

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

**“DIFERENCIAÇÃO QUÍMICA DE QUATRO ESPÉCIES DE
BAUHINIA (PATA-DE-VACA)”**

Amanda Jordano Aquino*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR (A) EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

**Orientadora: Quezia Bezerra Cass
Coorientador: Antonio Gilberto Ferreira**

* bolsista CNPq

**São Carlos - SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Amanda Jordano Aquino, realizada em 15/06/2018:

Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass
UFSCar

Profa. Dra. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
UFSCar

Prof. Dr. Fernando Batista da Costa
FCFRP/USP

Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes
FFCLRP/USP

DEDICATÓRIA

Dedico a minha avó Aparecida Pistilli de Moraes (in memoriam), ao meu irmão Vinicius de Moraes Miranda (in memoriam) e aos meus Mestres com muito carinho.

EPÍGRAFE

“Fazer da interrupção um caminho novo, da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino

“Um, lembre-se de olhar para as estrelas e não para baixo, para seus pés. Dois, nunca desista do trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso. Três, se você tiver sorte o suficiente para encontrar o amor, lembre-se que é raro e não jogue fora.”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

A Deus por todo propósito de vida proporcionado.

Aos meus familiares: Joana de Moraes (mãe), Leandro Jordano (irmão), Juliane de M. Milani (irmã), Oswaldo Lasnou (tio - in Memoriam), Maria de Fátima M. Lasnou (tia), Marta Aurora Mota e Aquino (sogra), Jairo Aquino (sogro), Maria Alice Mota (tia), César da Mota e Aquino (cunhado), Lilian de Jesus (cunhada) e aos demais que contribuíram para eu chegar até aqui.

A todos os meus professores do ensino fundamental (Escola Estadual Prof. Edmur Neves), médio (Escola Estadual Prof. Genaro Domarco) e graduação (Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José do Rio Preto). Principalmente a Prof. Ieda Pastre Fertonani por todos ensinamentos e ajuda, meu orientador de iniciação científica Prof. Luiz Fernando Fertonani, ao Prof. Roberto da Silva, a Prof. Milla Alves Baffi e ao meu orientador de mestrado Prof. Maurício Boscolo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos professores e funcionários do PPGQ/UFSCar pelo trabalho realizado por nosso país.

Ao Alexandre A. Cruz pela amizade e disponibilidade no reparo de equipamentos.

Aos meus amigos do Separare (Núcleo de Pesquisa em Cromatografia) pela amizade, clima de apoio mútuo, incentivo, colaboração e momentos de descontração.

Ao Prof. Edenir R. Pereira-Filho e a Prof. Regina V. Oliveira pelo apoio e ensinamentos transmitidos.

Ao meu coorientador Prof. Antonio Gilberto Ferreira por todo apoio, ensinamentos além dos momentos inesquecíveis de dedicação e trabalho.

A minhas amigas Bianca R. L. Simões, Juliana C. Barreiro e Kenia L. Vanzolini por todo companheirismo, dedicação e ensinamentos.

A minha amiga Thayana Alves por todo companheirismo, conversas, conselhos, ensinamentos de NMR e elucidação estrutural.

A minha amiga Elza A. de Carvalho por todos os ensinamentos, carinho, pelas horas de conversa e dedicação. Não existem palavras para eu expressar a eterna gratidão que tenho por você, muito obrigada.

A médica Maria Júlia A. Geribello, ao Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ao Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, Dra. Ana Carolina de Sá Rosa e Silva, Dr. Ayrton Custódio Moreira e Dra. Paula Condé Lamparelli Elias.

Ao meu marido Pedro Luiz da Mota e Aquino por todo apoio e principalmente por estar comigo em todos os momentos. Melhor demonstração de amor não existe, muito obrigada. Eu te amo.

A todos que começaram esta linha de pesquisa no Separare juntamente com a Professora Quezia B. Cass, Prof. Flávio Luís Beltrame, Prof. Lúcia R. R. Martins, Vinicius Perasolo e Ricardo Sprenger.

