus* e *P. caroliniensis*.

2.4 - CONCLUSÃO

A interpretação dos dados de LC-ITMS permitiram a identificação de 20 compostos químicos entre flavonóis, flavonas, flavanonas e taninos hidrolisáveis enriquecendo sobremaneira os dados fitoquímicos do gênero *Phyllanthus* presentes na literatura fitoquímica. Nesse capítulo, ressalta-se porém, que os dados de interpretação não foram explicados detalhadamente para todos os compostos, pois os mesmos estão abordados no capítulo 3 que discute os resultados obtidos

utilizando analisador QqToF. A identificação química desses marcadores permitiu elaborar uma abordagem distinta para verificar a autenticidade vegetal de amostras comerciais de *Phyllanthus* adquiridas em várias localidades do Brasil. A presença de marcadores químicos específicos de *P. tenellus* revelou que a maioria das amostras comerciais pertenciam a essa espécie e não à espécie *P. niruri* como descrita em especificações do rótulo. Também ressalta-se que 2 amostras não apresentaram perfil semelhante a nenhuma das amostras analisadas, constituindo-se provavelmente em amostras adulteradas.

CAPÍTULO 3

3 - DESENVOLVIMENTO MULTIVARIADO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO E ESTUDO ESTATÍSTICO PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Phyllanthus*.

3.1 - INTRODUÇÃO

A redução de custos operacionais e humanos, bem como, a diminuição do consumo de solventes são temas vigentes em cromatografia líquida. Os avanços tecnológicos das últimas décadas como o desenvolvimento de partículas sub-2 μ m e o advento de sistemas UHPLC permitiram o desenvolvimento de métodos cromatográficos rápidos com alto poder de resolução e eficiência cromatográfica.

A abordagem empregada para o desenvolvimento de métodos cromatográficos geralmente consiste em alterações univariadas das condições cromatográficas, o que demanda muito tempo, conduz a métodos com baixa seletividade e/ou eficiência e não provê entendimento das interações entre as variáveis. Nesse sentido, a utilização do UHPLC aliado ao planejamento experimental com abordagem envolvendo alteração multivariada, permitem o desenvolvimento de métodos com número mínimo de experimentos chaves em tempo reduzido, fornecendo métodos de alta eficiência mesmo para matrizes complexas como extratos de plantas.

Como abordado na seção 2.1, o uso de perfis cromatográficos são empregados para verificar a autenticidade vegetal e classificação química de espécies. Análises por LC-MS de extratos vegetais geram muitas informações em vista da grande complexidade de sua matriz. Essas informações são mais rápida e amplamente compreendidas quando se utilizam ferramentas estatísticas de análise multivariada. Essas ferramentas propiciam o reconhecimento de padrões ao considerar as informações realmente relevantes dos diferentes grupos de amostras, indicando os compostos que diferenciam as espécies vegetais.

Assim, esse capítulo aborda o desenvolvimento do método de perfil cromatográfico usando planejamento experimental de forma rápida e totalmente

automatizada, bem como, a análise estatística multivariada dos dados obtidos por UHPLC-QqToF, de modo a verificar quais são os metabólitos secundários das 6 espécies de *Phyllanthus* estudadas que diferenciam as espécies.

3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 - Material Vegetal e Extração

Nesse trabalho as espécies vegetais utilizadas foram: *P. niruri* L., *P. tenellus* Roxb., *P. urinaria* L., *P. caroliniensis* Walt., *P. amarus* Schum. & Thonn. e *P. stipulatus* (Raf.) Webster. As amostras vegetais foram fornecidas pelo CPQBA-UNICAMP conforme seção 2.2.1. O processo extrativo é o mesmo descrito na seção 2.2.2.

3.2.2 - Desenvolvimento de Perfil Cromatográfico por UHPLC utilizando planejamento experimental “Quality by design”

O sistema de UHPLC utilizado foi Waters Acquity UPLC® H-Class equipado com gerenciador de colunas que permite a utilização de até 8 colunas em paralelo, e válvula seletora de solventes instalada na parte interna da bomba quaternária que possibilita a utilização de até seis soluções com pH's diferentes. O sistema cromatográfico e o *software* de controle de sistema Empower 3™ possui integração com o programa estatístico Fusion AE™ (S-Matrix Corporation, Eureka-CA) responsável pela elaboração do planejamento experimental com abordagem por "Quality by Design" para o desenvolvimento de métodos em cromatografia líquida.

Extrato etanólico de *P. niruri* foi utilizado para os experimentos. O estudo foi dividido em duas etapas, triagem e otimização. Na etapa de triagem avaliou-se a influência de diferentes colunas, pH da fase móvel, tempo inicial isocrático, modificadores orgânicos e tempo de gradiente. Já na etapa de otimização foi realizada a variação da temperatura, vazão, % final de B e faixa estreita de pH. A TABELA 3.1 descreve os parâmetros avaliados na etapa de triagem e otimização para a separação do extrato etanólico de *P. niruri*.

TABELA 3.1 - Condições avaliadas nas etapas de triagem e otimização.

Condições	Triagem	Otimização
Colunas Acquity UPLC™ (1,7 µm, 5 x 0,21 cm)	CSH fenil-hexil, HSS C ₁₈ , HSS T3 e HSS PFP	CSH fenil-hexil, HSS T3
pH's	2,1; 4,5 e 6,5	2,1; 2,3 e 2,5
Tempo de gradiente	5-10	7,5
%B inicial	5	5
%B final	90	65-95
Modificador Orgânico	acetonitrila e metanol	metanol
Temperatura do forno (°C)	40	35, 40, 45 e 50
Vazão (mL/min)	0,5	0,35; 0,4; 0,5 e 0,6
Volume de Injeção (µL)	2,0	2,0
Comprimento de onda (µm)	254	254

A etapa de triagem foi realizada durante um total de 13 horas e 44 injeções. Já a etapa de otimização foi realizada levando em consideração a condição cromatográfica indicada no estudo de triagem, durando 12 horas e 51 condições cromatográficas.

Para definição da melhor condição cromatográfica, superfícies de respostas foram delineadas tanto para o experimento de triagem quanto para a etapa de otimização. Em ambos, o parâmetro cromatográfico escolhido como resposta foi o máximo número de bandas.

3.2.3 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

O sistema de LC (Shimadzu Kioto, Japão) consiste em duas bombas quaternárias LC-30AD, ambas equipadas com unidade de gradiente de baixa pressão, autoinjeter SIL-30AC com alça de amostragem de 500 µL, dois degaseificadores DGU-20A_{SR}, forno CTO-20AC e controladora CBM 20A.

As análises das 6 espécies de *Phyllanthus* foram realizadas utilizando coluna Waters Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm, 10 x 0,21 cm). O detector de DAD (SPD-M30A) fez aquisição dos cromatogramas de 190 nm até 500 nm. As fases

móveis utilizadas foram: solvente A - solução de ácido fórmico pH 2,1 e B – metanol. Perfil do gradiente: 0 - 1,34 min, 5% B; 1,34 - 14,5 min, 5 - 60,9% B com vazão de 0,35 mL.min⁻¹. A coluna foi limpa com 95% de B por 5 minutos, depois retornou às condições iniciais e foi recondicionada por 5 min. Foram injetados 2 µL de extrato a 1 mg.mL⁻¹, solubilizados em água/etanol (70:30, v/v).

O sistema de LC foi acoplado ao espectrômetro de massas QqToF Impact HD (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) equipado com fonte de ionização ESI.

Foram realizados experimentos de íons totais e de íons produtos (auto-MS/MS) nos dois modos de ionização em uma faixa de massas de 80 a 1300. As condições da fonte de ionização foram: nebulizador 1,7 bar, vazão do gás de secagem 9,3 L/min, temperatura de secagem 200 °C, tensão do *End Plate* e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente. Foram 5 experimentos de íons produtos em ambos os modos de ionização variando a energia de fragmentação. As energias foram 20, 30, 40, 50 e 60 eV.

Em complemento aos experimentos por UHPLC-QqToF, considerou-se também para elucidação estrutural os dados obtidos no sistema HPLC-ITMS descrito na seção 2.2.3.

3.2.4 - Análise Multivariada dos Dados de LC-MS

O conjunto de dados iniciais foi gerado a partir da análise por UHPLC-QqToF-MS no modo negativo de ionização das 6 espécies de *Phyllanthus* descritas na seção 3.2.1. O extrato de cada espécie foi preparado em triplicata com triplicata de injeção, sendo o montante final de análises de 54.

O tratamento prévio dos dados de LC-MS e a análise multivariada empregando o modelo de análise de componentes principais (PCA) foram realizados pelo software ProfileAnalysis 2.1 (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha).

3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 - Planejamento Experimental no Desenvolvimento de Métodos Cromatográficos

A abordagem "Quality by Design" envolve duas etapas, triagem e otimização. Na etapa de triagem as variáveis cromatográficas avaliadas foram tipo de coluna, pH e modificador orgânico, pois esses fatores influenciam mais fortemente a seletividade cromatográfica para compostos ionizáveis⁹⁶. As colunas avaliadas apresentavam comportamentos de hidrofobicidade e seletividade distintos, no intuito de obter o máximo de ortogonalidade entre as condições cromatográficas. As colunas selecionadas apresentavam fases estacionárias diferentes, sendo duas colunas C₁₈, com características de seletividade distintas, uma fenil-hexil e outra pentafluorfenil⁹⁷. Nessa etapa também se explorou faixas amplas de pH, bem como, a influência dos modificadores orgânicos acetonitrila e metanol. Na etapa de triagem também alterou-se o tempo do gradiente sem alterar as proporções iniciais e finais dos modificadores orgânicos, alterando conseqüentemente a inclinação do gradiente. A inclinação do gradiente está relacionada com o fator de retenção (k^*) e o aumento desse parâmetro causa aumento inicial da resolução cromatográfica, no entanto, quando se excede o valor ideal, as bandas começam a se alargar diminuindo a resolução. O fator de retenção (k^*) é normalmente um dos primeiros parâmetros a ser ajustado, por isso a inclinação do gradiente foi abordada na etapa de triagem.

Após os ensaios de triagem, superfícies de respostas foram delineadas, de modo a verificar, quais variáveis cromatográficas mais impactaram na separação cromatográfica (FIGURA 3.1). Observou-se melhor separação em pH menor e tempo de gradiente próximo a 7 minutos. A melhor separação cromatográfica foi alcançada em valores de pH inferiores devido a natureza ácida dos compostos presentes no extratos. A maioria dos compostos são flavonoides e taninos (seção 3.3.3) os quais em menores pH encontram-se protonados e conseqüentemente apresentam maior retenção.

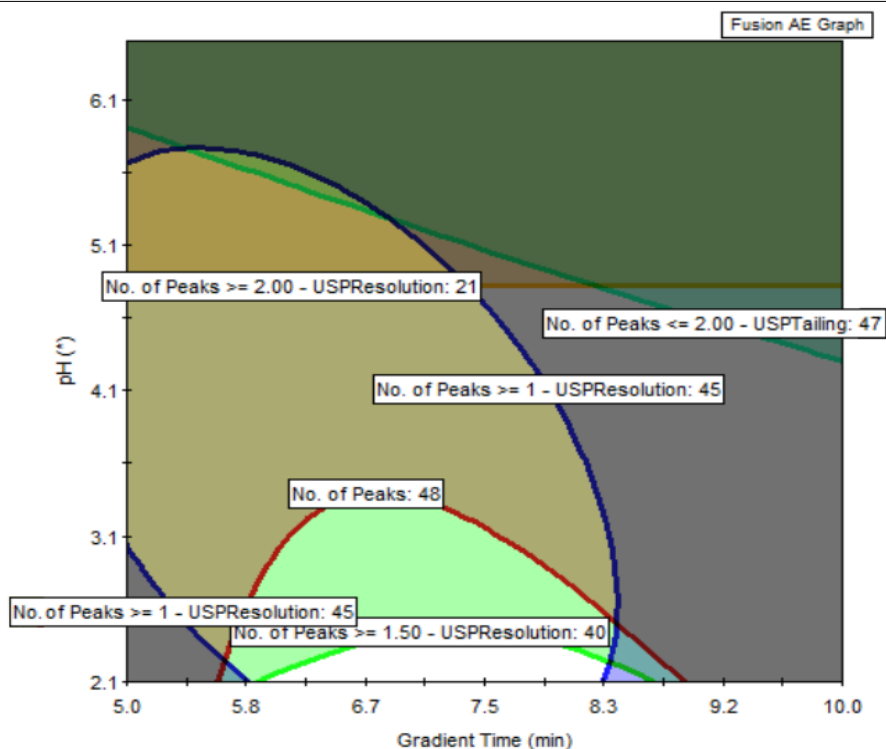


FIGURA 3.1 - Superfície de resposta obtida na etapa de triagem.

A partir dos resultados da triagem, as condições dos ensaios de otimização foram selecionadas. Nesta etapa foram avaliados os efeitos de temperatura e vazão. Avaliou-se também a influência do pH em uma faixa mais estreita e de duas colunas que demonstraram melhor seletividade na etapa de triagem, i.e. Acquity UPLC™ CSH fenil-hexil e HSS T3.

Na etapa de otimização observou-se grande influência da vazão e da temperatura (FIGURA 3.2). A alteração da temperatura influencia dois parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k) e seletividade (α). Temperaturas mais elevadas resultam em menores tempos de retenção, mas alteram também a seletividade especialmente para compostos ionizáveis e mais polares como os presentes nos extratos avaliados. Essa alteração pode resultar em ganho ou perda de resolução, a qual só pode ser verificada experimentalmente. O aumento da temperatura também resulta em menor viscosidade da fase móvel e consequentemente picos mais finos o que também contribui para maior resolução cromatográfica⁹⁸. Embora a maior quantidade de bandas cromatográficas fora verificado em vazão de 0,35 mL/min, nota-se que até vazões de aproximadamente 0,5 mL/min foram encontrados 20 bandas cromatográficas com resolução superior a

2. Isso é explicado pela menor influência da velocidade linear da fase móvel sobre a eficiência cromatográfica em colunas com tamanho de partículas menor, como as utilizadas nesse trabalho (1,7 µm). A equação de Van Deemter⁹⁹ descreve a relação entre velocidade linear (vazão) e altura de pratos teóricos (Equação 1).

$$H = A d_p + \frac{B D_M}{u} + \frac{C d_p^2 u}{D_M} \quad (1)$$

onde: H = altura de prato teórico; u = velocidade linear da fase móvel (mm/s); d_p = tamanho de partícula; D_M = coeficiente de difusão do analito; e A, B e C são constantes.

Ao diminuir o tamanho da partícula reduz-se o efeito de transferência de massa (termo C) e portanto possibilita a utilização de maiores vazões sem afetar a eficiência cromatográfica¹⁰⁰. Por esse motivo se utilizaram as vazões (velocidade linear) de 0,35 mL/min (3,51 mm/s), 0,40 mL/min (4,01 mm/s), 0,5 mL/min (5,02 mm/s) e 0,6 ml/min (6,02 mm/s).

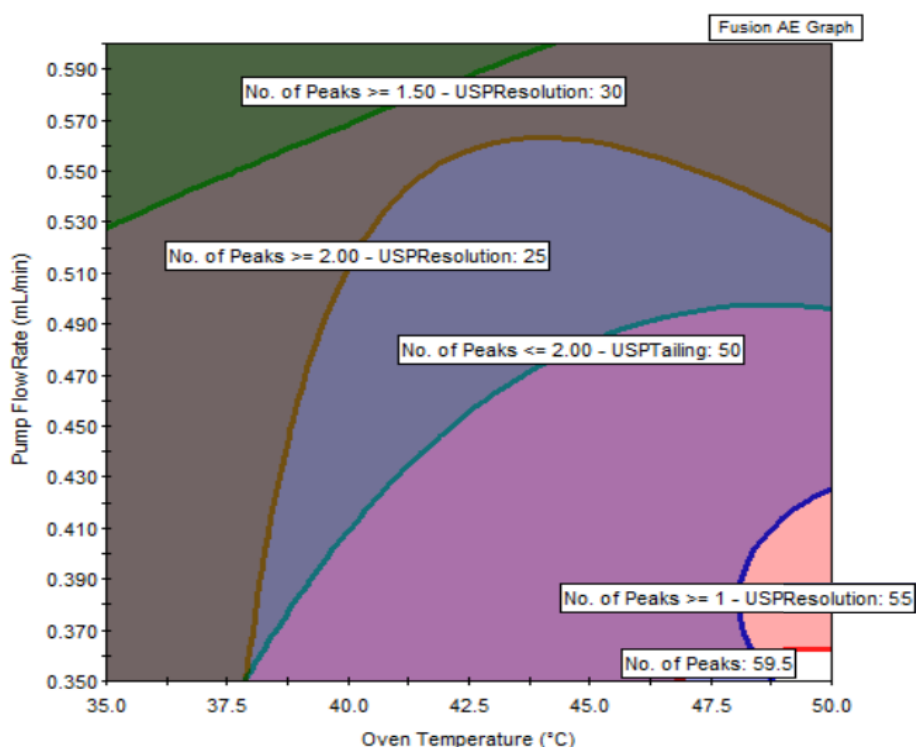


FIGURA 3.2 - Superfície de resposta obtida na etapa de otimização.

As superfícies de resposta ilustradas na FIGURA 3.3 demonstram o maior número de bandas cromatográficas em % final de B próximo a 70%, em temperatura próximo a 50 °C e em vazões menores (FIGURA 3.3). A melhor condição cromatográfica proposta pelo software está descrita na Tabela 3.2.

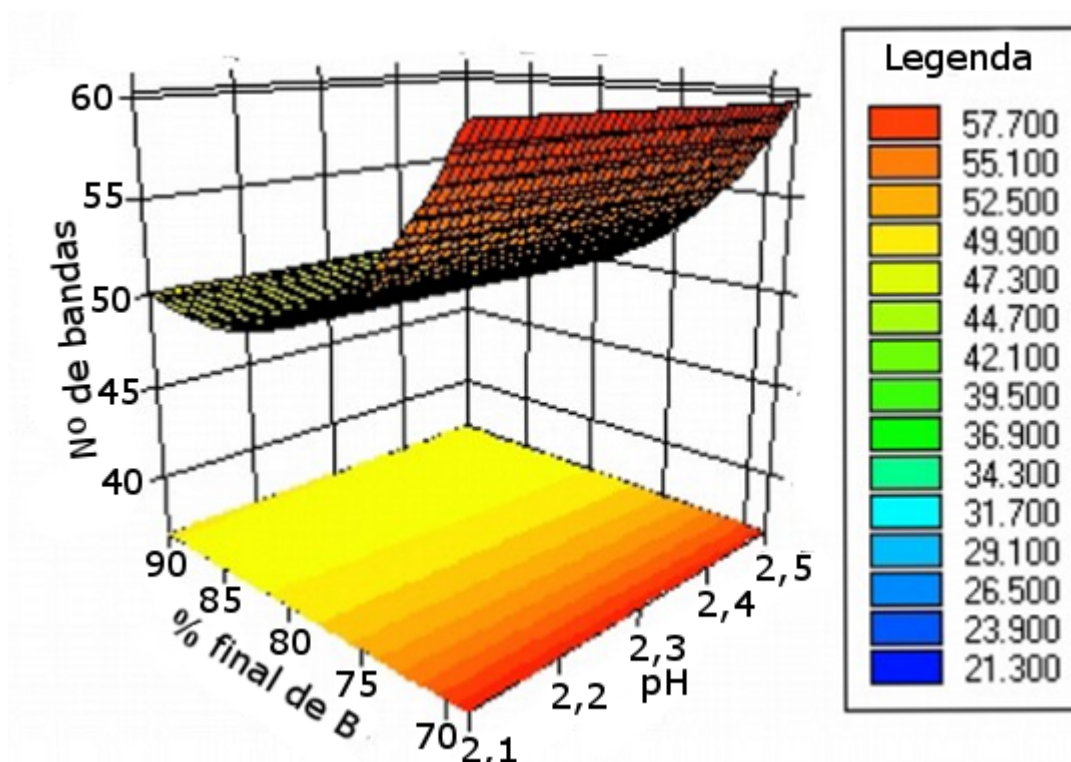


FIGURA 3.3 - Superfície de resposta obtida na etapa de otimização.

TABELA 3.2 - Melhor condição cromatográfica proposta pelo software Fusion AE™

Condição Cromatográfica	Melhor resposta
Vazão (mL/min)	0,35
% Final de metanol	68,8
Temperatura do forno (°C)	50
pH	2,1
Coluna	Acquity HSS T3

Os experimentos de triagem e otimização foram realizados com colunas de 5 cm de comprimento no intuito de diminuir o gasto de solvente e o tempo de desenvolvimento. No entanto, para aplicações complexas, como a de produtos de origem vegetal, é conveniente escalonar a condição final obtida para colunas com

maior eficiência cromatográfica, ou seja, maior número de pratos teóricos (N). Como N é diretamente proporcional ao comprimento da coluna (L) e inversamente proporcional ao diâmetro da partícula (dp), haverá incremento de N quando ocorrer aumento na relação L/dp. Logo substituiu-se a coluna de 5 cm de comprimento, L/dp próxima a 30.000, por coluna de relação L/dp igual a 58.800 (100 x 2,1 mm; 1,8 μ m).

A condição cromatográfica final desenvolvida foi capaz de separar, aproximadamente, 100 bandas cromatográficas com 14,5 minutos de análise (FIGURA 3.4).

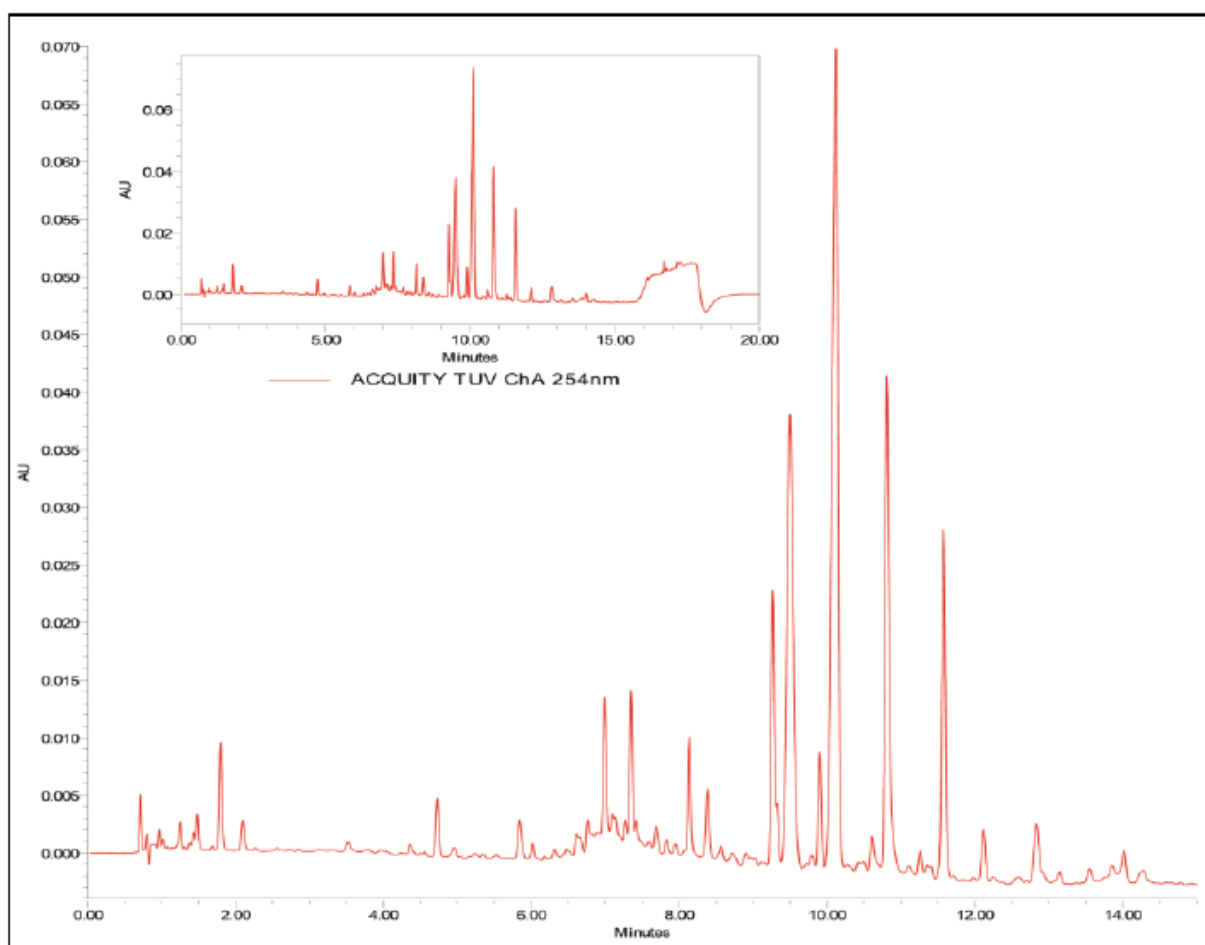


FIGURA 3.4 - Perfil cromatográfico do extrato etanólico de *P. niruri* (Acquity HSS T3 (100 x 2.1 mm; 1.8 μ m); A: Ácido fórmico pH 2.1, B: Metanol; eluição gradiente: 0 - 1,34min (5% B); 1,34 - 14,5 min (5-60,9% B).

O planejamento experimental utilizando a abordagem “Quality by Design” facilita sobremaneira o desenvolvimento de métodos cromatográficos, proporcionando reduções significativas no tempo de desenvolvimento e na quantidade de solvente orgânico utilizado. A diminuição no tempo de

desenvolvimento de métodos impacta diretamente no tempo de resposta e no custo operacional. Ao criar a superfície de resposta, que relaciona todas os fatores definidos no delineamento do experimento, há um ganho expressivo de eficiência cromatográfica com a avaliação da robustez na condição final obtida.

3.3.2 - Análise Multivariada dos Dados

O método cromatográfico desenvolvido por planejamento experimental foi transferido para diferente sistema de UHPLC-QqToF sem necessidade de adaptação de método, mantendo eficiência cromatográfica semelhante.

3.3.2.1 - Organização e Pré-Tratamento dos Dados

A análise estatística multivariada de dados requer a preparação prévia dos dados, como alinhamento de tempo de retenção (t_R), organização adequada do conjunto de dados em uma matriz de valores numéricos e uniformização do conjunto de dados.

O alinhamento de t_R dos cromatogramas foi realizado utilizando o algoritmo de vetor de deslocamento descrito por Podwojski *et al.*¹⁰¹. A média do desvio de t_R é calculada a partir do t_R das bandas cromatográficas candidatas a serem o mesmo composto, ou seja, que apresentam valores de t_R e m/z semelhantes.

Todo o intervalo de m/z e t_R avaliado são divididos em blocos denominados “*buckets*”. Quando o tamanho do “*bucket*” é determinado pelo operador provavelmente diversos “*buckets*” apresentarão variáveis de valor nulo para todas as amostras, uma vez que nenhum íon será encontrado em certo intervalo de t_R e m/z . Adicionalmente, poderá ocorrer que mais de um íon com m/z e t_R próximos incidam no mesmo “*bucket*” sendo posteriormente considerados na montagem do modelo estatístico como uma única variável. Com o objetivo de evitar tais desvantagens utilizou-se a opção no qual o software aplica um algoritmo de agrupamento hierárquico de modo a definir o tamanho ideal dos “*buckets*” baseando-se nos sinais de MS selecionados. Esses sinais são selecionados pela ferramenta denominada “*find molecular features*” (FMF) que verifica as

características moleculares de cada sinal de MS, a saber massa exata, distância entre os isótopos e t_R . Dessa forma o tamanho da matriz será significativamente menor, pois não haverá variáveis de valor nulo para todas as amostras, uma vez que os “*buckets*” são montados ao redor de cada sinal de MS. O tamanho do “*bucket*” calculado foi então de 1,57 minutos e 18,87 mDa.

Os parâmetros de FMF foram: limiar de relação sinal/ruído, limiar de coeficiente de relação e largura mínima do sinal de massas. O coeficiente de relação refere-se a correlação temporal entre dois isótopos em determinado tempo de retenção, ou seja, se hipoteticamente o isótopo 1 (m/z 351) é observado por 10 segundos e o isótopo 2 (m/z 352) por 8 segundos, significa que o coeficiente de correlação entre estes é de 0,8. Assim se o coeficiente de correlação calculado dos isótopos for maior que o limiar estabelecido, então o íon é considerado. Já a largura mínima do sinal de massas estabelece quantos espectros consecutivos o mesmo sinal de MS (m/z) deve aparecer para ser considerado. Os parâmetros de FMF estão descritos na TABELA 3.3.

TABELA 3.3 - Parâmetros que controlam a seleção dos íons por FMF

Parâmetro	Valor
Limiar de S/N	5
Limiar de Coeficiente de correlação	0,7
Largura mínima do sinal de MS	10 espectros

Legenda: S/N - relação sinal/ruído

Muitas vezes, em análise exploratória faz-se necessário um pré-processamento das variáveis (escalonamento). O escalonamento mais comumente realizado é o autoescalonamento, o qual consiste em centrar os dados na média e dividi-los, um a um, pelo desvio-padrão, de forma que todas as variáveis tenham o mesmo peso. Os dados tornam-se assim adimensionais, ou seja, compostos de alta e baixa intensidade apresentam a mesma influência. Esse tipo de escalonamento foi utilizado, no entanto, não resultou na separação das amostras em grupos bem definidos após montagem do modelo de PCA. Outra opção seria o não escalonamento, no entanto dessa forma os compostos de maior intensidade teriam muito peso na montagem do modelo estatístico, desprezando aqueles compostos de

menor intensidade. Foi utilizado, assim, o escalonamento denominado Pareto, no qual os dados também são centrados na média, no entanto, cada variável é dividida pela raiz quadrada do desvio-padrão. Em Pareto a magnitude dos dados é reduzida mas não removida completamente. Essa abordagem é apropriada para dados nos quais os sinais mais intensos são mais confiáveis e menos suscetíveis a ruído como os dados de LC-MS ¹⁰².

3.3.2.2 - Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é um modelo de projeção matemática elaborado para extrair, visualizar e classificar a variação em uma matriz de dados. O objetivo da PCA é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados, mantendo simultaneamente as informações presentes nos dados. PCA é um meio para filtrar os desvios mais significativos de um conjunto de dados identificando apenas as variáveis mais influentes ¹⁰³.

A matriz de dados numéricos consiste em m colunas de variáveis (387 "buckets") e n linhas de observações (54 corridas cromatográficas). Cada corrida cromatográfica pode ser representada graficamente em um espaço m -dimensional de variáveis. Isto resulta em um modelo espacial, no qual cada variável é uma coordenada. No entanto, não é possível visualizar os dados em um espaço m -dimensional (387 dimensões), assim a PCA calcula e classifica as coordenadas conforme a influência de cada variável no conjunto de dados. Essas novas coordenadas são denominadas componentes principais (PC's). O PC1 descreve a maior variação no conjunto de dados. PC2 descreve a segunda maior variância e é ortogonal a PC1 e assim por diante.

A partir da matriz de dados numéricos foi montado o modelo de PCA utilizando nível de confiança de 95%. Afim de verificar a significância do modelo gerado aplicou-se a validação cruzada que visa a correção dos limites do nível de confiança de modo a estabilizar o modelo. A validação cruzada é realizada retirando-se uma ou mais amostras da matriz original seguido da reconstrução do modelo. Em seguida usa-se o novo modelo para prever os dados removidos (\hat{c}_i) e então calcula-se o erro da previsão ($c_i - \hat{c}_i$). Calcula-se então o desvio padrão da soma dos

quadrados dos erros da precisão $\left(\sqrt{\frac{\sum_i (c_i - \hat{c}_i)^2}{n}} \right)^{104}$. O modelo foi recalculado usando validação cruzada completa que consiste em deixar uma amostra de fora por vez e calcular o erro para cada dado (método “*leave-one-out*”).

A PCA tem a capacidade de encontrar discrepâncias, ou seja, amostras que são extremos ou que não se enquadram dentro do modelo de PCA. Tais discrepâncias apresentam grande influência de puxar para si o modelo, podendo consumir um PC para explicar essa amostra¹⁰⁵. A verificação da presença de amostras discrepantes foi realizada avaliando o gráfico de influências (FIGURA 3.5).

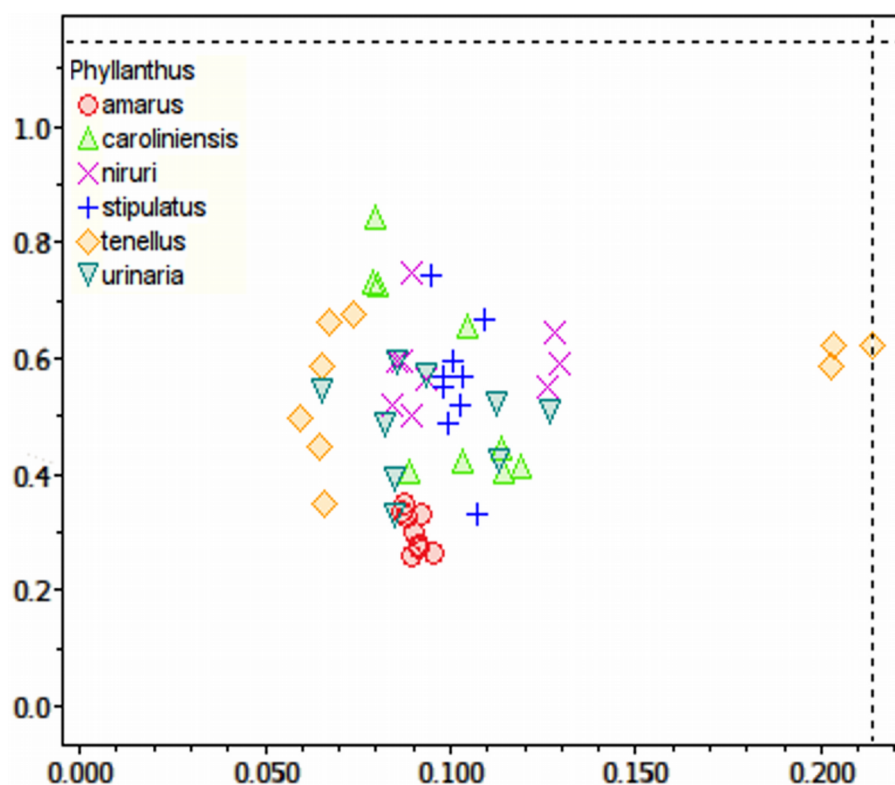


FIGURA 3.5 - Gráfico de influências do modelo de PCA para extratos de *Phyllanthus* com todas as amostras.

O eixo vertical é a medida da distância que uma análise está do espaço do modelo (D_m = distância do modelo), enquanto que o eixo horizontal é a medida de “*leverage*”, ou seja, a distância que a análise está do centro do modelo após ser projetada no espaço do modelo (D_c = distância do centro) (FIGURA 3.6).

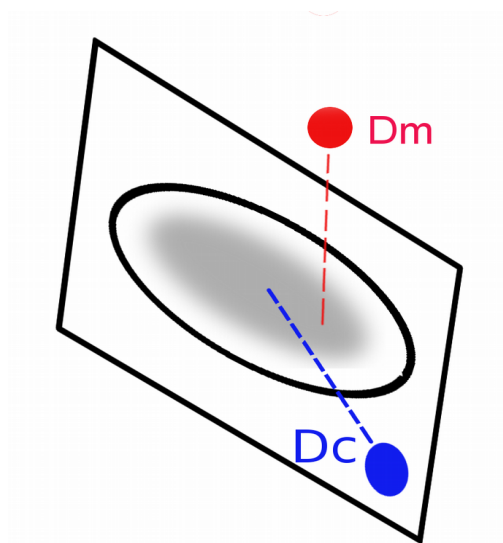


FIGURA 3.6 - Explicação dos termos distância do modelo (D_m) e distância do centro (D_c).

A avaliação do gráfico de influências (FIGURA 3.6) revelou que uma das replicatas de extração de *P. tenellus* apresentou alto grau de "leverage" causando deformação do modelo de PCA, dessa forma as replicatas de injeção dessa extração foram desconsideradas. O novo gráfico de influências demonstra que todas as amostras estão dentro da região de tolerância do modelo de PCA (FIGURA 3.7).

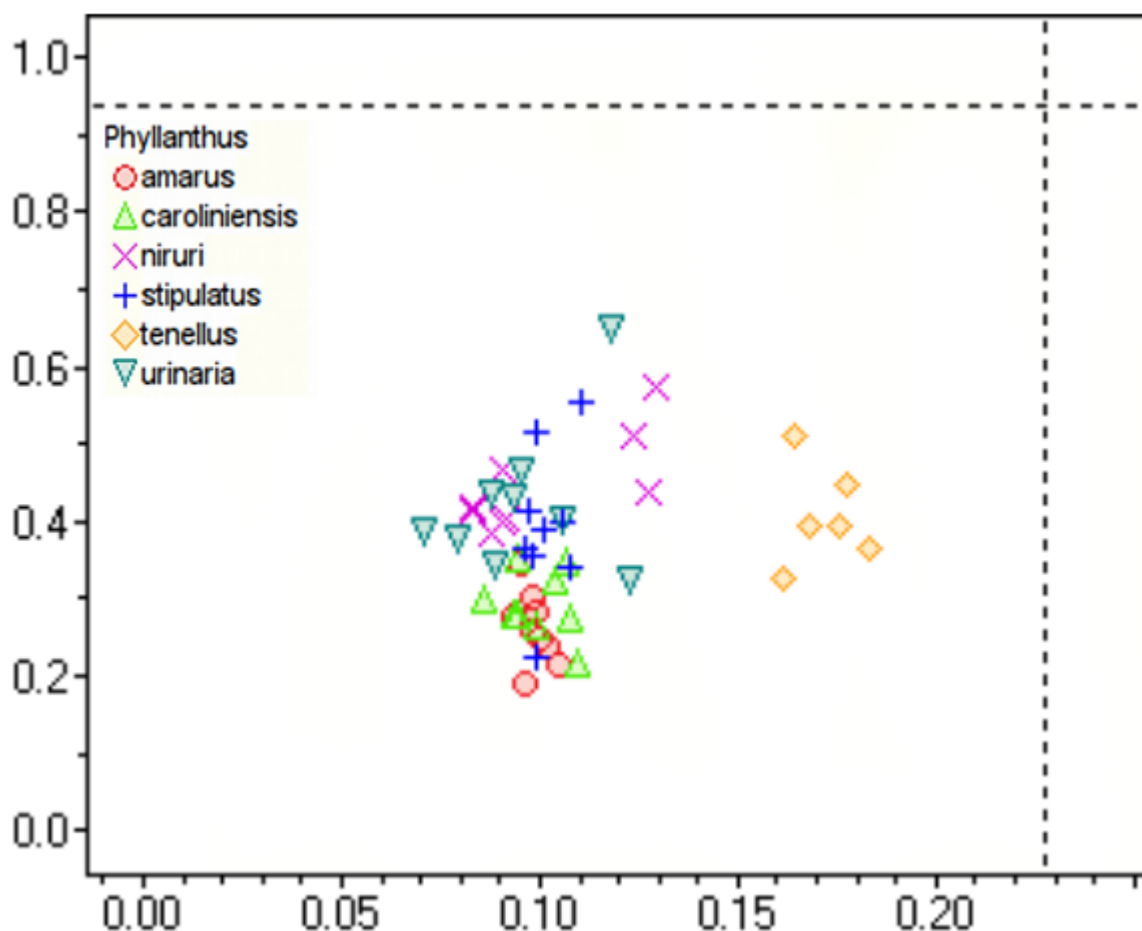


FIGURA 3.7: Gráfico de influências do modelo de PCA para extratos de *Phyllanthus* após retirada de amostras discrepantes.

Após a validação do modelo e retirada das amostras discrepantes faz-se necessário estabelecer a quantidade de componentes principais (PC's) suficientes para descrever a maior variação do conjunto de dados. Nesse trabalho o gráfico de declividade foi utilizado para identificar o número ideal de componentes. O gráfico de declividade é obtido traçando-se a porcentagem de variação explicada por componente extraído, sendo o perfil da curva resultante usada para determinar o ponto de corte. A FIGURA 3.8 demonstra que partindo do primeiro componente a curva inclina-se fortemente para baixo inicialmente e tornando-se aos poucos uma linha aproximadamente horizontal. O ponto anterior ao início da quase horizontalidade é o último componente a ser considerado ¹⁰⁶. Foram assim selecionados 5 PC's, que correspondem a 84,7% da variação total dos dados. A FIGURA 3.5 demonstra que a PC1 é responsável por 32,5% da variância original dos dados, já a PC2, PC3, PC4 e PC5 correspondem a 22,2, 17,5, 7,6 e 4,9%,

respectivamente. Após a PC5, a variância explicada apresenta uma diminuição pouco acentuada e, desta forma, foram escolhidas as 5 primeiras PC's.

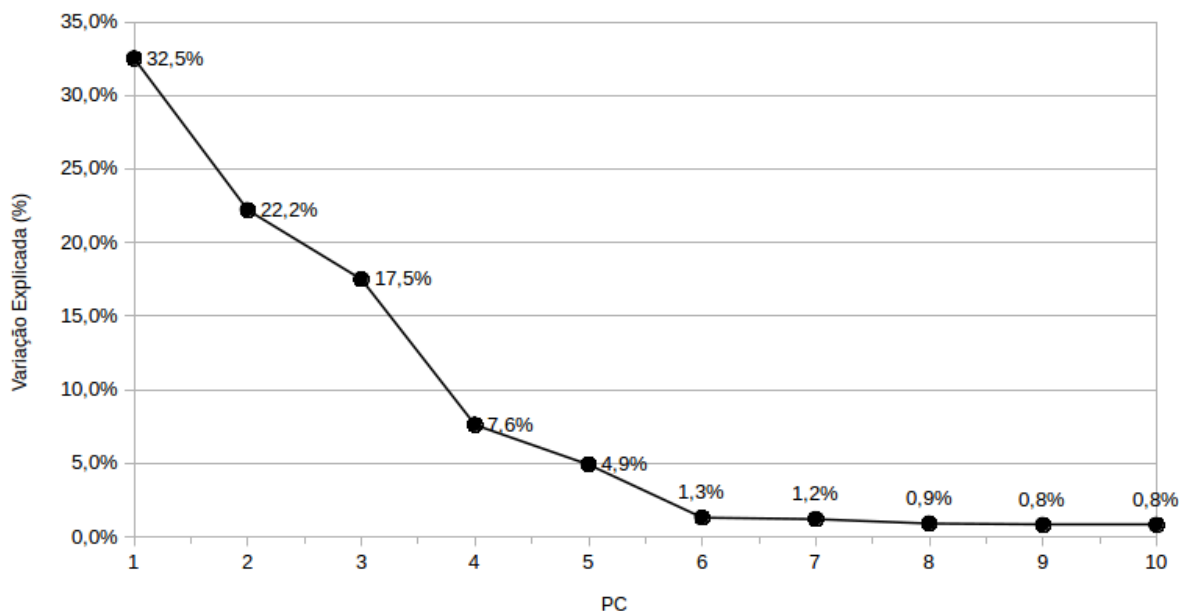


FIGURA 3.8 - Gráfico de declividade de fatores pela porcentagem de variância.

A projeção das amostras no novo sistema de eixos (PC's) é visualizada através do gráfico de "scores" (FIGURA 3.9A), no qual pode-se perceber que as amostras formam grupos, de acordo com as espécies a que pertencem. Associado a este está o gráfico de "loadings", o qual demonstra quais variáveis ("buckets") contribuem mais fortemente para a orientação do PC (FIGURA 3.9B). A escolha dos PC's que são mais interessantes para cada espécie foi realizada avaliando os gráficos de visualização de "scores". PC's com valores mais distantes de zero apresentam maior significância para determinada amostra. Assim, foram escolhidas as seguintes combinações de PC's: PC1 x PC2 (*P. niruri*), PC2 x PC3 (*P. tenellus* e *P. stipulatus*), PC3 x PC4 (*P. caroliniensis*), PC3 x PC5 (*P. amarus*) e PC4 x PC5 (*P. urinaria*) (FIGURA 3.10).