A minha orientadora Prof. Quezia B. Cass por todas orientações desde a disciplina de HPLC até as reuniões e conversas. Muito obrigada por me proporcionar liberdade, equipamentos e auxílio para desenvolver esta tese, entender todas as minhas condições de vida e exigir alta qualidade nos meus resultados, sou eternamente grata.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de Variância
CM	Característica molecular
CMF	Fragmentação por migração de carga
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CRF	Fragmentação por retenção de carga
DAD	Detector de arranjo de diodos
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
HCA	Análise hierárquica de grupos
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HRMS	<i>High resolution mass spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
LC	Cromatografia líquida
MQEP	Média quadrática do erro puro
MQFaj	Média quadrática da falta de ajuste
MQr	Média quadrática do resíduo
MQR	Média quadrática da regressão
MS	<i>Mass spectrometry</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PN	Produtos Naturais
QqTOF	Sistemas híbridos do tipo quadrupolo combinado com tempo de voo
RDA	Retro-Diels-Alder
RF	Fragmentações radicalares
RHR	Rearranjo de hidrogênio remoto
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
SQR	Soma quadrática da regressão
SQT	Soma quadrática total
SV	<i>Survey view</i> – gráfico de superfície
TOF	Analisadores de massas baseados no tempo de voo
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Solventes para extração de diferentes metabólitos secundários.	15
TABELA 4.1 - Variáveis e níveis utilizados na etapa 1.	31
TABELA 5.1 - Variáveis e níveis normalizados utilizados na etapa 1 do desenvolvimento das condições cromatográficas.	42
TABELA 5.2 - Análise de variância da etapa 1.	42
TABELA 5.3 - Variáveis utilizadas na etapa 2 do desenvolvimento das condições cromatográficas.	43
TABELA 5.4 - Análise de variância da etapa 2.	44
TABELA 5.5 - Dados LC-HRMS no modo negativo de ionização dos compostos identificados ou inferidos do extrato etanólico de folhas de <i>B. longifolia</i>	50
TABELA 5.6 - Deslocamentos químicos, multiplicidades de sinais e constantes de acoplamento dos espectros de ¹ H NMR e HSQC dos flavonoides O-glicosilados identificados.	60
TABELA 5.7 - Parâmetros para cálculos das características moleculares, análise hierárquica de grupos (HCA) e análise de componentes principais (PCA).	63
TABELA 5.8 - Dados de LC-HRMS dos buckets inferidos de <i>B. forficata</i> , <i>B. variegata</i> , <i>B. longifolia</i> e <i>B. affinis</i>	65
TABELA 5.9 - Distribuição dos <i>buckets</i> inferidos de <i>B. forficata</i> , <i>B. variegata</i> , <i>B. longifolia</i> e <i>B. affinis</i>	68
TABELA 8.1 - Resultado etapa 1 – número de bandas cromatográficas por experimento. ..	97
TABELA 8.2 - Resultado etapa 2 – número de bandas cromatográficas por experimento ...	98

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - Número de publicações na área de produtos naturais de 2007-2017.....	1
FIGURA 1.2 - <i>Artemisia annua</i> L ¹⁰ – Descoberta por Tu um dos pesquisadores responsáveis por receber o prêmio Nobel de fisiologia e medicina de 2015.....	2
FIGURA 3.1 - A - <i>B. scandens</i> (trepadeiras) ²¹ ; B - <i>B. galpinii</i> (arbustos) ²² ; e C - <i>B. forficata</i> (árvore) ²³	11
FIGURA 3.2 - Distribuição das espécies <i>B. longifolia</i> (BL), <i>B. forficata</i> (BF), <i>B. variegata</i> (BV) e <i>B. affinis</i> (BA) no Brasil ²⁷	12
FIGURA 3.3 - Folhas de <i>B. longifolia</i> (A) ²⁹ , <i>B. forficata</i> (B) ¹⁹ , <i>B. variegata</i> (C) ¹⁹ e <i>B. affinis</i> (D) ³⁰	13
FIGURA 3.4 - Flores de <i>B. longifolia</i> (A) ²⁹ , <i>B. forficata</i> (B) ¹⁹ e <i>B. variegata</i> (C) ¹⁹ , <i>B. affinis</i> (D) ³⁰	13
FIGURA 3.5 - Figura ilustrativa do gráfico de superfície(SV) da análise cromatográfica no modo negativo e autoMS de <i>B. affinis</i> . Eixo X tempo de retenção (min), Y relação massa/carga(<i>m/z</i>) e Z intensidade.	22
FIGURA 3.6 - Figura ilustrativa da análise hierárquica de grupos (HCA).	23
FIGURA 3.7 - Figura ilustrativa da análise de componentes principais (PCA).	24
FIGURA 5.1 - Cromatogramas do extrato etanólico de folhas da espécie <i>Bauhinia forficata</i> . A - Antes da extração por SPE; B - após extração por SPE; C – Extratos etanólicos (em duplicata) de folhas de <i>Bauhinia forficata</i> antes e após o procedimento de tratamento das amostras.....	40
FIGURA 5.2 - Etapas no desenvolvimento das condições cromatográficas.	41
FIGURA 5.3 - Gráficos de contorno obtidos na etapa 1 do planejamento experimental.	43
FIGURA 5.4 - Gráfico de contorno obtido na etapa 2. (* Os valores no gráfico de contorno são referentes ao número de bandas cromatográficas. **condição fixa: coluna bifeníl kinetex®, pH 4,2 (Ácido Fórmico 200µM), temperatura 40°C e vazão 0,5mL/min).	45
FIGURA 5.5 - Cromatograma final após a etapa 2 do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia forficata</i> (A) cromatograma do pico base (BPC) no modo negativo de ionização (-All/MS), e (B) por UV em 254nm. Condições cromatográficas: Coluna bifeníl kinetex®, vazão 0,7 ml/min, temperatura 50°C. Gradiente: 5-70%B.....	46
FIGURA 5.6 - Gráfico de superfície (SV) e cromatogramas de pico base (BPC) no modo negativo de ionização (-All/MS) para as espécies <i>B. forficata</i> (1a e b), <i>B. variegata</i> (2a e b), <i>B. affinis</i> (3a e b) e <i>B. longifolia</i> (4a e b).	47
FIGURA 5.7 - Cromatograma de pico de base (BPC) obtido por LC-HRMS no modo de ionização negativo do extrato etanólico de folhas de <i>Bauhinia longifolia</i> . Condição	