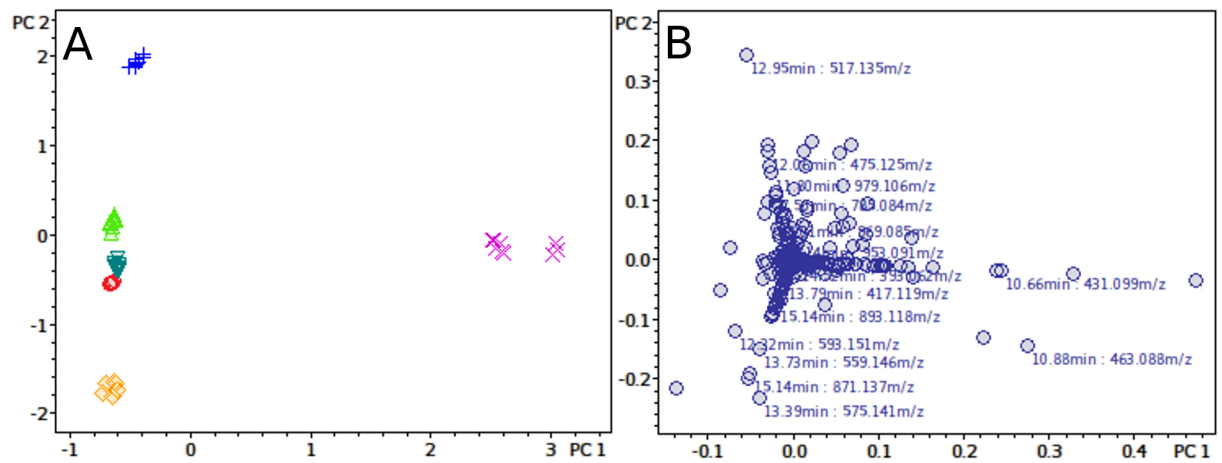


FIGURA 3.9 - Gráfico de "scores" (A) e "loadings" (B) (PC1 x PC2)

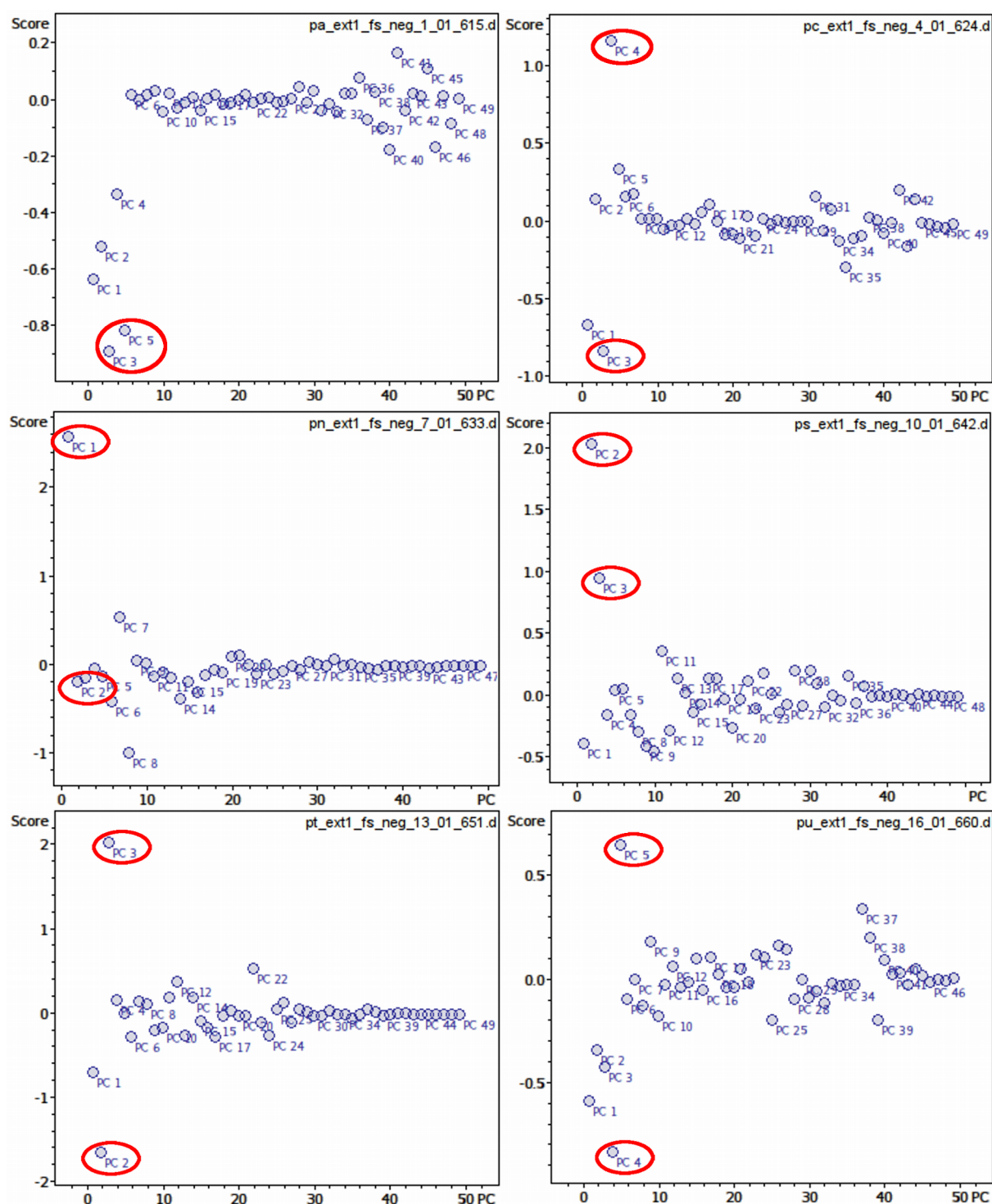


FIGURA 3.10 - Gráficos de visualização de "scores" obtidos a partir dos extratos de *Phyllanthus*.

A busca por marcadores químicos para cada espécie foi efetuada pela avaliação dos gráficos de "scores" e "loadings". A PCA separou os diferentes extratos em grupos bem definidos, no entanto para espécie *P. amarus* não foi

possível visualizar nenhum íon exclusivo ou predominante (FIGURA 3.11). Possivelmente o método cromatográfico desenvolvido a partir do extrato de *P. niruri* e aplicado para as demais espécies não se constitui um método ideal para extrato de *P. amarus*.

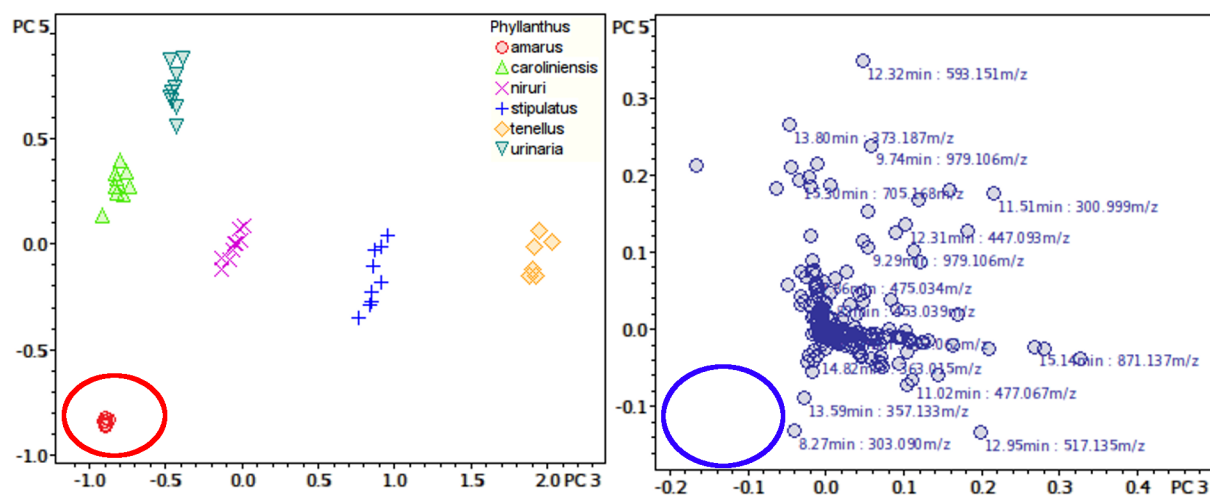


FIGURA 3.11 - Gráfico de "scores" e "loadings" (PC 3 x PC 5).

Para as outras espécies, por outro lado, foi possível verificar nos gráficos de "loadings" uma diversidade de compostos responsáveis pela diferenciação (FIGURA 3.12). Na TABELA 3.4 estão alistados os compostos envolvidos na diferenciação dos extratos.

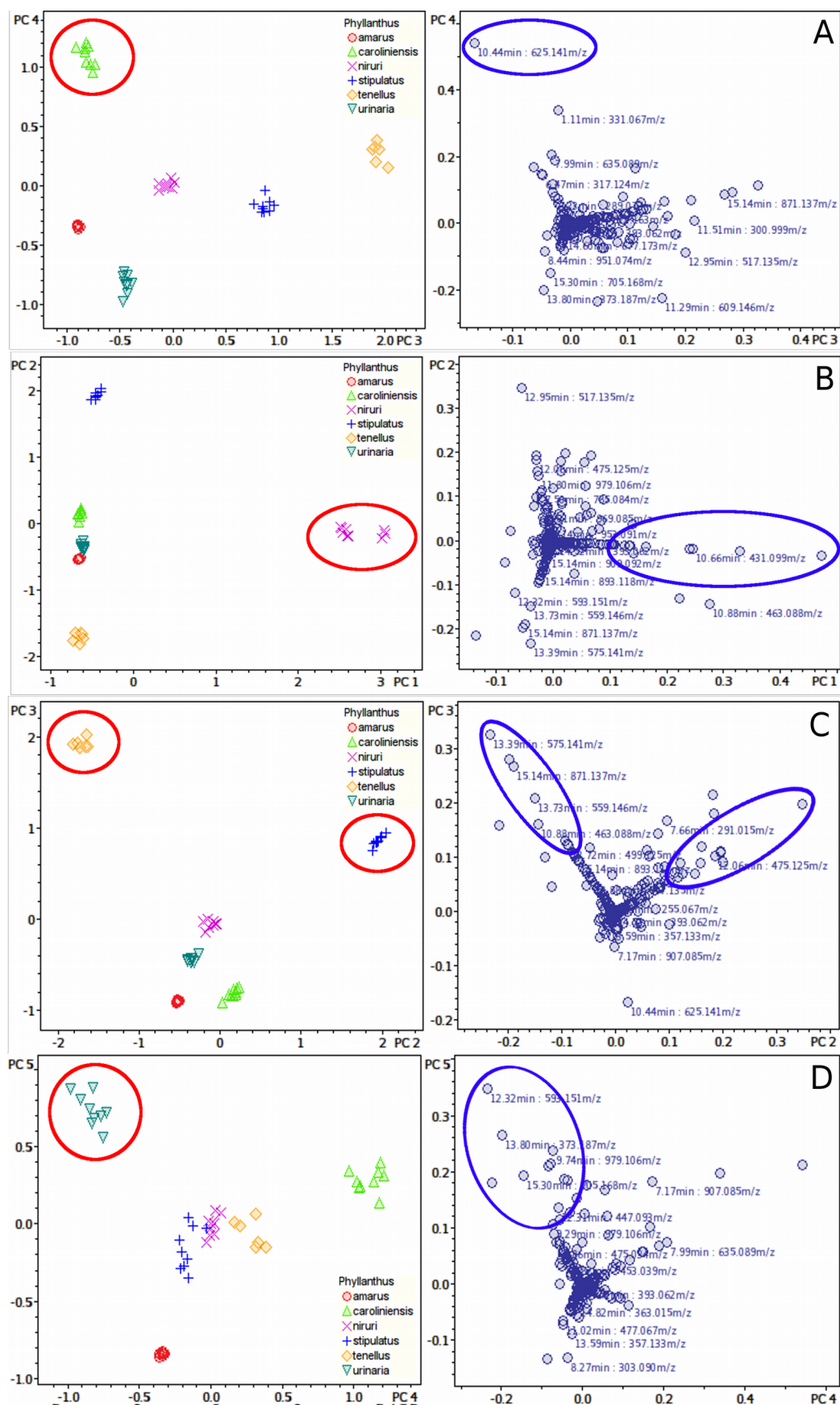


FIGURA 3.12 - Gráfico de "scores" e "loadings". A - PC3 x PC4; B - PC1 x PC2; C - PC2 x PC3; D -PC4 x PC5.

TABELA 3.4 - Relação de íons no modo negativo de ionização responsáveis pela diferenciação das espécies determinados por PCA.

Nº	t_R (min)	m/z	Form. mol.	<i>Pa</i>	<i>Pc</i>	<i>Pn</i>	<i>Ps</i>	<i>Pt</i>	<i>Pu</i>
1	6,50	337,093	C ₁₆ H ₁₈ O ₈			X			
2	7,50	785,084	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂				X		
3	9,18	953,092	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇		O	O	X		
4	9,90	433,114	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀				X		
5	9,99	447,093	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁			X			
6	10,25	593,151	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅			X			
7	10,44	625,141	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇		X				
8	10,66	431,099	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀			X			
9	10,84	577,157	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄			X			
10	10,88	463,088	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂			X		O	
11	11,20	477,067	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃				X		
12	11,29	609,146	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	O	O		O	X	O
13	11,80	979,106	C ₄₃ H ₃₂ O ₂₇				X		
14	12,06	475,125	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁				X		
15	12,31	447,093	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁			X		O	O
16	12,32	593,151	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅					O	X
17	12,95	517,135	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂				X		
18	13,37	583,109	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄			X			
19	13,39	575,141	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₄			O		X	
20	13,73	559,146	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃					X	
21	14,72	719,126	C ₃₅ H ₂₈ O ₁₇					X	
22	15,14	871,137	C ₄₂ H ₃₂ O ₂₁					X	
23	15,30	705,168	C ₃₂ H ₃₄ O ₁₈						X

Legenda: **X** significa que o íon apresenta maior intensidade na amostra assinalada, enquanto que **O** significa que o íon está presente em outras espécies em menor intensidade. Os compostos foram considerados presentes quando cumpriram todos os requisitos descritos na TABELA 3.3 (página 44) em todas as replicatas.

3.3.3 - Interpretação dos Dados de LC-MS/MS

Como observado no modelo de PCA, os perfis cromatográficos por LC-MS demonstram que os extratos das 6 espécies apresentam diferenças (FIGURA 3.13).

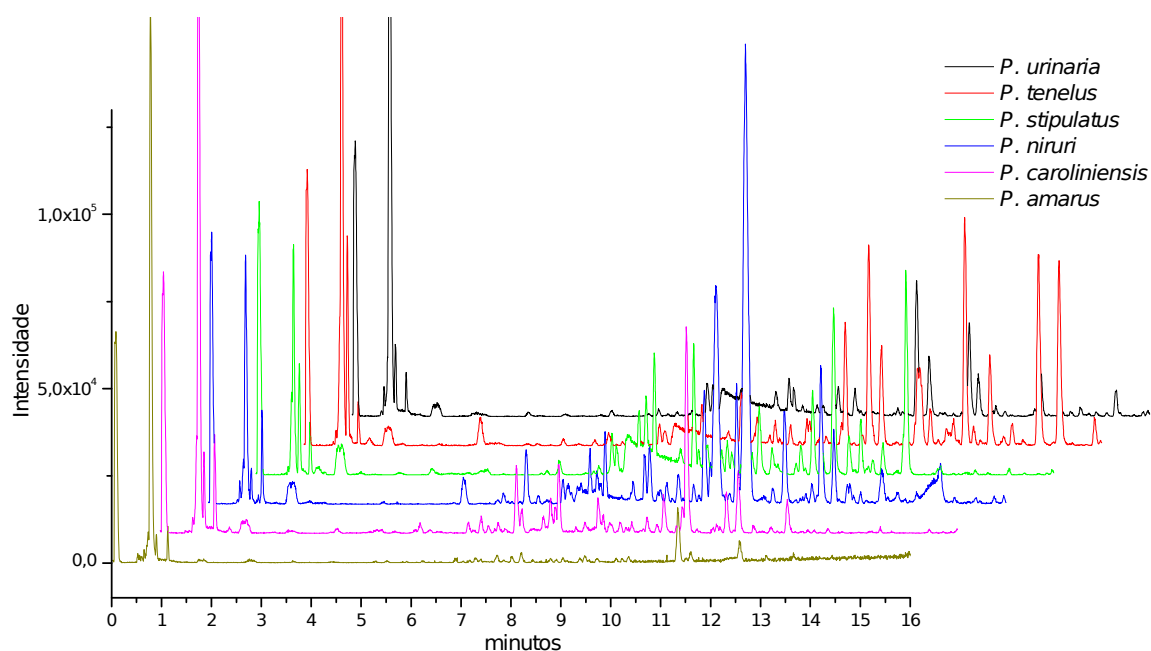


FIGURA 3.13 - Cromatogramas dos picos base dos extratos das 6 espécies de *Phyllanthus*

A diferenciação das espécies pode ser realizada por meio da identificação de marcadores químicos. Esses marcadores foram identificados como taninos e flavonoides glicosilados. Dentre os flavonoides foram encontrados flavonóis, flavonas e flavanonas com diferentes tipos glicosilação. Nos tópicos abaixo são discutidas as fragmentações de cada composto utilizando dois tipos de analisadores de massas, a saber, IT e QqToF. Todos os cromatogramas e espectros apresentados foram obtidos utilizando o analisador QqToF, salvo indicação em contrário. Espectros por IT-MS² e MS³ somente são demonstrados, quando fornecem informações adicionais úteis na caracterização dos compostos.

3.3.3.1 - Ácido 3-*p*-cumarilquínico

O composto **1** identificado como ácido 3-*p*-cumarilquínico (FIGURA 3.14) é um ácido polifenólico pertencente a subclasse de ácidos hidroxicinâmicos e foi detectado exclusivamente no extrato de *P. niruri* (FIGURA 3.15).

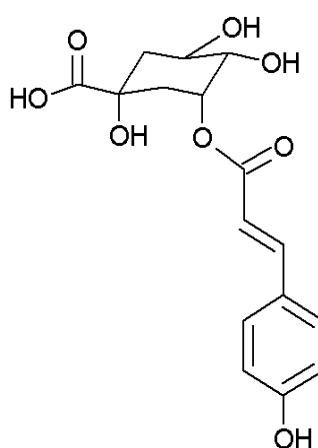


FIGURA 3.14 - Estrutura química do composto ácido *trans*-3-*p*-cumarilquínico.

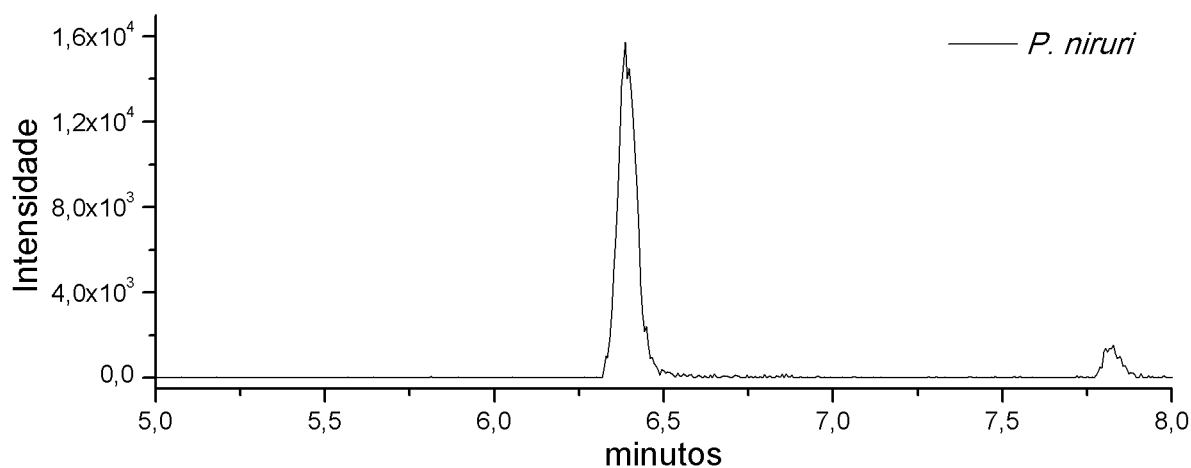


FIGURA 3.15 - Cromatograma do íon extraído de m/z 337,093 referente ao composto 1.

A identificação desse composto foi possível pela comparação dos espectros de MS/MS e UV de isômeros de ácidos *p*-cumarilquínicos reportados na literatura^{107,108}. Clifford *et. al*¹⁰⁸ realizaram um estudo sistemático de fragmentação de diversos ácidos clorogênicos e reportaram diferentes rotas de fragmentação dependendo da posição do resíduo de acila. Para ácidos 3-*p*-cumarilquínicos o íon de m/z 163 seria o pico base, o que está em acordo com espectro experimental obtido (FIGURA 3.16). Adicionalmente, Navarro-González *et. al*¹⁰⁷ conseguiram diferenciar vários ácidos clorogênicos que apresentavam isomeria geométrica com base em espectros no UV. Para os ácidos 3-*p*-cumarilquínicos *cis* e *trans* os valores de λ máximo foram de 305 e 310 nm, respectivamente. Os valores experimentais aqui obtidos corroboram com a estrutura ácido *trans*-3-*p*-cumarilquínico (FIGURA

3.17).

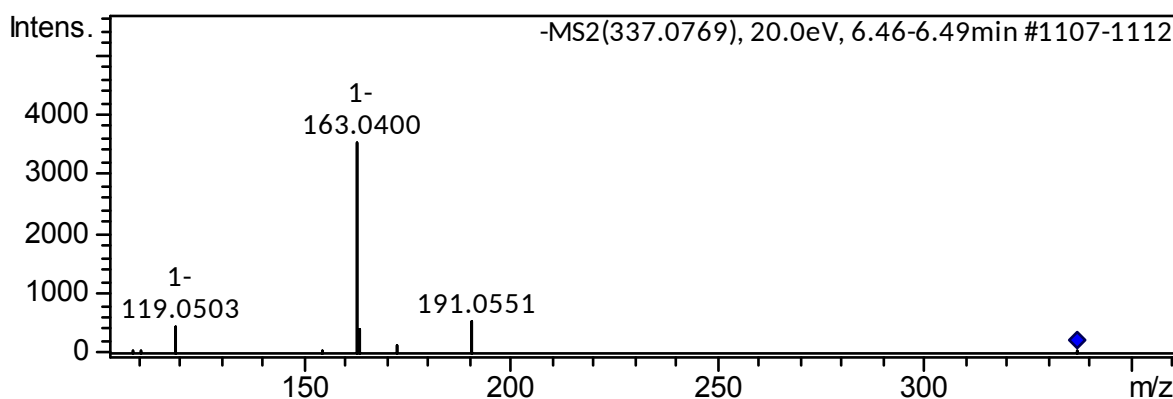


FIGURA 3.16 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 1 (ácido trans-3-p-cumarilquínico) de m/z 337,0769

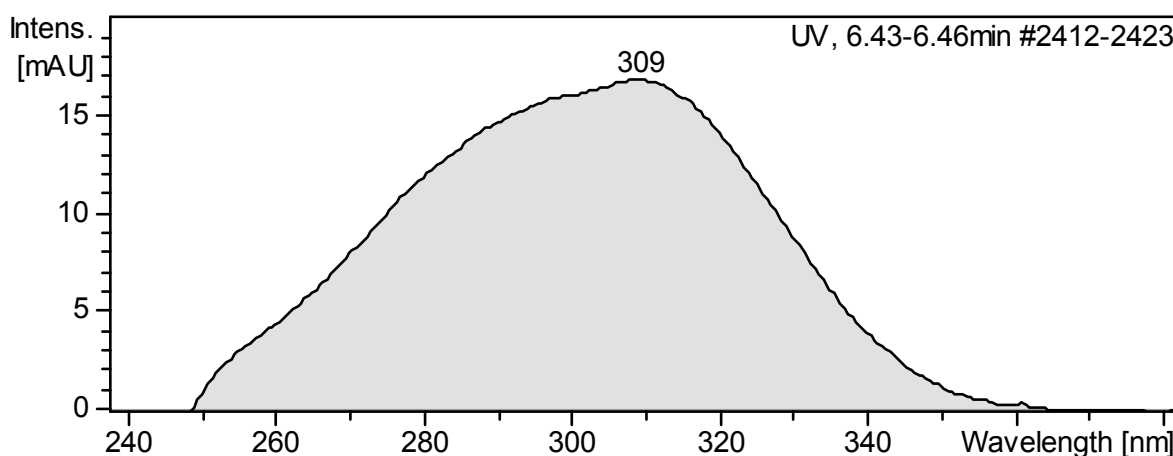
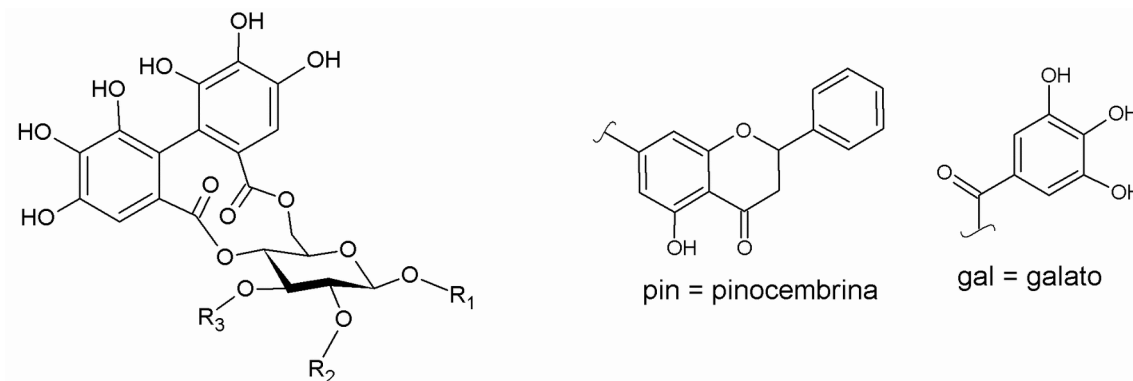


FIGURA 3.17- Espectro de UV do composto 1 (ácido trans-3-p-cumarilquínico)

3.3.3.2 - Taninos Hidrolisáveis

Diversos taninos estão presentes nos extratos das espécies estudadas⁴⁶, sendo que estes geralmente não fornecem grande poder de diferenciação, no entanto, alguns taninos foram encontrados preferencialmente em algumas espécies. Destacam-se quatro taninos (FIGURA 3.18): 1,3-digaloi-4,6-hexahidroxidifenilglucose (**2**) presente exclusivamente em *P. stipulatus* (FIGURA 3.19); ácido geraniínico¹⁰⁹ (**3**) presente em maior concentração em *P. stipulatus*, mas também presente em *P. niruri* e *P. caroliniensis* (FIGURA 3.20); pinocembrina-7-O-[4“,6“-hexahidroxidifenil]-glucose (**21**) (FIGURA 3.21) e pinocembrina-7-O-[3“-O-

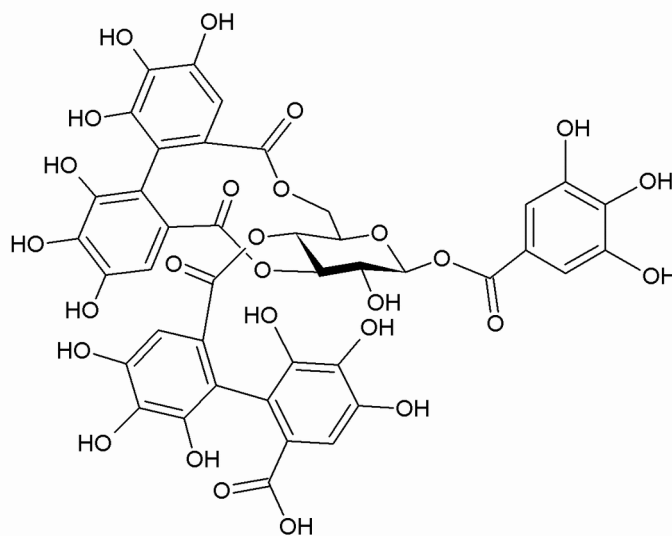
galoil-4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose (FIGURA 3.22) **(22)** identificados em *P. tenellus* e *P. urinaria* (traços) ¹¹⁰.



(2) 1,3-digaloil-4,6-hexahidroxidifenoilglucose - $R_1 = \text{gal}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{gal}$

(21) pinocembrina-7-O-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose - $R_1 = \text{pin}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$

(22) pinocembrina-7-O-[3''-O-galoil-4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose - $R_1 = \text{pin}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{gal}$



(3) ácido geraniínico

FIGURA 3.18 - Estruturas químicas de alguns taninos hidrolisáveis importantes na diferenciação das espécies

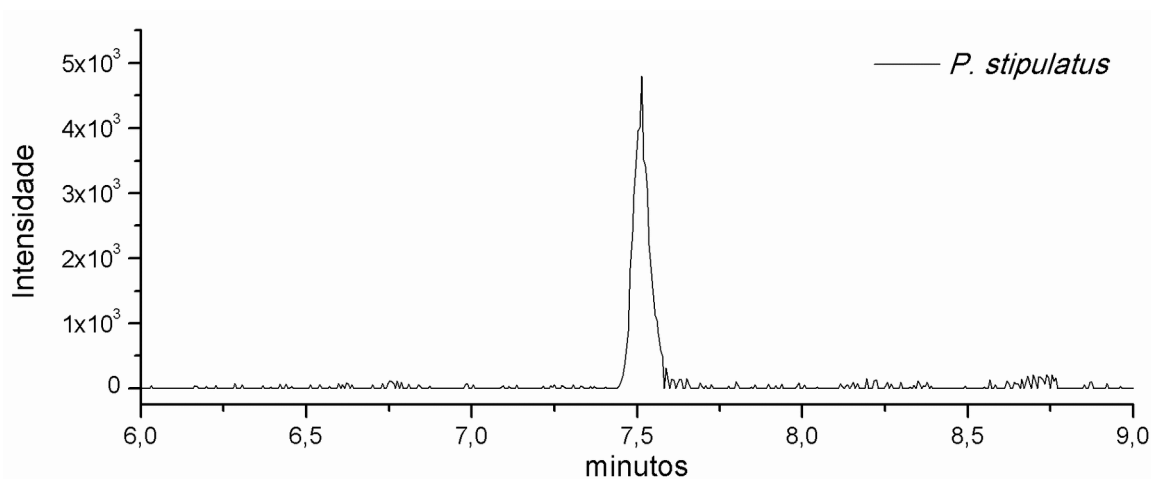


FIGURA 3.19 - Cromatograma do íon extraído de m/z 785,084 referente ao composto 2.

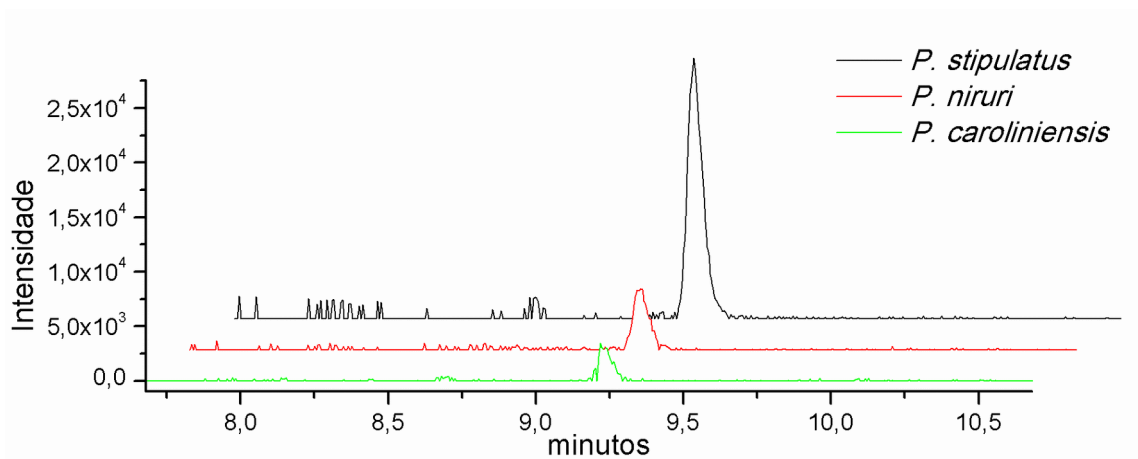


FIGURA 3.20 - Cromatograma do íon extraído de m/z 953,092 referente ao composto 3.

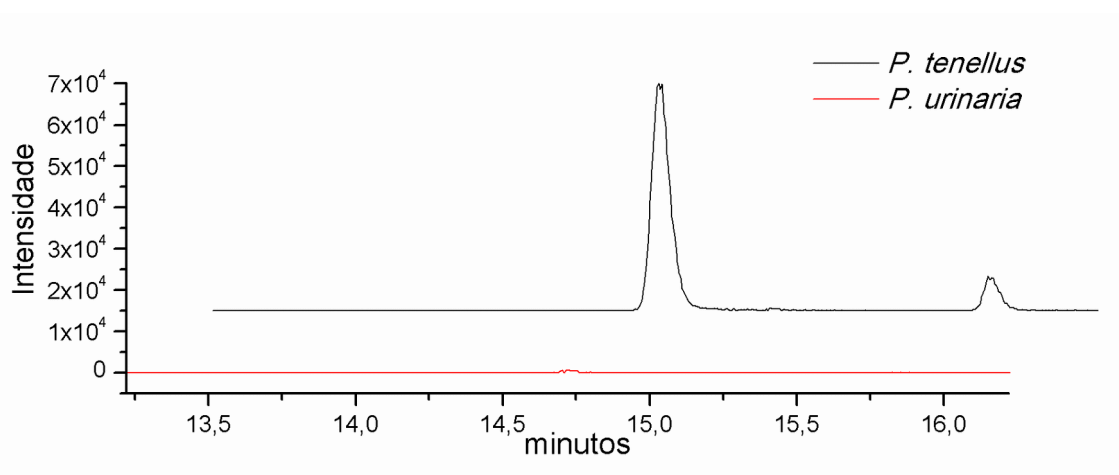


FIGURA 3.21 - Cromatograma do íon extraído de m/z 719,126 referente ao composto 21.

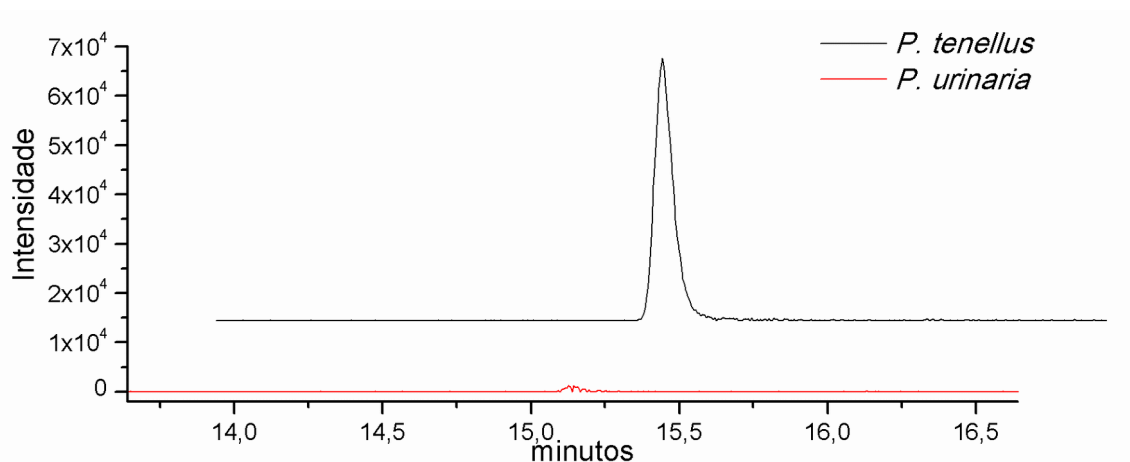


FIGURA 3.22 - Cromatograma do íon extraído de m/z 871,137 referente ao composto 22.

As estruturas sugeridas para taninos **2** e **3** não podem ser inequivocamente confirmadas somente por dados de fragmentação, uma vez que o padrão de fragmentação de taninos hidrolisáveis não é claro. Taninos hidrolisáveis não são estruturas simples, de modo geral, são formados por um núcleo de heterosídeo, como glucose, rodeado por diversas unidades de ácido gálico, as quais podem estar ligadas diretamente a outras unidades. Além disso, as unidades de ácidos gálicos podem sofrer reação de oxidação entre si, formando taninos mais complexos como elagitaninos¹¹¹.

Para facilitar a compreensão das fragmentações em taninos hidrolisáveis, nesse trabalho utiliza-se uma notação adaptada a partir da proposta por Domon e Castelo¹¹² para flavonoides exemplificado na FIGURA 3.23.

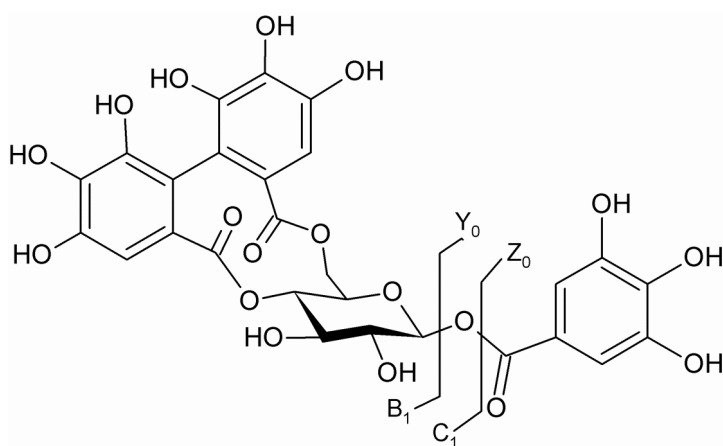


FIGURA 3.23 - Notação de fragmentação para taninos hidrolisáveis (ilustrado em corilagina)

O modo positivo de ionização fornece poucas informações estruturais, uma vez que os íons $[M+H]^+$ e $[M+2H]^{2+}$ não estão presentes. Geralmente são observados o íon resultante da perda de 170 unidades de massa e íons aduto como $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$ ¹¹³.

No modo negativo, por outro lado, é possível determinar o grau de substituição dos grupos galoil e ácidos elágicos, mas não a posição das ligações. Nos espectros de MS/MS a presença de grupos galoil é observada pela perda de $170u$ (B_1) e $152u$ (C_1), enquanto que o grupo elágico é atestado pela presença de um intenso pico de m/z 301 (Z_0).

Os espectros de MS/MS (FIGURA 3.24 e 3.25) do composto **2** e **3** no modo negativo de ionização revelaram a presença do íon de m/z 301 característico de ácido elágico, bem como, os íons 615 e 783, respectivamente, referente a perda de ácido gálico (B_1) por reação de rearranjo envolvendo o hidrogênio da hidroxila do açúcar⁹³. Para o composto **2** o íon de m/z 463 (B_1C_1) é característico da perda do segundo resíduo de ácido gálico com permanência da hidroxila ligada a glucose. A fragmentação do composto **3** gerou outros íons produtos importantes como 651, 633, 615, 481, 463, 337 e 319, cujo mecanismo de fragmentação é explicado na FIGURA 3.26.

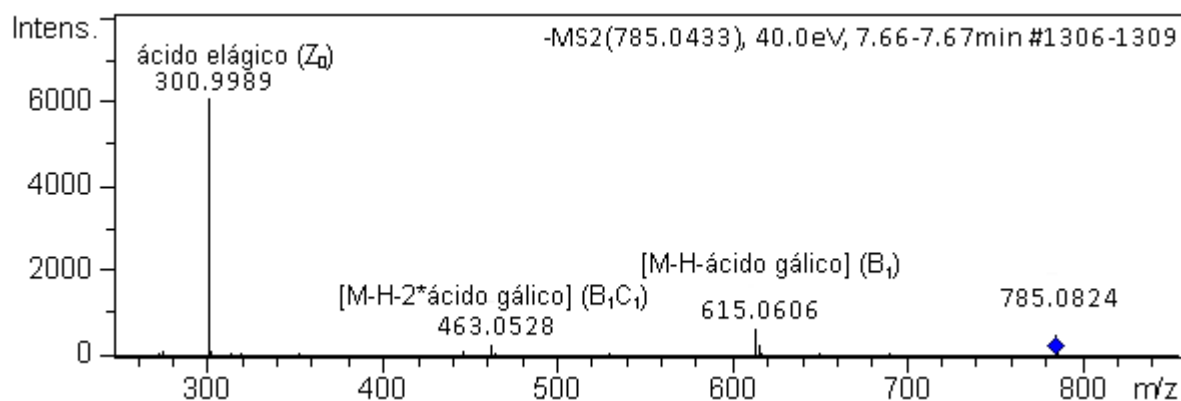


FIGURA 3.24 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 2 (1,3-digaloil-4,6-hexahidroxidifenoilglucose) de m/z 785,0433

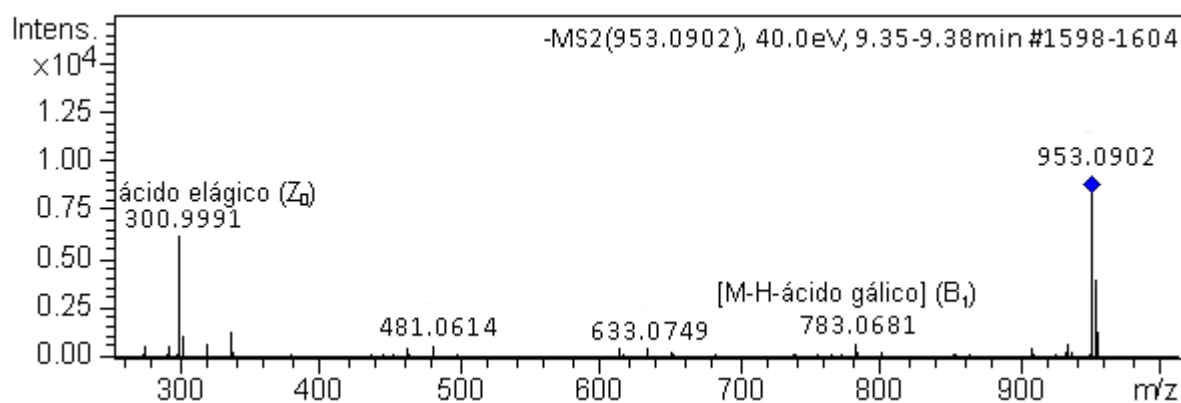


FIGURA 3.25 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 3 (ácido geraniínico) de m/z 953,0902

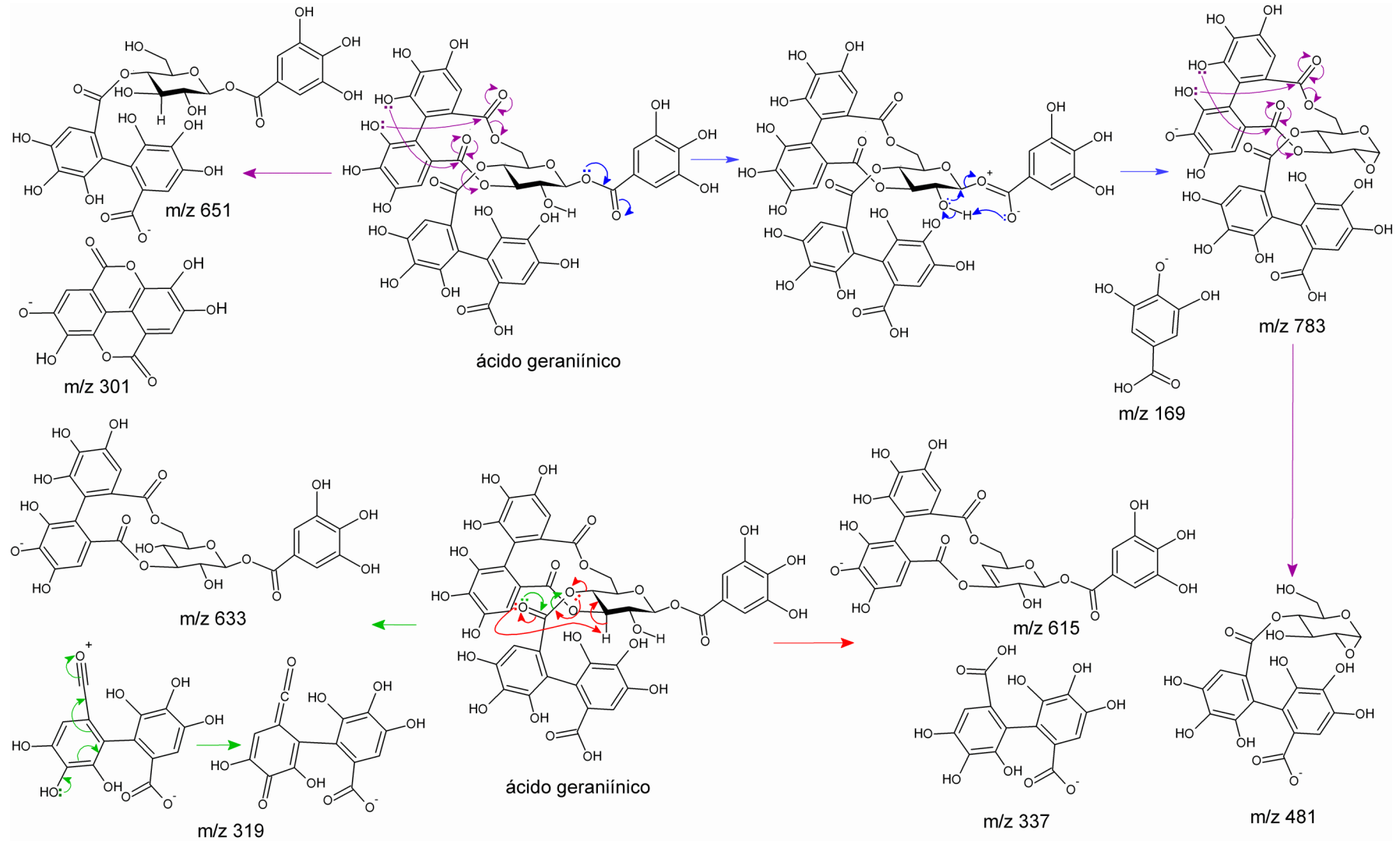


FIGURA 3.26 - Rotas de fragmentação do ácido geraniínico.

Os compostos **21** e **22** são elagitaninos que em vez de ácido gálico apresentam a flavona pinocembrina ligada a posição 1 da glucose. Os espectros de MS/MS no modo positivo revelaram os íons de m/z 257(Y_0) e 303 (Z_0) referentes a pinocembrina e ácido elágico. Para os compostos **21** e **22**, respectivamente, notam-se os íons de m/z 465 e 617 (B_1), relativos a perda de pinocembrina. A fragmentação do composto **22** originou também os íons 571, 447 e 315, referentes a $[M-H\text{-ácido elágico}]^-$ (C_1), $[M-H\text{-pinocembrina-ácido gálico}]^-$ (B_1B_1), e $[M-H\text{-pinocembrina-ácido elágico}]^-$ (B_1C_1) (FIGURA 3.27 e 3.28).

Espectros de MS/MS no modo negativo revelaram o íon de m/z 301 referente ao ácido elágico (Z_0) (FIGURAS 3.29 e FIGURA 3.30). As posições das ligações ao açúcar são difíceis de discernir, mas determinou-se as estruturas (FIGURA 3.17) devido aos dados presentes na literatura¹¹⁰ e a elucidação estrutural realizada por NMR (seção 4.2).