cromatográfica: 0-60 min, 5-80% B; 60-70 min, 100% B; 70-80 min, 5% B, vazão de 1,0 mL/min e temperatura 50°C. Coluna analítica: bifenil restek® (5 µm, 150 mm × 4.6 mm).....	48
FIGURA 5.8 - Exemplos de protoantocianidinas, epímeros e dímeros adaptado de Li et. al. 2007 ¹³⁰	54
FIGURA 5.9 - Mecanismo de fragmentação no modo negativo (QqTOF) dos dímeros de proantocianidinas ^{78,130,137}	55
FIGURA 5.10 - Mecanismo de fragmentação no modo negativo (QqTOF) flavonoide O-mono/di ou tri-glicosilado (derivado) ^{78,138,139}	59
FIGURA 5.11 - Estrutura e dados de NMR da Bauhiniastatina 2 (75).....	62
FIGURA 5.12 - Dendograma – Análise hierárquica de grupos das 4 espécies de <i>Bauhinia</i> estudadas.....	69
FIGURA 5.13 - Gráfico de variância explicada (%) para escolha de número de componentes principais utilizadas no tratamento dos dados de PCA.....	70
FIGURA 5.14 - Análise de componentes principais (PCA) com 35 compostos inferidos de <i>B. forficata</i> , <i>B. variegata</i> , <i>B. longifolia</i> e <i>B. affinis</i> . 5.14a(Scores e Loadings): PC1 versus PC2 e 5.14b(Scores e Loadings): PC2 versus PC3.....	71
FIGURA 5.15 - Análise de componentes principais (PCA) com 220 buckets de <i>B. forficata</i> , <i>B. variegata</i> , <i>B. longifolia</i> e <i>B. affinis</i> . 5.15a (Scores e Loadings): PC1 versus PC2 e 5.15b(Scores e Loadings): PC2 versus PC3.....	72
FIGURA 5.16 - Cromatograma do íon extraído (EIC) de Kaempferitrina (íon molecular desprotonado, adutos e clusters).....	73

RESUMO

DIFERENCIAÇÃO QUÍMICA DE QUATRO ESPÉCIES DE *BAUHINIA* (PATA-DE-VACA). A busca de compostos inéditos a partir de produtos naturais com alta atividade biológica é uma tarefa árdua que foi aprimorada devido a evolução das técnicas analíticas instrumentais. Adicionalmente, o uso de ervas medicinais para o tratamento de doenças persiste por gerações e o estudo farmacológico destes fármacos evidencia a sua atividade biológica. No entanto, apesar de ser reconhecido o valor dos produtos naturais o desmatamento ainda cresce no Brasil. As *Bauhinias* (pata-de-vaca), com mais de 60 espécies nativas, são extensivamente utilizadas na medicina popular brasileira para o controle de diabetes. Desta maneira, em 2009 *B. forficata*, *B. variegata* e/ou *B. affinis* foram incluídas na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Inserido neste contexto, este trabalho relata os resultados obtidos da identificação por LC-HRMS e LC-SPE/NMR de compostos em extratos etanólicos de folhas de *Bauhinia longifolia*, espécie fitoquimicamente pouco estudada, e a diferenciação química de *B. forficata*, *variegata*, *longifolia* e *affinis* utilizando análise/caracterização por LC-HRMS e ferramentas quimiométricas não supervisionadas de classificação. As condições cromatográficas foram desenvolvidas utilizando planejamento fatorial completo e conhecimentos físico-químicos cromatográficos. Com este método foi possível caracterizar 74 (setenta e quatro) compostos em *Bauhinia longifolia*, a maioria destes foram identificados pela primeira vez nesta espécie, sendo eles ácidos fenólicos, proantocianidinas e flavonoides O-glicosilados. Além disso, foram isolados 6 (seis) metabólitos por LC-SPE (*time slice*) e identificados por NMR, destes compostos quatro (miricitrina, juglanina, afzelina, bauhiniastatina 2) são inéditos para *B. longifolia*, destacando-se a bauhiniastatina 2 relatada na literatura com propriedades anticancerígenas. Adicionalmente, o perfil químico (LC-HRMS) analisado por análise hierárquica de grupos (HCA) e análise de componentes principais diferenciou as 4 espécies de *Bauhinia* e outros 24 compostos foram inferidos. Assim, 99 (noventa e nove) compostos foram identificados nesta tese fornecendo informações importantes que podem ser utilizadas no controle de qualidade de extratos etanólicos de folhas de *Bauhinia*, como também para explicar propriedades etnoterapêuticas, ações farmacológicas e toxicológicas,

ABSTRACT

CHEMICAL DIFFERENTIATION OF FOUR SPECIES OF *BAUHINIA* (COW'S PAW). The search for new compounds from natural products with high biological activity is an arduous task that has improved due to the evolution of instrumental analytical techniques. In addition, the use of medicinal herbs for the treatment of diseases is still used for generations and the pharmacological studies of these drugs evidences their biological activity. In spite of this, deforestation still grows in Brazil. The *Bauhinia* (pata-de-vaca), with more than 60 native species, are extensively used in Brazilian popular medicine for the control of diabetes. Thus, in 2009 *B. forficata*, *B. variegata* and/or *B. affinis* were included in the National List of Medicinal Plants of Interest to SUS (RENISUS). In this context, the present work reports the results of LC-HRMS and LC-SPE / NMR identification of compounds in leaves of *Bauhinia longifolia*, a species with few phytochemical studies, and the chemical differentiation of *B. forficata*, *variegata*, *longifolia* and *affinis* using LC-HRMS and unsupervised chemometric tools. Chromatographic conditions were developed using full factorial design and liquid chromatographic knowledge. With this method it was possible to characterize 74 (seventy-four) compounds in *Bauhinia longifolia*. Most of these were first identified in this species, namely phenolic acids, flavonoids O-glycosylated and proanthocyanidins. In addition, 6 (six) were isolated by LC-SPE and identified by NMR in which four (miricitrin, juglanin, afzelin, bauhiniastatin 2) are unknown for this species, especially bauhiniastatin 2 reported in the literature with anticancer properties. Furthermore, the chemical profile by LC-HRMS analyzed by hierarchical cluster analysis and principal component analysis differentiated the 4 species of *Bauhinia* and 24 other compounds were inferred. Thus, 99 (ninety-nine) compounds were identified in this thesis by providing important information that can be used in the quality control of ethanolic extracts of *Bauhinia* leaves, as well as to explain ethnotherapeutic properties, pharmacological and toxicological actions.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
ABSTRACT	xi
1 - Introdução	1
2 - Objetivos	7
2.1 - Gerais	7
2.2 - Específicos	7
3 - Fundamentação teórica	11
3.1 - <i>Bauhinia forficata</i> , <i>B. variegata</i> , <i>B. longifolia</i> e <i>B. affinis</i>	11
3.2 - Análise química e técnicas analíticas avançadas na pesquisa de produtos naturais	14
3.2.1 - Preparo da amostra.....	15
3.2.2 - Técnicas instrumentais para análise química qualitativa de compostos fitoquímicos	16
3.2.3 - Técnicas hífenadas para identificação de marcadores químicos em matrizes vegetais.....	17
3.2.4 - LC-NMR	24
4 - Materiais e métodos.....	29
4.1 - Solventes.....	29
4.2 - Material Vegetal	29
4.3 - Preparo da amostra.....	30
4.4 - Desenvolvimento das condições cromatográficas	31
4.5 - Análise por LC-HRMS.....	32
4.5.1 - Caracterização de <i>B. longifolia</i>	32
4.5.2 - Análise de componentes principais das 4 espécies de <i>Bauhinia</i>	33
4.5.3 - Diferenciação das 4 espécies de <i>Bauhinia</i>	33
4.6 - Análise por LC-SPE/NMR para caracterização de <i>Bauhinia longifolia</i>	34