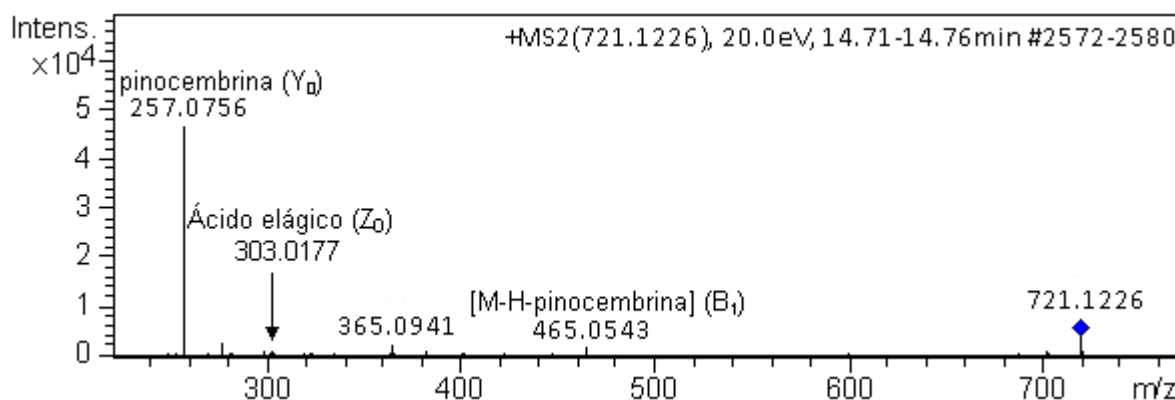


FIGURA 3.27 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 21 (pinocembrina-7-O-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]-glucose) de m/z 721,1226

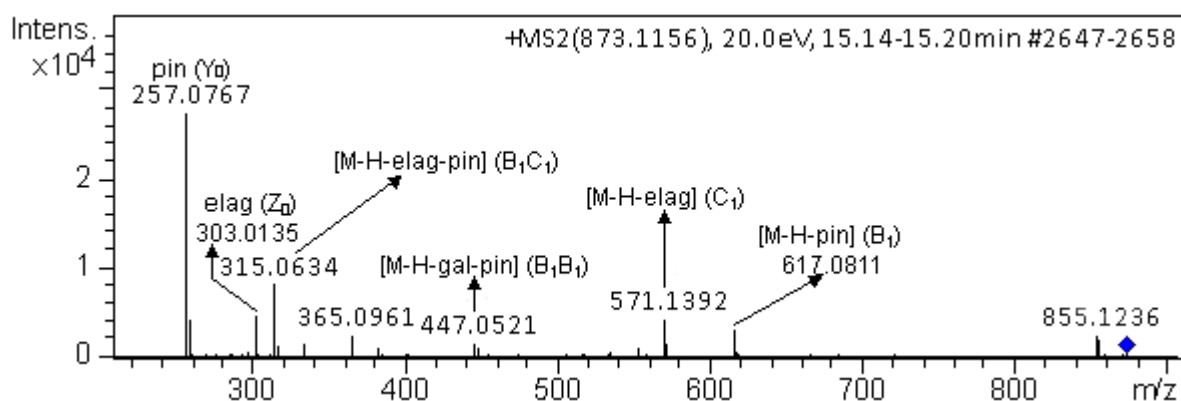


FIGURA 3.28 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 22 (pinocembrina-7-O-[3"-O-galoil-4",6"-hexahidroxi-difenol]-glucose) de m/z 873,1156. Legenda: pin = pinocembrina; elag = ácido elágico; gal = ácido gálico

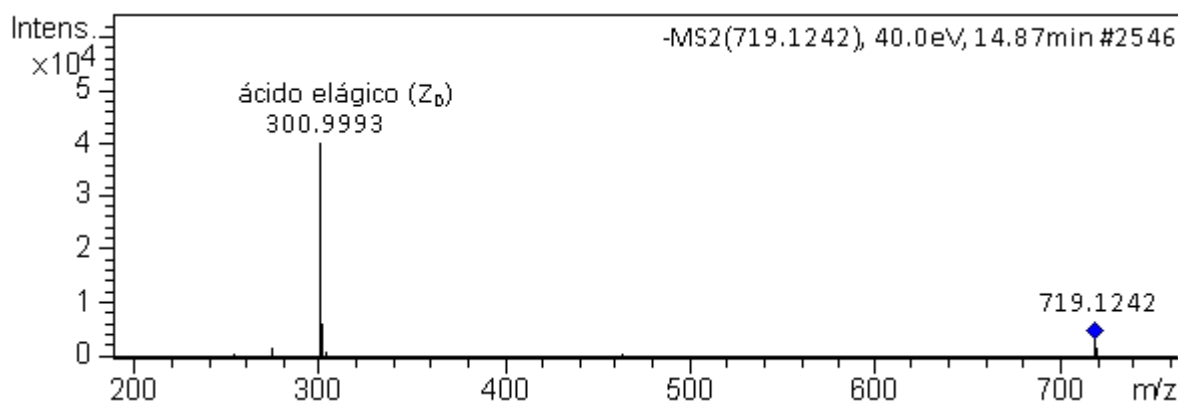


FIGURA 3.29 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 21 (pinocembrina-7-O-[4",6"-hexahidroxi-difenol]-glucose) de m/z 719,1242.

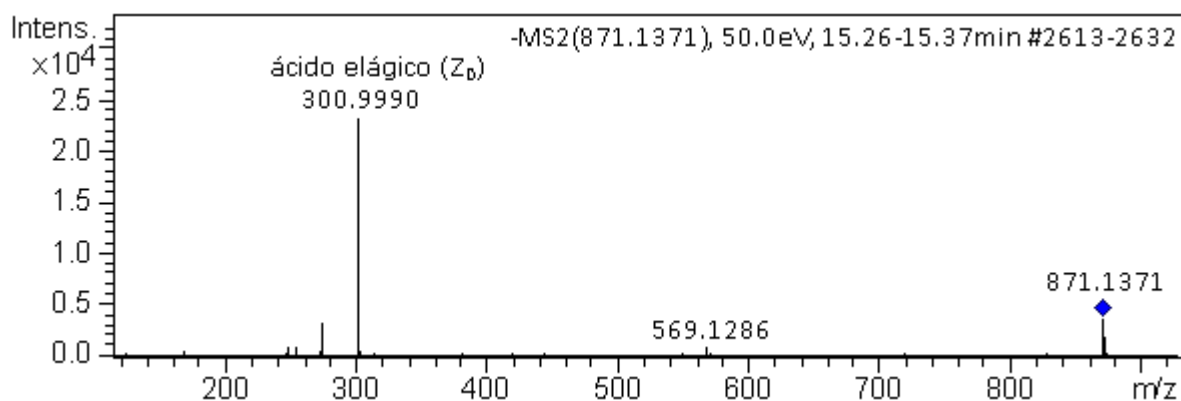


FIGURA 3.30 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto 22 (pinocembrina-7-O-[3"-O-galoil-4",6"-hexahidroxi-difenol]-glucose) de m/z 871,1371

O composto **13** é outro elagitanino importante, mas sua estrutura não pode ser inferida. Sua presença foi observada em maior concentração em *P*.

stipulatus, mas também está presente nas demais espécies, exceto *P. amarus* (FIGURA 3.31).

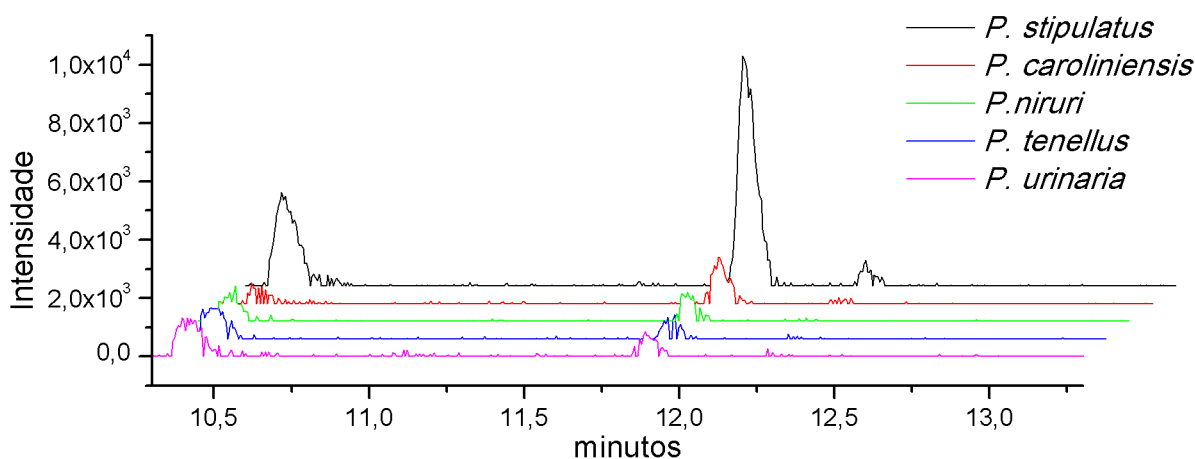


FIGURA 3.31: Cromatograma do íon extraído de m/z 979,106 referente ao composto 13.

A fragmentação no modo negativo de ionização revelou íons referentes a perda de CO_2 evidenciando a presença de carboxilas livres. O íon $[\text{M}-\text{H}-170]^-$ com intensidade significativa é indicativo de grupo galoil ligada a posição 1 da glucose, bem como, o pico base de m/z 301 é característico de ácido elágico (FIGURA 3.32).

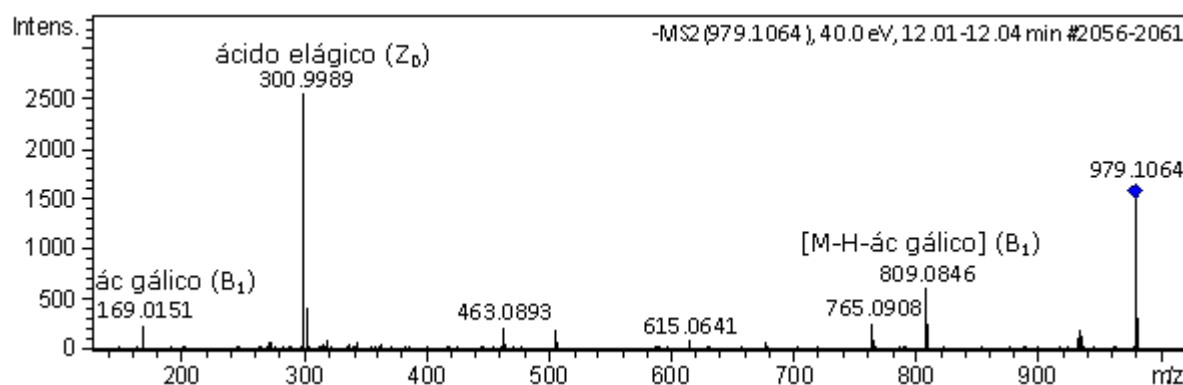


FIGURA 3.32: Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 13 de m/z 979,1064

3.3.3.3 - Flavonoides

Os flavonoides são os principais compostos responsáveis pela

diferenciação das espécies em estudo. Foram identificados diversos flavonoides glicosilados, dentre os quais flavonóis, flavonas e flavanonas.

As fragmentações de flavonoides glicoconjugados seguem um padrão definido, dessa forma, a discussão das fragmentações segue a notação proposta por Domon e Castelo ¹¹² (FIGURA 3.33). Os íons contendo a aglicona são representados por k, lX_j, Y_j e Z_j , onde j é o número da ligação interglicosídica clivada, contando a partir da aglicona, k e l indicam as quebras cruzadas do anel glicosídico. A ligação glicosídica entre a aglicona e o glicosídeo apresenta numeral 0. Caso a carga permaneça no resíduo de carboidrato os íons produtos são designados como k, lA_i e B_i , no qual i representa o número (≥ 1) da ligação glicosídica quebrada, partindo do terminal não reduzido. A notação sugerida por Ma *et al.* ¹¹⁴ foi seguida para se referir aos íons produtos resultantes da fragmentação da aglicona. As representações usadas para os íons referentes aos anéis A e B intactos foram respectivamente m, nA_0 e m, nB_0 , onde m e n indicam quais ligações do anel C foram clivadas. O valor subscrito 0 é usado para evitar confusão com as notações A_i e B_i usadas para íons produtos de carboidratos.

3.3.3.3.1 - Flavonoides O-glicosilados

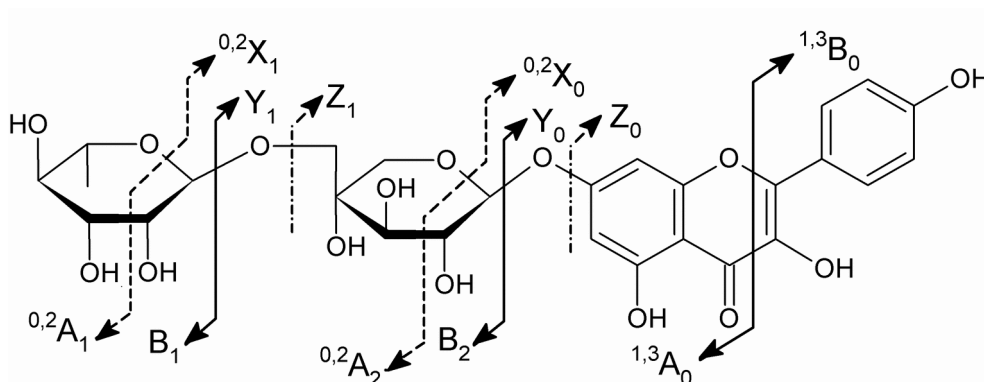


FIGURA 3.33: Notação de fragmentação de flavonoides (ilustrado em canferol-7-O-rutinosídeo)

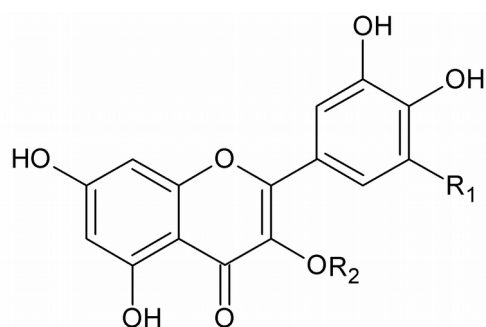
Flavonoides O-glicosilados apresentam variações quanto a estrutura da

aglicona, posição da glicosilação, quantidade e tipo de monossacarídeos e característica da ligação interglicosídica.

A posição da glicosilação em flavonoides não é de fácil interpretação, uma vez que geralmente são observadas somente as fragmentações características da perda do açúcar. As fragmentações típicas da quebra da aglicona como retro Diels-Alder e demais retrociclicações, as quais forneceriam informações mais fidedignas sobre a posição da ligação glicosídica, nem sempre são observadas. No entanto, flavonoides são comumente conhecidos por sua atividade antioxidante, a qual advém de sua capacidade de doação de átomos de hidrogênio por meio de quebra homolítica formando radical fenóxi relativamente estável. Essa quebra radicalar é observada em experimentos de MS/MS no modo negativo pela visualização do íon radicalar $[Y_0-H]^-$. Hvattum e Ekeberg¹¹⁵ observaram maior estabilidade desse radical especialmente em flavonoides que apresentavam grupo hidroxila na posição 3, dupla ligação entre 2 e 3, carbonila na posição 4 e hidroxila na posição orto do anel B.

Hvattum e Ekeberg¹¹⁵, e Cuyckens e Claeys¹¹⁶ estudaram a relação de intensidade $[Y_0-H]^-:Y_0^-$ para diversos flavonóis e notaram que a intensidade do íon $[Y_0-H]^-$ aumenta em maiores energias de colisão. Observaram também que o íon $[Y_0-H]^-$ era mais intenso que o íon Y_0^- nos flavonoides 3-O e 7-O glicosilados, enquanto que nos flavonoides 4'-O glicosilados o íon Y_0^- era mais intenso. A relação $[Y_0-H]^-:Y_0^-$ mostrou-se muito maior para flavonol 3-O-glicosilados. A relação $[Y_0-H]^-:Y_0^-$, dessa maneira, não pode ser usada para classificação inequívoca da posição da ligação glicosídica, entretanto é um bom indicativo especialmente para flavonóis 3-O-glicosilados. A intensidade da quebra radicalar aumenta também quanto maior o número de hidroxilas no anel B.

As informações acima permitiram inferir 3 flavonóis monoglicosilados (FIGURA 3.34) com ligação glicosídica na posição 3. São estes: miricitrina (**10**), presente principalmente em *P. niruri* e *P. tenellus*, mas existente em concentrações traço em *P. amarus* e *P. urinaria* (FIGURA 3.35); miquealina (**11**) observado em *P. stipulatus*, mas também em concentrações traço em *P. urinaria*, *P. tenellus* e *P. amarus* (FIGURA 3.36); e quercitrina (**15**) visualizado em *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. urinaria* (FIGURA 3.37).



(10) miricitrina - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{ramnose}$

(11) miquealina - $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{glucuronídeo}$

(15) quercitrina - $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{ramnose}$

FIGURA 3.34 - Flavonóis monoglicosilados presentes nas espécies de *Phyllanthus*

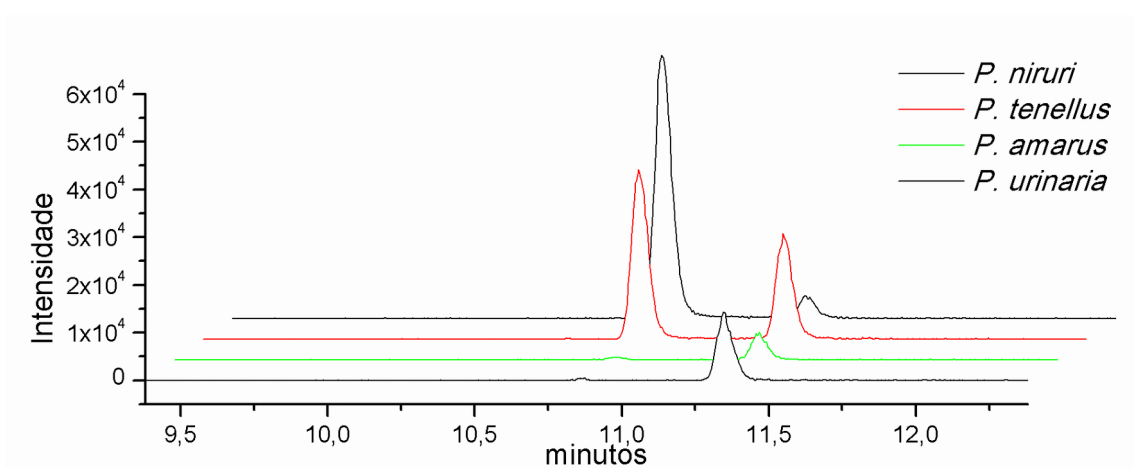


FIGURA 3.35 - Cromatograma do íon extraído de m/z 463,088 referente ao composto 10.

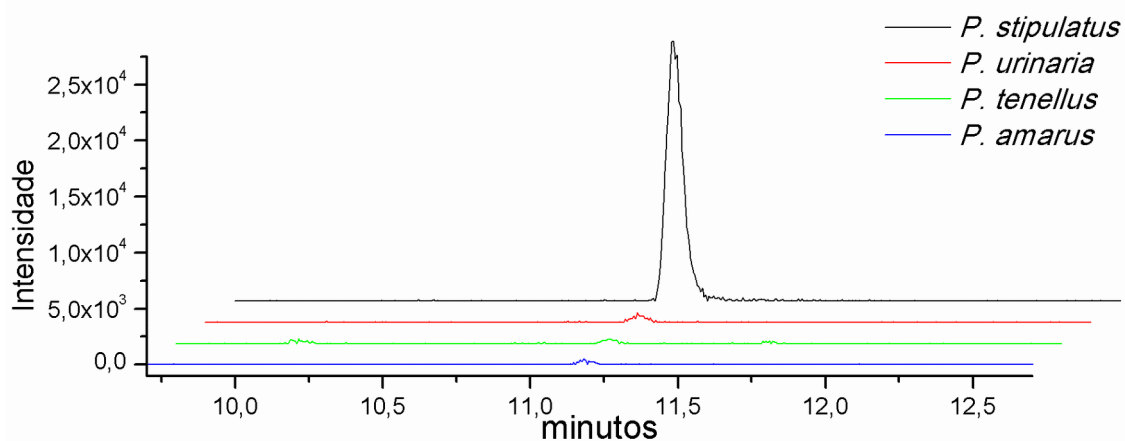


FIGURA 3.36 - Cromatograma do íon extraído de m/z 477,067 referente ao composto 11.

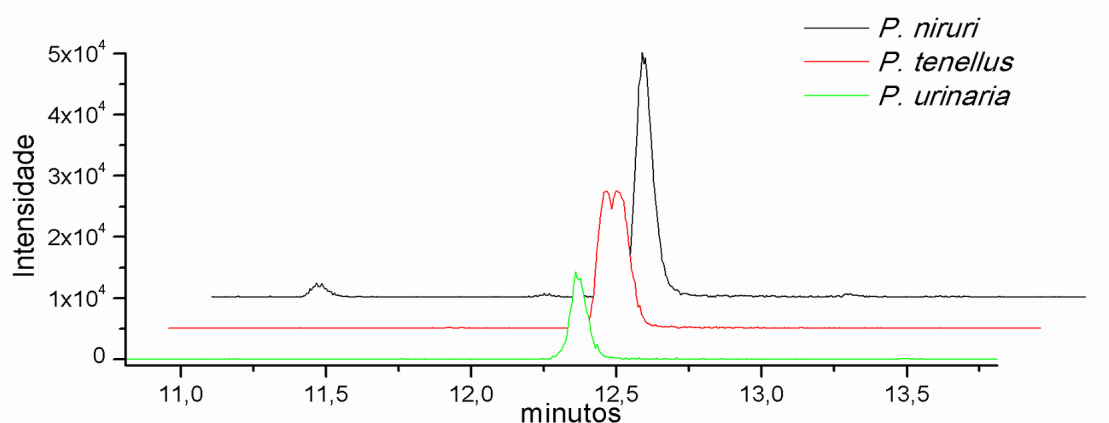


FIGURA 3.37 - Cromatograma do íon extraído de m/z 447,093 referente ao composto 15.

Os espectros de MS/MS no modo positivo de ionização da miricitrina (**10**) e quercitrina (**15**) apresentaram respectivamente os íons de m/z 319 e 303 referentes a quebra Y_0^+ com eliminação de ramnose (FIGURAS 3.38 e 3.39). No modo negativo, por outro lado, observou-se os íons Y_0^- e $[Y_0-H]^-$. Utilizando 50eV como energia de colisão observou-se uma relação entre Y_0^- e $[Y_0-H]^-$ de 3,9 e 2,4, o que é forte indicativo de ligação glicosídica na posição 3, ademais a maior razão entre os dois íons para miricitrina está em conformidade com Hvattum e Ekberg¹¹⁵ que relacionaram maior intensidade de $[Y_0-H]^-$ com maior número de hidroxilas no anel B. Ablajan *et al.*¹¹⁷ observaram também claras diferenças no padrão de fragmentação entre flavonóis 3-O e 7-O glicosilados, no primeiro os íons $[Y_0-H-CO-H]^-$ e $[Y_0-H-CO_2-H]^-$ apresentaram grande intensidade, enquanto que no segundo $[Y_0-CO]^-$ era bastante abundante. Tal observação corrobora com as estruturas com glicosilação na posição 3, visto que os íons explicados acima são bastante intensos em ambos os compostos (FIGURAS 3.40 e 3.41).

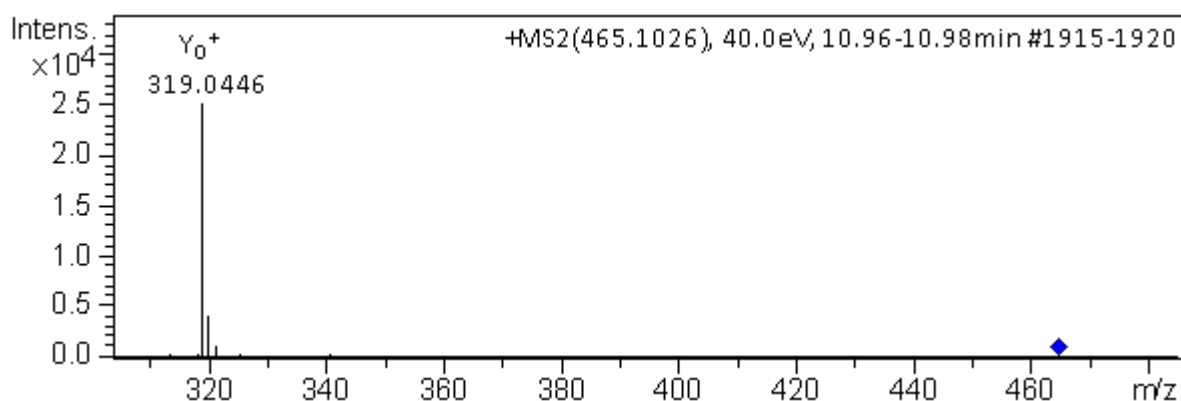


FIGURA 3.38 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 10 (miricitrina) de m/z 465,1026.

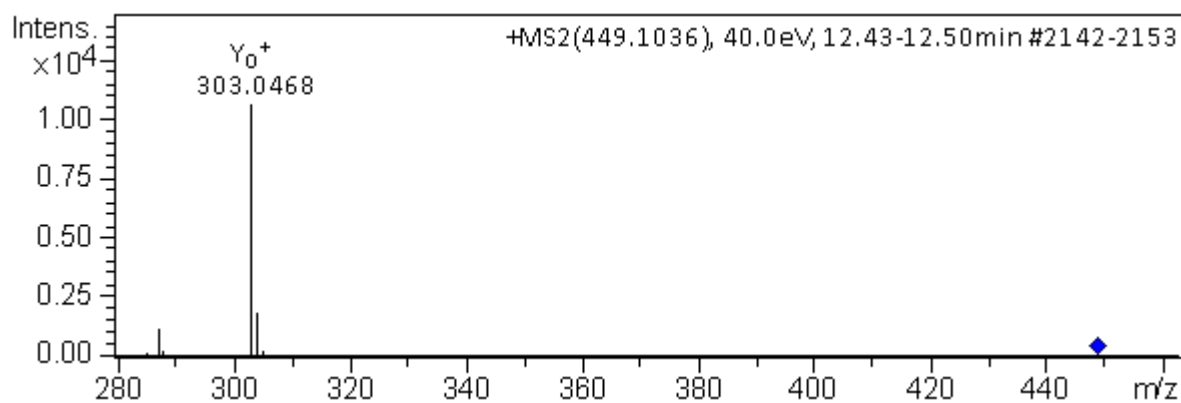


FIGURA 3.39 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 15 (quercitrina) de m/z 449,1036.

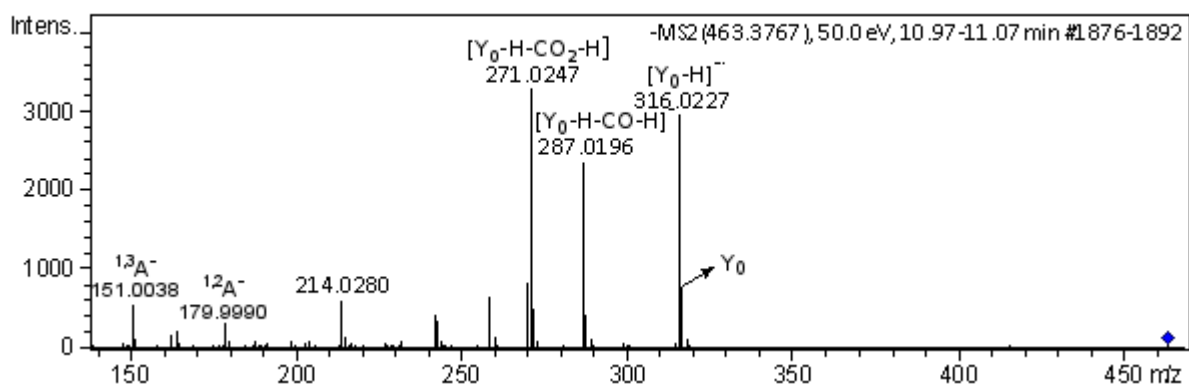


FIGURA 3.40 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto 10 (miricitrina) de m/z 463,3767

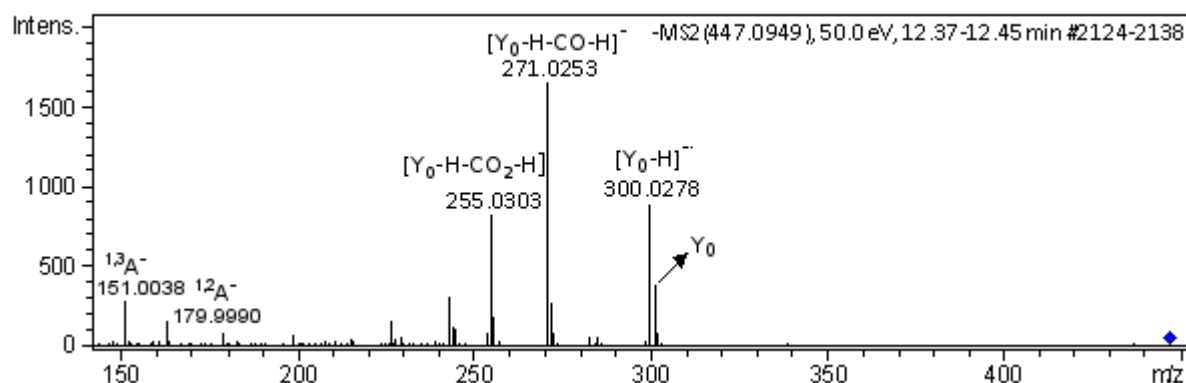


FIGURA 3.41 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto 15 (quercitrina) de m/z 447,0949.

A fragmentação no modo negativo do composto **11**, em contraste aos outros flavonóis monoglicosilados, apresentou o íon $[Y_0-H]^-$ em intensidade reduzida. Embora, isso seja indicativo de ligação glicosídica na posição 4', parece mais provável que a pequena intensidade do íon resultante de fragmentação homolítica seja resultado da influência do ácido glucurônico ligado a posição 3 da aglicona. Em trabalho anterior o mesmo composto foi isolado e purificado a partir de extratos aquosos dessa mesma espécie e identificado por NMR ⁴⁶. Em ambos os modos de ionização foram observados os íons referentes a aglicona quercetina (Y_0) (FIGURA 3.42 e 3.43). No modo negativo as fragmentações de retrociclicização ($^{1,3}A_0^-$ e $^{1,2}A_0^-$) e perda de CO_2 $[M-H-CO_2]^-$ também foram percebidas ao elevar-se a energia de colisão (FIGURA 3.44).

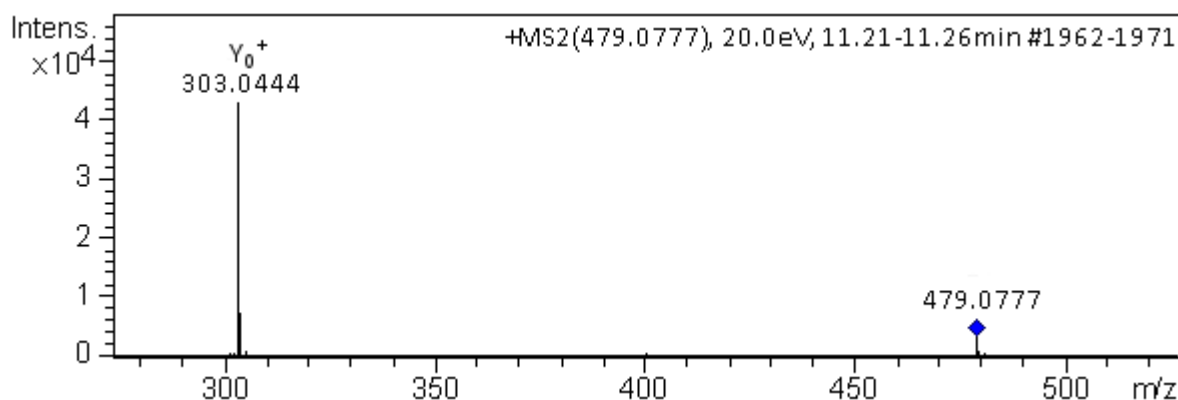


FIGURA 3.42 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 11 (miquéalina) de m/z 479.0777.

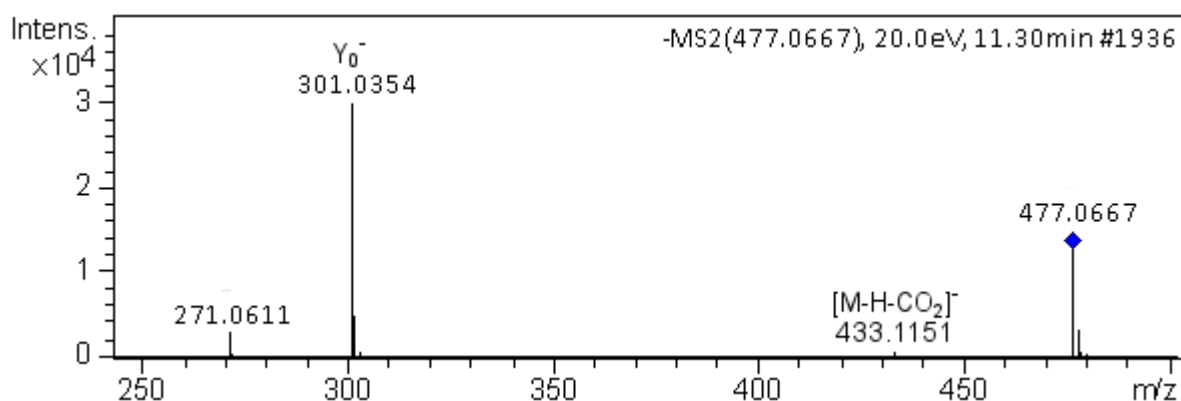


FIGURA 3.43 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 11 (miquelialina) de m/z 477.0667.

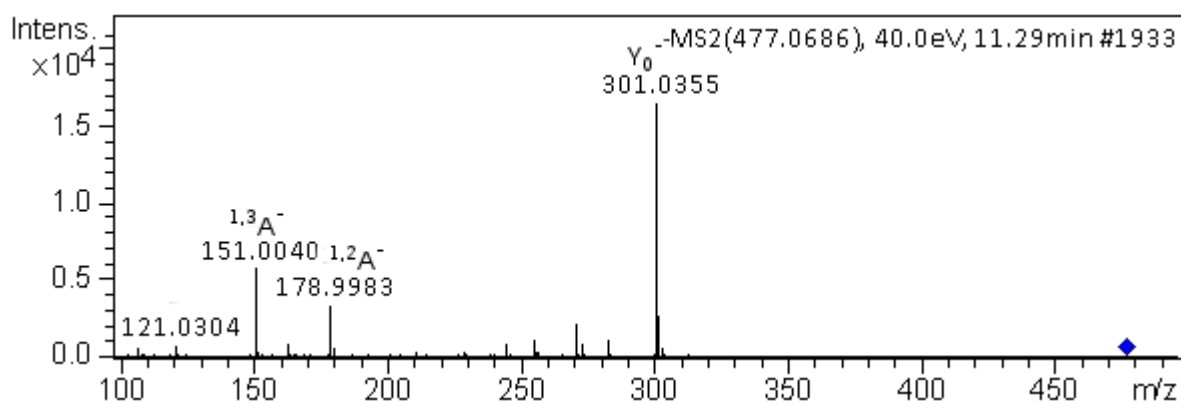
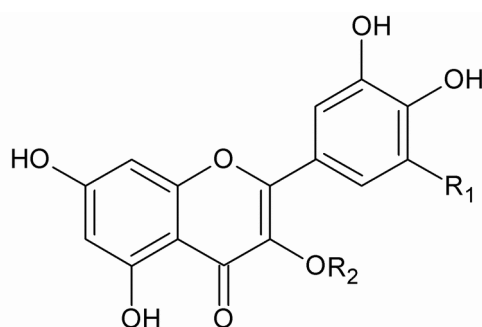


FIGURA 3.44 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 11 (miquelialina) de m/z 477.0686.

Outros dois flavonóis O-monoglicosilados que não apresentam grande importância na diferenciação das espécies foram observados, sendo estes miricetrina-3-O-glucosídeo, encontrado em *P. tenellus* e isoquercitrina presente em todos os extratos (FIGURA 3.45).



miricetina-3-O-glucosídeo - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{glucose}$

isoquercitrina - $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{glucose}$

FIGURA 3.45 - Outros flavonóis O-monoglicosilados encontrados em *Phyllanthus*

Os espectros de MS/MS no modo positivo de ionização de ambos os compostos acima revelaram a quebra Y_0^+ com perda neutra de $162u$ referente a perda de resíduo de glucose (FIGURA 3.46 e 3.47). No modo negativo de ionização com energia de colisão de 50eV , por outro lado, foi possível observar além da quebra Y_0^- , os íons de m/z 316 e 300 inerentes a clivagem $[Y_0\text{-H}]^-$. Estes íons juntamente aos íons relativos as fragmentações $[Y_0\text{-H-CO-H}]^-$ e $[Y_0\text{-H-CO}_2\text{-H}]^-$ indicam a presença O-glicosilação na posição 3 dos flavonóis (FIGURA 3.48 e 3.49)¹¹⁵⁻¹¹⁷. A comparação de intensidade entre os íons $[Y_0\text{-H}]^-$ e Y_0^- dos flavonóis monoglicosilados com resíduo de ramnose, miricitrina (**10**) e quercitrina (**15**), com os flavonóis ligados a glucose, miricetina-3-O-glucosídeo e isoquercitrina, revelaram que a intensidade do íon referente a quebra radicalar não está somente relacionada a estrutura do núcleo do flavonol, mas também ao tipo de resíduo de açúcar. Essas razões foram superiores quando o açúcar ramnose (FIGURAS 3.40 e 3.41) foi substituído por glucose (FIGURAS 3.48 e 3.49). Assim a partir de miricetina-3-O-glucosídeo e isoquercitrina os valores encontrados foram respectivamente de 5,6 e 3,6.

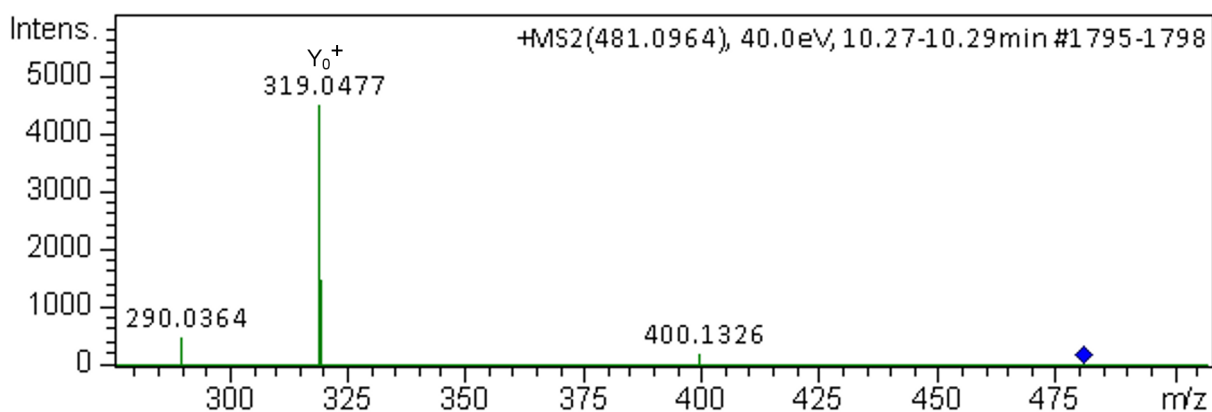


FIGURA 3.46 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto miricetina-3-O-glucosídeo de m/z 481.0964.

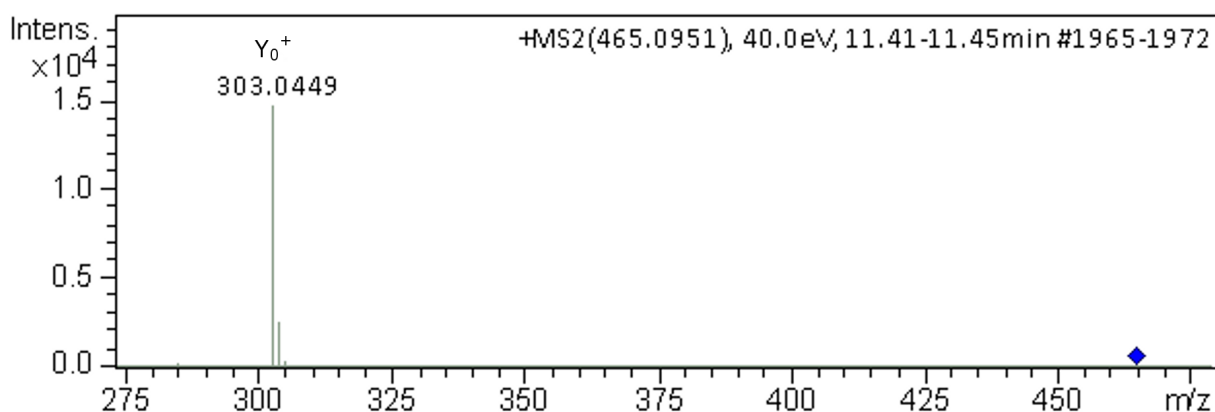


FIGURA 3.47 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto isoquercitrina de m/z 465.0951.

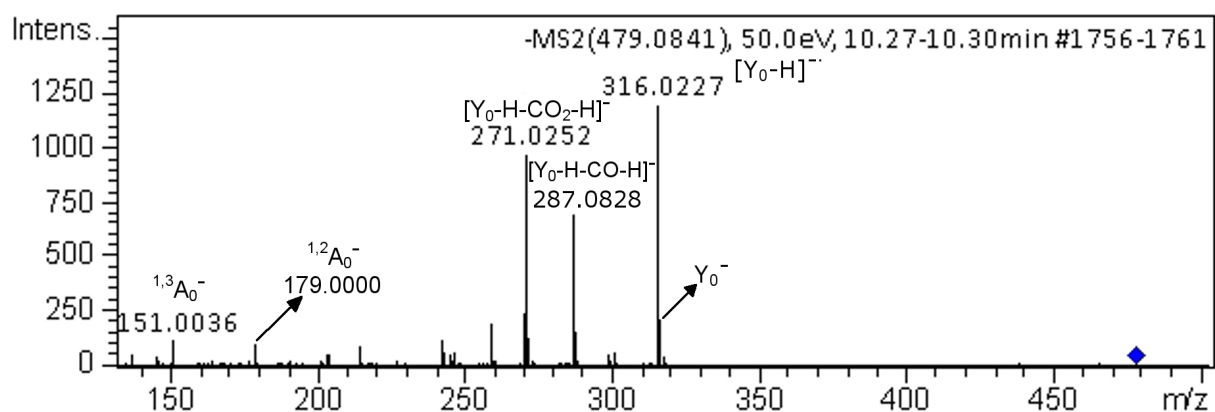


FIGURA 3.48 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto miricetina-3-O-glucosídeo de m/z 479.0841

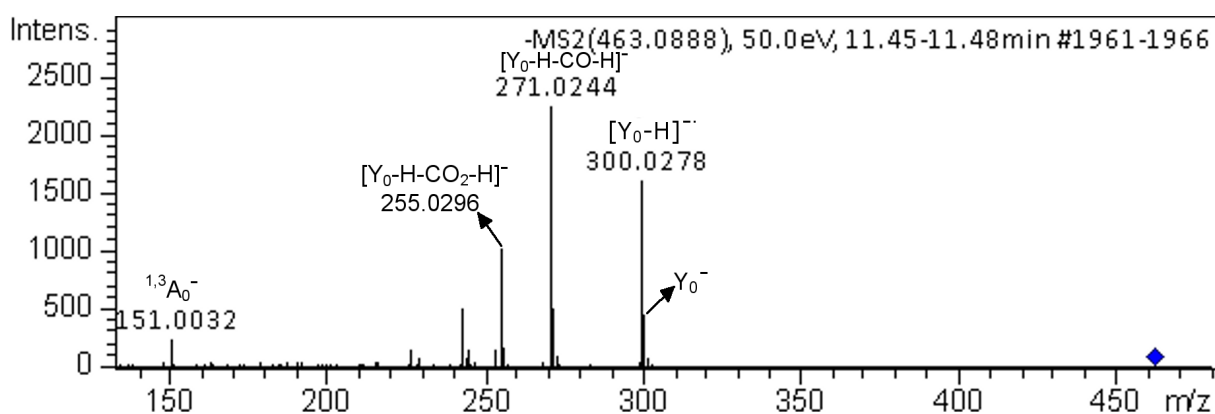
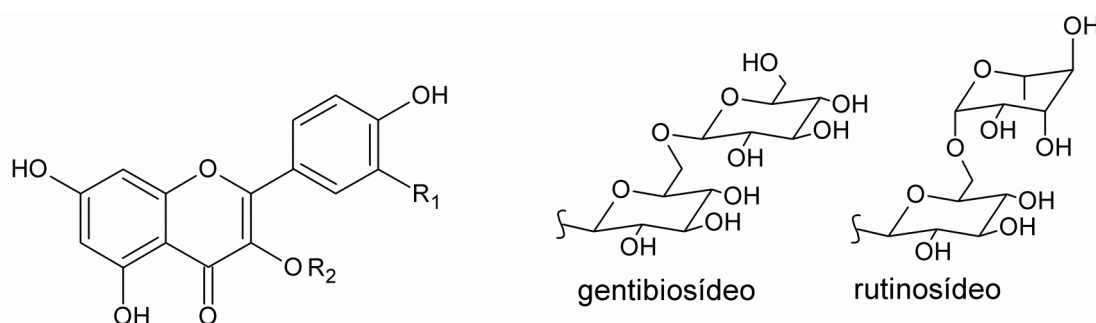


FIGURA 3.49 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (50eV) do composto isoquercitrina de m/z 463.0888.

Dentre os flavonoides encontrados, foram também identificados 4 flavonóis diglicosilados importantes na diferenciação das espécies (FIGURA 3.50), os quais são: quercetina-3-O-gentibiosídeo (**7**) (FIGURA 3.51), presente majoritariamente em *P. caroliniensis* e em concentrações traço em *P. urinaria* e *P. niruri*; rutina (**12a**) presente em todas as espécies, exceto *P. niruri* e *P. caroliniensis*; canferol-3-O-gentibiosídeo (**12b**) observado em *P. caroliniensis* (FIGURA 3.52); e canferol-3-O-rutinosídeo (**16**) existente em *P. urinaria* e *P. tenellus* (FIGURA 3.53). O tratamento estatístico considerou os compostos **12a** e **12b** como sendo a mesma substância por serem isômeros e apresentarem t_R próximos, no entanto os experimentos de íons produtos revelaram diferenças estruturais evidentes.



- (7) quercetina-3-gentibiosídeo - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{gentibiosídeo}$
 (12a) rutina - $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{rutinosídeo}$
 (12b) canferol-3-O-gentibiosídeo - $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{gentiobiosídeo}$
 (16) canferol-3-O-rutinosídeo - $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{rutinosídeo}$

FIGURA 3.50 - Flavonóis diglicosilados presentes nas espécies de *Phyllanthus*

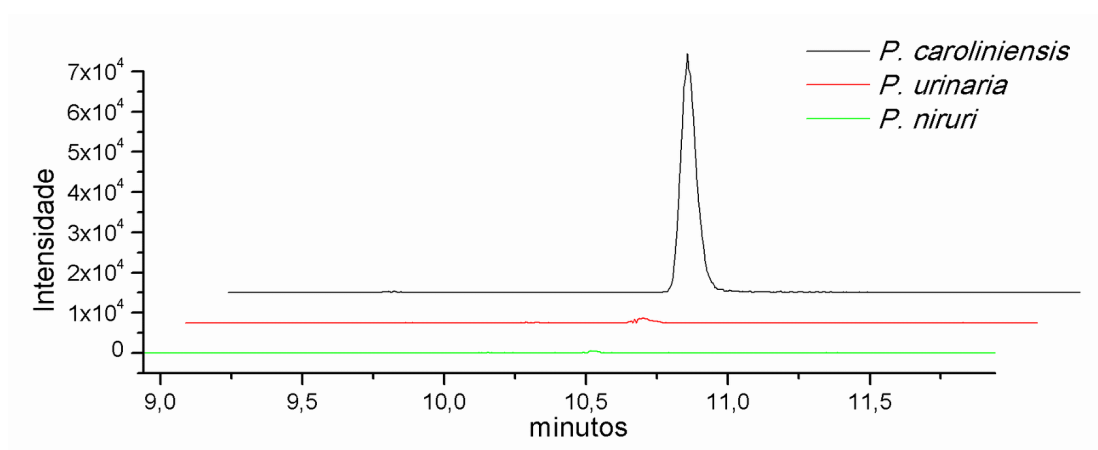


FIGURA 3.51: Cromatograma do íon extraído de m/z 625,141 referente ao composto 7.

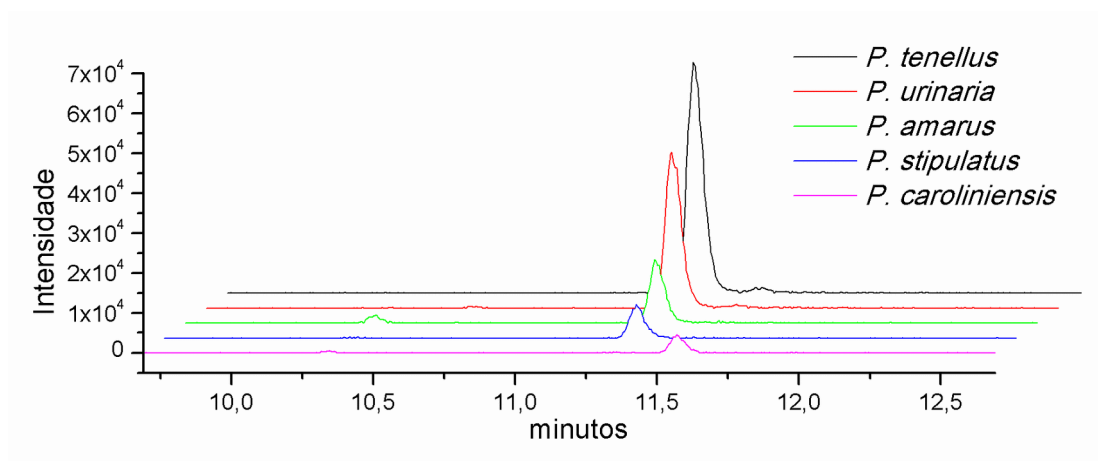


FIGURA 3.52: Cromatograma do íon extraído de m/z 609,146 referente ao composto 12a e 12b.

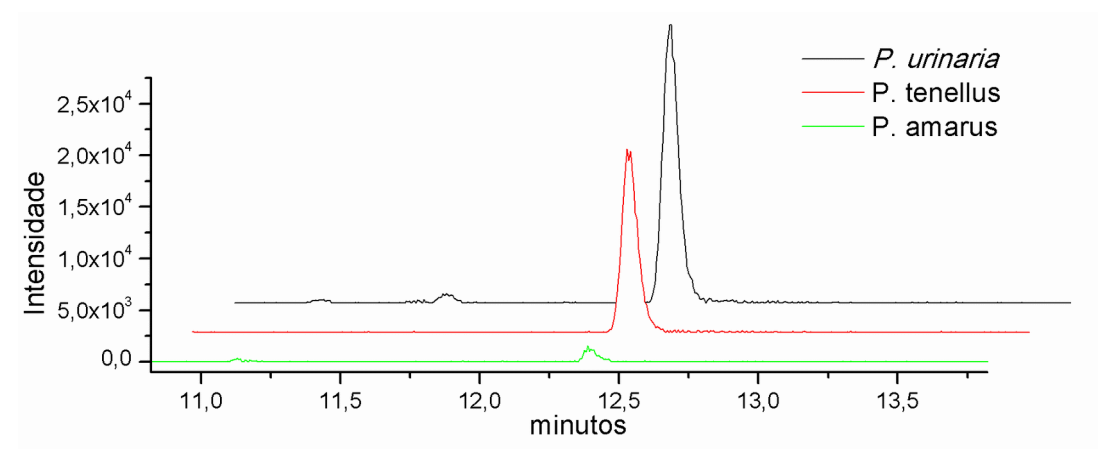


FIGURA 3.53: Cromatograma do íon extraído de m/z 593,151 referente ao composto 16.

Experimentos de íons produtos no modo positivo revelaram para todos os flavonóis diglicosilados os íons correspondentes a quebra Y_0^+ e Y_1^+ , demonstrando os monossacarídeos que os compõem (FIGURA 3.54-3.57).

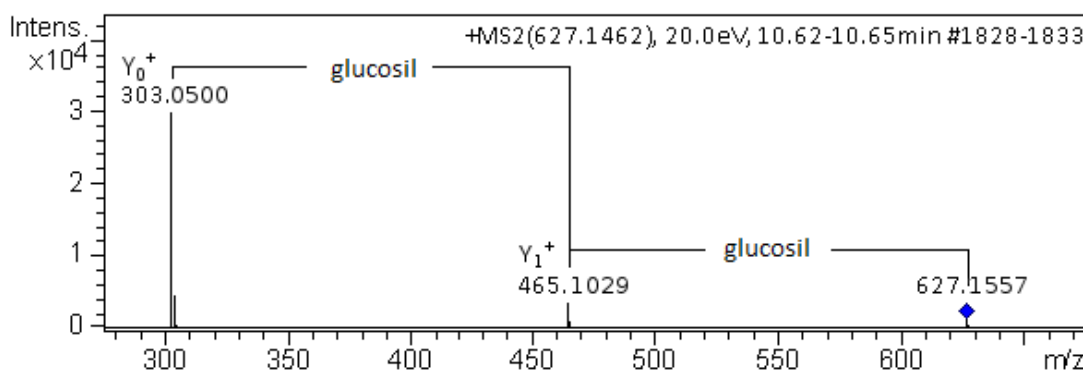


FIGURA 3.54 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 7 (quercetina-3-O-gentibiosídeo) de m/z 627,1462.

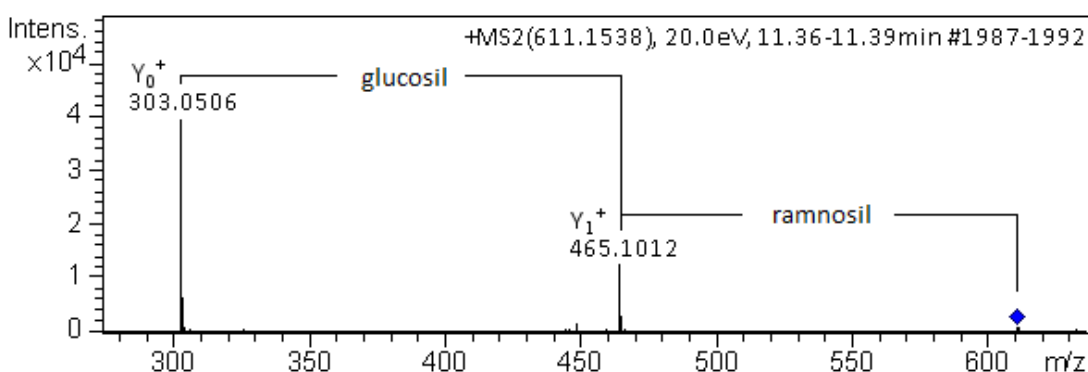


FIGURA 3.55 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 12a (rutina) de m/z 611,1538.

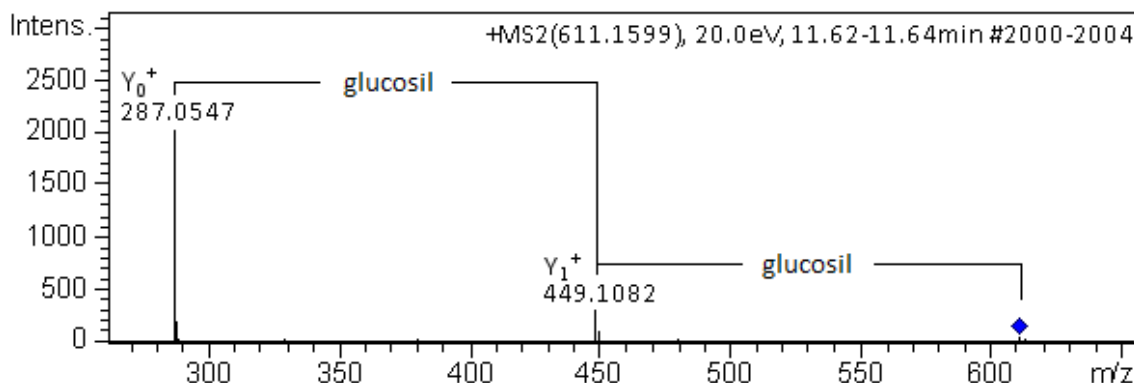


FIGURA 3.56 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 12b (canferol-3-O-gentibiosídeo) de m/z 611,1599.

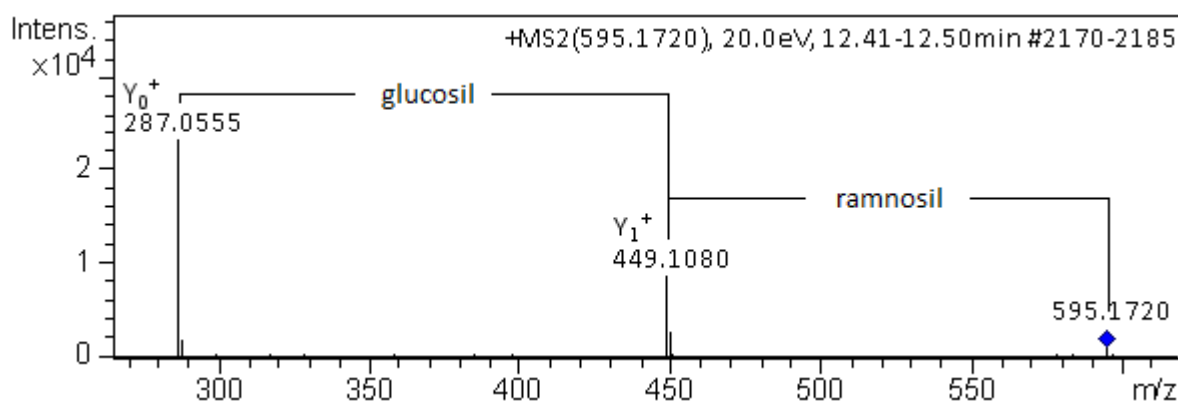


FIGURA 3.57 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 16 (canferol-3-O-rutinosídeo) de m/z 595,1720.

Flavonóis diglicosilados podem ser di-O-glicosilados ou O-diglicosilados, variando quanto a posição da ligação e o tipo de ligação interglicosídica. Ferreres *et al.*¹¹⁸ avaliaram o comportamento de quatro grupos de flavonoides com 2 resíduos de hexose, sendo estes flavonóis X,Y-di-O-glicosilados, onde X e Y correspondem as posições 3, 7 ou 4' da aglicona e flavonóis com diferentes ligações interglicosídicas, como sofrósídeos (Glc (1 → 6) Glc), alosil (1 → 2) glucosídeos e gentibiosídeos (Glc (1 → 6) glc). Experimentos de íons produtos no modo negativo de ionização revelaram que flavonóis O-diglicosilados (1→2) apresentam íons relativos as quebras Y_1^- e/ou Z_1^- com elevada abundância relativa (13-79%), enquanto que para flavonoides ligados a gentibiosídeos (1→6) o íon Y_1^- apresenta abundância relativa muito baixa e o íon Z_1^- não é observado. Para ambos o íon Y_0^- é o pico base. Cuyckens *et al.*¹¹⁶ encontraram relação semelhante para rutinosídeos (1→6) e neohesperidosídeos (1→2). Em flavonoides di-O-glicosilados, por outro lado, o pico base é aquele relacionado a perda do primeiro resíduo de hexose, enquanto que os íons relacionados a aglicona livre deixam de ser observado (Z_0^-) ou passa a apresentar abundância relativa de aproximadamente 30%.

Os quatro flavonóis diglicosilados apresentaram o perfil típico de fragmentação de flavonóis O-diglicosilado (1→6), ou seja, não foram observados os íons Y_1^- e Z_1^- e o pico base foram os íons referente a quebra homolítica $[Y_0-H]^-$ ou Y_0^- , em todas as energias de colisão avaliadas¹¹⁸. Adicionalmente, os compostos **7** e **12a** apresentaram relação entre $[Y_0-H]^-:Y_0^-$ de 2,67 e 3,49, respectivamente, indicativo de ligação 3-O-glicosídica, enquanto que para os compostos **12b** e **16** essa razão foi, nessa ordem, de 0,72 e 1,56. A menor relação para os últimos talvez esteja

relacionado a uma ligação do tipo 7-O-glicosídica, mas, mais provavelmente, se deva ao menor grau de hidroxilação do anel B ¹¹⁵. Aparentemente, também, existe uma relação entre o tipo de dissacarídeo e a intensidade do íon $[Y_0-H]^-$, ou seja, os flavonóis com ramnose terminal (**12a e 16**) apresentaram maior relação entre os íons $[Y_0-H]^-$: Y_0^- que os compostos que tinham glucose terminal (**6 e 12b**), mesmo apresentando o mesmo núcleo flavonoídico. Outro indicativo que esses flavonóis são todos 3-O glicosilados é a alta intensidade dos íons $[Y_0-H-CO-H]^-$ e $[Y_0-H-O_2-H]^-$ ¹¹⁷ (FIGURA 3.58-3.61).

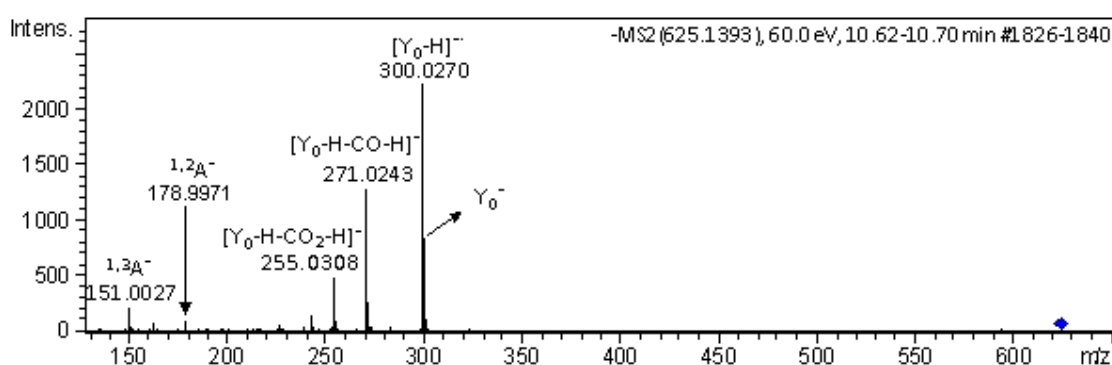


FIGURA 3.58 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 7 (quercetina-3-O-gentibiosídeo) de m/z 625,1393.

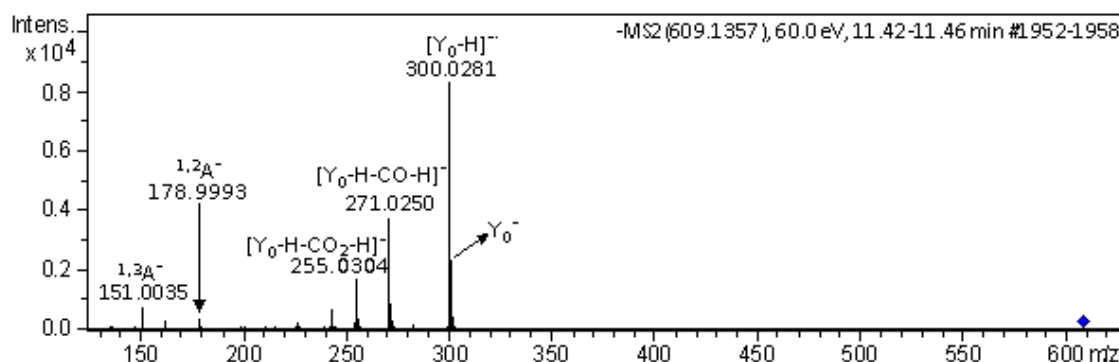


FIGURA 3.59 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 12a (rutina) de m/z 609,1357.

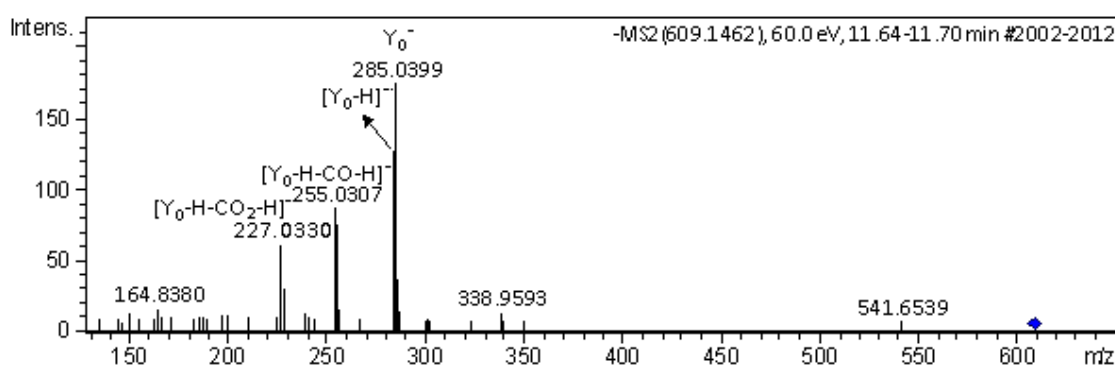


FIGURA 3.60 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 12b (canferol-3-O-gentibiosídeo) de m/z 609,1462.

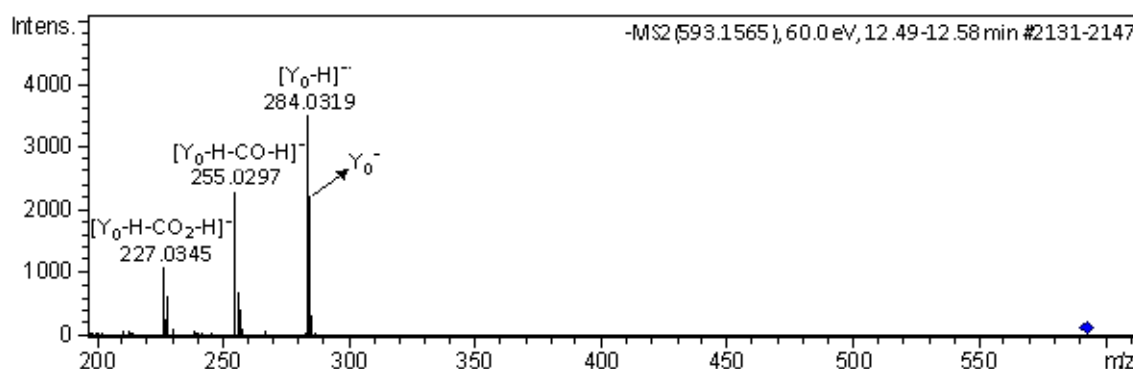


FIGURA 3.61 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (60eV) do composto 16 (canferol-3-O-rutinosídeo) de m/z 625,1393.

3.3.3.3.2 - Flavonoides C-Glicosilados

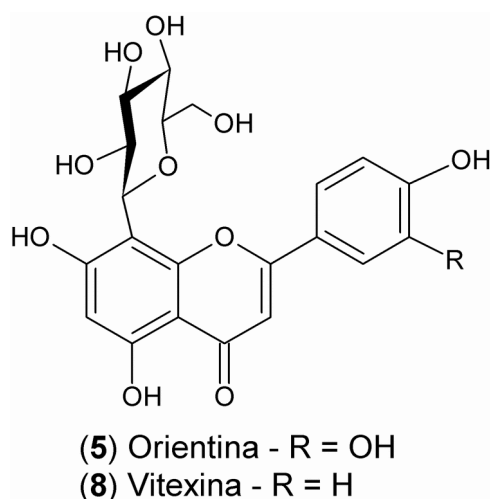
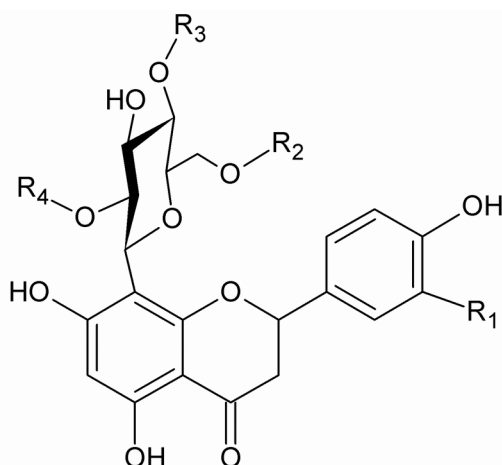
Flavonoides C-glicosilados apresentam o açúcar ligado diretamente ao núcleo do flavonoide por uma ligação carbono-carbono. Este tipo de ligação é a responsável pela fácil diferenciação de flavonoides por espectrometria de massas, uma vez que em experimentos de MS/MS não haverá o íon altamente intenso Y_0 resultante da quebra da ligação éster, mas sim clivagens cruzadas no anel sacarídico (k,lX) e perda de moléculas de água. Os sítios de ligação dos heterosídeos em flavonoides C-glicosilados se resume as posições 6 e 8, nunca sendo reportado ligações em outras posições, como no anel B, por exemplo ¹¹⁶.

Os perfis de fragmentação de flavonoides C-glicosilados permitem a diferenciação de isômeros posicionais 6-C ou 8-C, no entanto é necessário cautela, uma vez que existem grandes diferenças de perfis de fragmentação nos distintos modos de ionização, tipos de analisadores e energias de colisão ¹¹⁹. A perda de

molécula de água em elevadas energias de colisão é mais pronunciado em flavonoides 6-C que em 8-C glicosilados, o que explicado pelo fato do grupo hidroxila da posição 2" estar entre os grupos hidroxila da posição 5 e 7 do flavonoide. Nessa posição a ligação de hidrogênio entre o éter do açúcar e as hidroxilas na posição 5 ou 7 limitam a rotação do resíduo de açúcar, facilitando a eliminação de água. Em flavonoides 8-C glicosilados, em contrapartida, a mesma perda de água somente ocorre em relação a posição 7 e ainda é desfavorecida pela ligação de hidrogênio entre a hidroxila em 2" do açúcar e o éter da aglicona ¹¹⁶. Em CID com baixas energias de colisão, por outro lado, Waridel *et al.* ¹²⁰ observaram que no modo positivo tanto em QqToF MS/MS (20eV) como em IT-MS² (50%) as fragmentações resultantes da perda de uma e duas moléculas de água são íons bastantes abundantes em 8-C e não em 6-C, mas no modo negativo utilizando IT-MS² (50%) as perdas de água só são observadas para isômeros 6-C.

No modo positivo de ionização utilizando os mesmos equipamentos acima somente alterando a energia de colisão no QqToF MS/MS para 30eV, Waridel *et al.* ¹²⁰ encontraram outros íons produtos diagnósticos. O íon produto $^{0,2}X^+$ é característica de ambos os isômeros 6-C e 8-C, no entanto em 6-C é possível observar os íons $^{0,2}X_0^+-CH_2O_2$, $^{0,2}X_0^+-CHO$, $^{0,2}X_0^+-H_2O$, e fragmentações tipo $^{m,n}A_0^+$, enquanto que em isômero 8-C dentre os íons acima somente o íon $^{0,2}X_0^+-CHO$ é visualizado. No modo negativo, outros dados importantes foram notados utilizando IT-MS². Para isovitexina e isoorientina (6-C) são observadas as perdas de uma e duas moléculas de água, o que não é verificado para os isômeros 8-C. Além disso, para isoorientina e isovitexina os íons $[M-H-90]^-$ ($^{0,3}X^-$) apresentaram abundância muito maior quando comparados com os isômeros 8-C ¹¹⁹.

Foram identificados diversos flavonoides C-glicosilados importantes na diferenciação das espécies, dentre esses flavonas (compostos 5 e 8) (FIGURA 3.62) e flavanonas (4, 14 e 17, 19 e 20) (FIGURA 3.63).

FIGURA 3.62 - Flavonas C-glicosiladas presentes nas espécies de *Phyllanthus*

- (4) Naringenina 8-C glucosídeo - $R_1, R_2, R_3,$ e $R_4 = H$
 (14) Naringenina 8-C-6"-O-acetilglucosídeo - $R_1 = H; R_2 = Ac; R_3$ e $R_4 = H$
 (17) Naringenina 8-C-4",6"-O-diacetilglucosídeo - R_1 e $R_4 = H; R_2$ e $R_3 = Ac$
 (19) Eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo - $R_1 = OH; R_2, R_3$ e $R_4 = Ac$
 (20) Naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo - $R_1 = OH; R_2, R_3$ e $R_4 = Ac$

FIGURA 3.63 -Flavanonas C-glicosiladas presentes nas espécies de *Phyllanthus*

Os compostos **5** e **8** foram inferidos como as flavonas 8-C-glicosiladas orientina e vitexina, respectivamente, presentes exclusivamente em *P. niruri* (FIGURA 3.64 e 3.65).

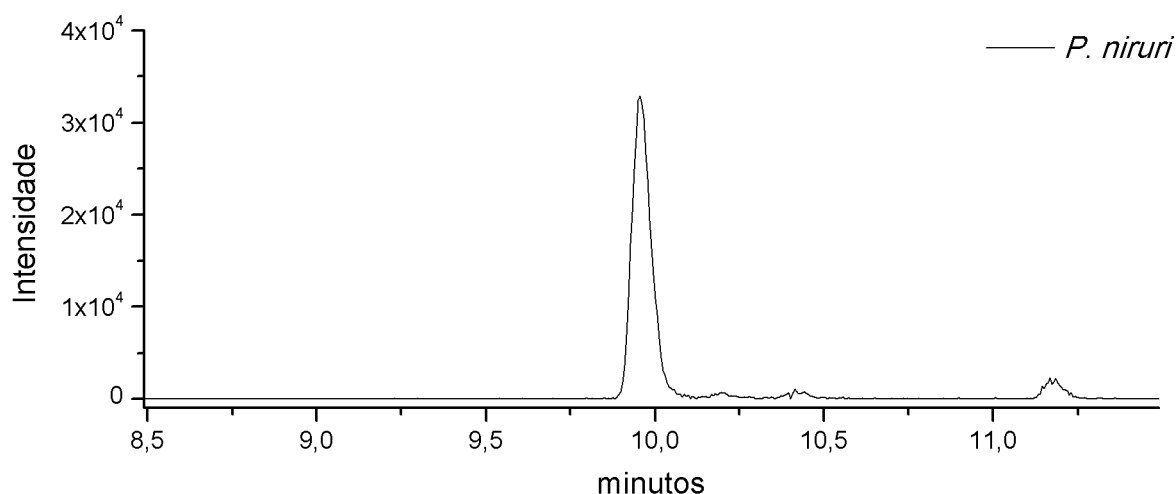


FIGURA 3.64 - Cromatograma do íon extraído de m/z 447,093 referente ao composto 5

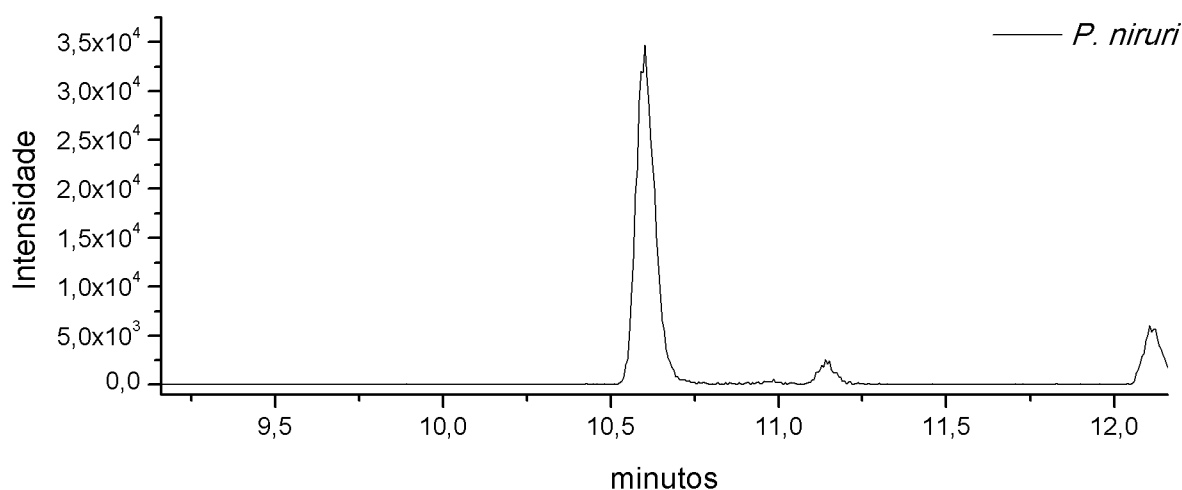


FIGURA 3.65 - Cromatograma do íon extraído de m/z 431,099 referente ao composto 8.

Os experimentos de MS/MS no modo positivo de ionização utilizando os analisadores de massas QqToF (30eV) e IT revelaram clivagens típicas do anel sacarídico como o íon $^{0,2}X^+$ de m/z 329 e 313 para orientina e vitexina, nessa ordem. Além disso, a alta abundância dos sinais referentes as perdas de neutras de moléculas de água sugerem glicosilação na posição 8 (FIGURAS 3.66 e 3.67). Aumentando a energia de colisão em QqToF para 40eV, procurou-se pelos outros íons diagnósticos propostos por Waridel *et al*¹²⁰. Tanto nos espectros obtidos no IT (FIGURAS 3.66B e 3.67B) quanto no QqToF (FIGURAS 3.68 e 3.69) foi verificado o íon $^{0,2}X^+-H_2O$, íon diagnóstico de 6-C, mas em reduzida intensidade. Os demais íons

não foram observados, exceto o íon resultante da clivagem $^{0,2}X^+-CHO$, no entanto, este íon não apresentou elevada intensidade como reportado para flavonoides 8-C glicosilados. Em CID de baixa energia no modo positivo somente as perdas de água estavam em conformidade com os dados encontrados por Waridel *et al.*¹²⁰ sendo as demais fragmentações não observadas na abundância relatada. Somente ao elevar a energia de colisão para 50eV o íon $^{0,2}X^+-CHO$ típico de isômeros 8-C foi observado em elevada abundância relativa (FIGURAS 3.70 e 3.71).

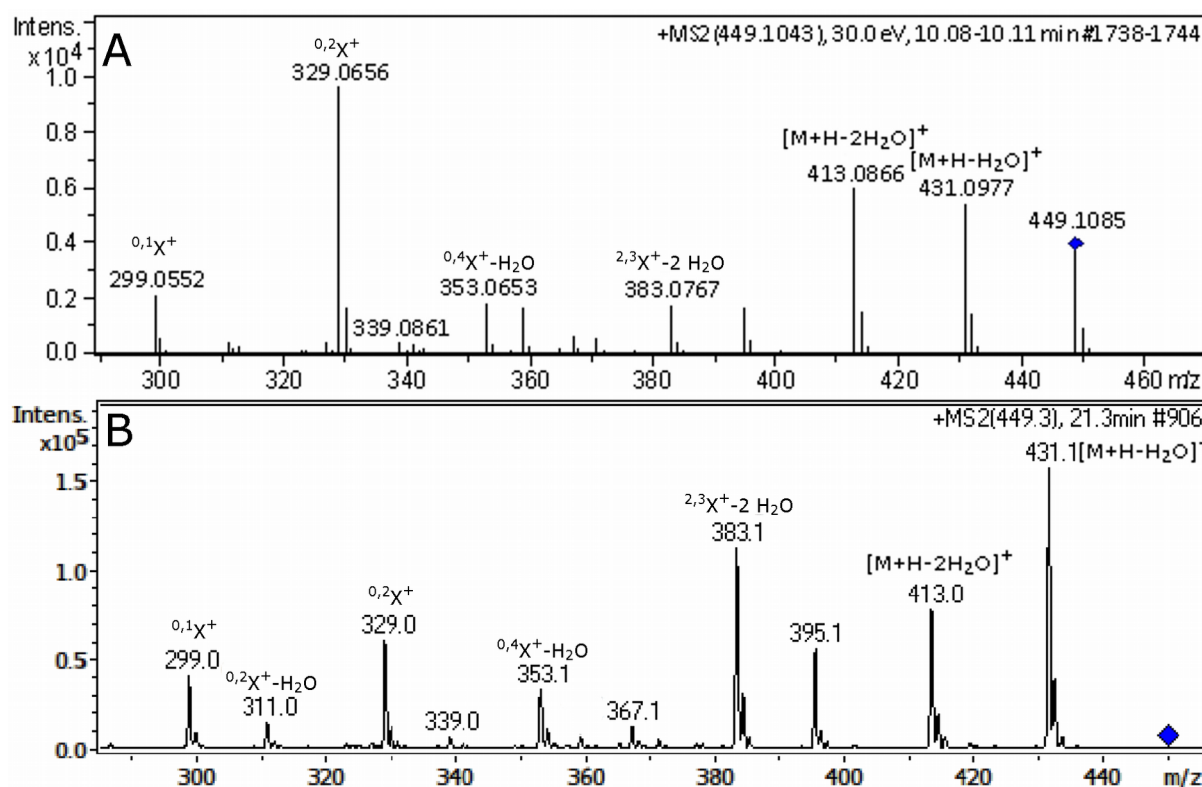


FIGURA 3.66 - Espectros MS/MS do composto 5 (orientina) de m/z 449. A - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(+) IT MS² (1V).

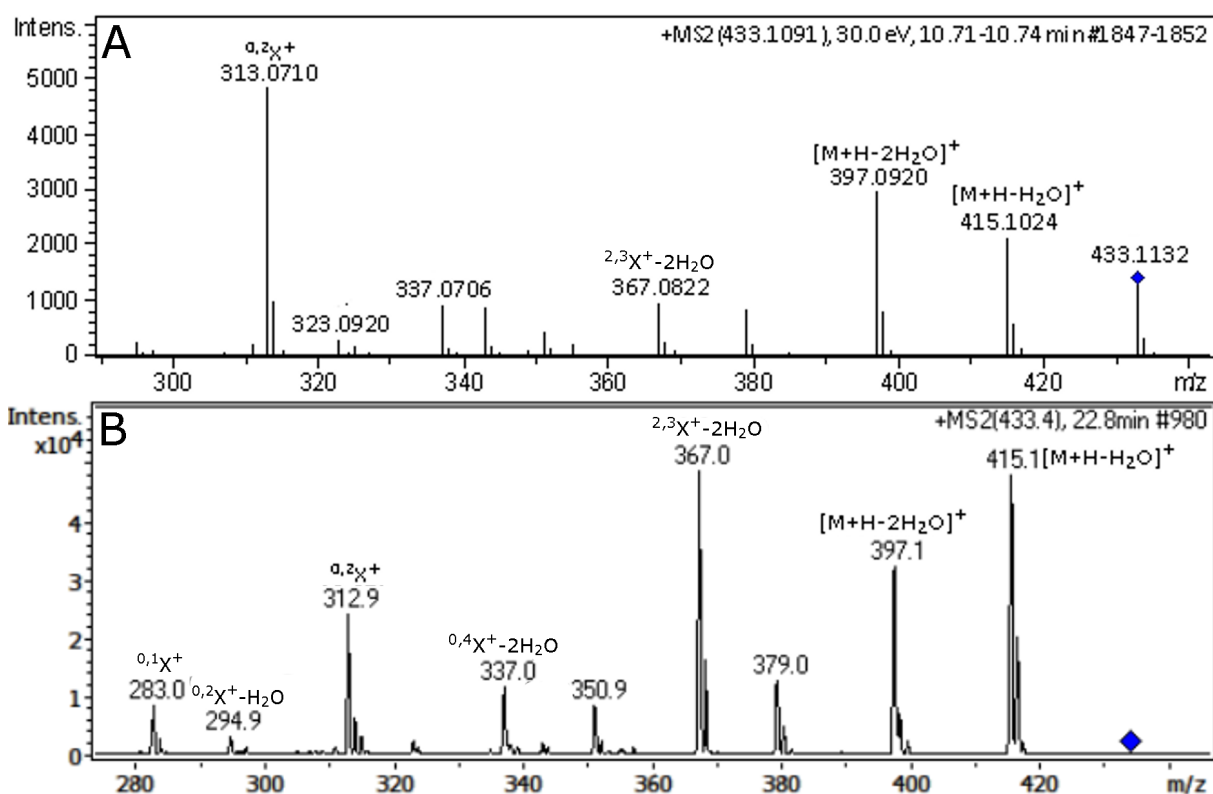


FIGURA 3.67 - Espectros MS/MS do composto 8 (vitexina) de m/z 433. A - Espectro ESI(+)-QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(+)-IT MS² (1V).

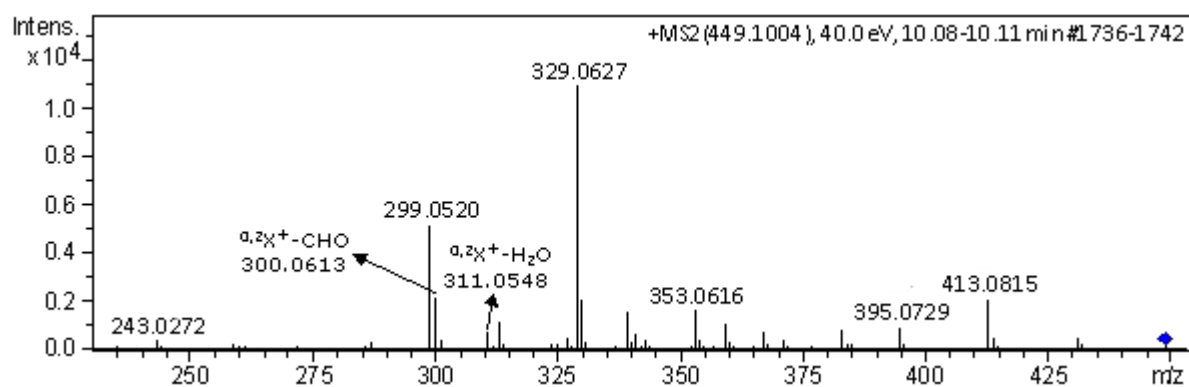


FIGURA 3.68 - Espectro ESI(+)-QqToF MS/MS (40eV) do composto 5 (orientina) de m/z 449.1004.

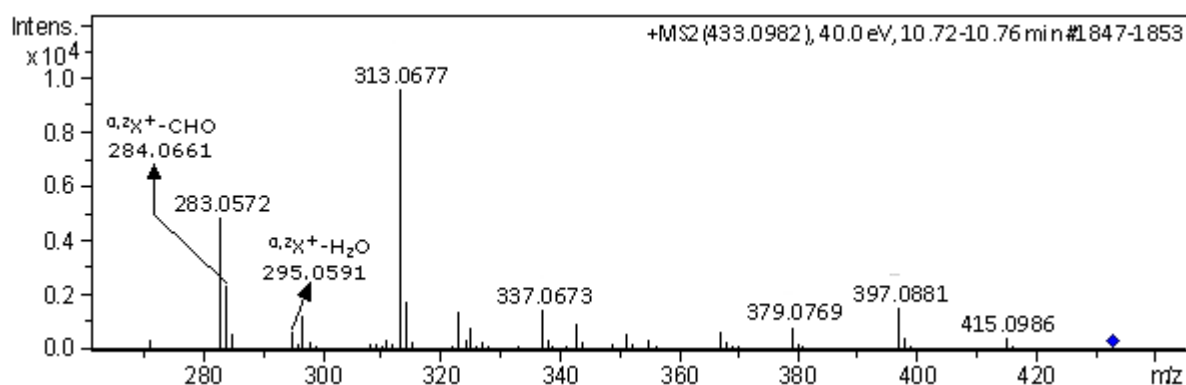


FIGURA 3.69 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 8 (vitexina) de m/z 433.0982.

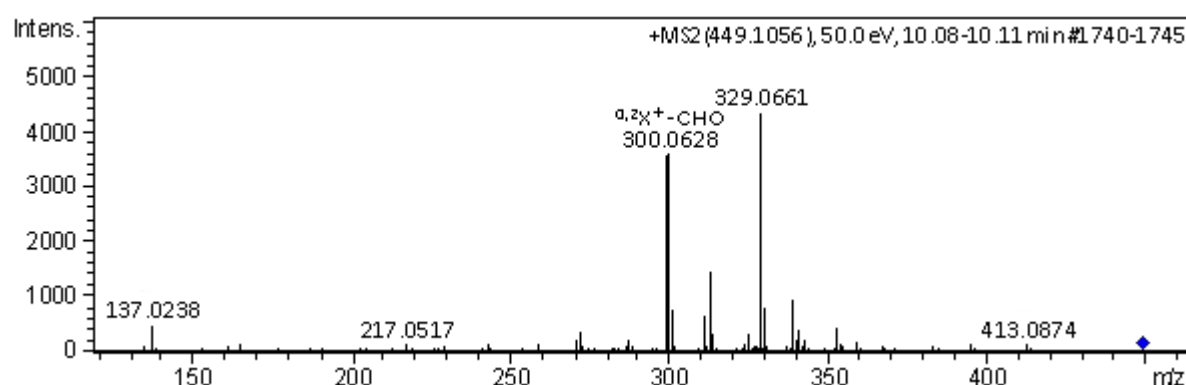


FIGURA 3.70 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (50eV) do composto 5 (orientina) de m/z 449.1056.

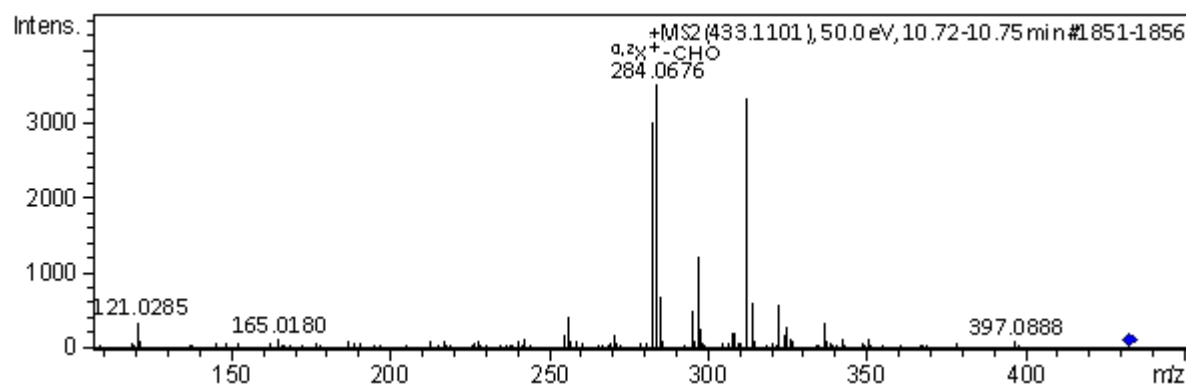


FIGURA 3.71 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (50eV) do composto 8 (vitexina) de m/z 433.1101.

No modo negativo de ionização os perfis de fragmentação tanto por IT quanto por QqToF (30eV) foram muito semelhantes. Para ambos metabólitos a quebra $^{0,2}X^-$ foi significativamente mais intensa que $^{0,3}X^-$, além de não apresentar os

íons concernentes a perda de moléculas de água, o que consiste em forte indicativo de ligação 8-C^{119,120} (FIGURAS 3.72 e 3.73).