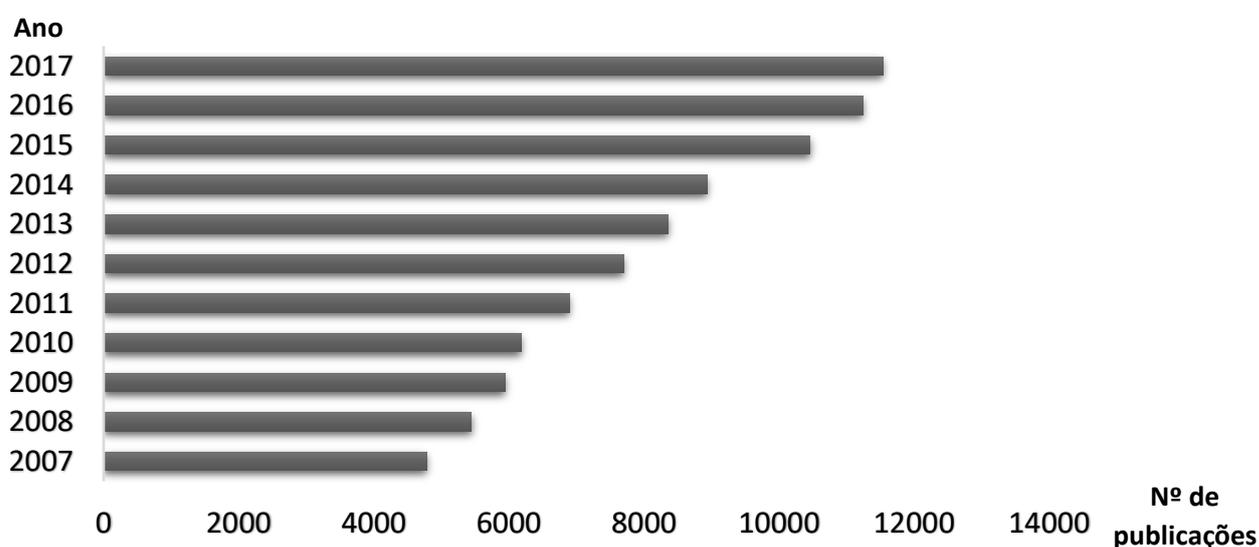
5 - Resultados e discussão	39
5.1 - Desenvolvimento analítico	39
5.2 - Perfil cromatográfico das quatro espécies de <i>Bauhinia</i>	46
5.3 - Caracterização química do extrato etanólico de <i>B. longifolia</i> por LC-HRMS e LC-SPE/NMR.....	48
5.3.1 - Ácidos fenólicos e derivados (1-16)	52
5.3.2 - Flavan-3-ols e Protoantocianidinas (17-33).....	53
5.3.3 - Flavonoides, derivados e Bauhiniastatina 2 (34-75)	56
5.3.4 - Identificação de compostos usando LC-SPE/NMR	57
5.4 - Diferenciação química utilizando ferramentas quimiométricas.....	62
5.4.1 - Estudo das características moleculares	62
5.4.1.1 - Ácido quínico e derivados (76, 83, 86)	64
5.4.1.2 - Dissacarídeo (77)	64
5.4.1.3 - Ácidos benzoicos (3, 78 e 84).....	64
5.4.1.4 - Cinamaldeídos (79, 80)	66
5.4.1.5 - Derivados do ácido cinâmico (81, 82, 88, 13, 89)	66
5.4.1.6 – Protoantocianidinas (32, 85)	66
5.4.1.7 - Catequina-galato (31).....	66
5.4.1.8 - Flavonoides e derivados (94, 99).....	67
5.4.1.9 - Outros compostos identificados	67
5.4.2 - Classificação quimiométrica.....	67
6 - Conclusões	77
7 - Referências	81
8 - Apêndices.....	97

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Durante a última década, o interesse científico sobre fitoterápicos aumentou, principalmente, com relação à sua identidade, qualidade e eficácia, sendo uma importante área de estudo da medicina, biologia, farmácia e química ¹⁻³.

Os recentes avanços na genômica, proteômica, metabolômica, tecnologias de bioinformática e analíticas levaram o número de publicações em produtos naturais (PN) a triplicarem de 2007 a 2017 ^{4,5} (FIGURA 1.1), pois revolucionaram a identificação de seus compostos, permitindo pesquisas mais abrangentes (*desreplicação*, *high-throughput screening*) do que as técnicas de isolamento tradicional. Atualmente, o foco neste tipo de pesquisa é o interesse central dos estudos fitoquímicos de PN e, de maneira geral, pode ser dividido em: i) Identificação, qualidade, autenticação de substâncias/extratos ativos e ii) busca de novos medicamentos à base de PN, produção e pesquisa para entender os efeitos farmacológicos, toxicológicos e a eficácia das ervas medicinais ².



* informação obtida em abril de 2018 da base de dados web of knowledge com a entrada "Natural products".

FIGURA 1.1- Número de publicações na área de produtos naturais de 2007-2017.

Os produtos naturais possuem enorme diversidade química e estrutural que não pode ser igualada a nenhuma biblioteca sintética de pequenas moléculas e continuam a inspirar novas descobertas em química, biologia e medicina. Eles são evolutivamente melhorados e as maiores fontes e/ou modelos de fármacos ⁶.

A clínica médica está cheia de histórias notáveis de produtos naturais que impactaram profundamente a terapêutica clínica como por exemplo, o paclitaxel (Taxol®) para o tratamento de câncer, que age na célula cancerígena ligando-se

especificamente a subunidade B da tubulina, proteína produzida na mitose da célula cancerígena, formando um composto estável que não permite a divisão celular ⁷.

Os prêmios como o Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2015 para William C. Campbell e Satoshi Omura, pela descoberta das avermectinas microbianas de produtos naturais e o de Youyou Tu para a descoberta da artemisinina⁸ (FIGURA 1.2), um fármaco que reduziu significativamente as taxas de mortalidade de pacientes que sofrem de malária, demonstram reconhecimentos notórios em PN e o potencial atual de descoberta de compostos com alta atividade biológica e com alto valor financeiro agregado.

Mais de 95% da biodiversidade mundial (aproximadamente 2 milhões de espécies de plantas, animais, fungos, microrganismos e similares) não foi avaliada para qualquer atividade biológica. Desta maneira, pesquisas para a identificação e autenticação de extratos vegetais são fontes de conhecimentos extremamente valiosos ⁹.

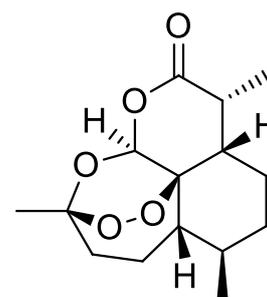


FIGURA 1.2- *Artemisia annua* L¹⁰ – Descoberta por Tu um dos pesquisadores responsáveis por receber o prêmio Nobel de fisiologia e medicina de 2015.