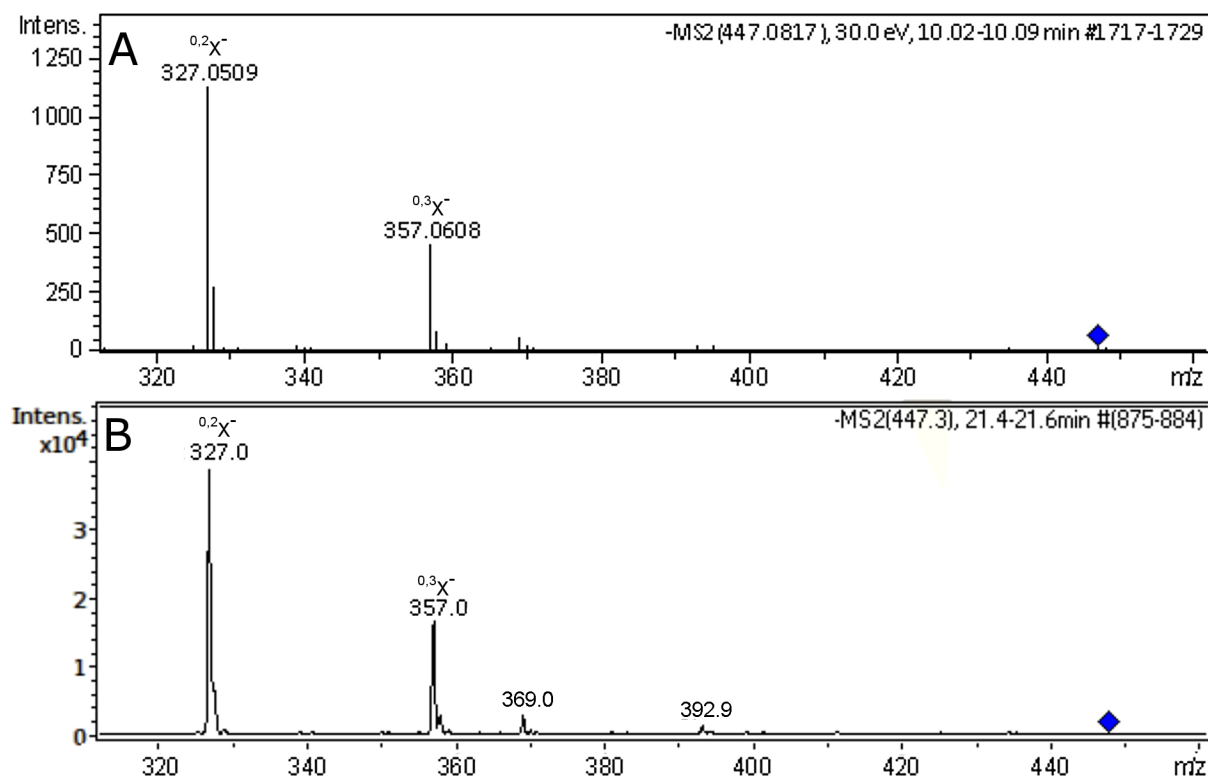


FIGURA 3.72 - Espectros MS/MS do composto 5 (orientina) de m/z 449. A - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(-) IT MS² (1V).

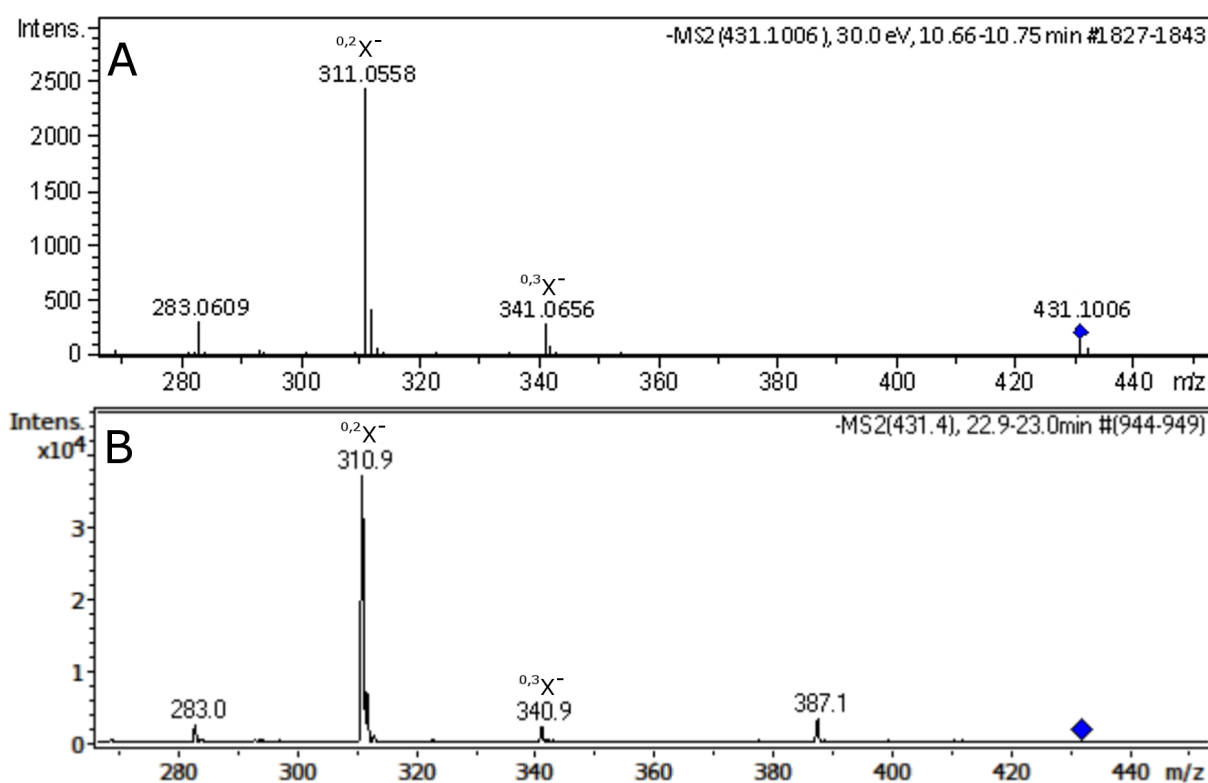


FIGURA 3.73 - Espectros MS/MS do composto 8 (vitexina) de m/z 449. A - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (30eV); B - Espectro ESI(-) IT MS² (1V).

As flavanonas C-glicosiladas **4**, **14**, **17** constituem-se importantes marcadores químicos da espécie *P. stipulatus*, embora estejam presentes em reduzidas concentrações em *P. tenellus* (FIGURA 3.74-3.76). Destaca-se o composto **17** identificado como naringenina-8-C-4",6"-diacetilglucosídeo reportado pela primeira vez. Por outro lado, os compostos **19** e **20** são compostos inéditos de grande importância na caracterização de *P. tenellus* (FIGURA 3.77 e 3.78). O modelo de PCA revelou que o composto **19** também estava presente em *P. niruri*, mas uma avaliação cuidadosa do t_R e espectro de MS/MS revelou que esse composto não era o mesmo presente *P. stipulatus*.

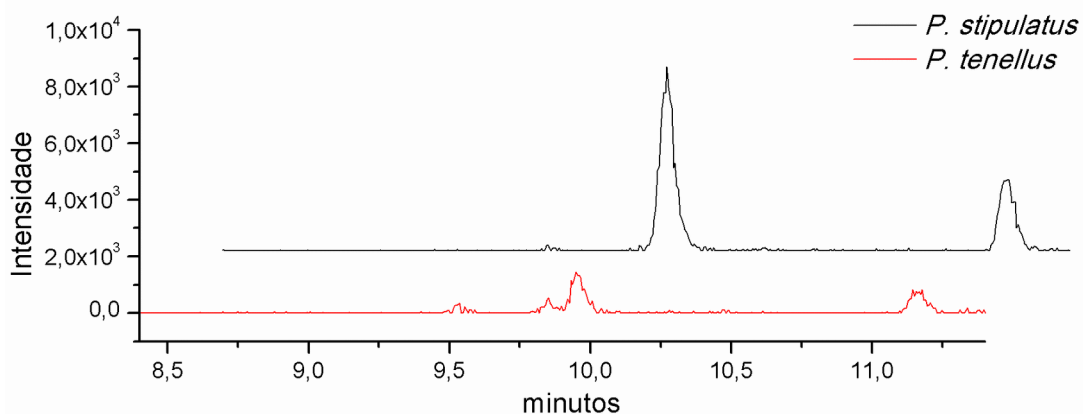


FIGURA 3.74 - Cromatograma do íon extraído de m/z 433,125 referente ao composto 4.

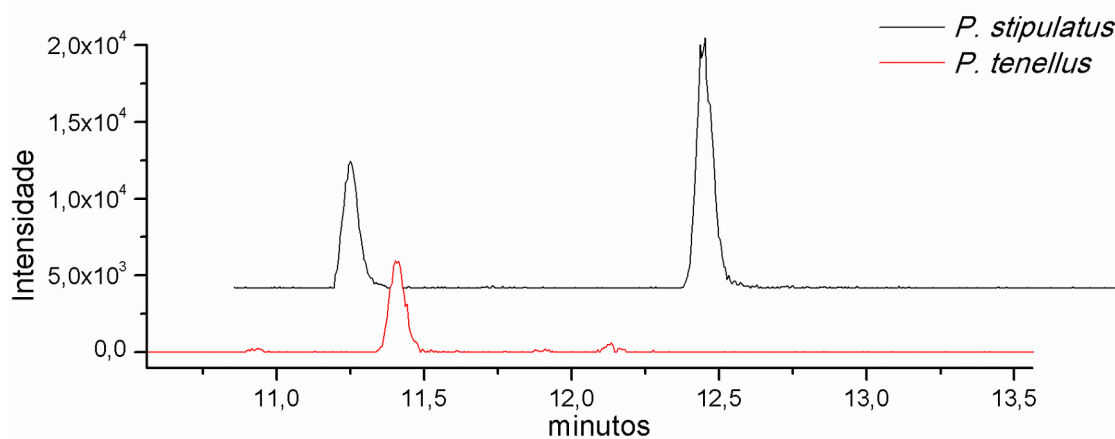


Figura 3.75 - Cromatograma do íon extraído de m/z 475,114 referente ao composto 14

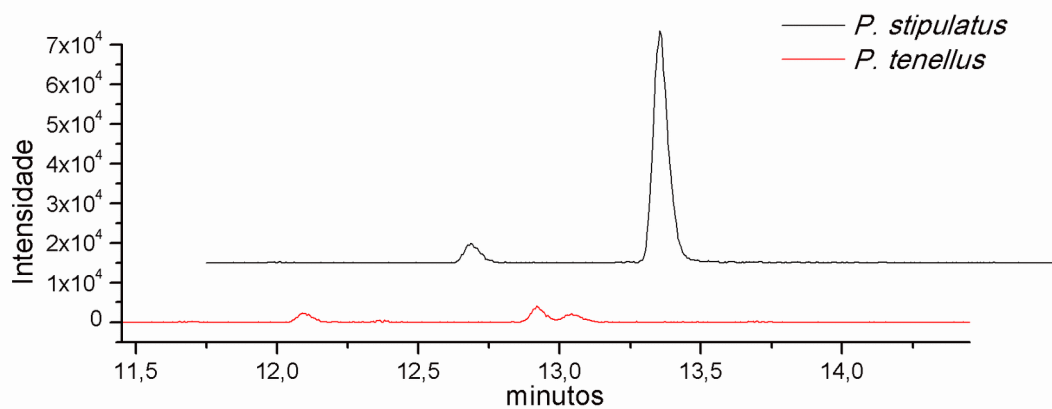


FIGURA 3.76 - Cromatograma do íon extraído de m/z 517,135 referente ao composto 17

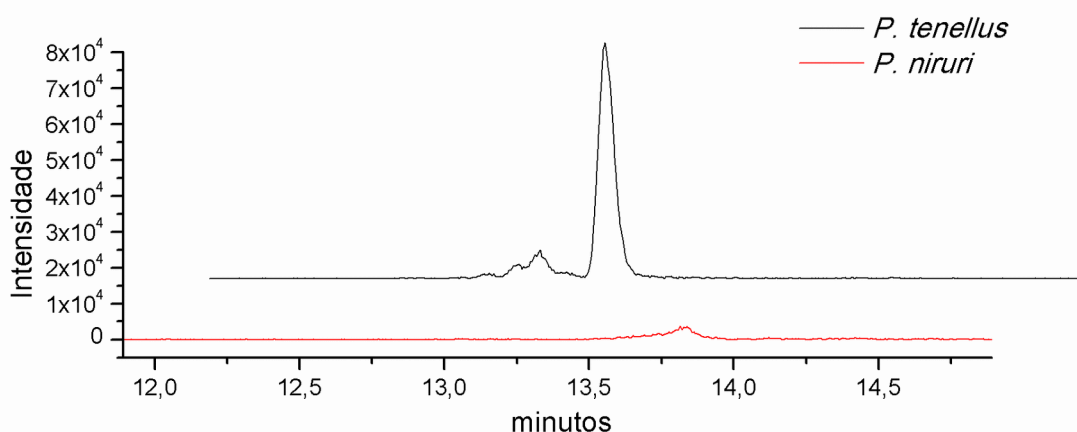


FIGURA 3.77 - Cromatograma do íon extraído de m/z 575,141 referente ao composto 19.

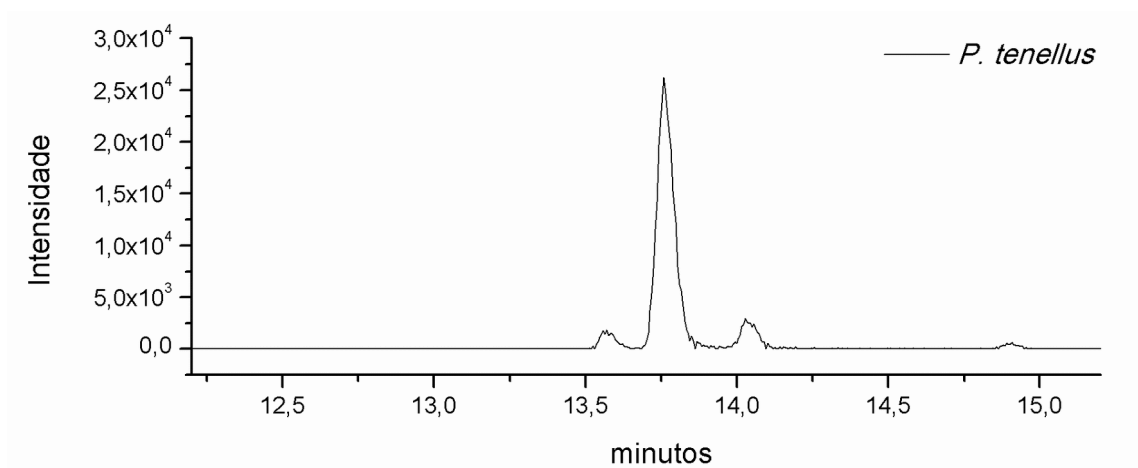


FIGURA 3.78 - Cromatograma do íon extraído de m/z 559,146 referente ao composto 20

Experimentos de íons produtos no modo positivo de ionização revelaram que todas as flavanonas identificadas são C-glicosiladas em virtude de apresentarem os íons relacionados às quebras cruzadas do anel sacarídico, destacando a quebra $^{0,2}X^+$. Adicionalmente, foram observados os íons concernentes à reação de retro Diels-Alder do anel C ($^{1,3}A_0^+$) para os compostos **4**, **14**, **17** (FIGURAS 3.79-3.83). As perdas de 60 Da para os compostos **14**, **17**, **19** e **20** evidenciam a presença de grupos acetatos. O posicionamento da maioria desses grupos pode ser determinada verificando as quebras cruzadas do anel sacarídico. A clivagem cruzada do anel heterosídico $^{0,4}X_0-2 H_2O$, por exemplo, resultam em perdas neutras diferentes para o composto **4**, não acetilado, e os compostos **14** e **17** que

apresentam, respectivamente, um e dois grupos acetil. No primeiro a perda neutra corresponde a $96u$, enquanto que para os outros dois representa $138u$. Esta diferença atesta a presença de um grupo acetil obrigatoriamente na posição 6 da glucose. Na presença de três grupos acetilas (compostos **19** e **20**), a quebra cruzada $^{0,4}X_0$ é acompanhada da perda de grupo acetato e água [$^{0,4}X_0 - H_2O - Ac + H$] $^+$, resultando na perda de 180 Da. Ademais, para os compostos **19** e **20** a clivagem cruzada do anel $^{0,2}X_0$ resulta em perda de $204u$, o que é explicado pela presença de dois grupos acetilas na posição 6" e 3" ou 4". Dessa forma, o terceiro grupo está provavelmente ligado a posição 2".

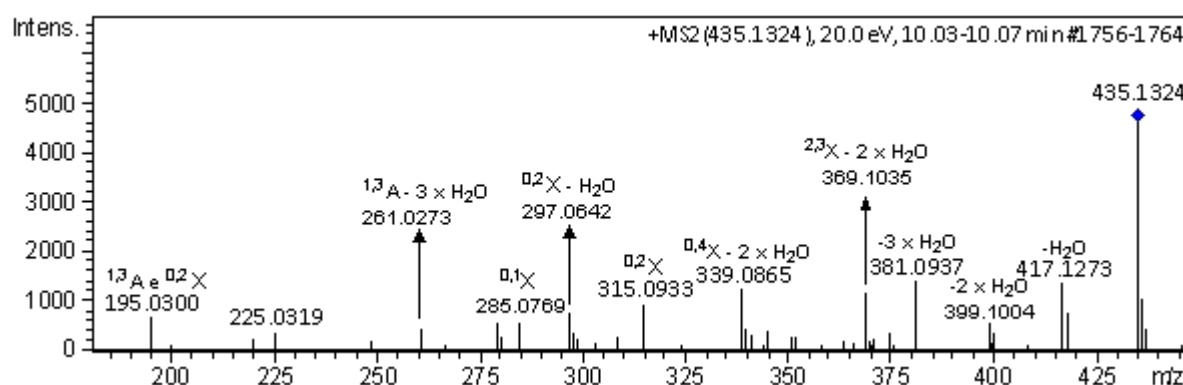


FIGURA 3.79 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 4 (naringenina-8-C-glucosídeo) de m/z 435.1324.

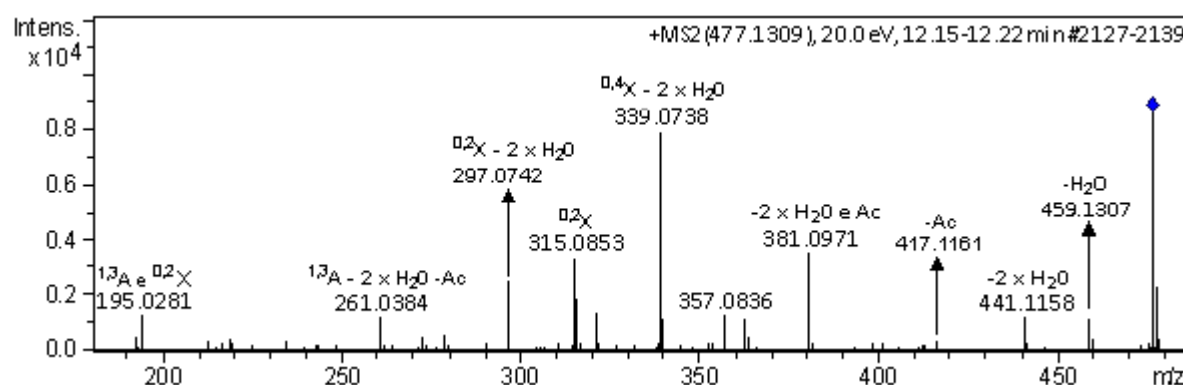


FIGURA 3.80 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 14 (naringenina-8-C-6''-O-acetilglucosídeo) de m/z 477,1309.

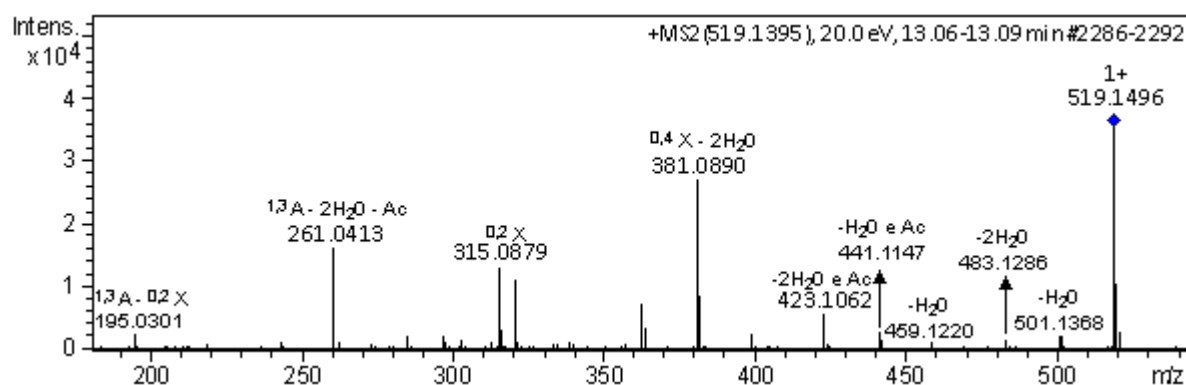


FIGURA 3.81 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 17 (naringenina-8-C-4'',6''-O-diacetilglucosídeo) de m/z 519,1395.

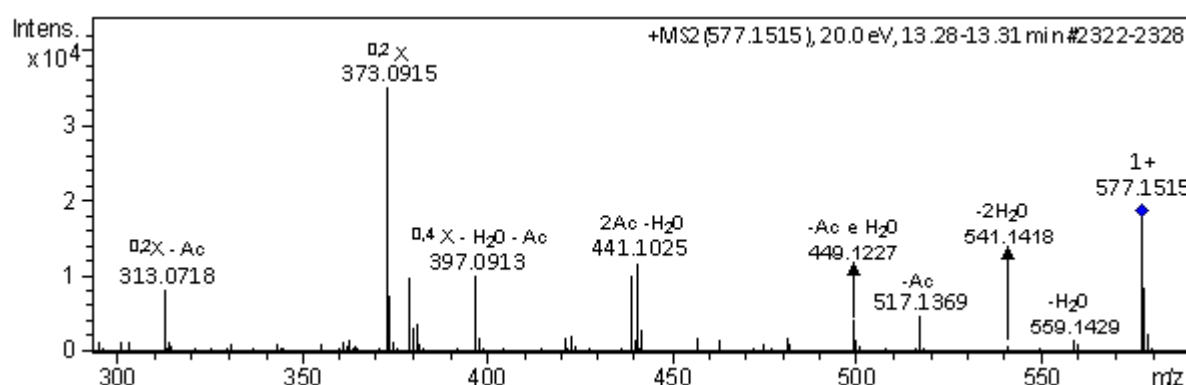


FIGURA 3.82 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 19 (eridictiol-8-C-2'',4'',6''-O-triacetilglucosídeo) de m/z 519,1395.

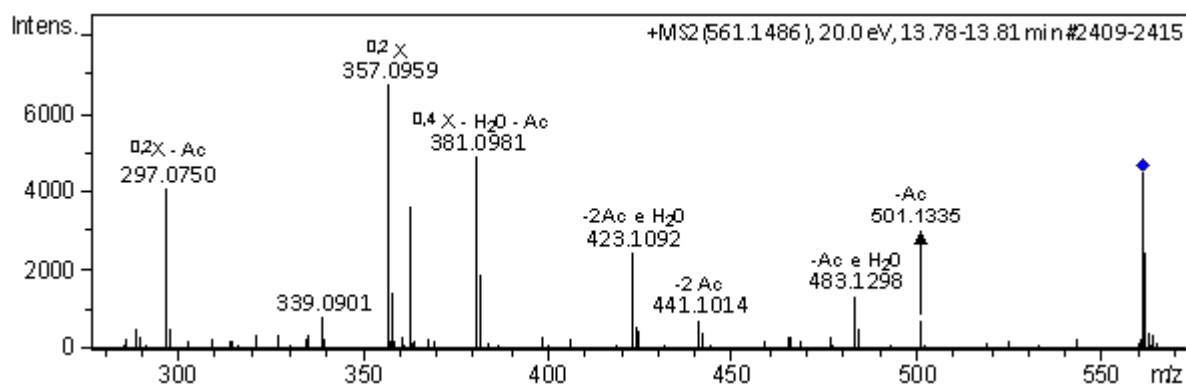


FIGURA 3.83 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (20eV) do composto 20 (naringenina-8-C-2'',4'',6''-O-triacetilglucosídeo) de m/z 519,1395.

A fragmentação no modo negativo de ionização com energia de colisão de 20eV demonstraram menor quantidade de íons produtos que no modo positivo. Destacam-se as quebras cruzadas do anel glicosídico $^{0,2}X_0^-$ e $^{0,3}X_0^-$, sendo que a

última não é observada em compostos com mais de um grupo acetila. As perdas de moléculas de água e ácido acético são também observadas em pequena abundância. Nos compostos com mais de dois grupos acetilas a eliminação do primeiro grupo constitui-se um dos principais sinais no espectro (FIGURAS 3.84-3.88). A 40eV de energia de colisão evidenciam-se os íons produtos resultantes das fragmentações do núcleo flavonoídico acompanhado de quebra cruzada do anel ($^{0,2}X_0^-$). Os principais íons são resultantes da reação de retro Diels-Alder, a saber, $^{1,3}A_0^-$ e $^{1,3}B_0^-$ (FIGURAS 3.89-3.93). No composto **20** o íon de m/z 175 é resultado da perda de ácido acético através de rearranjo seguido de quebra $^{0,2}X_0^-$ e retro Diels-Alder ($^{1,3}A_0^-$) (FIGURA 3.94). Esse íon produto é de extrema importância, pois revela a existência de grupo acetila na posição 2". O composto **19** também apresentou o íon de m/z 175, no entanto, observou-se outros íons produtos mais intensos de m/z 161 e 149, os quais não puderam ser explicados.

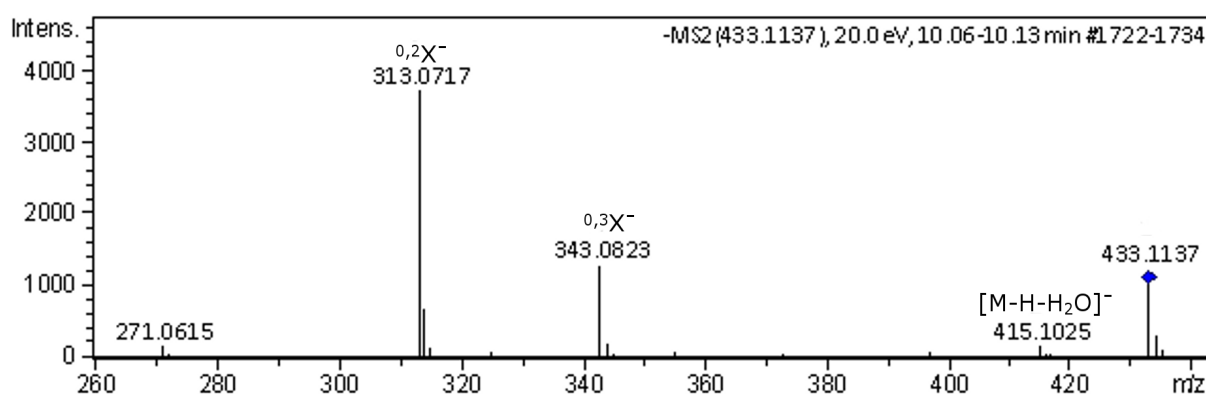


FIGURA 3.84 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 4 (naringenina-8-C-glucosídeo) de m/z 433,1137.

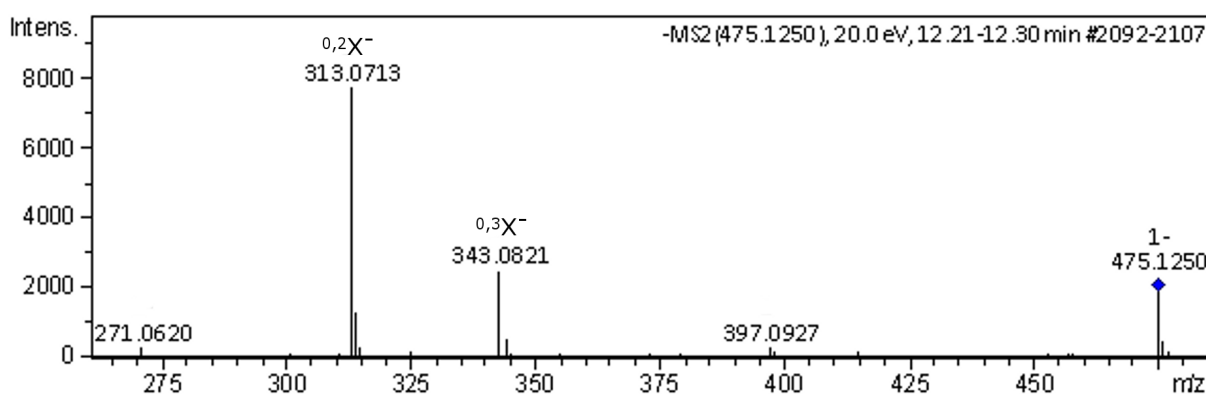


FIGURA 3.85 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 14 (naringenina-8-C-6''-O-acetilglucosídeo) de m/z 475,1250.

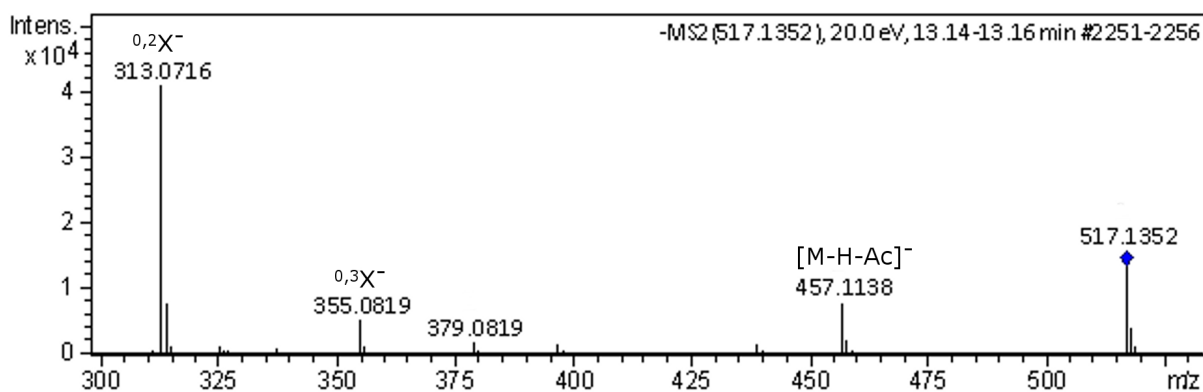


FIGURA 3.86 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 17 (naringenina-8-C-4",6"-O-diacetilglucosídeo) de m/z 517,1352.

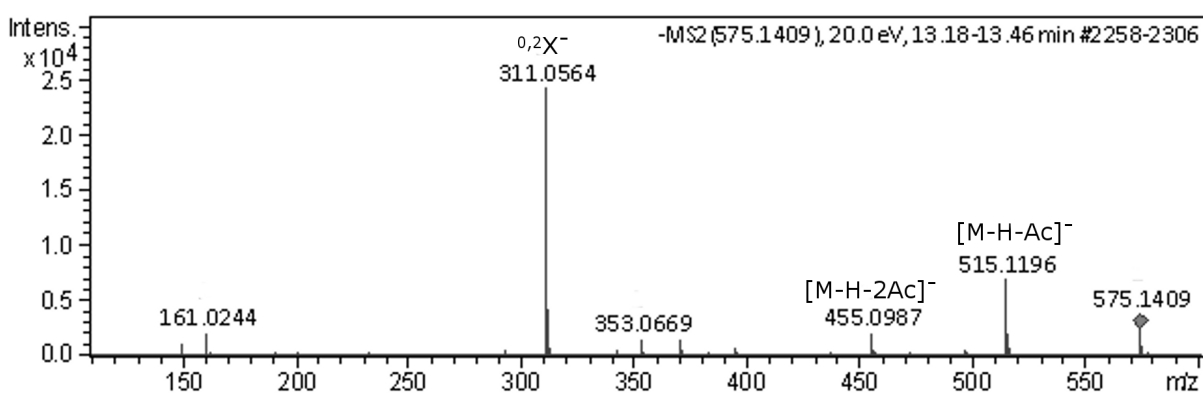


FIGURA 3.87 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 19 (eridictiol-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 575,1409.

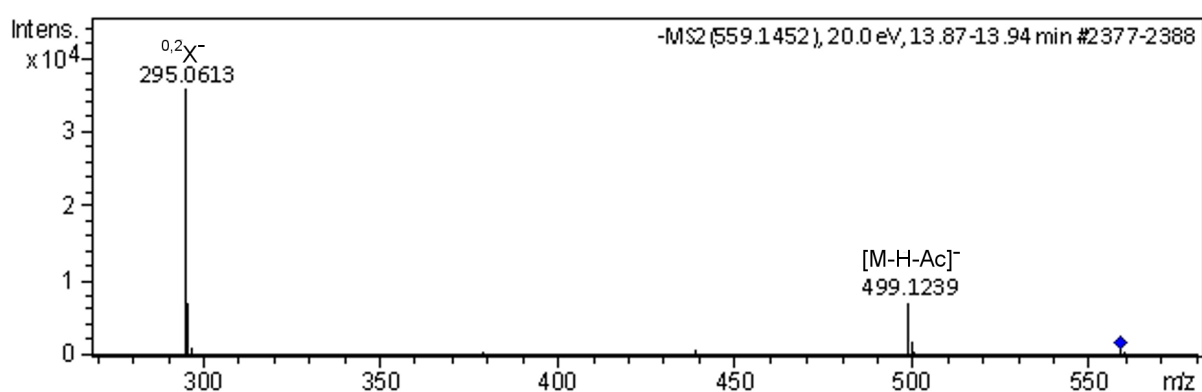


FIGURA 3.88 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (20eV) do composto 20 (naringenina-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo) de m/z 559,1452.

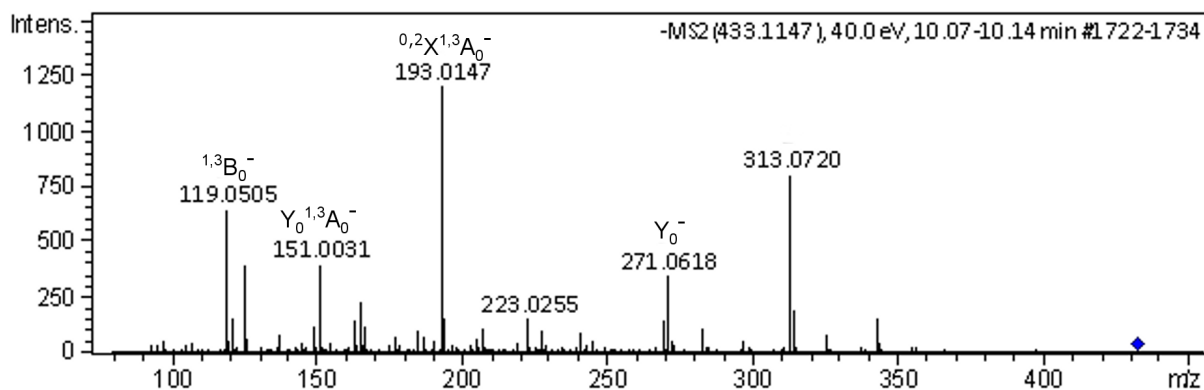


FIGURA 3.89 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 4 (naringenina-8-C-glucosídeo) de m/z 433,1147.

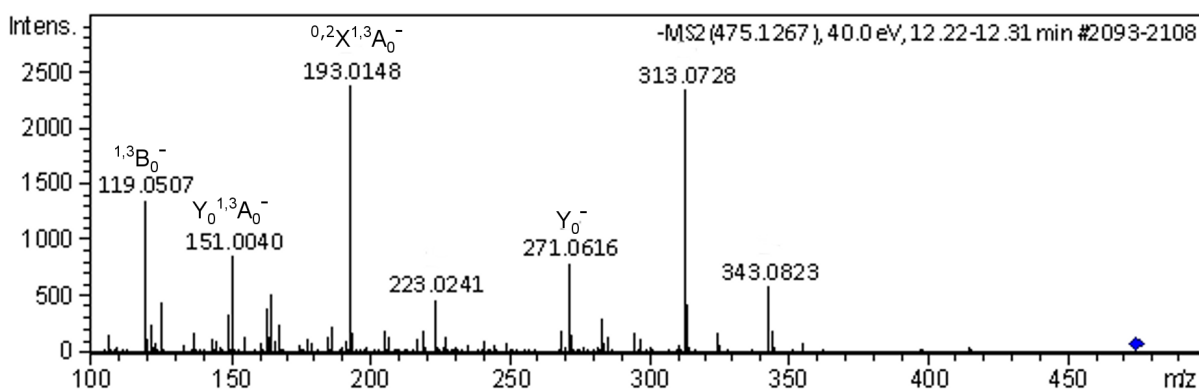


FIGURA 3.90 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 14 (naringenina-8-C-6''-O-acetilglucosídeo) de m/z 475,1267.

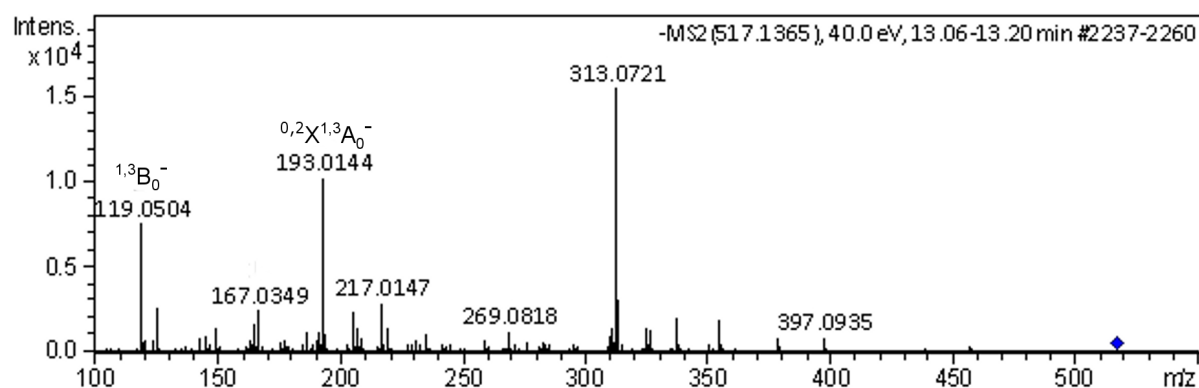


FIGURA 3.91 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 17 (naringenina-8-C-4'',6''-O-diacetilglucosídeo) de m/z 517,1365.

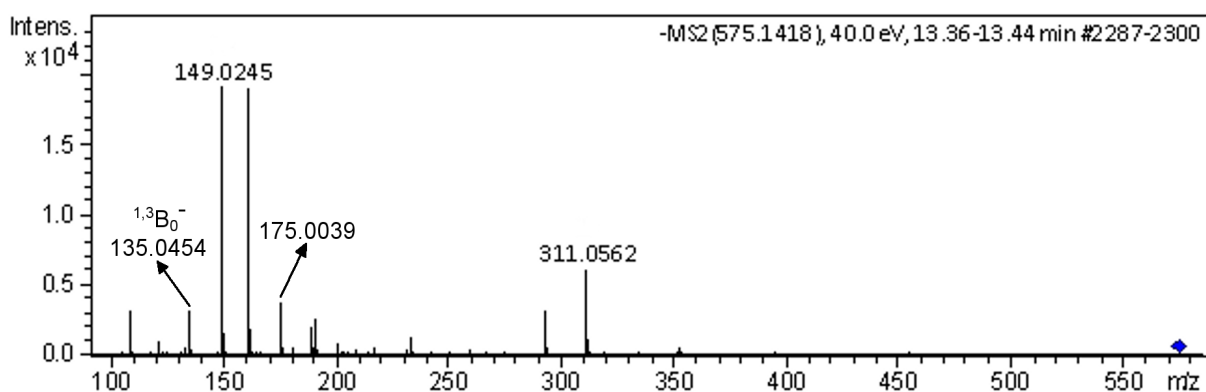


FIGURA 3.92 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 19 (eridictiol-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucósídeo) de m/z 575,1418.

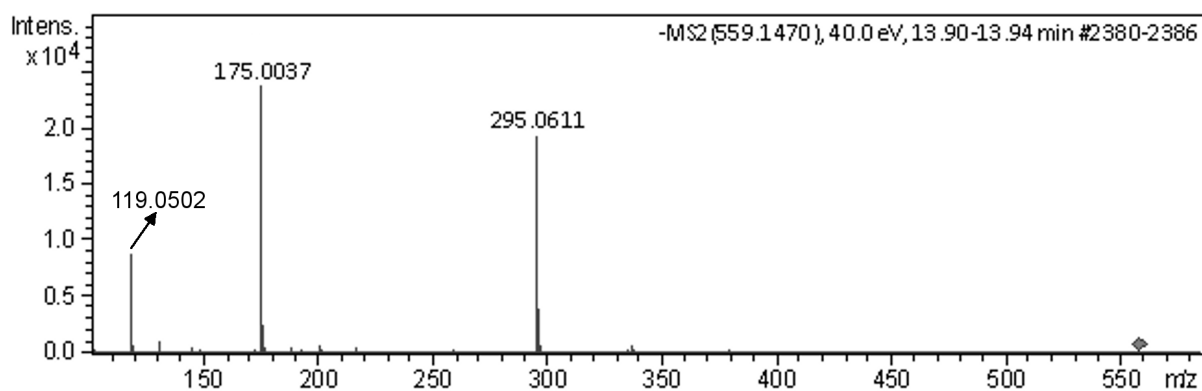


FIGURA 3.93 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 20 (naringenina-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucósídeo) de m/z 559,1470.

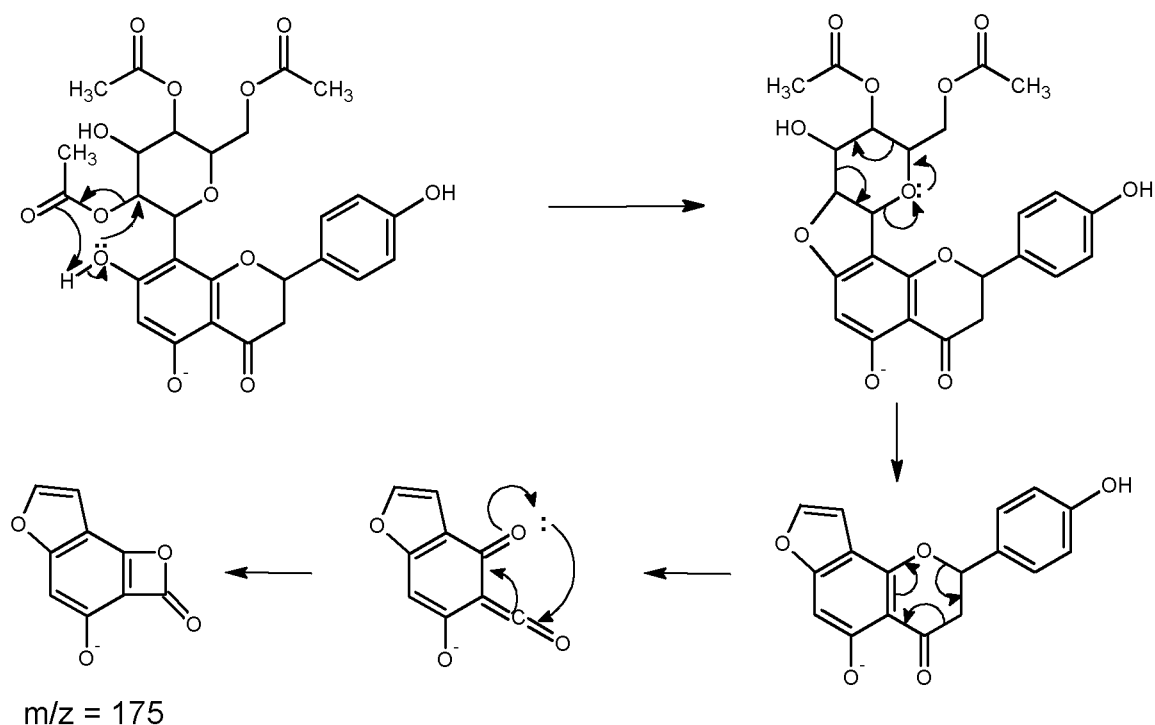


FIGURA 3.94 - Rota de fragmentação de flavanonas C-glicosiladas com acetilação na posição 2''.

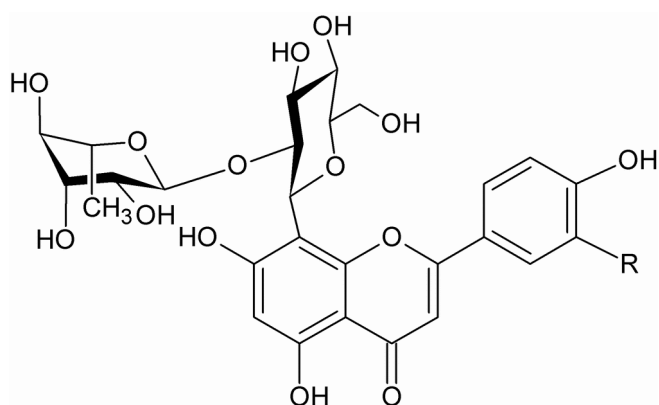
Os dados de fragmentação de Waridel *et al*¹²⁰ para flavonas C-glicosiladas foram usados como modelo para explicar as clivagens de flavanonas C-glicosiladas, uma vez que não foram encontrados trabalhos sobre fragmentações dessa classe. Nos espectros de MS/MS, em modo positivo de ionização e a baixa energia de colisão, os principais íons produtos da fragmentação do composto **4** foram aqueles resultantes de perda de moléculas de água, o que corrobora para o isômero 8-C. No entanto, para os compostos acetilados **14** e **17** a intensidade das perdas de moléculas de água ou ácido acético é pouco expressiva, em contrapartida, perdas de moléculas de ácido acético e água são mais abundantes nos compostos **19** e **20** que apresentam grupo acetil na posição 2'', embora os mesmos não sejam os íons principais no espectro. A maior intensidade nesse último caso, talvez se deva ao fato da substituição na posição 2'' do grupo hidroxila por acetil. O grupo hidroxila pode formar ligação de hidrogênio com o oxigênio do éster no anel C, dificultando a livre rotação do açúcar, a aproximação das hidroxilas 2'' e 7 e conseqüentemente a perda de água por reação rearranjo (FIGURA 3.94). Na ausência do grupo hidroxila a ligação de hidrogênio não ocorreria e ademais, o

grupo acetil, mais volumoso, se posicionaria predominantemente de modo contrário ao anel C reduzindo a repulsão eletrônica, e portanto facilitando o rearranjo com eliminação de ácido acético. Waridel *et al.*¹²⁰ também não observaram a 20eV perdas procedentes de retrociclicações do anel C em flavonas 8-C glicosiladas, as quais foram notadas em todas as flavanonas C-glicosiladas. Dessa forma, o modelo proposto por Waridel no modo positivo de ionização para flavonas não é totalmente adequado para flavanonas C-glicosiladas especialmente as acetiladas.

No modo negativo de ionização, os íons produtos referentes a perda de água e/ou ácido acético apresentaram pequena intensidade, exceto para os compostos **19** e **20**, cuja explicação já foi descrita. Além disso, em nenhum dos compostos a quebra cruzada $^{0,3}X_0^-$ superou a intensidade de 40% em relação ao íon $^{0,2}X_0^-$, e inclusive não foi observado quando o número de acetilações era superior a 2^{119,120}. No modo negativo de ionização foi observado um forte indicativo de ligação glicosídica 8-C. Para elucidação inequívoca dos regioisômeros faz-se necessário um estudo de padrões de fragmentação de flavanonas 6-C e 8-C-acetilglicosilados.

3.3.3.3.3 - Flavonas-O,C-diglicosiladas

Exclusivamente no extrato de *P. niruri* foram encontradas duas flavonas O,C-diglicosiladas (FIGURA 3.95) identificadas como orientina-2"-O-ramnosídeo (**6**) (FIGURA 3.96) e vitexina-2"-O-ramnosídeo (**9**) (FIGURA 3.97).



- (6) Orientina-2''-O-ramnosídeo - R = OH
(9) Vitexina-2''-O-ramnosídeo - R = H

FIGURA 3.95 - Estrutura química das flavonas O,C-diglicosiladas presentes em *P. niruri*.

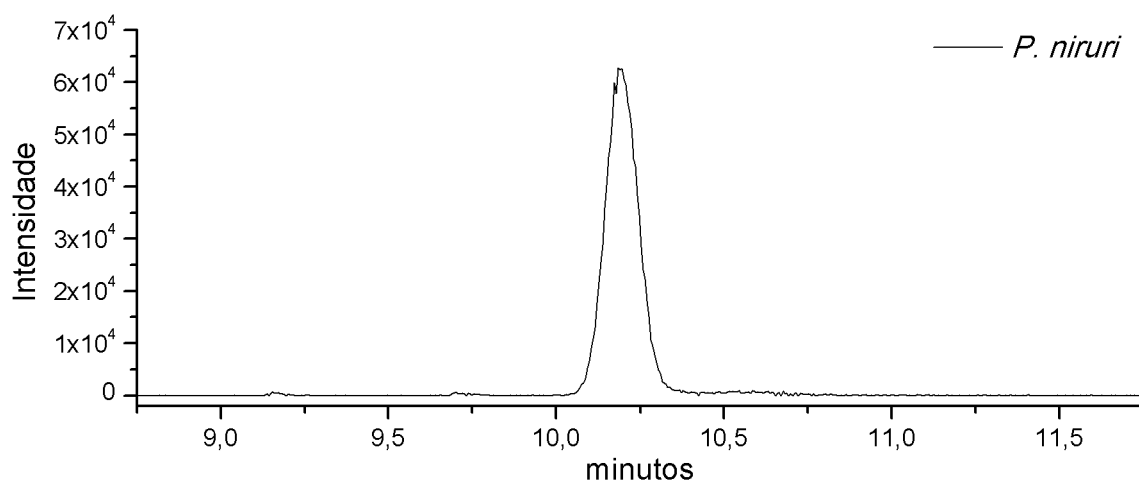


FIGURA 3.96 - Cromatograma do íon extraído de m/z 593,151 referente ao composto 6.

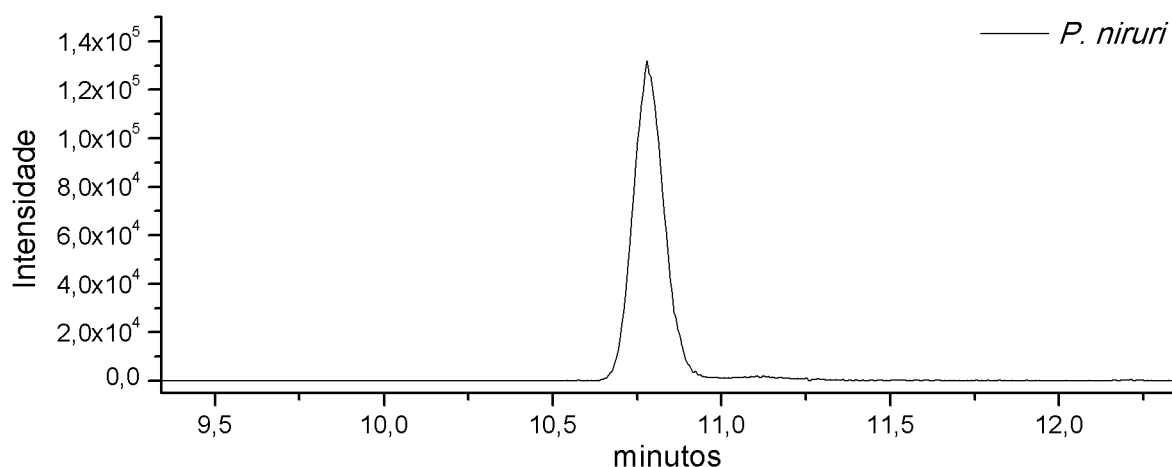


FIGURA 3.97 - Cromatograma do íon extraído de m/z 577,157 referente ao composto 9.

Os experimentos de íons produtos no modo negativo de ionização utilizando QqToF MS/MS com energia de colisão de 30eV (FIGURA 3.98 e 3.99) e IT-MS² com amplitude de fragmentação de 1 V (FIGURA 3.100 e 3.101) apresentaram espectros muito semelhantes. Em ambos observam-se a perda de ramnosil (Y_1^+) como pico base, bem como, os íons referentes a quebra Z_1^+ , $[Z_1-H_2O]^+$ e $[Y_1,^{0,2}X]^+$. Em IT-MS² também estão presentes em pequena intensidade outros íons referente a quebra cruzada do anel heterosídico.

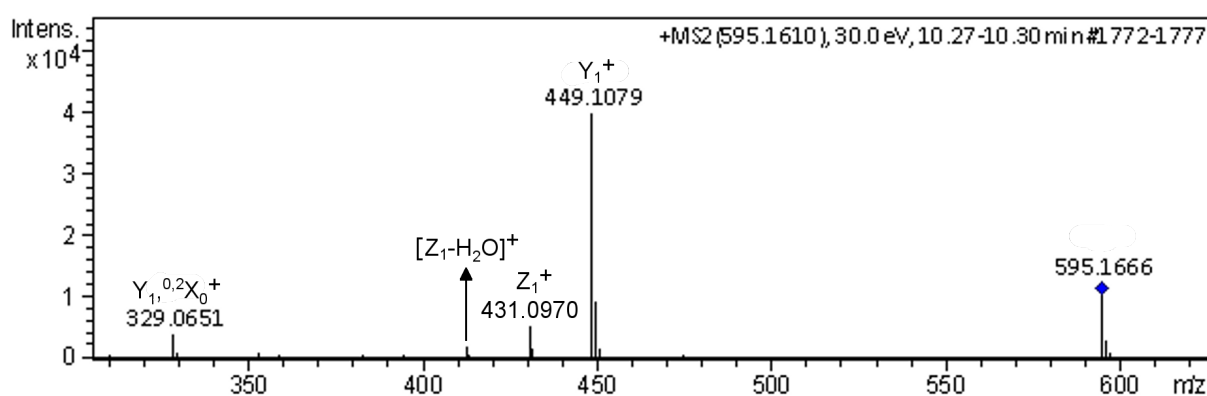


FIGURA 3.98 - Espectro ESI(+)-QqToF MS/MS (30eV) do composto 6 (orientina-2"-O-ramnosídeo) de m/z 595,1610.

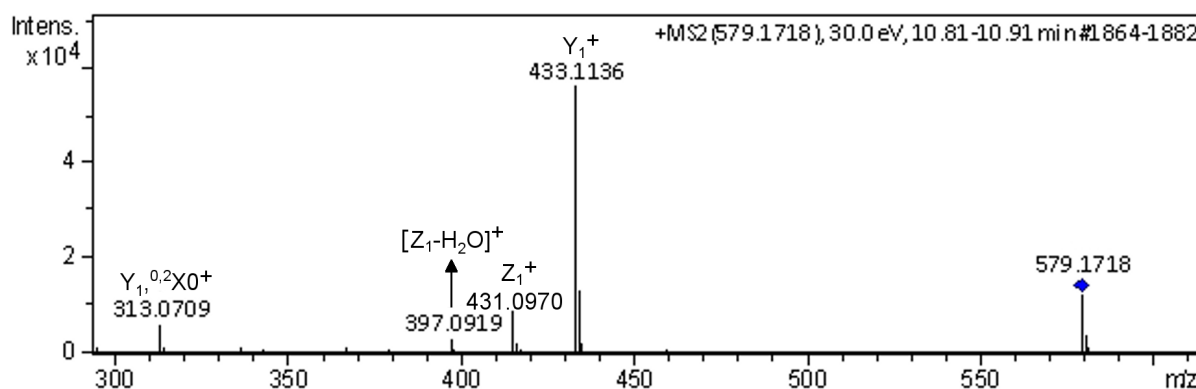


FIGURA 3.99 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (30eV) do composto 8 (vitexina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 579,1718.

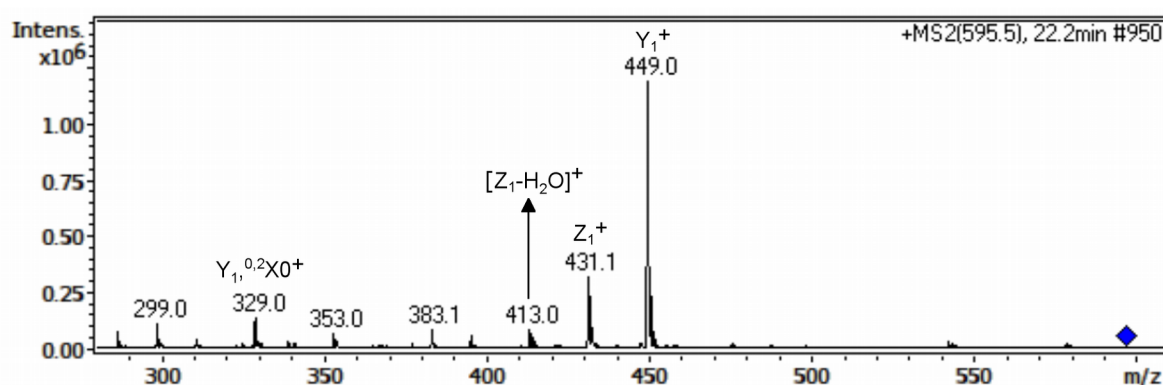


FIGURA 3.100 - Espectro ESI(+) IT-MS² (1V) do composto 6 (orientina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 595,5.

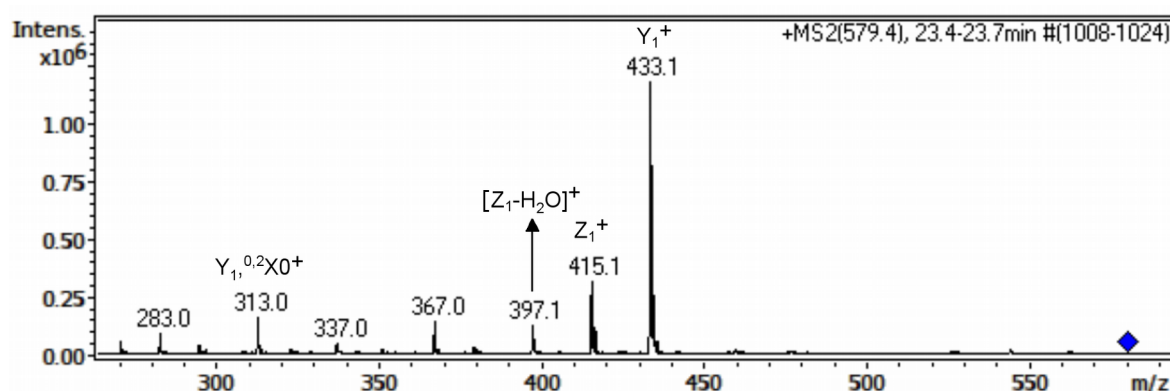


FIGURA 3.101 - Espectro ESI(+) IT-MS² (1V) do composto 8 (vitexina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 579,4.

Tanto em experimentos de IT-MS³ a partir do íon [M+H-146]⁺ (FIGURA 3.102 e 3.103), quanto em QqToF MS/MS com energia de colisão a 40 eV (FIGURA 3.104 e 3.105) para os compostos **6** e **9**, ficou evidente a semelhança com os

espectros das flavonas 8-C glicosiladas orientina (**5**) (FIGURA 3.66) e vitexina (**8**) (FIGURA 3.67), sendo os íons referentes a perdas de moléculas de água os principais íons indicando a glicosilação na posição 8¹²⁰.

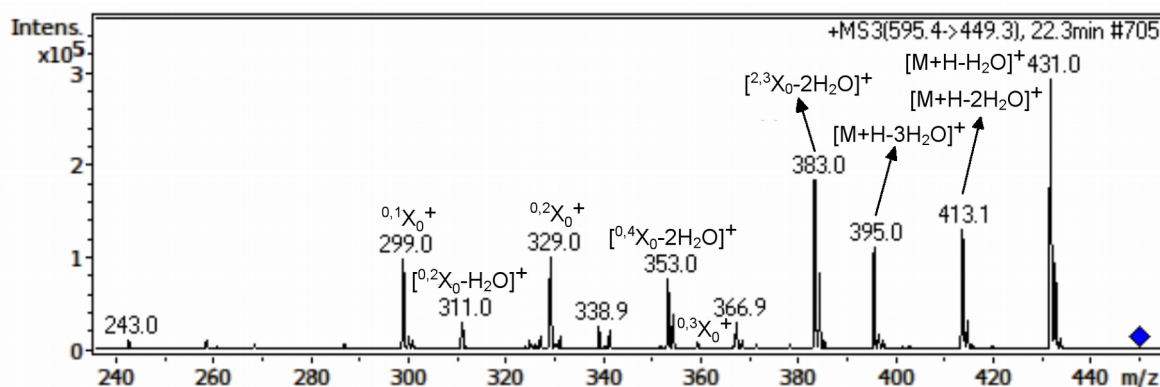


FIGURA 3.102 - Espectro ESI(+) IT MS³ (1V) do composto 6 (orientina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 595.4 → 449.3.

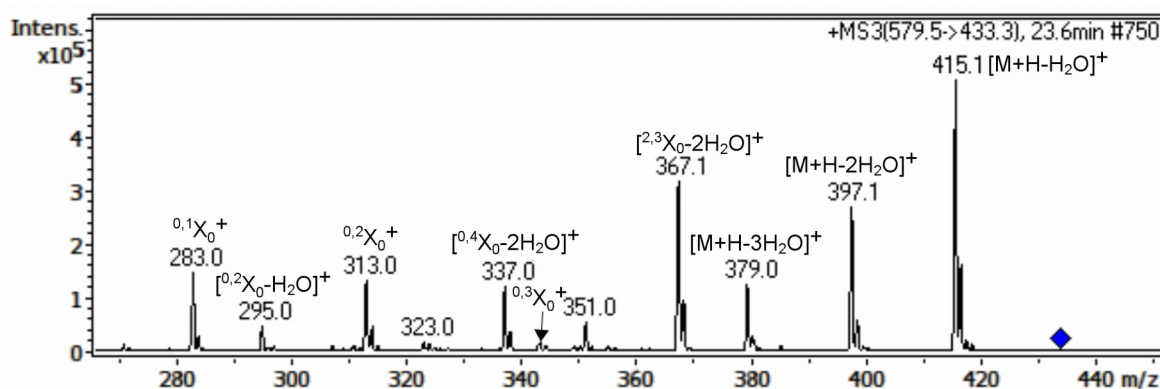


FIGURA 3.103 - Espectro ESI(+) IT MS³ (1V) do composto 8 (vitexina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 579.5 → 433.3.

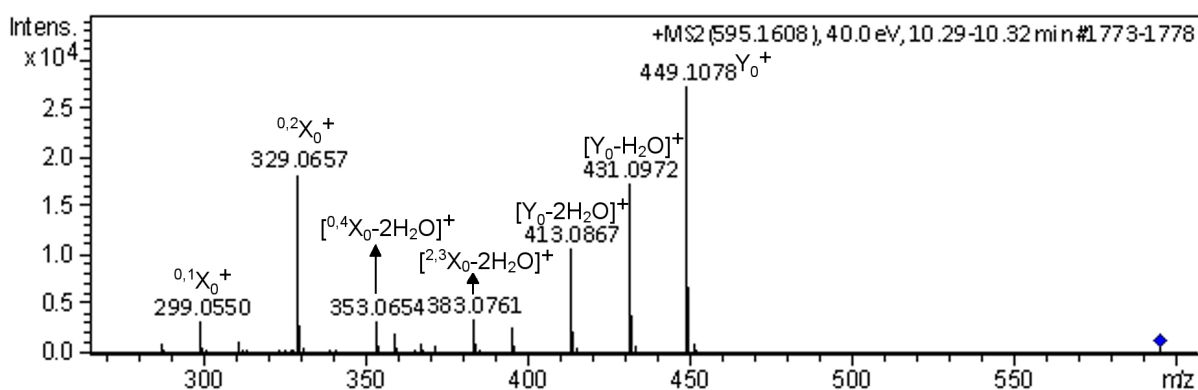


FIGURA 3.104 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 6 (orientina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 595.1608

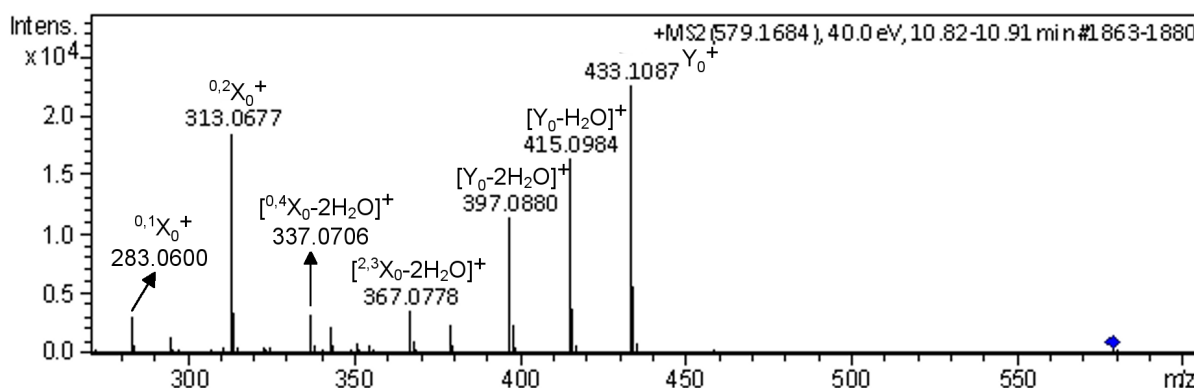


FIGURA 3.105 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 9 (vitexina-2''-O-ranósídeo) de m/z 579.1684

No modo negativo de ionização os experimentos de massas sequencial em ambos os analisadores também foram bastante semelhantes e permitiram definir os compostos **6** e **9** como flavonas-O,C-diglicosiladas (FIGURAS 3.106 e 3.107). A O-glicosilação em flavonas C-glicosiladas pode ocorrer tanto em hidroxilas fenólicas, posições 7 ou 4', como nas hidroxilas do heterosídeo, mais comumente na posição 2''. Essas diferenças são facilmente observadas pela comparação das quebras Y^- e Z^- . Flavonas di-O,C-glicosiladas apresentam a quebra Y_0^- com abundância relativa superior a 90% ¹¹⁶, enquanto que em flavonas O,C-diglicosiladas a quebra Y_1^- apresenta baixa intensidade e o pico base é representado pelo íon da fragmentação Z_1^- , originado do rearranjo semelhante ao explicado na FIGURA 3.94 ¹²¹.

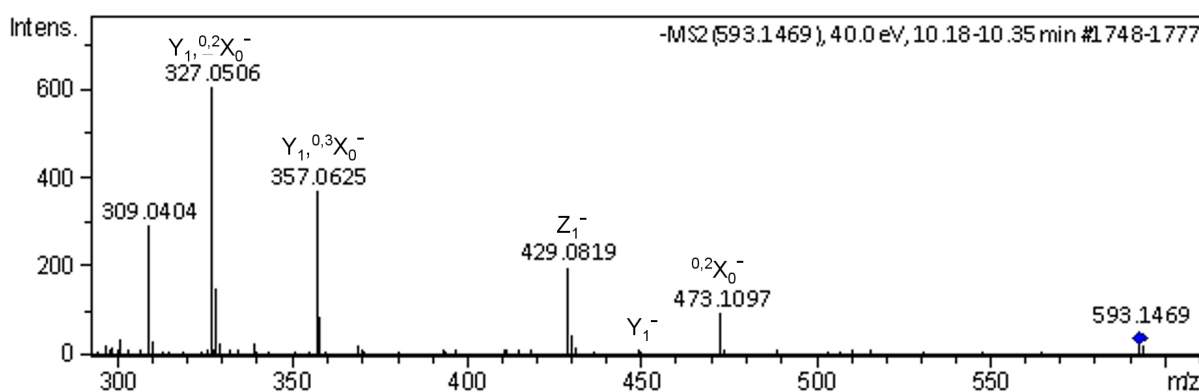


FIGURA 3.106 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 6 (orientina-2''-O-ranósídeo) de m/z 593.1469

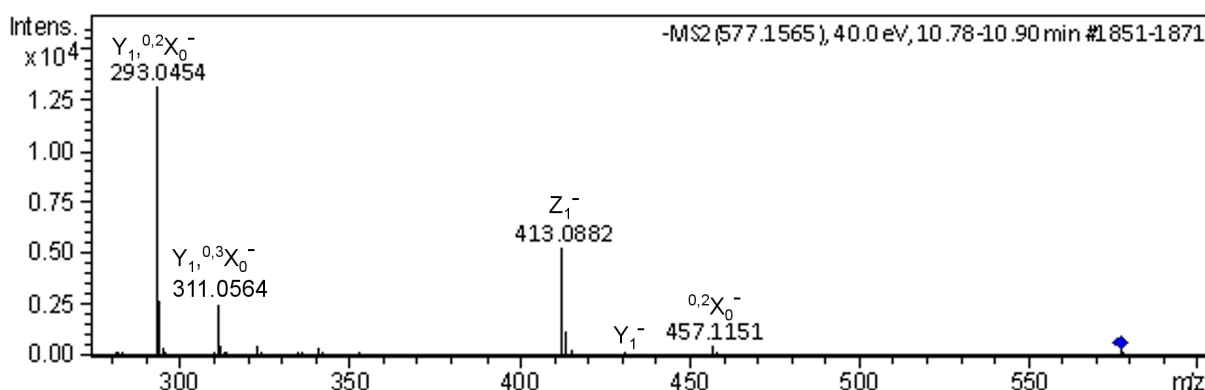


FIGURA 3.107 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 9 (vitexina-2''-O-ramnosídeo) de m/z 577.1565

3.3.3.3.4 - Flavona C-glicosilada acilada

Muitos artigos fitoquímicos relatam a identificação de flavonoides glicosilados com grupos acila ligado ao resíduo de açúcar ^{116,122}. Tais grupos podem ser galoil, feruloil, quinoil, cumaril, cafeoil, malonil e outros. No extrato de *P. niruri* foi identificada a inédita flavona 8-C-acilglicosilada denominada como luteolina-8-C-ramnosil-2''-O-galoil (FIGURAS 3.108 e 3.109).

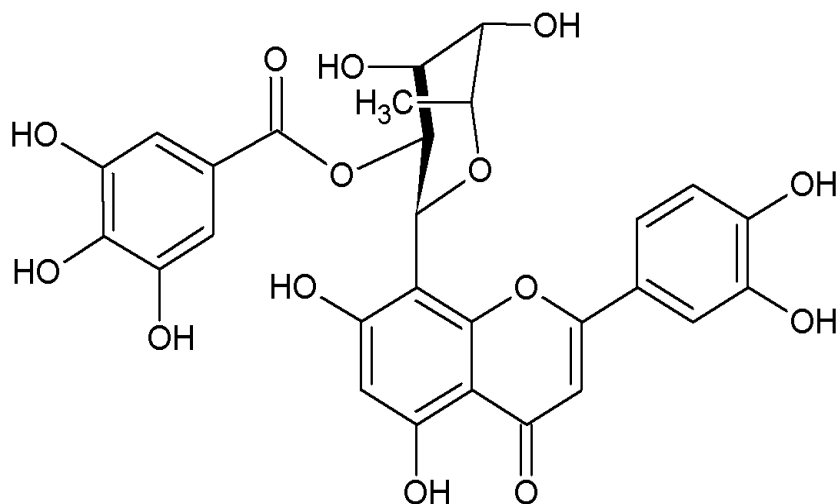


FIGURA 3.108 - Flavona C-glicosilada acilada identificada em *P. niruri*.

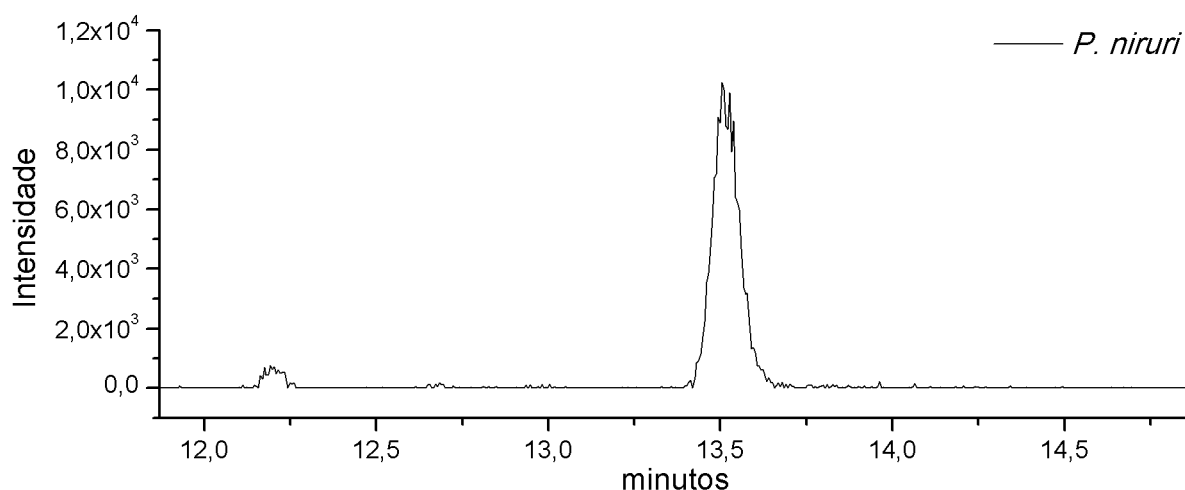


FIGURA 3.109 - Cromatograma do íon extraído de m/z 583,109 referente ao composto 18.

Experimentos de MS/MS no modo positivo revelaram os íons produtos de m/z 481 ($^{0,2}X_0$), 359 ($^{0,3}X_0, Y_1$), 353 ($^{0,4}X_0-2H_2O$), 341 ($^{0,3}X_0, Z_1$), 329 ($^{0,2}X_0, Y_1$), 311 ($^{0,2}X_0, Z_1$) e 299 ($^{0,1}X_0$) relativos a quebras cruzadas do anel sacarídico e característico de flavonas C-glicosiladas. Os fragmentos de m/z 433 (Y_1), 415 (Z_1) e 397 (Z_1-H_2O) indicam a perda de grupo galoil, enquanto que os íons 329 ($^{0,2}X_0, Y_1$), 311 ($^{0,2}X_0, Z_1$) revelam que o grupo acil está ligado a ramnose por meio de ligação interglicosídica $1 \rightarrow 2$. (FIGURA 3.110) ¹²².

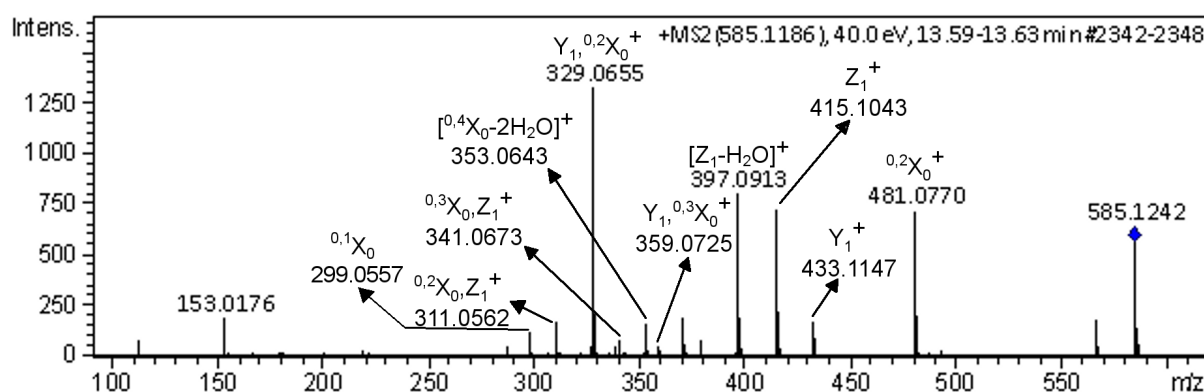


FIGURA 3.110 - Espectro ESI(+) QqToF MS/MS (40eV) do composto 18 (luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil) de m/z 585,1186

No modo negativo os experimentos de íons produtos também demonstraram íons característicos de flavonas C-glicosiladas como os íons de m/z 357 ($^{0,3}X_0, Y_1$), 327 ($^{0,2}X_0, Y_1$) e 309 ($^{0,2}X_0, Z_1$). A maior intensidade dos íons relativos a

quebra $^{0,2}X$ e intensidade relativa ($^{0,3}X:^{0,2}X$) bem inferior a 60% ¹¹⁹ é forte indicativo de glicosilação na posição 8. A presença do grupo galoil foi atestada principalmente pelos íons de m/z 431 (Y_1), 413 (Z_1), 169 (galoil) e 125 (galoil- CO_2) e sua ligação a posição 2'' pelos 327 ($^{0,2}X_0, Y_1$), 309 ($^{0,2}X_0, Z_1$) (FIGURA 3.111).

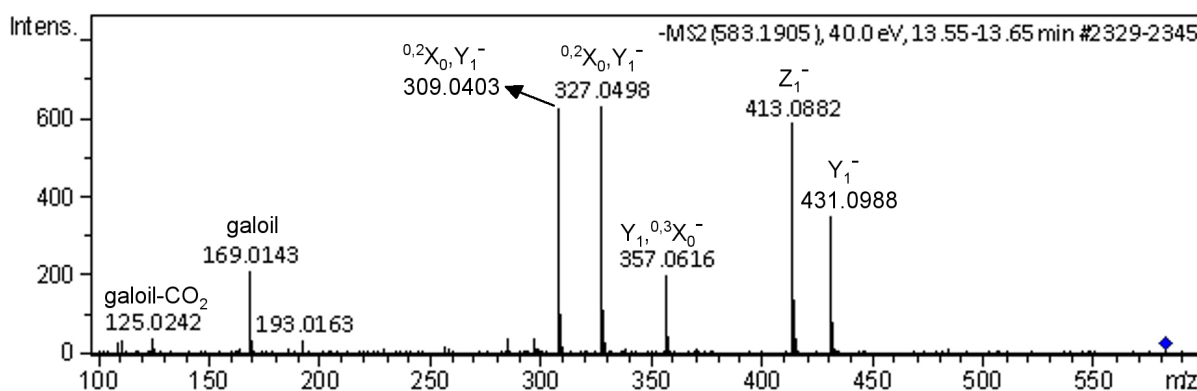


FIGURA 3.111 - Espectro ESI(-) QqToF MS/MS (40eV) do composto 18 (luteolina-8-C-ramnosil-2''-O-galoil) de m/z 583,1905

3.3.3.3.5 - Composto não identificado

Dentre todos os compostos apontados pelo modelo de PCA como importantes na diferenciação das espécies somente o composto **23** ($C_{32}H_{34}O_{18}$) é totalmente incógnito. Os experimentos de QqToF MS/MS só forneceram dados de fragmentação no modo negativo e esse foi insuficiente para chegar a qualquer conclusão.

3.3.4 - Resultados dos Experimentos de Caracterização Química das Espécies de *Phyllanthus* Estudadas

Os resultados obtidos por espectrometria sequencial de massas com diferentes analisadores de massas e condições distintas encontram-se resumidos na TABELA 3.5.

O modelo estatístico aplicado juntamente a interpretação dos espectros de MS/MS possibilitaram identificar uma série de marcadores químicos para as

espécies, os quais são ilustrados graficamente na FIGURA (3.112).

TABELA 3.5 - Relação de compostos identificados nas 6 espécies de *Phyllanthus*

N°	t_R	Nome	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fórmula molecular
01	6,50	3- <i>p</i> -cumarilquínico	339,0915	337,1076	C ₁₆ H ₁₈ O ₈
02	7,50	1,3-digaloil-4,6-hexahidroxidifenoilglucose	-	785,0838	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂
03	9,18	ácido geraniínico	-	953,0922	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₇
04	9,90	Naringenina 8-C-glucosídeo	435,1289	433,1142	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀
05	9,99	orientina	449,1084	447,0935	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
06	10,25	orientina-2"-O-ramnosídeo	595,1672	593,1515	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
07	10,44	quercetina-3-O-gentibiosídeo	627,1528	625,1405	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇
08	10,66	vitexina	433,1137	431,0986	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
09	10,84	vitexina-2"-O-ramnosídeo	579,1712	577,1568	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄
10	10,88	miricitrina	465,1026	463,0888	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
11	11,20	miquealina	479,0827	477,0673	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
12a	11,29	rutina	611,1591	609,1468	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
12b	11,66	canferol-3-O-gentibiosídeo	611,1572	609,1466	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
13	11,80	elagitanino não identificado	-	979,1065	C ₄₃ H ₃₂ O ₂₇
14	12,06	naringenina 8-C-6"-acetilglucosídeo	477,1396	475,1254	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁
15	12,31	quercitrina	449,1079	447,0940	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
16	12,32	canferol-3-O-rutinosídeo	595,1693	593,1520	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
17	12,95	naringenina 8-C-4",6"-diacetilglucosídeo*	519,1503	517,1351	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₂
18	13,37	luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil*	585,1247	583,1080	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₄
19	13,39	eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo*	577,1567	575,1417	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₄
20	13,73	naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo*	561,1596	559,1474	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃
21	14,72	pinocembrina-7-O-[4",6"-hexahidroxidifenoil]-glucose	721,1410	719,1269	C ₃₅ H ₂₈ O ₁₇
22	15,14	pinocembrina-7-O-[3"-O-galoil-4",6"-hexahidroxidifenoil]-glucose	873,1488	871,1374	C ₄₂ H ₃₂ O ₂₁

Legenda: * marca os compostos identificados nunca reportados anteriormente

:

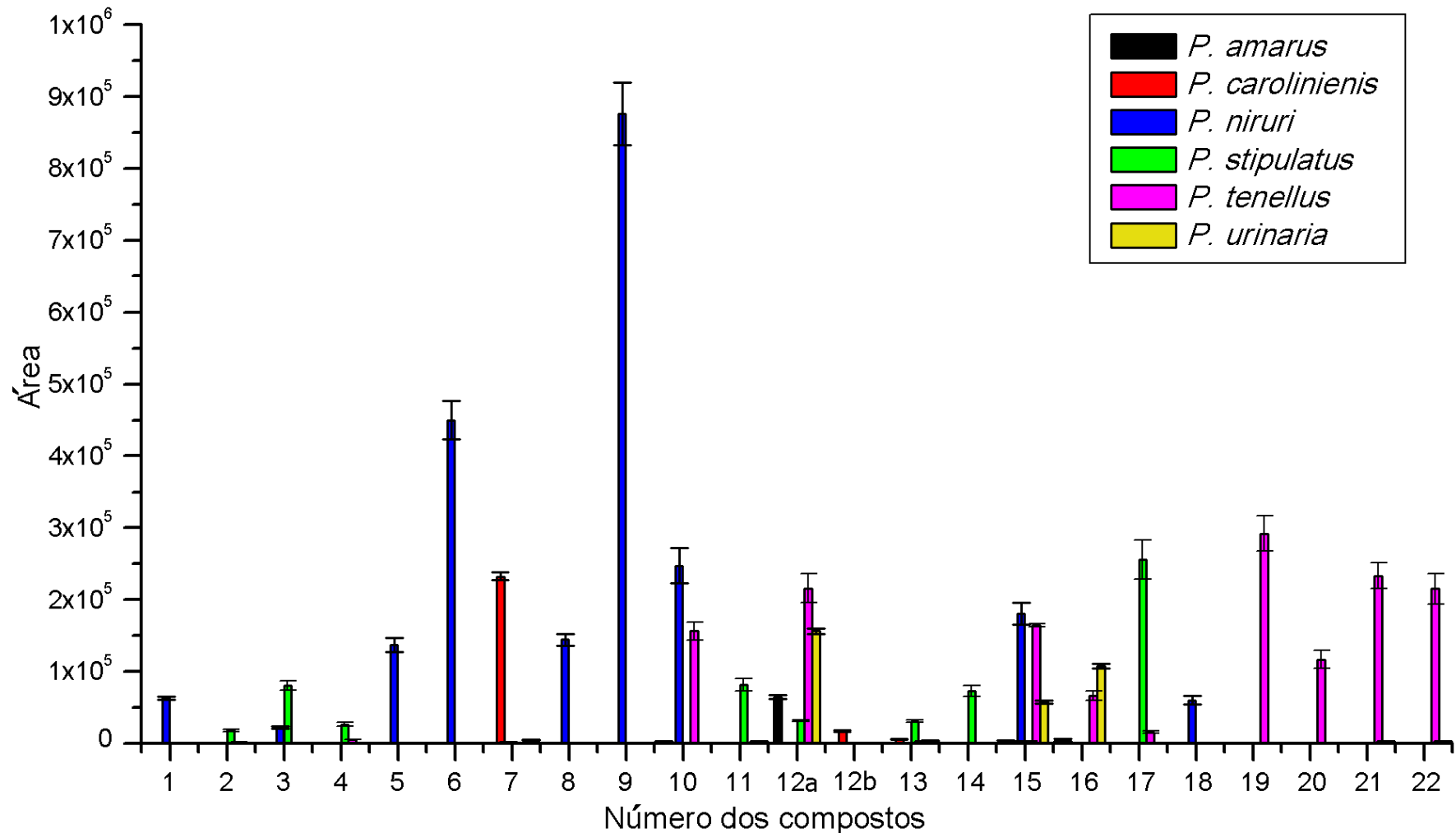


FIGURA 3.112 - Gráfico ilustrativo das áreas dos compostos identificados por espécie.

A FIGURA 3.112 ilustra graficamente a diferença entre os extratos etanólicos das espécies estudadas. A biossíntese de flavonas C-glicosiladas é evidenciada para *P. niruri*. Destacam-se as flavonas C-monoglicosiladas (compostos **5** e **8**), O,C-diglicosiladas (compostos **6** e **9**) e C-glicosiladas com grupo acil ligado (composto **18**). As flavanonas C-acetilglicosiladas diferenciam *P. tenellus* e *P. stipulatus*. Os compostos **14** e **17** foram encontrados predominantemente em *P. stipulatus*, enquanto que os compostos **19** e **20** em *P. tenellus*. Os taninos hidrolisáveis **21** e **22** que apresentam uma flavanona em lugar de grupo galoil foi encontrado principalmente em *P. tenellus*. O composto **11** também é importante para diferenciação de *P. stipulatus*, sendo único flavonol ligado a ácido glucurônico identificado. Os flavonóis O-diglicosilados também exercem importante papel na caracterização da espécie *P. caroliniensis*, uma vez que os flavonóis ligados a resíduo de gentibiosídeo (compostos **7** e **12b**) foram encontrados predominantemente nessa espécie. As espécies *P. urinaria* e *P. amarus* não apresentaram marcadores específicos. *P. urinaria* apresentou quantidades semelhantes a *P. tenellus* para os flavonóis **12**, **15** e **16**. O extrato etanólico de *P. amarus* não forneceu compostos em intensidades significativas exceto rutina. A diferenciação quimiométrica para *P. amarus* e *P. urinaria* foi obtida pela ausência de marcadores específicos. Os resultados obtidos para *P. amarus* evidenciam a necessidade de avaliação de outros tipos de extratos. A partir da avaliação de extratos aquosos das mesmas amostras de *P. amarus*, por exemplo, foi possível identificar por LC-ITMS 11 compostos, entre elagitaninos e flavonóis glicosilados ⁴⁶.

3.4 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram a importância de planejamento experimental. O emprego de software estatístico para desenvolvimento de método cromatográfico permitiu obter um método ideal para estudos de desreplicação, i. e., com maior número de bandas sendo representativo da totalidade dos extratos analisados. Adicionalmente, tal planejamento reduziu drasticamente o tempo dispendido no desenvolvimento. Por outro lado, o tratamento estatístico dos dados de UHPLC-MS, utilizando modelo de PCA, possibilitou identificar de modo mais acurado quais compostos químicos se sobressaíam na diferenciação das espécies,

fornecendo informações seguras para garantia da autenticidade vegetal. A identificação de 22 compostos por meio de espectrometria de massas sequencial, permitiu não somente encontrar marcadores químicos para espécies, como também enriquecer sobremaneira a literatura fitoquímica do gênero *Phyllanthus*, descrevendo de modo inédito 4 compostos.

CAPÍTULO 4

4 - CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO DE *Phyllanthus tenellus* POR LC-SPE-NMR e LC-MS

4.1 - INTRODUÇÃO

Phyllanthus tenellus apesar de seu amplo uso medicinal e também constar na farmacopeia brasileira como espécie oficial de “quebra-pedra”⁵⁵, até o momento dispõem de poucos estudos relacionados a atividade terapêutica e a estudos fitoquímicos. Embora seja extensamente utilizada para o tratamento de urolitíases, não existe nenhum estudo farmacológico que indique tal atividade. Os poucos trabalhos farmacológicos existentes indicam atividade antimicrobiana^{123,124}, antiviral (hepatite B humana)¹²⁵ e imunomodulatória pelo estímulo a produção de óxido nítrico¹²⁶. A literatura fitoquímica dessa espécie restringe-se a poucos trabalhos. Destacando-se o nosso trabalho com extratos aquosos que identificou por LC-ITMS taninos (corilagina e ácido gálico), polifenólicos (ácido carboxílico de brevifolina) e flavonóis heterosídicos (miricitrina, rutina, isoquercetina, quercitrina e canferol-3-O-rutinosídeo)^{46,94}. Huang *et al*¹¹⁰ de forma inédita identificaram os taninos pinocembrina-7-O-[4,6-hexahidroxi-difenil]- β -D-glucose e pinocembrina-7-O-[3-O-galoil-4,6-hexahidroxi-difenil]- β -D-glucose. Reporta-se também a identificação das lignanas nirantina, nirtetralina e hinoquinina¹²⁵.

A espectroscopia de NMR é uma técnica de elucidação estrutural amplamente utilizada em produtos naturais, pois fornece informações inequívocas sobre estruturas químicas complementando as informações obtidas por espectrometria de massas. No entanto, o procedimento de isolamento e purificação de compostos demanda muito tempo e trabalho. Nesse sentido o acoplamento do LC ao NMR acelera sobremaneira esse processo, sobretudo ao utilizar uma interface automatizada de SPE, a qual resolve muitas incompatibilidades entre os sistemas. O aprisionamento em cartuchos de SPE possibilita a concentração dos compostos e também afasta a necessidade de utilização de solventes deuterados em LC (seção 1.2.3).

Assim, a espécie *P. tenellus* foi escolhida para estudo por LC-SPE-NMR, uma vez que sua literatura fitoquímica é bastante escassa e também em face da identificação dos compostos inéditos naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo e eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo por LC-MS (Capítulo 3) cujas estruturas necessitam ser confirmadas.

4.2 - MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 - Material Vegetal e Extração

O procedimento de extração foi realizado conforme explicado na seção 2.2.2 a partir de amostra vegetal autêntica de *P. tenellus* Roxb. cedida pelo CPQBA-UNICAMP.

4.2.2 - Cromatografia Líquida Hifenada a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

O sistema LC (1200 series, Agilent GmbH, Alemanha) consiste em bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, detector de DAD G1315D e autoinjeter G1329A. O sistema de LC foi controlado pelo software Hystar 2.3 (Bruker). O LC foi diretamente acoplado ao sistema automatizado de troca de cartucho (ACE™ Spark Holland, Alemanha) equipado com uma gama de cartuchos, contendo diferentes fases estacionárias, para o qual a vazão é direcionado automaticamente. As medidas de NMR foram realizadas com o equipamento Bruker Avance III (14,1 Tesla/600 MHz) com magneto blindado (*Ultrashield Plus*®). O espectrômetro é equipado com trocador automático de amostra, criossonda TCI de 5 mm, com bobinas de ^1H e ^{13}C e pré-amplificador refrigerados a uma temperatura de aproximadamente 77K. A sonda possui bobina de gradiente de campo no eixo z (53G/cm) e unidade de ajuste e unidade de ajuste automático de sintonia – ATMA® (*Automatic Tuning and Matching*). O equipamento possui ainda *CryoFIT*® com cela de detecção de 60 μL que permite o acoplamento direto com o sistema HPLC-SPE à sonda de NMR, no entanto optou-se por trabalhar de forma isolada para otimizar a

utilização de ambos os equipamentos. As análises foram realizadas utilizando coluna Restek Raptor Bifenil (5 μm , 15 x 0,46 cm). As fases móveis utilizadas foram: solvente A - água/ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) e B - metanol. Perfil do gradiente: 0 - 7 min, 30 - 36% B; 7 - 19 min, 36 - 41% B; 19 - 40 min, 41 - 86% B; 40 - 42 min, 86 - 100% B com vazão de 1 mL.min⁻¹. A coluna foi limpa com 100% de B por 5 minutos, depois retornou às condições iniciais em 2 min (100-30%) e, por fim, foi recondicionada por 10 min. Foram injetados 50 μL de extrato a 30 mg.ml⁻¹, solubilizados em água/etanol (70:30, v/v). O detector de DAD fez aquisição dos cromatogramas desde 190 nm até 500 nm. A amostra foi centrifugada a 9300 x g e o sobrenadante límpido foi transferido para vial para posterior análise por LC. As bandas de interesse foram detectadas e os compostos correspondentes foram adsorvidos em cartuchos de SPE com fase estacionária de polidivinilbenzeno (HySphere Resin GP, 10 mm x 2 mm, 10 μm), utilizando sistema automatizado de troca de cartucho. A coleta das frações foi realizada por tempo e limiar de absorção por UV (TABELA 4.1). Trinta corridas cromatográficas consecutivas foram realizadas. Depois do processo de adsorção, os cartuchos foram secos com N₂ por 30 min para eliminar resíduos de solventes. Metanol deuterado (99,8% D) foi usado para eluir os compostos dos cartuchos de SPE diretamente para tubos de NMR (Bruker, 3 mm o.d.).