Apesar de o Brasil possuir cerca de 55 mil espécies de plantas, 10% da flora mundial, em 2013 gerou apenas 0,19% (R\$ 1,1 milhão de reais) do que produziu o mercado global de fitoterápicos (R\$ 58 bilhões), sendo que poderia fornecer ao ano, em torno de US\$ 5 bilhões de dólares ^{11,12}. Estes valores são indícios que ainda precisamos conhecer a flora brasileira, a fim de potencializar o seu uso comercial sustentável uma vez que atualmente florestas são grandemente devastadas para mineração, obtenção de matérias primas como madeira ou para plantação de cana de

açúcar, banana, café, dentre outros ^{13,14}. Desta forma, com o conhecimento ampliado dos recursos naturais, os recursos oriundos de sua comercialização poderiam ser utilizados na pesquisa, saúde, empregos diretos e indiretos, além de ser forte justificativa para preservação da nossa biodiversidade.

Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS) em países em desenvolvimento e alguns países industrializados como o Canadá, França, Alemanha e Itália o uso de produtos da medicina tradicional abrange de 76% a 96% da população¹². De forma semelhante, 82% dos brasileiros utilizam ervas medicinais em seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento da medicina popular, medicina indígena, quilombola ou científica ¹⁵.

Devido a estes fatores, em 2006 foi aprovado no Brasil a fitoterapia como prática integrativa complementar para tratamento de pacientes no sistema público de saúde (SUS), um dos maiores sistemas de saúde gratuito do mundo, que atende 200 milhões de habitantes ^{16,17}. Adicionalmente, em 2008 o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos aprovou o uso de 12 plantas para tratamento e prevenção de doenças no SUS, além de elencar 70 plantas medicinais, como *Bauhinia ssp.* (*B. affinis*, *B. forficata* ou *B. variegata*) amplamente utilizadas pela população, na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao sistema único de saúde (RENISUS), programa federal brasileiro que tem como objetivo a promoção de pesquisa, desenvolvimento e inovação afim de regulamentar o uso de fitoterápicos e insumos à base de plantas medicinais¹⁸.

A análise química é uma ferramenta indispensável no uso dos recursos naturais, pois através dela é possível a geração de um banco de dados com as características físicas e químicas do material vegetal garantindo a qualidade, segurança de sua comercialização e com isso a abertura do mercado para exportação destes medicamentos.

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - Gerais

1. Identificar compostos em *B. longifolia* por LC-HRMS e LC-SPE/NMR;
2. Diferenciar quatro espécies de *Bauhinia* através de marcadores identificados por LC-HRMS e técnicas quimiométricas não supervisionadas;

2.2 - Específicos

1. Desenvolver um perfil cromatográfico para diferenciação de *Bauhinia spp.*, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD), conhecimentos físico-químicos cromatográficos e planejamento experimental objetivando um maior número de picos separados;
2. Caracterizar os compostos presentes em *B. longifolia* por LC-HRMS e LC-SPE/NMR.
3. Aplicar a condição cromatográfica desenvolvida para identificar por LC-HRMS os compostos presentes em *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*;
4. Diferenciar as *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis* utilizando os compostos identificados por LC-HRMS e métodos quimiométricos não supervisionados (HCA e PCA);

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 - *Bauhinia forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*

Utilizada amplamente pela população brasileira para o tratamento e prevenção de diabetes, as plantas gênero *Bauhinia* Linnaeus (*Bauhinia* L.) são conhecidas popularmente como pata de vaca ou unha-de-boi devido as suas folhas bilobadas, podendo possuir porte arbóreo, arbustivo ou escandente/trepadeiras (FIGURA 3.1), folhas geralmente coriáceas (duras e rígidas como um couro), flores com um plano de simetria (zigomorfas) de coloração variada e fruto do tipo legume¹⁹. O nome *Bauhinia* é a uma homenagem feita por Carolus Linnaeus aos irmãos Jean (Johan) Bauhin (1541-1613) e Gaspard (Kaspar) Bauhin (1550-1624), médicos e botânicos suíços ²⁰.



FIGURA 3.1- A - *B. scandens* (trepadeiras)²¹; B - *B. galpinii* (arbustos)²²; e C - *B. forficata* (árvore)²³.

O gênero *Bauhinia* possui cerca de 300 espécies distribuídas em países tropicais, incluindo África, Ásia e América do sul, sendo que

aproximadamente 60 espécies podem ser encontradas em todo território brasileiro^{24,25}.

As espécies *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis* são árvores e sua distribuição geográfica é mostrada na FIGURA 3.2. *B. forficata*, reconhecida como a *pata-de-vaca verdadeira*^{19,26} devido ao amplo estudo desta espécie no tratamento de diabetes, é nativa do Brasil e ocorre nos estados das regiões nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco), sul (Paraná, Rio Grande do Sul) e sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo).