TABELA 4.1 - Programação para coleta de frações por LC-SPE.

Janelas (minutos)		Fracionamento	
Início	Fim	Comprimento de onda	Limiar mínimo
16,00	23,50	253 nm	250 mAU
23,50	26,69	265 nm	270 mAU
38,02	30,58	202 nm	400 mAU
30,58	34,77	220 nm	400 mAU
38,37	41,34	220 nm	400 mAU

4.2.3 - Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

O sistema de LC utilizado está descrito na seção 3.2.3. As condições

cromatográficas são as mesmas descritas na seção 2.2.2. Foram injetados 5 μL de extrato a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, solubilizados em água/etanol (70:30, v/v)

O sistema de LC foi acoplado ao espectrômetro de massas QqToF Impact HD (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha) equipado com fonte de ionização ESI.

Para as análises de MS, a vazão da fase móvel foi dividida utilizando conector tipo T, direcionando uma vazão de 150 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para fonte ESI.

Foram realizados experimentos de íons totais e de íons produtos (auto-MS/MS) nos dois modos de ionização em uma faixa de massas de 80 a 1300. As condições da fonte ionização foram: nebulizador 1,7 bar, vazão do gás de secagem 9,3 L/min, temperatura de secagem 200 °C, tensão do *End Plate* e capilar de 500 V e 4500 V, respectivamente. A energia de fragmentação foi de 30 eV.

4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises por LC-SPE-NMR e LC-QqToF/MS foram realizadas de forma complementar de modo a confirmar as estruturas dos compostos e tornar possível a correlação dos resultados descritos aqui com o capítulo 3.

Os experimentos de LC-SPE-NMR foram realizados em coluna cromatográfica preenchida com sílica totalmente porosa e de maior tamanho de partícula, enquanto que os experimentos descritos no capítulo 2 e 3 utilizaram colunas de núcleo de fundido e de UHPLC, respectivamente. A utilização dessas colunas de maior eficiência não foram utilizadas nesse trabalho devido principalmente a baixa capacidade de carga das mesmas. Os avanços em NMR, como a utilização de criosondas, aumentaram sua sensibilidade, mas comparativamente à MS sua sensibilidade é muito inferior, requerendo concentrações muito mais elevadas. Dessa forma, escolheu-se coluna com sílica porosa e de maior tamanho de partícula que suportou alta capacidade de carga sem afetar a resolução cromatografia.

O extrato foi fracionado em 11 frações (FIGURA 4.1) que foram retidas nos cartuchos de SPE. O processo foi repetido 30 vezes a fim de adquirir massa suficiente para análise. Após os experimentos de NMR 8 compostos foram estruturalmente caracterizados.

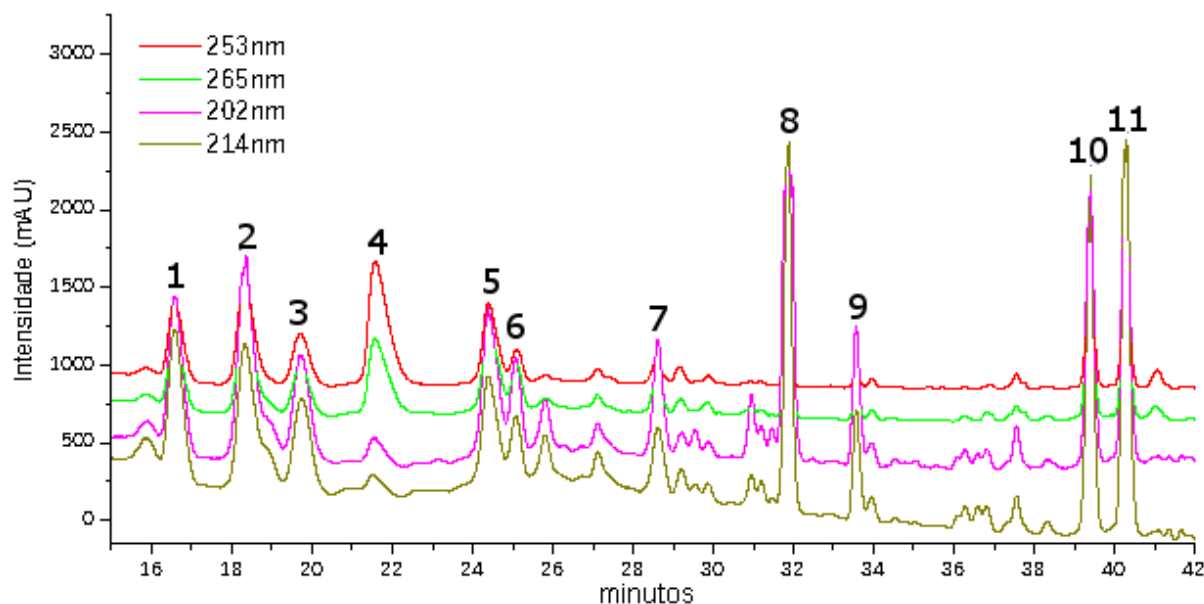


FIGURA 4.1 - Cromatograma do extrato de *P. tenellus*. Os números 1 a 11 indicam as bandas cromatográficas que foram coletadas em SPE.

Composto 1: Miricitrina. $t_R = 16,8$. UV: 256, 348 nm. MS: 463,088 [M-H]⁻; 465,0984 [M+H]⁺. Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₁₂. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 317,0230 (31,86%); 316,0172 (100%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 319,0368 (100%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 0,96 (d; $J = 6,19$ Hz; 3H; ram H-6''); 3,35 (m 1H; ram H-4''); 3,51 (dq; $J = 9,50$ e 6,20 Hz; 1H; ram H-5''); 3,78 (dd; $J = 9,58$ e 3,39 Hz; 1H; ram H-3''); 4,21 (dd; $J = 3,31$ e 1,70 Hz; 1H; ram H-2''); 5,32 (d; $J = 1,61$ Hz; 1H; ram H-1''); 6,20 (d, $J = 2,12$ Hz, 1H; H-6); 6,37 (d, $J = 2,12$ Hz, 1H; H-8); 6,95 (s 2H; H-2' e H-6') (APÊNDICE 1).

Composto 2: Rutina. $t_R = 18,5$. UV: 255 (sh), 356 nm. MS: 609,1471 [M-H]⁻; 611,1555 [M+H]⁺. Fórmula molecular: C₂₇H₃₀O₁₆. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 301,0292 (17,70%); 300,0216 (15,65%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 465,0891 (1,70%); 303,0415 (100%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 1,14 (d; $J = 6,27$ Hz; 3H; ram H-6'''); 3,25-3,51 (m 7H; açúcar H's); 3,56 (dd; $J = 9,49$ e 3,39 Hz, 1H; ram H-3'''); 3,65 (dd; $J = 3,39$ e 1,53 Hz; 1H; ram H-2'''); 3,82 (dd; $J = 11,11$ e 1,44 Hz; 1H; glc H-6a''); 4,54 (d; $J = 1,53$ Hz; 1H; ram H-1'''); 5,13 (d; $J = 7,80$ Hz; 1H; glc H-1''); 6,24 (d; $J = 2,20$ Hz; 1H; H-6); 6,43 (d; $J = 2,20$ Hz; 1H; H-8); 6,90 (d; $J = 8,31$ Hz; 1H; H-5'); 7,65 (dd; $J = 8,48$ e 2,20 Hz; 1H; H-6'); 7,69 (d; $J = 2,20$ Hz; 1H; H-2') (APÊNDICE 2).

Composto 3: Isoquercitrina. $t_R = 19,9$. UV: 253 (sh), 355 nm. MS: 463,0889 [M-H]⁻; 465,0988 [M+H]⁺. Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₁₂. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 301,0285 (56,36%); 300,0218 (100%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 303,0413 (100%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 3,23 – 3,49 (m 3H; açúcar H's); 3,50 (dd; $J = 9,30$ e $7,80$ Hz; 1H; glc H-2''); 3,59 (dd; $J = 11,90$ e $5,40$ Hz; 1H; glc H-6b''); 3,73 (dd; $J = 11,95$ e $2,29$ Hz; 1H; glc H-6a''); 5,27 (d; $J = 7,63$ Hz; 1H; glc H-1''); 6,23 (d; $J = 2,03$ Hz; 1H; H-6); 6,42 (d; $J = 2,03$ Hz; 1H; H-8); 6,89 (d; $J = 8,48$ Hz; 1H, H-5'); 7,61 (dd; $J = 8,48$ e $2,20$ Hz; 1H; H-6'); 7,72 (d; $J = 2,20$ Hz; 1H; H-2') (APÊNDICE 3).

Composto 5a: Quercetrina. $t_R = 24,5$. UV: 270, 354 nm. MS: 447,0937 [M-H]⁻; 449,1032 [M+H]⁺. Fórmula molecular: C₂₁H₂₀O₁₁. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 301,0282 (85,63%); 300,0216 (100%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 303,0407 (100%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 0,96 (d; $J = 6,10$ Hz; 3H, ram H-6''); 3,35-3,43 (m 2H; açúcar H's); 3,76 (dd; $J = 9,32$, $3,39$ Hz; 1H; ram H-3''); 4,23 (dd; $J = 3,39$ e $1,70$ Hz 1H, ram H-2''); 5,37 (d; $J = 1,70$ Hz; 1H, ram H-1''); 6,22 (d; $J = 2,20$ Hz; 1 H, H-6); 6,40 (d; $J = 2,20$ Hz; 1H; H-8); 6,93 (d; $J = 8,31$ Hz; 1H; H-5'); 7,33 (dd; $J = 8,31$ e $2,20$ Hz; 1H; H-6'); 7,36 (d; $J = 2,20$ Hz; 1H; H-2') (APÊNDICE 4).

Composto 5b: Canferol-3-O-rutinosídeo. $t_R = 24,5$. UV: 265, 350 nm. MS: 593,1518 [M-H]⁻; 595,1600 [M+H]⁺. Fórmula molecular: C₂₇H₃₀O₁₅. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 285,0344 (45,92%); 284,0272 (14,52%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 449,0945 (1,56%); 287,0465 (100%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 1,14 (d; $J = 6,10$ Hz; 3H, ram H-6'''); 3,25-3,50 (m 7H; açúcar H's); 3,54 (dd; $J = 9,66$ e $3,39$ Hz; 1H; ram H-3'''), 3,64 (dd; $J = 3,31$ e $1,44$ Hz; 1H; ram H-2'''); 3,82 (dd; $J = 11,27$ e $1,61$ Hz; 1H; glc H-6a''); 4,53 (d; $J = 1,53$ Hz; 1H; ram H-1'''); 5,15 (d; $J = 7,46$ Hz; 1H; glc H-1''); 6,24 (d; $J = 2,03$ Hz; 1H; H-6); 6,44 (d; $J = 2,03$ Hz; 1H; H-8), 6,91 (d; $J = 8,99$ Hz; 2H; H-3' e H-5'); 8,09 (d; $J = 8,99$ Hz; 2H; H-2' e H-6') ((APÊNDICE 5).

Composto 6: Astragalina. $t_R = 25,2$. UV: 266, 348 nm. MS: 447,0939 [M-H]⁻; 449,1035 [M+H]⁺. Fórmula molecular, C₂₁H₂₀O₁₁. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 285,0332 (42,65%); 284,0269 (100%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 287,0460 (100%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 3,20 – 3,48 (m 4H; açúcar H's); 3,53 (dd; $J = 11,6$ e $5,1$ Hz; 1H;

glc H-6b"); 3,69 (dd; $J = 11,6$ e $2,4$ Hz; 1H; glc H-6a") e 5,26 (d; $J = 7,46$ Hz; 1H, glc H-1"); 6,22 (d; $J = 2,03$ Hz; 1H; H-6); 6,41 (d; $J = 2,03$ Hz; 1H; H-8); 6,89 (d; $J = 9,0$ Hz; 2H; H-3' e H-5'); 8,07 (d; $J = 9,0$ Hz; 2H; H-2' e H-6') (APÊNDICE 6).

Composto 8: Eridictiol-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo. $t_R = 31,9$. UV: 288(sh) nm. MS: 575,1414 $[M-H]^-$ e 577,1491 $[M+H]^+$. Fórmula molecular: $C_{27}H_{28}O_{14}$. MS/MS $[M-H]^-$ (30eV): 515,1060 (5,1%); 455,0882 (3,2%); 395,0679 (3,9%); 353,0603 (7,2%); 311,0490 (100,0%); 293,0408 (9,2%); 233,0386 (4,2%); 209,0418 (1,6%); 201,0165 (2,2%); 191,0308 (3,4%); 161,0208 (51,9%); 149,0215 (39,9%); 135,0423 (2,5%); 109,0265 (5,0%). MS/MS $[M+H]^+$ (30eV): 481,0975 (6,7%); 441,0894 (21,8%); 439,0884 (15,7%); 423,0793 (11,3%); 421,0780 (11,9%); 399,0800 (5,1%); 397,0791 (26,2%); 381,0701 (22,4%); 379,0695 (64,5%); 373,0802 (41,0%); 363,0601 (11,1%); 361,0591 (36,4%); 355,0700 (11,4%); 345,0491 (5,8%); 333,0662 (7,1%); 331,0703 (11,9%); 321,0504 (23,8%); 313,0608 (59,2%); 303,0403 (27,4%); 295,0508 (57,5%); 261,0312 (77,8%); 243,0213 (26,4%); 237,0321 (100,0%); 219,0219 (6,3%); 195,0228 (34,4%); 177,0128 (54,1%); 169,0443 (7,5%); 163,0341 (4,9%); 145,0452 (15,1%); 127,0352 (12,6%); 109,0252 (9,1%).

Composto 9: Naringenina-8-C-2",4",6"-O-triacetilglucosídeo. $t_R = 33,6$. UV: 288(sh) nm. MS: 559,1460 $[M-H]^-$ e 561,1539 $[M+H]^+$. Fórmula molecular: $C_{27}H_{28}O_{13}$. MS/MS $[M-H]^-$ (30eV): 439,0946 (1,9%); 337,0643 (5,0%); 295,0548 (100,0%); 217,0101 (1,8%); 174,9998 (16,6%); 119,0474 (5,7%). MS/MS $[M+H]^+$ (30eV): 440,937 (12,1%); 423,0922 (15,3%); 399,860 (3,9%); 381,0838 (83,4%); 363,0748 (100,0%); 357,0860 (53,5%); 345,0527 (3,0%); 339,0751 (19,1%); 335,0815 (4,0%); 321,0506 (15,5%); 315,0767 (30,8%); 303,0400 (13,3%); 297,0663 (80,4%); 285,0667 (6,4%); 279,0412 (4,0%); 261,0313 (43,0%); 243,0213 (30,8%); 237,0322 (18,4%); 229,0666 (3,4%); 219,0224 (8,4%); 195,0227 (27,2%); 187,0552 (3,3%); 177,0128 (26,9%); 169,0444 (6,2%); 147,0394 (5,8%); 145,0452 (12,1%); 127,0350 (12,3%); 109,0254 (6,9%). 1H NMR (600 MHz, metanol- d_4): δ 1,87 (s 3H; ac CH_3); 2,02 (s 3H; ac CH_3); 2,12 (s 3H; ac CH_3); 2,84 (d(l); $J = 17,2$; 1H; H-3b); 3,09 (dd; $J = 17,2$ e $13,8$; 1H; H-3a); 3,75 (m 1H; glc H-5"); 3,81 (t; $J = 9,4$; glc H-3") 4,09 (d(l); $J = 11,8$; glc H-6b") 4,24 (m 1H; glc H-6a"); 4,90 (m 2H; glc H-1" e H-4"); 5,59 (d(l); $J = 13,3$; 1H; H-2); 5,73 (t; $J = 9,2$ Hz; 1H; glc H-2"); 5,95 (s 1H; H-6); 6,92 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H; H-3' e H-

5'); 7,51 (d; $J = 8,7$ Hz; 2H; H-2' e H-6') (APÊNDICE 7)

Composto 10: Pinocembrina-7-O-[4'',6''-hexahidroxidifenoil]- β -D-glucose. $t_R = 39,5$. UV: 257(sh) nm. MS: 719,1264 [M-H]⁻ e 721,1317 [M+H]⁺. Fórmula molecular: C₃₅H₂₈O₁₇. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 463,0402 (0,77%); 300,9920 (100%); 275,0133 (2,97%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 465,0533 (2,71%); 303,0047 (5,90%); 277,0724 (9,05%); 257,0724(100%); 153, 0140 (3,90%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 2,87 (dd; $J = 17,2$ e 3,1 Hz; 1H; flv H-3b); 3,22 (m; 1H; flv H-3a), 3,60 (dd; $J = 9,0$ e 7,6 Hz; 1H; glc H-2''); 3,73 (dd; $J = 9,7$ e 9 Hz; 1H; glc H-3''); 3,85 (dd; $J = 13,2$ e 1,0 Hz; 1H; glc H-6b''); 4,14 (m 1H; glc H-5''); 4,88 (m 1H; glc H-4''); 5,1 (d; $J = 7,6$ Hz; 1H; glc H-1''); 5,28 (dd; $J = 13,6$ e 6,6 Hz; 1H; glc H-6a''); 5,56 (dd; $J = 13,1$ e 2,9 Hz; 1H; flv H-2); 6,24 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; H-6); 6,29 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; H-8), 6,58 (s 1H; HHDP H-5'''); 6,71 (s 1H; HHDP H-5'''); 7,40 (m 1H; flv H-4'); 7,45 (m 2H; flv H-3' e H-5'); 7,54 (m 2H; flv H-2' e H-6') (APÊNDICE 8).

Composto 11: Pinocembrina-7-O-[3''-O-galoil-4'',6''-hexahidroxidifenoil]- β -D-glucose. $t_R = 40,3$. UV: 257(sh) nm. MS: 871,1374 [M-H]⁻; 873,1442 [M+H]⁺. Fórmula molecular, C₄₂H₃₂O₂₁. MS/MS [M-H]⁻ (30eV): 827,1266 (0,58%); 719,1066 (0,23%); 569,1201 (0,43%); 300,9919 (8,3%); 275,0133 (0,51%). MS/MS [M+H]⁺ (30eV): 617,0563 (1,9%); 553,1183 (2,0%); 447,0407 (5,4%); 383,0990 (4,0%); 365,0907 (5,2%); 335,0820 (2,1%); 315,0608 (13,1%); 303,0030 (14,4%); 297,0512 (4,2%); 277,0242 (4,9%); 269,0724 (1,8%); 257,0724 (100,0%); 171,0235 (8,4%); 153,0135 (21,2%); 153,0135 (21,2%); 145,0448 (4,5%). ¹H NMR (600 MHz, metanol-*d*₄): δ 2,88 (dd; $J = 17,1$ e 3,1 Hz; 1H; flv H-3b); 3,22 (m 1H; flv H-3a), 3,88 (dd; $J = 9,3$ e 7,6 Hz; 1H; glc H-2''); 3,9 (dd; $J = 13,4$ e 1,0 Hz; 1H; glc H-6b''); 4,35 (dd; $J = 10,7$ e 5,8 Hz; 1H; glc H-5''); 5,09 (t; $J = 9,9$ 1H; glc H-4''); 5,27 (d; $J = 7,6$; 1H; glc H-1''); 5,36 (dd; $J = 13,6$ e 6,7 Hz; 1H; glc H-6a''); 5,46 (dd; $J = 10,0$ e 9,3 Hz; 1H, glc H-3''); 5,57 (dd; $J = 13,0$ e 3,1 Hz; 1H; flv H-2); 6,27 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; flv H-6); 6,32 (d; $J = 2,2$ Hz; 1H; flv H-8), 6,48 (s 1H; HHDP H-5'''); 6,61 (s 1H; HHDP H-5'''); 7,04 (s 2H, gal H-2'''' e H-6'''''); 7,41 (m 1H; flv H-4'); 7,45 (m 2H; flv H-3' e H-5'); 7,55 (m 2H; flv H-2' e H-6') (APÊNDICE 9).

Todos os compostos identificados apresentam um núcleo flavonoídico e

isso foi comprovado pela presença de dois sinais em comum entre todas as substâncias, exceto o composto **9**, a saber, dois duplos dubletos na região de 6,20 a 6,45 ppm com 4J de aproximadamente 2 Hz, característicos do anel A de flavonoides. Dentre os flavonóis, encontraram-se quercetina, canferol e miricetina glicosiladas. Os compostos **2**, **3** e **5a** apresentam quercetina como aglicona, o que foi comprovado pela observação de três sinais típicos de substituição 3,4 aromática do anel B flavonoídico com constantes de acoplamento orto ($^3J \approx 8$ Hz) e meta ($^4J \approx 2$ Hz). O composto **1** é o único representante de derivado de canferol, pois revelou somente 1 singleto (δ 6,95 ppm) com integral de 2, inerente a benzeno 1,3,4,5 tetra substituído. Já os compostos **5b** e **6** são derivados de miricetina, uma vez que apresentaram padrão típico de para-substituição aromática, i.e., dois dubletos ($^3J \approx 2$ Hz) com acoplamento de segunda ordem AA'BB'. Os compostos **10** e **11** não se constituem flavonóis, sendo na realidade elagitaninos com a flavanona pinocembrina ligada a posição 1 da glucose. O anel B da flavanona não apresenta nenhum grupo hidroxila, o qual é claramente observado pelo padrão de acoplamento típico de sistemas AA'BB'C aromáticos (δ 7,38 a 7,56 ppm). Os sinais $\delta \approx 5,56$ ppm (dd; $^3J \approx 13,0$ e $3,0$; H-2), $\delta \approx 3,22$ ppm (m; H-3a) e $\delta \approx 2,87$ ppm (dd; $^2J \approx 17,0$ e $^3J \approx 3,0$; H-3b), inerentes aos hidrogênios do anel C, definem a presença do substituinte pinocembrina, destacando-se a constante de acoplamento alta típica de H-H vicinal. O metabólito **9** identificado como flavanona C-glicosilada, apresentou sinais característicos de anel B para-substituído, a saber dois dubletos com $\delta = 6,92$ (d; $J = 8,7$ Hz; 2H) e $7,51$ (d; $J = 8,7$ Hz; 2H). O singleto em $5,95$ ppm corresponde ao único hidrogênio ligado diretamente ao carbono presente no anel A, comprovando que a hexose está ligada por uma ligação C-C. Semelhantemente aos compostos **10** e **11**, os quais apresentam flavononas em suas estruturas, o espectro de $^1\text{H-NMR}$ demonstrou para o composto **9** os sinais próprios do anel C, ou seja, os sinais $\delta = 5,59$ (d(l); $J = 13,3$; 1H; H-2), $\delta = 3,09$ (dd; $J = 17,2$ e $13,8$; 1H; H-3a) e $\delta = 2,84$ (d(l); $J = 17,2$; 1H; H-3b).

Os experimentos de LC-MS/MS permitiram inferir os tipos heterosídeos ligados ao núcleo flavonoídico. Os compostos **1** e **5a** apresentam ramnose em sua estrutura, a qual é verificada pela perda neutra de 146 Da. O composto **3**, por outro lado, perdeu 162 Da inerente ao resíduo de glucose. Já os compostos **2**, **5b** e **6** são flavonóis ligados ao dissacarídeo rutinosídeo, uma vez que os espectros de MS/MS

revelaram no modo positivo o íon $[M-H-146]^+$ de baixa intensidade e o pico base $[M-H-146-162]^+$, típico de ligação interglicosídica $1 \rightarrow 6$ (ver seção 3.3.3.3.1).

As constantes de acoplamento $^3J_{H-H}$ do resíduo de ramnose dos compostos **1** e **5a** revelaram conformação de cadeira invertida (1C_4). As constantes $^3J_{H3-H4}$ e $^3J_{H4-H5}$ superiores a 9 Hz caracterizam acoplamento diaxial, o qual só seria possível em conformação 1C_4 , haja vista a constante $^3J_{H2-H3}$ de aproximadamente 3 que exclui a possibilidade do confôrmero em bote, mais energético. A constante $^3J_{H1-H2}$ em torno 1,7 Hz é indicativo de interação equatorial-axial ou equatorial-equatorial, não sendo possível afirmar se os compostos são α ou β .

O resíduo de glucose do composto **3** e **6** apresentaram constante $^3J_{H1-H2}$ maior que 7,4 Hz que caracteriza interação entre dois hidrogênios axiais, ou seja, configuração β . A conformação adotada é de cadeira 4C_1 , uma vez que a inversão da cadeira (1C_4) implicaria em $^3J_{H1-H2}$ de aproximadamente 2 Hz e a conformação em bote originaria uma interação equatorial-axial entre H2-H3, incompatível com a constante $^3J_{H2-H3}$ encontrada de 9,3 Hz para o composto **3**, típica de interação axial-axial.

As constantes de acoplamento $^3J_{H-H}$ das hexoses presentes nos flavonóis diglicosilados **2** e **5b** foram muito semelhantes as constantes $^3J_{H-H}$ das hexoses dos flavonóis monoglicosilados, confirmando configuração β para glucose e relação equatorial-axial ou equatorial-equatorial entre os H1 e H2 da ramnose.

Os experimentos 1H - ^{13}C HMBC confirmaram os compostos **1**, **2**, **3**, **5a** como flavonóis 3-O-glicosilados, pois foi observado acoplamento entre o carbono 3 do flavonol ($\delta \approx 135$ ppm) com o H-1" ($\delta \approx 5,2$ ppm). Para os compostos **5b** e **6** não foi possível observar o acoplamento de H-1" com nenhum ^{13}C , todavia infere-se a estrutura como flavonol 3-O-glicosilado, uma vez que os experimentos de MS/MS demonstraram íon produto $[Y_0-H]^-$ com abundância significativa (ver seção 3.3.3.3.1). O composto **2** apresentou ainda correlação entre o H-6a" da glucose ($\delta = 3,82$ ppm) e ^{13}C -2" ($\delta = 102$ ppm) da ramnose comprovando interação glicosídica $1 \rightarrow 6$. Inferiu-se que o composto **5b** também apresenta ligação interglicosídica $1 \rightarrow 6$, embora não seja observado correlações de 1H - ^{13}C HMBC que a comprovem devido ao padrão de fragmentação por MS obtido.

A presença de dois singletos com deslocamento de aproximadamente 6,65 e 6,68 sugerem a presença de grupo hexahidroxifenol (HHDP), caracterizando

os compostos **10** e **11** como elagitaninos, enquanto que o sinal em 7,04 ppm (s 2H), do composto **11** está relacionado ao grupo galoil adicional. A constante de acoplamento elevada (${}^3J_{H1''-H2''} = 7,6$ Hz) para o sinal hidrogênio ligado ao carbono anomérico ($\delta = 5,1$ e $5,27$) implica em configuração β . Ademais, as elevadas constantes de acoplamento para os demais hidrogênios do anel (${}^3J_{H2''-H3''}$, ${}^3J_{H3''-H4''}$, ${}^3J_{H5''-H6''}$) estão relacionadas à interação trans-diaxial encontrada somente na conformação tipo cadeira (4C_1). Os sinais dos H-6a'' e H-4'' da glucose apresentaram-se bastante desblindados em ambos os compostos ($10 - \delta H4'' = 4,88$ e $\delta H6a'' = 5,28$; $11 - \delta H4'' = 5,09$ e $\delta H6a'' = 5,36$), indicando a ligação do ácido elágico nessas posições. Além disso, o composto **11** apresentou o sinal do H-3'' fortemente desblindado ($\delta = 5,46$), o que sugere ligação do grupo galoil em 3''. Para o composto **11** as posições das substituições foram confirmadas por experimentos de 1H - ${}^{13}C$ HMBC. O hidrogênio do carbono anomérico ($\delta = 5,27$) mostrou correlação com o C-7 ($\delta = 166,4$), determinando o sítio de ligação da pinocembrina em 1''. Também foram observadas as correlações entre H-6a'' ($\delta = 5,36$) e C-7'' ($\delta = 169,2$), e H-4'' ($\delta = 5,09$) e C-7'''' ($\delta = 168,9$), posicionando o grupo HHDP nas posições 4 e 6 da glucose. A posição do grupo galoil foi confirmada pela interação entre H-3'' ($\delta = 5,46$) com o carbono da carboxila do ácido gálico ($\delta = 167,7$). Os dados de NMR estão em conformidade com o trabalho de Huang et al.¹¹⁰ que identificou pela primeira vez esses compostos em *P. tenellus*.

O composto **9** foi caracterizado como flavonoide C-glicosilado baseando-se nos resultados de LC-MS/MS (seção 3.3.3.3.2) e 1H -NMR, no entanto, os resultados obtidos, experimentos de 1H - ${}^{13}C$ HMBC, não permitiram precisar a posição da glicosilação, apesar de o padrão de fragmentação por MS indicar a posição 8. O acoplamento dos sinais de hidrogênio em aproximadamente 2 ppm aos sinais de carbono próximos a 170 ppm revelam a presença de grupos acetila. As posições dos grupos acetilas foram determinadas baseando-se na forte desblindagem dos hidrogênios do anel glicosídico (H-2'', H-4'', H-6a'' e H-6b'') a indicam acetilação da glucose. O composto **8** apresentou espectros de MS/MS (seção 3.3.3.3.2) muito semelhante ao composto **9** diferindo somente em um átomo de oxigênio. No entanto, os espectros de NMR não foram passíveis de interpretação, impossibilitando a determinação inequívoca da estrutura química. Assim, diante do ineditismo dos compostos **8** e **9** os experimentos de LC-SPE-NMR serão refeitos, de

modo a identificar esses compostos inequivocamente.

4.4 - CONCLUSÃO

A busca por novos compostos não é uma tarefa fácil e muitas vezes é infrutífera. O uso de sistema automatizado de LC-SPE nesse trabalho reduziu de modo significativo o tempo dispendido nesse esforço, além de afastar a necessidade de mudança para escala semi-preparativa, e conseqüentemente reduzir o consumo de solvente.

Os dados de NMR contribuíram significativamente para elucidação estrutural de oito compostos identificados por LC-ITMS e LC-QqToF/MS, caracterizando de modo inequívoco a posição de grupos substituintes. A confirmação de muitas estruturas por NMR indicam que os mecanismos de fragmentação propostos e as discussões realizadas na interpretação dos espectros de massas estão corretos. No entanto, a maior contribuição desse trabalho relaciona-se a confirmação da estrutura química do metabólito naringenina-8-C-3",4",6"-O-triacetilglucosídeo, cuja estrutura foi proposta através de dados de MS/MS (seção 3.3.3.3.2), e nunca antes relatado na literatura.

CAPÍTULO 5

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desreplicação é uma abordagem cada vez mais utilizada em fitoquímica, pois evita-se assim a caracterização dos constituintes químicos de um extrato utilizando a laboriosa abordagem clássica de isolar, purificar para depois identificar. Evita-se conseqüentemente o trabalho de isolamento de compostos de pouco interesse. Reduz-se também o tempo e os gastos dispendidos em separações preparativas ou semi-preparativas. A identificação direta de metabólitos secundários a partir de perfis cromatográficos abrangentes possibilita também a busca de marcadores químicos de espécies e conseqüentemente a verificação de autenticidade vegetal. Nesse contexto, os resultados apresentados nesse trabalho obtidos a partir de amostras autênticas, identificadas botanicamente propiciaram a diferenciação química de seis espécies do gênero *Phyllanthus* e a identificação de marcadores químicos para cada espécie de quebra-pedra analisada.

O uso de planejamento fatorial para obtenção das condições cromatográficas por UHPLC reduziu drasticamente o tempo de desenvolvimento do método e forneceu um perfil cromatográfico com alta eficiência e elevado número de picos. O uso do QqToF hifenado ao UHPLC elevou o número de compostos inicialmente identificados por IT-MS.

Para LC-SPE-NMR, em contrapartida, selecionou-se coluna cromatográfica que suportasse maior capacidade de carga, reduzindo conseqüentemente o número de injeções necessárias para obter massa suficiente para a realização de experimentos de NMR.

O presente trabalho também identificou amostras comerciais a partir de perfis cromatográficos por LC-MS. 18 amostras comerciais rotuladas como *P. niruri* apresentaram semelhança de composição química com amostras autênticas de *P. tenellus*. Os marcadores químicos rutina, canferol-3-O-rutinosídeo, eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo, naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo e pinocembrina-7-O-[4",6"-hexahidroxidifenoil]-glucose foram encontrados nas 18 amostras. Outras 2 amostras comerciais não apresentaram semelhança de composição com nenhuma espécie avaliada, constituindo-se provavelmente em

adulteração.

Modelos estatísticos de análise de componentes principais (PCA) classificaram as 6 espécies em grupos bastante distintos e demonstraram quais eram os compostos químicos responsáveis pela diferenciação. A PCA revelou 23 íons como relevantes, sendo que 22 destes foram identificados através da interpretação de dados de espectrometria de massas sequencial. Compostos nunca antes relatados na literatura tiveram suas estruturas inferidas, como naringenina-8-C-4",6"-diacetilglucosídeo, luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil, eridictiol-8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo e naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo.

A utilização de LC-SPE-NMR facilitou grandemente a elucidação estrutural por NMR, uma vez que não foi necessário o emprego de cromatografia em escala semi-preparativa para isolamento. A utilização de equipamento de NMR com criosonda eleva significativamente a relação de sinal ruído possibilitando inclusive experimentos bidimensionais heteronucleares de amostras pouco concentradas. A interpretação dos espectros de NMR resultou na identificação de 8 compostos, todos eles em conformidade com as estruturas inferidas por LC-MS.

No total 26 marcadores químicos foram discutidos nos capítulos de 2 a 4. Em cada um desses capítulos diversos compostos iguais tiveram numerações distintas, uma vez que foram numerados em ordem de eluição nos diferentes métodos cromatográficos aplicados. Assim na tabela 5.1 estão listados todos os compostos identificados, juntamente a numeração original de cada capítulo.

TABELA 5.1 - Relação de todos os compostos identificados nos capítulos 2, 3 e 4.

N°	Composto	N° LC-ITMS	N° LC-QqToF	N° LC-NMR
1	1,3-digaloil-4,6-HHDP-glucose		2	
2	3-p-cumarilquínico		1	
3	Ácido geraniínico		3	
4	Astragalina	12		6
5	Canferol-3-O-gentibiosídeo	10	12b	
6	Canferol-3-O-rutinosídeo	14	16	5b
7	Corilagina	1		
8	Eridictiol 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo	16	19	8
9	Isoquercitrina		SN	3
10	Luteolina-8-C-ramnosil-2"-O-galoil	17	18	
11	Miquealina	8	11	
12	Miricetrina-3-O-glucosídeo		SN	
13	Miricitrina	5	10	1
14	Naringenina 8-C-2",4",6"-triacetilglucosídeo	18	20	9
15	Naringenina 8-C-4",6"-diacetilglucosídeo	15	17	
16	Naringenina 8-C-6"-acetilglucosídeo	13	14	
17	Naringenina 8-C-glucosídeo		4	
18	Orientina	2	5	
19	Orientina-2"-O-ramnosídeo	4	6	
20	Pinocembrina-7-O-[3"-O-galoil-4",6"-HHDP]-glucose	20	22	
21	Pinocembrina-7-O-[4",6"-HHDP]-glucose	19	21	
22	Quercetina-3-O-gentibiosídeo	3	7	
23	Quercetrina	11	15	5a
24	Rutina	9	12a	2
25	Vitexina	6	8	
26	Vitexina-2"-O-ramnosídeo	7	9	

Legenda: HHDP – hexahidroxidifoil; SN – sem numeração.

Como demonstrado na tabela 5.1, esse trabalho resultou na identificação de vários compostos, alguns dos quais inéditos, o que enriquece significativamente a literatura fitoquímica do gênero *Phyllanthus*. Ademais, perfis cromatográficos por LC-MS revelaram-se uma importante ferramenta na diferenciação química de espécies, evidenciando diversos marcadores químicos específicos de cada espécie, os quais inclusive permitiram a classificação de amostras comerciais.

REFERÊNCIAS

1. FANG, X.; SHAO, L.; ZHANG, H. & WANG, S. "CHMIS-C: A Comprehensive Herbal Medicine Information System for Cancer". *J. Med. Chem.*, 48 (5): 1481, 2005.
2. NINGTHOUJAM, S. S.; TALUKDAR, A. D.; POTSANGBAM, K. S. & CHOUDHURY, M. D. "Challenges in developing medicinal plant databases for sharing ethnopharmacological knowledge". *J. Ethnopharmacol.*, 141 (1): 9, 2012.
3. SPRENGER, R. DA F. & AQUINO, A. J. "Perfil cromatográfico – desreplicando para não reisolar". IN: *Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações*. CASS, Q. B. & CASSIANO, N. M. (Eds.). Rio de Janeiro, Elsevier, 2015. p. 251–274.
4. MIDDLESWORTH, F. V. & CANNELL, R. J. P. "Dereplication and Partial Identification of Natural Products". IN: *Natural Products Isolation*. CANNELL, R. J. P. (Eds.). Humana Press, 1998. p. 279–327.
5. WOLFENDER, J. L.; MARTI, G. & QUEIROZ, E. F. "Advances in Techniques for Profiling Crude Extracts and for the Rapid Identification of Natural Products: Dereplication, Quality Control and Metabolomics". *Curr. Org. Chem.*, 14 (16): 1808, 2010.
6. DIAS, D. A. & URBAN, S. "Application of HPLC-NMR for the rapid chemical profiling of a Southern Australian Sponge, *Dactylospongia* sp". *J. Sep. Sci.*, 32 (4): 542, 2009.
7. FUNARI, C. S.; EUGSTER, P. J.; MARTEL, S.; CARRUPT, P.-A.; WOLFENDER, J.-L. & SILVA, D. H. S. "High resolution ultra high pressure liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry dereplication strategy for the metabolite profiling of Brazilian *Lippia* species". *J. Chromatogr. A*, **1259**: 167, 2012.
8. GRATA, E.; BOCCARD, J.; GUILLARME, D.; GLAUSER, G.; CARRUPT, P.-A.; FARMER, E. E.; WOLFENDER, J.-L. & RUDAZ, S. "UPLC-TOF-MS for plant metabolomics: a sequential approach for wound marker analysis in *Arabidopsis thaliana*". *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 871 (2): 261, 2008.
9. ORTH, H. C.; RENDEL, C. & SCHMIDT, P. C. "Isolation, purity analysis and stability of hyperforin as a standard material from *Hypericum perforatum* L". *J. Pharm. Pharmacol.*, 51 (2): 193, 1999.
10. SAITO, K.; DIXON, R. A. & WILLMITZER, L. *Plant Metabolomics*. Springer, 2006. p. 384.
11. CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. "Estratégias for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants: concepts about structural modification for improve the activity". *Quím. Nova*, 21 (1): 99, 1998.
12. PEREIRA, C. G. "Processos de obtenção de extratos e substâncias bioativas". IN: *Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais*. SOUZA, G. H. DE S.; MELLO, J. C. P. & LOPES, N. P. (Eds.). Ouro Preto, Editora UFOP, 2012. p. 55–72.
13. BUCAR, F.; WUBE, A. & SCHMID, M. "Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds". *Nat. Prod. Rep.*, 30 (4): 525, 2013.

14. GU, J.-Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G. & TIMMERMANN, B. N. "Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS". *Phytochem. Anal.*, 17 (2): 102, 2006.
15. BÖRÖCZKY, K.; LAATSCH, H.; WAGNER-DÖBLER, I.; STRITZKE, K. & SCHULZ, S. "Cluster analysis as selection and dereplication tool for the identification of new natural compounds from large sample sets". *Chem. Biodivers.*, 3 (6): 622, 2006.
16. GÖDECKE, T.; NIKOLIC, D.; LANKIN, D. C.; CHEN, S.-N.; POWELL, S. L.; DIETZ, B.; BOLTON, J. L.; VAN BREEMEN, R. B.; FARNSWORTH, N. R. & PAULI, G. F. "Phytochemistry of cimicifugic acids and associated bases in *Cimicifuga racemosa* root extracts". *Phytochem. Anal. PCA*, 20 (2): 120, 2009.
17. ADHAMI, H.-R.; SCHERER, U.; KAEHLIG, H.; HETTICH, T.; SCHLOTTERBECK, G.; REICH, E. & KRENN, L. "Combination of bioautography with HPTLC-MS/NMR: a fast identification of acetylcholinesterase inhibitors from galbanum(†)". *Phytochem. Anal. PCA*, 24 (4): 395, 2013.
18. LIN, S.; ZHANG, Z.-X.; CHEN, T.; YE, J.; DAI, W.-X.; SHAN, L.; SU, J.; SHEN, Y.-H.; LI, H.-L.; LIU, R.-H.; XU, X.; WANG, H. & ZHANG, W. "Characterization of chlorinated valepotriates from *Valeriana jatamansi*". *Phytochemistry*, **85**: 185, 2013.
19. EUGSTER, P. J.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L.; CARRUPT, P.-A. & WOLFENDER, J.-L. "Ultra high pressure liquid chromatography for crude plant extract profiling". *J. AOAC Int.*, 94 (1): 51, 2011.
20. MURUGAIYAH, V. & CHAN, K.-L. "Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection". *J. Chromatogr. A*, 1154 (1-2): 198, 2007.
21. QIU, H.; LIANG, X.; SUN, M. & JIANG, S. "Development of silica-based stationary phases for high-performance liquid chromatography". *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (10): 3307, 2011.
22. HAN, Z.; ZHENG, Y.; LUAN, L.; CAI, Z.; REN, Y. & WU, Y. "An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in traditional Chinese medicines". *Anal. Chim. Acta*, 664 (2): 165, 2010.
23. SONG, J.-Z.; LI, S.-L.; ZHOU, Y.; QIAO, C.-F.; CHEN, S.-L. & XU, H.-X. "A novel approach to rapidly explore analytical markers for quality control of *Radix Salviae Miltiorrhizae* extract granules by robust principal component analysis with ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet-quadrupole time-of-flight mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53 (3): 279, 2010.
24. MALDANER, L. & JARDIM, I. C. S. F. "The state of art of ultra performance liquid chromatography". *Quím. Nova*, 32 (1): 214, 2009.
25. GRITTI, F. & GUIOCHON, G. "The current revolution in column technology: How it began, where is it going?". *J. Chromatogr. A, High-Performance Columns and their Operations: The Speed, Efficiency and Peak Capacity Obtainable with High-Performance Columns under Various Operation Conditions.*, **1228**: 2, 2012.
26. HIBBERT, D. B. "Experimental design in chromatography: a tutorial review". *J.*

- Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., **910**: 2, 2012.
27. HUFFMAN, S. W.; LUKASIEWICZ, K.; GELDART, S.; ELLIOTT, S.; SPERRY, J. F. & BROWN, C. W. "Analysis of microbial components using LC-IR". *Anal. Chem.*, **75** (17): 4606, 2003.
28. VISSER, T.; VREDENBREGT, M. J.; TEN HOVE, G. J.; DE JONG, A. P. J. M. & SOMSEN, G. W. "Gradient elution liquid chromatography-infrared spectrometry at μg l-1 level using capillary column switching and addition of a make-up liquid. A preliminary study". *Anal. Chim. Acta*, **342** (2-3): 151, 1997.
29. BRINGMANN, G.; MESSER, K.; WOHLFARTH, M.; KRAUS, J.; DUMBUYA, K. & RÜCKERT, M. "HPLC-CD on-line coupling in combination with HPLC-NMR and HPLC-MS/MS for the determination of the full absolute stereostructure of new metabolites in plant extracts". *Anal. Chem.*, **71** (14): 2678, 1999.
30. IWASA, K.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; SUGIURA, M.; TAKEUCHI, A.; TODE, C.; TOKUDA, H. & TAKEDA, K. "Online Structural Elucidation of Alkaloids and Other Constituents in Crude Extracts and Cultured Cells of *Nandina domestica* by Combination of LC-MS/MS, LC-NMR, and LC-CD Analyses". *J. Nat. Prod.*, **71** (8): 1376, 2008.
31. WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K. & HOSTETTMANN, K. "Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: A powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites". *J. Chromatogr. A*, **1000** (1-2): 437, 2003.
32. US DEPARTMENT OF COMMERCE, N. "NIST Standard Reference Database 1A v14". Disponível em: <<http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>>. Acesso em: 20/8/2015.
33. "MassBank | Statistics". Disponível em: <<http://www.massbank.jp/en/statistics.html>>. Acesso em: 20/8/2015.
34. "KEGG COMPOUND". Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg/compound/>>. Acesso em: 20/8/2015.
35. "The PubChem Project". Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 20/8/2015.
36. "ChemSpider | Search and share chemistry". Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 20/8/2015.
37. WOLF, S.; SCHMIDT, S.; MÜLLER-HANNEMANN, M. & NEUMANN, S. "In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra". *BMC Bioinformatics*, **11** (1): 148, 2010.
38. WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; LACHAVANNE, J.-B. & HOSTETTMANN, K. "Identification of the polar constituents of *Potamogeton* species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSn and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside". *Phytochemistry*, **65** (16): 2401, 2004.
39. TATSIS, E. C.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT, J. & GEROTHANASSIS, I. P. "Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS". *Phytochemistry*, **68** (3): 383, 2007.
40. SEGER, C.; STURM, S. & STUPPNER, H. "Mass spectrometry and NMR

- spectroscopy: modern high-end detectors for high resolution separation techniques – state of the art in natural product HPLC-MS, HPLC-NMR, and CE-MS hyphenations". *Nat. Prod. Rep.*, 30 (7): 970, 2013.
41. BOTITSI, H. V.; GARBIS, S. D.; ECONOMOU, A. & TSIPI, D. F. "Current mass spectrometry strategies for the analysis of pesticides and their metabolites in food and water matrices". *Mass Spectrom. Rev.*, 30 (5): 907, 2011.
42. FERNANDEZ, L. E. M. "Introduction to ion trap mass spectrometry: Application to the structural characterization of plant oligosaccharides". *Carbohydr. Polym.*, 68 (4): 797, 2007.
43. GHARAIBEH, A. A.; AL-SERINI, A.; QASAYMEH, R. M.; MA'AYA'H, A. S.; TAWAHA, K.; EL-ELIMAT, T. & ALALI, F. Q. "Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ultraviolet/visible photodiode array analysis of selected colchicum species". *Z. Naturforschung - Sect. C J. Biosci.*, 67 C (9-10): 451, 2012.
44. MCGARVEY, B. D.; LIAO, H.; DING, K. & WANG, X. "Dereplication of known pregnane glycosides and structural characterization of novel pregnanes in *Marsdenia tenacissima* by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-tandem mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.*, 47 (6): 687, 2012.
45. ABBET, C.; SLACANIN, I.; HAMBURGER, M. & POTTERAT, O. "Comprehensive analysis of *Phyteuma orbiculare* L., a wild Alpine food plant". *Food Chem.*, 136 (2): 595, 2013.
46. SPRENGER, R. DA F. & CASS, Q. B. "Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, **1291**: 97, 2013.
47. JAROSZEWSKI, J. W. "Hyphenated NMR methods in natural products research, part 1: direct hyphenation". *Planta Med.*, 71 (8): 691, 2005.
48. RICCIO, R.; BIFULCO, G.; CIMINO, P.; BASSARELLO, C. & GOMEZ-PALOMA, L. "Stereochemical analysis of natural products. Approaches relying on the combination of NMR spectroscopy and computational methods". *Pure Appl. Chem.*, 75 (2-3): 295, 2003.
49. HALABALAKI, M.; VOUGOGIANNOPOULOU, K.; MIKROS, E. & SKALTSOUNIS, A. L. "Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products". *Curr. Opin. Biotechnol.*, **25**: 1, 2014.
50. CORCORAN, O. & SPRAUL, M. "LC–NMR–MS in drug discovery". *Drug Discov. Today*, 8 (14): 624, 2003.
51. NDJOKO, K.; WOLFENDER, J.-L.; RÖDER, E. & HOSTETTMANN, K. "Determination of pyrrolizidine alkaloids in *Senecio* species by liquid chromatography/thermospray-mass spectrometry and liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectroscopy". *Planta Med.*, 65 (6): 562, 1999.
52. WANN, M.-H. "20 Application of LC-NMR in pharmaceutical analysis". IN: *Separation Science and Technology*. AHUJA, S. & DONG, M. W. (Eds.). Academic Press, 2005. p. 569–579.