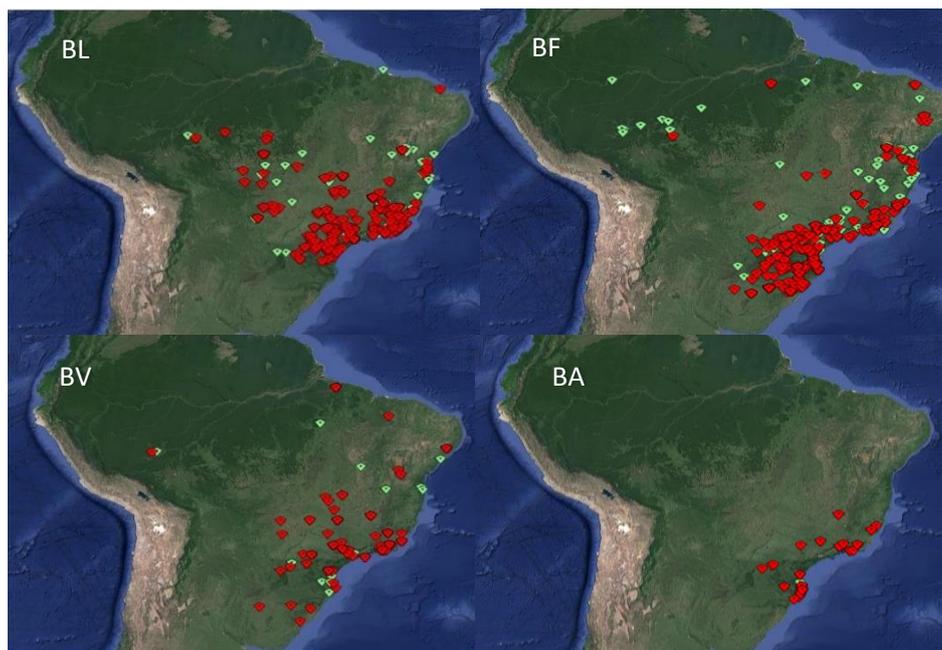


FIGURA 3.2- Distribuição das espécies *B. longifolia*(BL), *B. forficata*(BF), *B. variegata*(BV) e *B. affinis*(BA) no Brasil ²⁷.

B. variegata é originária da Índia e amplamente utilizada no Brasil na arborização urbana, principalmente nas regiões sul e sudeste. Tal predominância faz com que, há muito tempo, a população venha confundindo as espécies e fazendo uso desta como medicinal, principalmente porque *B. variegata* apresenta folhas semelhantes às de *B. forficata* aos olhos de um leigo (FIGURA 3.3 e 3.4) ²⁸.

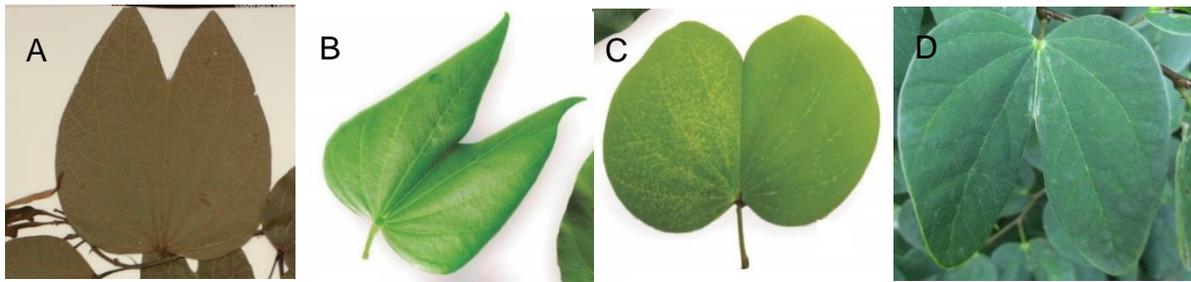


FIGURA 3.3 - Folhas de *B. longifolia* (A)²⁹, *B. forficata* (B)¹⁹, *B. variegata* (C)¹⁹ e *B. affinis* (D)³⁰.

Nativa do Brasil, a *B. longifolia* é distribuída no norte (Pará, Rondônia), nordeste (Bahia), centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná) sendo majoritariamente predominante na região de Cerrado e Mata Atlântica. A espécie *Bauhinia affinis* é nativa e, está presente principalmente no Espírito Santo e Paraná ⁶.



FIGURA 3.4 - Flores de *B. longifolia* (A) ²⁹, *B. forficata* (B) ¹⁹ e *B. variegata* (C) ¹⁹, *B. affinis* (D) ³⁰.

Os resultados apoiam, para a maioria das espécies, as propriedades terapêuticas dos extratos de folhas, indicando que estas são principalmente devido à presença de flavonoides. Os compostos fenólicos presentes em PN, como flavonoides, podem atuar como agentes hipoglicemiantes principalmente em diabetes mellitus tipo 2 (em que há insuficiência da secreção e/ou ação de insulina) reduzindo, a absorção intestinal de carboidratos na dieta, modulando as enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (inibindo a α -glicosidase), aumentando a secreção de insulina através da estimulação das células β pancreáticas, além de ter propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias ³¹.