53. JAROSZEWSKI, J. W. "Hyphenated NMR methods in natural products research, Part 2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation". *Planta Med.*, 71 (9): 795, 2005.
54. BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "QUEBRA-PEDRA: *Phyllanthus niruri* herbae". IN: Farmacopeia Brasileira. Brasília, 2010. p. 1229–1234.
55. BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. "QUEBRA-PEDRA: *Phyllanthus tenellus* herbae". IN: Farmacopeia Brasileira. Brasília, 2010. p. 1235–1240.
56. THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II". *Bot. J. Linn. Soc.*, 141 (4): 399, 2003.
57. MARTINS, L. R. R. Perfil Cromatográfico e Análise Multivariada para o Controle de Qualidade de Amostras Comerciais do Gênero *Phyllanthus* (Quebra-Pedra). São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2008. Tese de Doutorado, 154 p.
58. SILVA, M. J. A. DA & SALES, M. F. DE. "*Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae) em Pernambuco, Brasil". *Acta Bot. Bras.*, 21: 79, 2007.
59. TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I. A. & GIULIETTI, A. M. "O gênero *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil". *Acta Bot. Bras.*, 17: 265, 2003.
60. LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. Plantas Medicinais do Brasil: Nativa e Exóticas. 7a ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. p. 200.
61. WEBSTER, G. L. "A Revision of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in the Continental United States". *Brittonia*, 22: 44, 1970.
62. GARCIA, C. M.; ZANETTI, G. D.; ZAGO, A. M.; BITTENCOURT, C. F. & HEINZMANN, B. M. "Estudo Morfo-Anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb.". *Acta Farm. Bonaer.*, 23 (1): 67, 2004.
63. FARNSWORTH, N. R. "Ethnopharmacology and drug development". *Book Symp. Ethnobot. Search New Drugs*, 42, 1996. Fortaleza-CE.
64. MATOS, F. J. A. Farmácias Vivas: Sistema de Utilização de Plantas Medicinais Projetado para Pequenas Comunidades. 2a ed. Fortaleza, EUFC, 1994. p. 140–142.
65. IWU, M. M. Handbook of African Medicinal Plants. Boca Raton, CRC Press, 1993. p. 34.
66. KAPOOR, L. D. Handbook of ayurvedic medicinal plants. Boca Raton, CRC Press, 1990. p. 261–262.
67. RIBEIRO, P. G. F. & DINIZ, R. C. Plantas Aromáticas e Medicinais: Cultivo e Utilização. Londrina, IAPAR, 2008. p. 171.
68. SIMÕES, C. M. O. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 3a ed. Porto Alegre, UFRGS, 1989. p. 72–73.
69. HUANG, K. C. The pharmacology of chinese herbs. 2a ed. Boca Raton, CRC Press, 1999. p. 279.

70. BARROS, M. E.; SCHOR, N. & BOIM, M. A. "Effects of an aqueous extract from *Phyllanthus niruri* on calcium oxalate crystallization in vitro". *Urol. Res.*, 30 (6): 374, 2003.
71. MURUGAIYAH, V. & CHAN, K.-L. "Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents". *J. Ethnopharmacol.*, 124 (2): 233, 2009.
72. RODGERS, A. L.; WEBBER, D.; RAMSOUT, R. & GOHEL, M. D. I. "Herbal preparations affect the kinetic factors of calcium oxalate crystallization in synthetic urine: implications for kidney stone therapy". *Urolithiasis*, 42 (3): 221, 2014.
73. RAMSOUT, R.; RODGERS, A. & WEBBER, D. "E15 Investigation of the effects of *Phyllanthus niruri* on in vitro calcium oxalate crystallization". *Eur. Urol. Suppl.*, Abstracts of the 1st Meeting of the EAU Section of Urolithiasis (EULIS)., 10 (7): 467, 2011.
74. FREITAS, A. M.; SCHOR, N. & BOIM, M. A. "The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation". *BJU Int.*, 89 (9): 829, 2002.
75. BARROS, M. E.; LIMA, R.; MERCURI, L. P.; MATOS, J. R.; SCHOR, N. & BOIM, M. A. "Effect of extract of *Phyllanthus niruri* on crystal deposition in experimental urolithiasis". *Urol. Res.*, 34 (6): 351, 2006.
76. NISHIURA, J. L.; CAMPOS, A. H.; BOIM, M. A.; HEILBERG, I. P. & SCHOR, N. "*Phyllanthus niruri* normalizes elevated urinary calcium levels in calcium stone forming (CSF) patients". *Urol. Res.*, 32 (5): 362, 2004.
77. MICALI, S.; SIGHINOLFI, M. C.; CELIA, A.; DE STEFANI, S.; GRANDE, M.; CICERO, A. F. & BIANCHI, G. "Can *Phyllanthus niruri* Affect the Efficacy of Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy for Renal Stones? A Randomized, Prospective, Long-Term Study". *J. Urol.*, 176 (3): 1020, 2006.
78. CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R.; CECHINEL FILHO, V. & YUNES, R. A. "A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential". *Med. Res. Rev.*, 18 (4): 225, 1998.
79. BAGALKOTKAR, G.; SAGINEEDU, S. R.; SAAD, M. S. & STANSLAS, J. "Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review". *J. Pharm. Pharmacol.*, 58 (12): 1559, 2006.
80. PATEL, R. S.; ROY, M. & DUTTA, G. K. "Mass spectrometry - a review". *Vet. World*, 5 (3): 185, 2012.
81. QI, W.; HUA, L. & GAO, K. "Chemical constituents of the plants from the genus *Phyllanthus*". *Chem. Biodivers.*, 11 (3): 364, 2014.
82. SARIN, B.; VERMA, N.; MARTÍN, J. P. & MOHANTY, A. "An Overview of Important Ethnomedicinal Herbs of *Phyllanthus* Species: Present Status and Future Prospects.". *Sci. World J.*, 2014: 1, 2014.
83. GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. "Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários". *Quím. Nova*, 30 (2), 2007.
84. LIANG, Y.-Z.; XIE, P. & CHAN, K. "Quality control of herbal medicines". *J.*

- Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci., 812 (1-2): 53, 2004.
85. CALIXTO, J. B. "Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)". *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **33**: 179, 2000.
86. MARTINS, L.; PEREIRA-FILHO, E. & CASS, Q. "Chromatographic profiles of *Phyllanthus*; aqueous extracts samples: a proposition of classification using chemometric models". *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2): 469, 2011.
87. FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; VINHOLES, J.; SILVA, S. T.; VALENTÃO, P. & ANDRADE, P. B. "Bauhinia forficata Link authenticity using flavonoids profile: Relation with their biological properties". *Food Chem.*, 134 (2): 894, 2012.
88. SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; MENDES, G. C.; SEABRA, R. M. & FERREIRA, M. A. "Phenolic profile in the evaluation of commercial quince jellies authenticity". *Food Chem.*, 71 (2): 281, 2000.
89. AMARAL, J. S.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A. & FERRERES, F. "Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves". *Food Chem.*, 88 (3): 373, 2004.
90. HENDRICKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; DE BONTE, D. & HALL, R. D. "Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts". *Anal. Chim. Acta*, 545 (1): 53, 2005.
91. MARKOM, M.; HASAN, M.; DAUD, W. R. W.; SINGH, H. & JAHIM, J. M. "Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods". *Sep. Purif. Technol.*, 52 (3): 487, 2007.
92. WEI, W.-X.; PAN, Y.-J.; ZHANG, H.; LIN, C.-W. & WEI, T.-Y. "Two new compounds from *Phyllanthus niruri*". *Chem. Nat. Compd.*, 40 (5): 460, 2004.
93. LI, Q. M. & CLAEYS, M. "Characterization and differential of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry". *Biol. Mass Spectrom.*, 23 (7): 406, 1994.
94. SPRENGER, R. F. Caracterização de quatro espécies de quebra-pedra utilizando cromatografia líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massa em múltiplos estágios. São Carlos, UFSCar, 2011. Dissertação de Mestrado, 122 p.
95. SPRENGER, R. F.; TOMASI, S. S.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B. & BATISTA JR., J. M. "Solution-state conformations of natural products from chiroptical spectroscopy: the case of isocoeilagin. *Org Biomol Chem.*, 14 (13): 3369, 2016.
96. CASS, Q. B. "Ortogonalidade no modo reverso de eluição". IN: *Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações*. CASS, Q. B. & CASSIANO, N. M. (Eds.). Rio de Janeiro, Elsevier, 2015. p. 1–16.
97. "Waters Reversed-Phase Column Selectivity chart". Disponível em: <http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475&locale=pt_BR>. Acesso em: 9/12/2015.
98. DOLAN, J. W. "Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography". *J. Chromatogr. A*, 965 (1-2): 195, 2002.

99. VAN DEEMTER, J. J. "Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography: J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg and A. Klinkenberg, Chem. Engng Sci.5 271–289, 1956". Chem. Eng. Sci., Frontiers of Chemical Engineering Science., 50 (24): 3867, 1995.
100. KUMAR, A.; SAINI, G.; NAIR, A. & SHARMA, R. "UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis". Acta Pol. Pharm., 69 (3): 371, 2012.
101. PODWOJSKI, K.; FRITSCH, A.; CHAMRAD, D. C.; PAUL, W.; SITEK, B.; STÜHLER, K.; MUTZEL, P.; STEPHAN, C.; MEYER, H. E.; URFER, W.; ICKSTADT, K. & RAHNENFÜHRER, J. "Retention time alignment algorithms for LC/MS data must consider non-linear shifts". Bioinforma. Oxf. Engl., 25 (6): 758, 2009.
102. BERG, R. A. VAN DEN; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K. & WERF, M. J. VAN DER. "Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data". BMC Genomics, 7 (1): 142, 2006.
103. JOLLIFFE, I. "Principal Component Analysis". IN: Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. 487 p.
104. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S. & VOLPE, P. L. O. "Chemometrics I: multivariate calibration, a tutorial". Quím. Nova, 22 (5): 724, 1999.
105. MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R. & CARNEIRO, R. L. "Análise multivariada de dados cromatográficos: conceitos e aplicações". IN: Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações. CASS, Q. B. & CASSIANO, N. M. (Eds.). Rio de Janeiro, Perfil cromatográfico – desreplicando para não reisolar, 2015. p. 251–274.
106. HAIR JR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J. & ANDERSON, R. E. "Exploratory Factor Analysis". IN: Multivariate Data Analysis. Harlow, Pearson Education Limited, 2014. p. 89–150.
107. NAVARRO-GONZÁLEZ, I.; GONZÁLEZ-BARRIO, R.; GARCÍA-VALVERDE, V.; BAUTISTA-ORTÍN, A. B. & PERIAGO, M. J. "Nutritional Composition and Antioxidant Capacity in Edible Flowers: Characterisation of Phenolic Compounds by HPLC-DAD-ESI/MSn". Int. J. Mol. Sci., 16 (1): 805, 2014.
108. CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S. & KUHNERT, N. "Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids". J. Agric. Food Chem., 51 (10): 2900, 2003.
109. POJCHAIJONGDEE, N.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S. & POOBRASERT, O. "Geraniinic acid derivative from the leaves of *Phyllanthus reticulatus*". Pharm. Biol., 48 (7): 740, 2010.
110. HUANG, Y. L.; CHEN, C. C.; HSU, F. L. & CHEN, C. F. "Two Tannins from *Phyllanthus tenellus*". J. Nat. Prod., 61 (4): 523, 1998.
111. MUELLER-HARVEY, I. "Analysis of hydrolysable tannins". Anim. Feed Sci. Technol., Tannins: Analysis and Biological Effects in Ruminant Feeds., 91 (1–2): 3, 2001.
112. DOMON, B. & COSTELLO, C. "A Systematic Nomenclature for Carbohydrate

Fragmentations in Fab-MS MS Spectra of Glycoconjugates". *Glycoconj. J.*, 5 (4): 397, 1988.

113. SALMINEN, J.-P.; OSSIPOV, V.; LOPONEN, J.; HAUKIOJA, E. & PIHLAJA, K. "Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 864 (2): 283, 1999.

114. MA, Y. L.; LI, Q. M.; VANDENHEUVEL, H. & CLAEYS, M. "Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry". *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (12): 1357, 1997.

115. HVATTUM, E. & EKEBERG, D. "Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.*, 38 (1): 43, 2003.

116. CUYCKENS, F. & CLAEYS, M. "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids". *J. Mass Spectrom.*, 39 (1): 1, 2004.

117. ABLAJAN, K.; ABLIZ, Z.; SHANG, X.-Y.; HE, J.-M.; ZHANG, R.-P. & SHI, J.-G. "Structural characterization of flavonol 3,7-di-O-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry". *J. Mass Spectrom.*, 41 (3): 352, 2006.

118. FERRERES, F.; LLORACH, R. & GIL-IZQUIERDO, A. "Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry". *J. Mass Spectrom. JMS*, 39 (3): 312, 2004.

119. BECCHI, M. & FRAISSE, D. "Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids". *Biol. Mass Spectrom.*, 18 (2): 122, 1989.

120. WARIDEL, P.; WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J. & HOSTETTMANN, K. "Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers". *J. Chromatogr. A*, 926 (1): 29, 2001.

121. FERRERES, F.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P. & GIL-IZQUIERDO, A. "Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 1182 (1): 56, 2008.

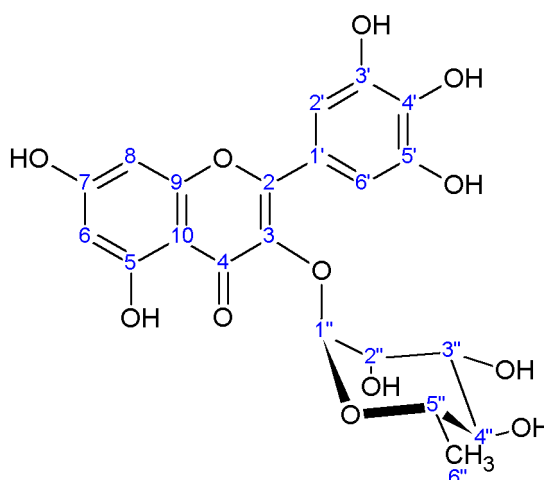
122. BENAYAD, Z.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. & ES-SAFI, N. E. "Characterization of flavonoid glycosides from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) crude seeds by HPLC-DAD-ESI/MS analysis". *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (11): 20668, 2014.

123. OLIVEIRA, D. F.; PEREIRA, A. C.; FIGUEIREDO, H. C. P.; CARVALHO, D. A.; SILVA, G.; NUNES, A. S.; ALVES, D. S. & CARVALHO, H. W. P. "Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region". *Fitoterapia*, 78 (2): 142, 2007.

124. MIRANDA, G. S.; SANTANA, G. S.; MACHADO, B. B.; COELHO, F. P. & CARVALHO, C. A. "In vitro antibacterial activity of four plant species at different alcoholic contents". *Rev. Bras. Plantas Med.*, 15 (1): 104, 2013.

125. HUANG, R.-L.; HUANG, Y.-L.; OU, J.-C.; CHEN, C.-C.; HSU, F.-L. & CHANG, C. "Screening of 25 compounds isolated from *Phyllanthus* species for anti-human hepatitis B virus in vitro". *Phytother. Res.*, 17 (5): 449, 2003.
126. IGNÁCIO, S. R. N.; FERREIRA, J. L. P.; ALMEIDA, M. B. & KUBELKA, C. F. "Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts". *J. Ethnopharmacol.*, 74 (2): 181, 2001.

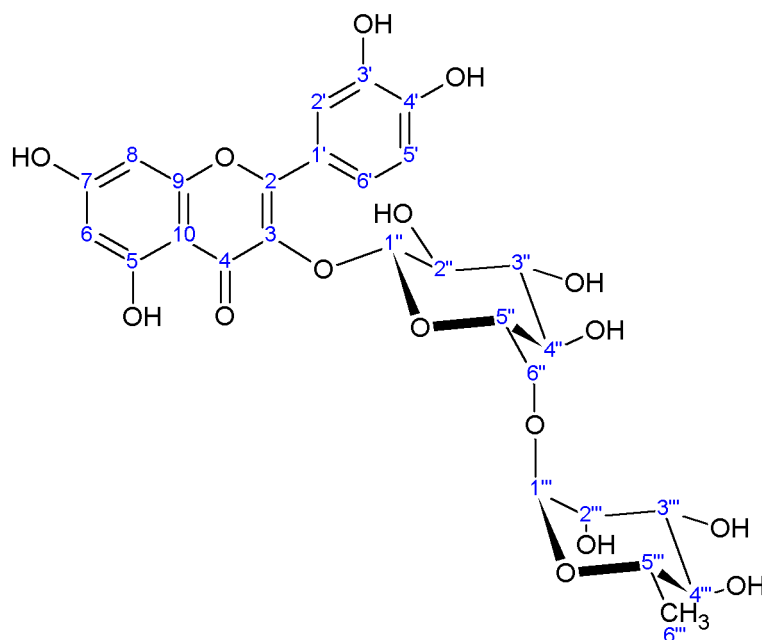
APÊNDICE 1: DADOS DE NMR DE MIRICITRINA (COMPOSTO 1)



	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	6,20 (d; $J = 2,12$ Hz)	H-8	C-6 (99,4)	C-5 (162,6) C-7 (165,2) C-8 (94,4) C-10 (105,8)
H-8	6,37 (d; $J = 2,12$ Hz)	H-6	C-8 (94,4)	C-4 (179,4) C-6 (99,4) C-7 (165,2) C-9 (158,1) C-10 (105,8)
H-2'/H-6'	6,95 (s)	-	C-2'/C-6' (109,3)	C-2 (159,2) C-1' (120,7) C-3'/C-5' (146,5) C-4' (137,5) C-2'/C-6' (109,3)
H-1''	5,32 (d; $J = 1,61$ Hz)	H-2''	C-1'' (103,3)	C-3 (136,0) C-2'' (71,6)
H-2''	4,21 (dd; $J = 3,31$ e $1,70$ Hz)	H-1''/H-3''	C-2'' (71,6)	C-3'' (71,8) C-4'' (73,0)
H-3''	3,78 (dd; $J = 9,58$ e $3,39$ Hz)	H-2''/H-4''	C-3'' (71,8)	C-2'' (71,6) C-4'' (73,0)

H-4"	3,35 (m)	-	C-4" (73,0)	C-3" (71,7) C-5" (71,8) C-6" (17,5)
H-5"	3,51 (dq; $J = 9,50$ e $6,20$ Hz)	H-4"/H-6"	C-5" (71,7)	C-3" (71,8) C-4" (73,0) C-6" (17,5)
H-6"	0,96 (d; $J = 6,19$ Hz)	H-5"	C-6" (17,5)	C-4" (73,0) C-5" (71,8)

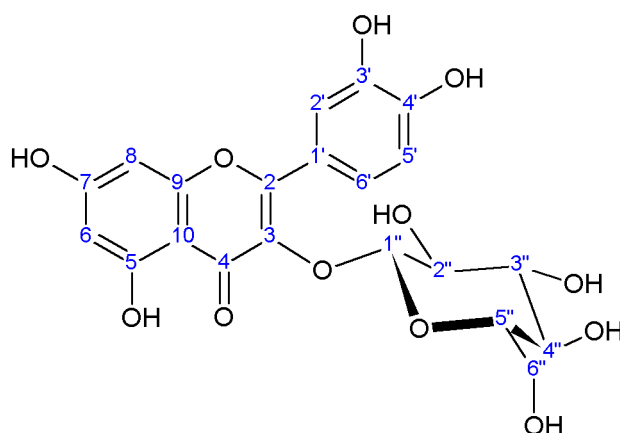
APÊNDICE 2: DADOS DE NMR DE RUTINA (COMPOSTO 2)



	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	6,24 (d; <i>J</i> = 2,20 Hz)	H-8	C-6 (99,4)	C-4 (179,3) C-5 (162,6) C-7 (165,6) C-8 (94,4) C-10 (105,2)
H-8	6,43 (d; <i>J</i> = 2,20 Hz)	H-6	C-8 (94,4)	C-6 (99,4) C-7 (165,6) C-9 (158,0) C-10 (105,2)
H-2'	7,69 (d; <i>J</i> = 2,20 Hz)	H-6'	C-2' (117,1)	C-2 (159,1) C-1' (122,7) C-3' (145,4) C-4' (149,4) C-6' (122,8)
H-5'	6,90 (d; <i>J</i> = 8,31 Hz)	H-6'	C-5' (115,4)	C-1' (122,7) C-3' (145,4) C-4' (149,4) C-6' (122,8)
H-6'	7,65 (dd; <i>J</i> = 8,48 e 2,20 Hz)	H-2'/H-5'	C-6' (122,8)	C-2 (159,1) C-2' (117,1) C-5' (117,1) C-4' (149,4)
H-1''	5,13 (d; <i>J</i> = 7,80 Hz)	H-2''	C-1'' (103,9)	C-3 (135,1) C-3' (77,6)
H-2''	3,25-3,51 (m)	H-1''/H-3''	C-2'' (75,0)	C-1'' (103,9) C-3'' (77,6)

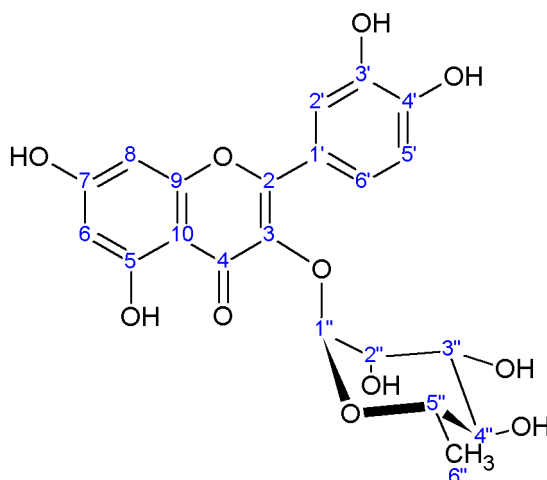
	¹H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-3''	3,25-3,51 (m)	H-4''	C-3'' (77,6)	C-2'' (75,0) C-4'' (70,8)
H-4''	3,25-3,51 (m)	-	C-4'' (70,8)	C-3'' (77,6)
H-5''	3,25-3,51 (m)	H-6a''	C-5'' (76,7)	C-4'' (70,8) C-6'' (68,0)
H-6a''	3,82 (dd; $J = 11,11$ e $1,44$ Hz)	H-5''/H-6b''	C-6'' (68,0)	C-4'' (70,8) C-1''' (101,8)
H-6b''	3,25-3,51 (m)	H-6a''	C-6'' (68,0)	C-5''' (76,7)
H-1'''	4,54 (d; $J = 1,53$ Hz)	H-2'''	C-1''' (101,8)	C-2'''/C-3''' (71,4) C-5''' (69,0)
H-2'''	3,65 (dd; $J = 3,39$ e $1,53$ Hz)	H-1'''/H-3'''	C-2''' (71,4)	C-3''' (71,4) C-4''' (73,4)
H-3'''	3,56 (dd; $J = 9,49$ e $3,39$ Hz)	H-2'''/H-4'''	C-3''' (71,4)	C-4''' (73,4) C-5''' (69,0)
H-4'''	3,25-3,51 (m)		C-4''' (73,4)	C-3''' (71,4) C-5''' (69,0)
H-5'''	3,25-3,51 (m)	H-4'''/H-6'''	C-5''' (69,0)	C-6''' (17,3)
H-6'''	1,14 (d; $J = 6,27$ Hz)	H-5'''	C-6''' (17,3)	C-4''' (73,4) C-5''' (69,0)

APÊNDICE 3: DADOS DE NMR DE ISOQUERCITRINA (COMPOSTO 3)



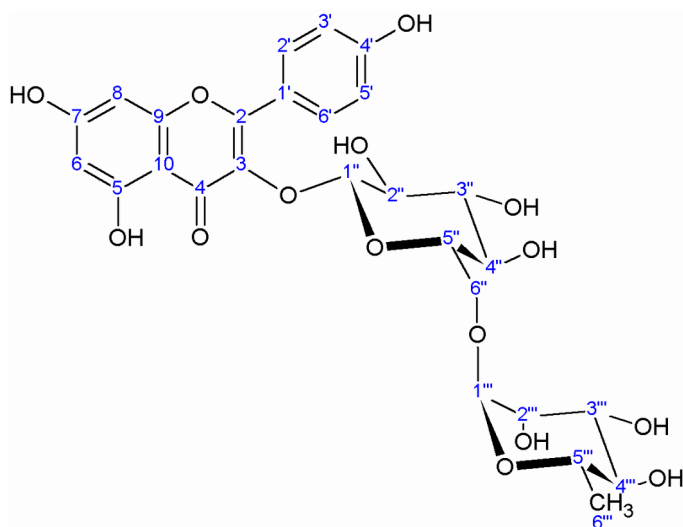
	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	6,23 (d; $J = 2,03$ Hz)	H-8	C-6 (99,3)	-
H-8	6,42 (d; $J = 2,03$ Hz)	H-6	C-8 (94,2)	-
H-2'	7,72 (d; $J = 2,20$ Hz)	H-6'	C-2' (117,1)	C-6' (122,8)
H-5'	6,89 (d; $J = 8,48$ Hz)	H-6'	C-5' (115,9)	C-3' (146,3) C-4' (149,6) C-6' (122,8)
H-6'	7,61 (dd; $J = 8,48$ e $2,20$ Hz)	H-2'/H-5'	C-6' (122,8)	C-2 (155,6) C-2' (117,1) C-4' (149,7)
H-1''	5,27 (d; $J = 7,63$ Hz)	H-2''	C-1'' (103,9)	C-3 (135,4)
H-2''	3,50 (dd; $J = 9,30$ e $7,80$)	H-1''/H-3''	C-2'' (75,5)	-
H-3''	3,23-3,49 (m)	H3''/H-4''	C-3'' (77,6)	-
H-4''	3,23-3,49 (m)	-	C-4'' (71,0)	-
H-5''	3,23-3,49 (m)	H-4''/H-6a'' /H-6b''	C-5'' (78,1)	-
H-6a''	3,73 (dd; $J = 11,95$ e $2,29$ Hz)	H-5''/H-6b''	C-6'' (62,0)	-
H-6b''	3,59 (dd; $J = 11,95$ e $5,40$ Hz)	H-5''/H-6a''	C-6'' (62,0)	-

APÊNDICE 4: DADOS DE NMR DE QUERCITRINA (COMPOSTO 5a)



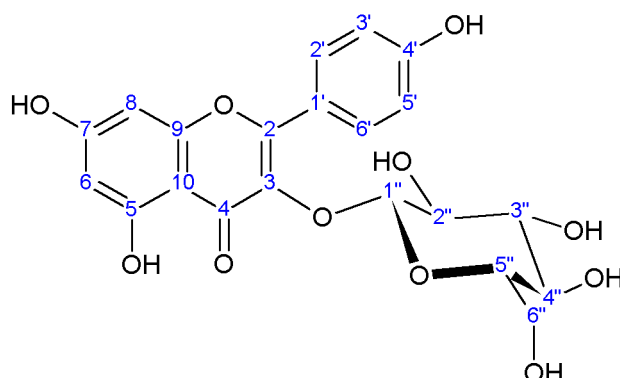
	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	6,22 (d; $J = 2,20$ Hz)	H-8	C-6 (99,6)	C-5 (162,8) C-10 (105,7)
H-8	6,40 (d; $J = 2,20$ Hz)	H-6	C-8 (94,5)	C-6 (99,6) C-7 (165,8) C-9 (158,8) C-10 (105,9)
H-2'	7,36 (d; $J = 2,20$ Hz)	H-6'	C-2' (116,7)	C-2 (159,8) C-1'/C-6' (122,8) C-3' (146,7) C-4' (150,0)
H-5'	6,93 (d; $J = 8,31$ Hz)	H-6'	C-5' (116,0)	C1'/C-6' (122,8) C-3' (146,7) C-4' (149,7)
H-6'	7,33 (dd; $J = 8,31$ e $2,20$ Hz)	H-2'/H-5'	C-6' (122,8)	C-2'/C-5' (116,7) C-4' (149,7)
H-1''	5,37 (d; $J = 1,70$ Hz)	H-2''	C-1'' (103,4)	C-3 (136,0) C-2'' (72,0)
H-2''	4,23 (dd; $J = 3,39$ e $1,70$)	H-1''/H-3''	C-2'' (72,0)	C-3'' (72,0)
H-3''	3,76 (dd; $J = 9,32$ e $3,39$)	H3''/H-4''	C-3'' (72,0)	C-2'' (72,0) C-4'' (73,9)
H-4''	3,35-3,43 (m)	H-3''	C-4'' (73,9)	C-3'' (72,0) C-6'' (17,8)
H-5''	3,35-3,43 (m)	H-4''/H-6''	C-5'' (74,4)	C-4'' (73,4)
H-6''	0,96 (d; $J = 6,1$ Hz)	H-5''	C-6'' (17,8)	C-3''/C-4''/C5''

APÊNDICE 5: DADOS DE NMR DE CANFEROL 3-RUTINOSÍDEO (COMPOSTO 5b)



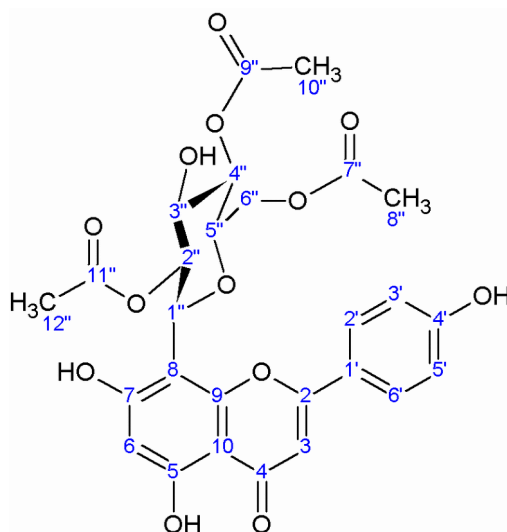
	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	6,24 (d; $J = 2,03$ Hz)	H-8	C-6 (100,3)	-
H-8	6,44 (d; $J = 2,03$ Hz)	H-6	C-8 (94,7)	-
H-2'/H-6'	8,09 (d; $J = 8,99$ Hz)	H-3'/H-5'	C-2'/C-6'(132,5)	C-2 (162,0) C-2'/C-6' (132,5) C-4' (159,6)
H-3'/H-5'	6,91 (d; $J = 8,99$ Hz)	H-2'/H-6'	C-3'/C-5' (116,9)	C-2 (162,0) C-1' (122,8) C-3'/C-5' (116,9)
H-1''	5,15 (d; $J = 7,46$ Hz)	H-2''	C-1'' (104,8)	-
H-2''	3,25-3,50 (m)	H-1''	-	-
H-3''	3,25-3,50 (m)	-	-	-
H-4''	3,25-3,50 (m)	-	-	-
H-5''	3,25-3,50 (m)	H-6a''	-	-
H-6a''	3,82 (dd; $J = 11,27$ e $1,61$ Hz)	H-5''	C-6'' (68,4)	-
H-6b''	3,25-3,51 (m)	-	-	-
H-1'''	4,53 (d; $J = 1,53$ Hz)	H-2'''	C-1''' (102,3)	C-2'''/C-3''' (72,5) C-5''' (69,6)
H-2'''	3,64 (dd; $J = 3,31$ e $1,44$ Hz)	H-1'''/H-3'''	C-2''' (72,4)	C-4''' (73,9)
H-3'''	3,54 (dd; $J = 9,66$ e $3,39$ Hz)	H-2'''/H-4'''	C-3''' (72,6)	-
H-4'''	3,25-3,50 (m)	H-3'''	C-4''' (73,9)	-
H-5'''	3,25-3,50 (m)	H-4'''/H-6'''	C-5''' (69,6)	-
H-6'''	1,14 (d; $J = 6,10$ Hz)	H-5'''	C-6''' (18,5)	C-4''' (73,9) C-5''' (69,6)

APÊNDICE 6: DADOS DE NMR DE ASTRAGALINA (COMPOSTO 6)



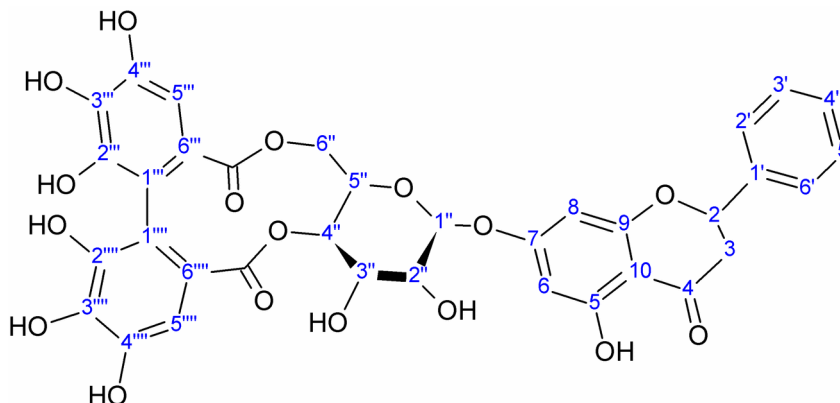
	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	6,22 (d; $J = 2,03$ Hz)	H-8	C-6 (99,3)	-
H-8	6,41 (d; $J = 2,03$ Hz)	H-6	C-8 (94,0)	-
H-2'/H-6'	8,07 (d; $J = 9,0$ Hz)	H-3'/H-5'	C-2'/C-6' (131,4)	C-2 (161,7)
H-3'/H-5'	6,80 (d; $J = 9,0$ Hz)	H-2'/H-6'	C-3'/C-5' (115,5)	C-1' (123,1)
H-1''	5,26 (d; $J = 7,46$ Hz)	H-2''	C-1'' (103,5)	-
H-2''	3,20-3,48 (m)	H-1''	-	-
H-3''	3,20-3,48 (m)	-	-	-
H-4''	3,20-3,48 (m)	-	-	-
H-5''	3,20-3,48 (m)	H-4'''/H-6a''/H-6b''	-	-
H-6a''	3,69 (dd; $J = 11,6$ e $2,4$ Hz)	H-5''/H-6b''	-	-
H-6b''	3,53 (dd; $J = 11,6$ e $5,1$ Hz)	H-5''/H-6a''	-	-

APÊNDICE 7: DADOS DE NMR DE NARINGENINA-8-C-2'',4'',6''-O-TRIAcETILGLUCOSÍDEO (COMPOSTO 9)



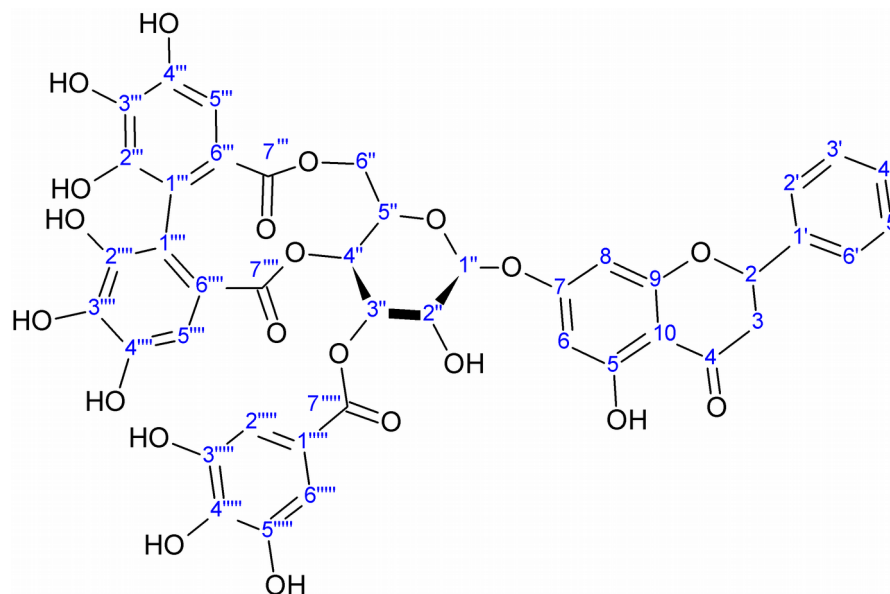
	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-6	5,95 (s)	-	C-6 (96,3)	C-10 (103,4)
H-2	5,59 (d(l); <i>J</i> = 13,3 Hz)	H-3a/H-3b	C-2 (79,5)	C-4 (198,2)
H-3a	3,09 (dd; <i>J</i> = 17,2 e 13,8)	H-2/H-3b	C-3 (44,3)	C-2 (79,5)
H-3b	2,84 (d(l); <i>J</i> = 17,2 Hz)	H-2/H-3a	C-3 (44,3)	-
H-2'/H-6'	7,51 (d; <i>J</i> = 8,70 Hz)	H-3'/H-5'	C-2'/C-6'(128,5)	C-2'/C-6'(128,5) C-4' (158,5)
H-3'/H-5'	6,92 (d; <i>J</i> = 8,7 Hz)	H-2'/H-6'	C-3'/C-5'(116,8)	C-1' (131,5)
H-1''	4,90 (m)	H-2''	C-1'' (72,9)	C-7 (164,5) C-10 (103,4)
H-2''	5,73 (t; <i>J</i> = 9,2 Hz)	H-1''/H-3''	C-2'' (73,2)	-
H-3''	3,81 (t; <i>J</i> = 9,4)	H-4''/H-5''	C-3'' (75,6)	-
H-4''	4,90 (m)	H-3''/H-5''	C-4'' (72,9)	C-4'' (72,9)
H-5''	3,75 (m)	H-4''/H-6a''/H-6b''	C-5'' (77,9)	-
H-6a''	4,24 (m)	H-5''/H-6b''	C-6a'' (64,2)	-
H-6b''	4,09 (d(l); <i>J</i> = 11,8 Hz)	H-5''/H-6a''	C-6b'' (64,4)	-
H-8''	1,87 (s)	-	C-8'' (21,2)	C-7'' (172,0)
H-10''	2,12 (s)	-	C-10'' (21,2)	C-9'' (172,0)
H-12''	2,02 (s)	-	C-12'' (21,4)	C-11'' (173,0)

APÊNDICE 8: DADOS DE NMR DE PINOCEMBRINA-7-O-[4'',6''-HEXAHIDROXIDIFENOIL]-B-D-GLUCOSE (COMPOSTO 10)



	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-2	5,56 (dd; $J = 13,1$ e $2,9$ Hz)	H-3a/H-3b	C-2 (80,8)	-
H-3a	3,22 (m; 1H)	H-2/H-3b	-	-
H-3b	2,87 (dd; $J = 17,2$ e $3,1$ Hz)	H-2/H-3a	C-3 (44,2)	-
H-6	6,24 (d; $J = 2,2$ Hz)	H-8	C-6 (98,1)	-
H-8	6,29 (d; $J = 2,2$ Hz)	H-6	C-8 (96,8)	-
H-2'/H-6'	7,54 (m)	H-3'/H-5'/H-4'	C-2'/C-6' (127,6)	-
H-3'/H-5'	7,45 (m)	H-2'/H-6'/H-4'	C-3'/C-5' (129,8)	-
H-4'	7,4 (m)	H-2'/H-6'/H-3'/H-5'	C-4' (129,8)	-
H-1''	5,1 (d; $J = 7,6$ Hz)	H-2''	C-1''' (101,6)	-
H-2''	3,6 (dd; $J = 9,0$ e $7,6$ Hz)	H-1''/H-2''	C-2'' (75,8)	-
H-3''	3,73 (dd; $J = 9,7$ e 9 Hz)	H-2''/H-4''	C-3'''(75,8)	-
H-4''	4,88 (m)	H-3''/H-5''	-	-
H-5''	4,14 (m)	H-4''/H-6a''/H-6b''	-	-
H-6a''	5,28 (dd; $J = 13,6$ e $6,6$ Hz)	H-5''/H-6b	-	-
H-6b''	3,85 (dd; $J = 13,2$ e $1,0$ Hz)	H-5''/H-6a	-	-
H-5'''	6,58 (s)	-	C-5''' (108,4)	-
H-5''''	6,71 (s)	-	C-5'''' (108,4)	-

APÊNDICE 9: DADOS DE NMR DE PINOCEMBRINA-7-O-[3''-O-GALOIL-4'',6''-HEXAHIDROXIDIFENOIL]-B-D-GLUCOSE (COMPOSTO 11)



	¹ H NMR	COSY	HSQC	HMBC
H-2	5,57 (dd; $J = 13,0$ e $3,1$ Hz)	H-3a/H-3b	C-2 (80,4)	-
H-3a	3,22 (m; 1H)	H-2/H-3b	-	C-4 (197,9)
H-3b	2,88 (dd; $J = 17,1$ e $3,1$ Hz)	H-2/H-3a	-	C-4 (197,9)
H-6	6,27 (d; $J = 2,2$ Hz)	H-8	C-6 (98,0)	C-10 (104,7)
H-8	6,32 (d; $J = 2,2$ Hz)	H-6	C-8 (96,5)	C-10 (104,7)
H-2'/ H-6'	7,55 (m)	H-3'/H-5'/H-4'	C-2'/C-6' (127,1)	C-2 (80,4) C-2'/C-6' (127,1) C-3'/C-5' (129,4) C-4' (129,8)
H-3'/ H-5'	7,45 (m)	H-2'/H-6'/H-4'	C-3'/C-5' (129,4)	C-1' (139,8) C-3'/C-5' (129,4) C-4' (129,8)
H-4'	7,41 (m)	H-2'/H-6'/H-3'/H-5'	C-4' (129,8)	C-2'/C-6' (127,1)
H-1''	5,27 (d; $J = 7,6$ Hz)	H-2''	C-1''' (101,0)	C-7 (166,4)
H-2''	3,88 (dd; $J = 9,3$ e $7,6$ Hz)	H-1''/H-2''	C-2'' (72,7)	-
H-3''	5,46 (dd; $J = 10,0$ e $9,3$ Hz)	H-2''/H-4''	C-3''' (75,6)	C-7'''' (167,8)
H-4''	5,09 (t; $J = 9,9$)	H-3''/H-5''	C-4''' (71,1)	C-7'''' (169,2)
H-5''	4,35 (dd; $J = 10,7$ e $5,8$)	H-4''/H-6a''/H-6b''	C-5''' (72,7)	-
H-6a''	5,36 (dd; $J = 13,6$ e $6,7$ Hz)	H-5''/H-6b''	C-6'' (63,8)	C-7''' (169,2)
H-6b''	3,9 (dd; $J = 13,4$ e $1,0$ Hz)	H-5''/H-6a''	C-6'' (63,8)	-

¹H NMR		COSY	HSQC	HMBC
H-5'''	6,48 (s)	-	C-5''' (108,4)	C-1''' (116,1) C-3''' (137,4) C-4''' (145,4) C-7''' (169,2)
H-5''''	6,61 (s)	-	C-5'''' (108,0)	C-1'''' (116,1) C-3'''' (137,4) C-4'''' (145,4) C-7'''' (169,2)
H-2'''''/ H-6''''	7,04 (s)	-	C-2'''''/C-6'''' (110,4)	C-1'''' (120,5) C-2'''''/C-6'''' (110,4) C-3'''''/C-5'''' (146,1) C-4'''' (139,6) C-7'''' (167,8)