Em folhas de *B. forficata*, por exemplo, diversos estudos biológicos evidenciam a atividade antidiabética atribuindo principalmente aos glicosídeos flavonoídicos e, em particular, a kaempferitrina (Caempferol 3,7-di-O- α -L-

ramnopiranosídeo), um marcador químico presente nas folhas de *B. forficata*³²⁻³⁶.

Com relação a caracterização química de *Bauhinia ssp.*, até a presente data, não há compostos relatados na literatura para *B. affinis* e foram identificados em folhas de *B. longifolia* flavonoides O-glicosilados^{37,38}, em *B. variegata*, flavonoides O-glicosilados e sesquiterpenos³⁹⁻⁴¹ e em *B. forficata* flavonoides O-glicosilados, fitoesterol, catequinas, protoantocianidinas^{33,40}.

Para produção e comercialização de drogas vegetais o controle de qualidade é realizado com base em legislação específica, as resoluções da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), além disso, métodos de controle de qualidade de algumas plantas medicinais já validados estão presentes em monografias encontradas, por exemplo, na Farmacopeia dos Estados Unidos, Farmacopeia Chinesa, monografias da OMS, Farmacopeia Japonesa e Farmacopeia Brasileira⁴². No entanto, ainda há escassez de monografias na Farmacopeia Brasileira para matérias primas de diversas espécies vegetais, como é o caso das Bauhinias³.

3.2 - Análise química e técnicas analíticas avançadas na pesquisa de produtos naturais

Normalmente, uma erva medicinal contém centenas de constituintes químicos, e múltiplos componentes são frequentemente considerados responsáveis pelos efeitos terapêuticos, que podem funcionar "sinergicamente" e dificilmente podem ser analisados⁴³. Consequentemente, é essencial identificar os constituintes de plantas medicinais para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade na pesquisa clínica, e melhorar o controle de qualidade na perspectiva de compostos farmacologicamente benéficos e/ou perigosos.

No entanto, a complexidade e a variabilidade inerente aos extratos botânicos são um desafio analítico. Assim, métodos de separação e detecção sofisticados com alta sensibilidade e seletividade são necessários. Estes que permitem uma rápida análise da composição química possibilitando a determinação de metabólitos secundários em baixas concentrações que podem

ser responsáveis pela atividade biológica ou diferenciação de espécies vegetais
1.

3.2.1 - Preparo da amostra

O preparo do extrato é a primeira etapa para análise de matrizes vegetais, uma vez que as macromoléculas como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos estão em concentrações superiores aos metabólitos secundários como flavonoides, taninos, antraquinonas, cumarinas, terpenos, saponinas e alcaloides, os quais geralmente apresentam marcante atividade biológica e são elementos essenciais na diferenciação das espécies ⁴⁴.

De modo geral, os extratos utilizados em estudo de produtos naturais para diferenciação de espécies e autenticação vegetal são aqueles mais abrangentes e representativos da totalidade dos compostos da matriz vegetal. Além disso, os processos extrativos a frio normalmente são preferíveis, pois preservam a integridade dos componentes presentes no extrato.

A grande diversidade química de metabólitos em produtos naturais de diferentes polaridades, características ácido-base e massa molecular tornam a escolha do solvente um ponto crucial, pois ele guiará quais e quantos compostos serão extraídos. Solventes de diferentes polaridades podem ser utilizados quando se deseja classes específicas de compostos, como demonstrado na TABELA 3.1.

TABELA 3.1- Solventes para extração de diferentes metabólitos secundários.

Solventes	Classe de metabólitos secundários
éter de petróleo e hexano	lipídeos, ceras, pigmentos e furanocumarinas.
tolueno, diclorometano e clorofórmio	alcaloides (base livre), antraquinonas livres, óleos voláteis e glicosídeos cardiotônicos.
acetato de etila e n-butanol	flavonoides, cumarinas
etanol e metanol	heterosídeos em geral
misturas hidroalcoólicas	agliconas, ceras, sapogeninas, iridoides e sesquiterpenos
Água	saponinas e taninos
água acidificada	alcaloides
água alcalinizada	Saponinas

* Adaptada a partir de Cechinel et. al. (2010) ⁴⁴.

Os solventes de extração como metanol e etanol são muito utilizados para análises abrangentes de matrizes vegetais por LC-MS ⁴⁵⁻⁴⁸, visto que possibilitam a extração de diversas classes de compostos em quantidades maximizadas. No entanto, somente o processo extrativo pode não ser 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 automação⁴⁹. Tratamentos por SPE são aplicados em trabalhos de identificação de marcadores químicos em espécies vegetais, especialmente na remoção de clorofila ^{50,51}.

3.2.2 - Técnicas instrumentais para análise química qualitativa de compostos fitoquímicos

A análise química em produtos naturais implica necessariamente na utilização de técnicas cromatográficas, como cromatografia gasosa (CG) ⁵²⁻⁵⁴ e cromatografia líquida (LC) ^{55,56}. A GC é indicada para análise de compostos voláteis de baixo peso molecular e estáveis a altas temperaturas, já a LC possibilita analisar compostos voláteis e não voláteis, de baixo a alto peso molecular, desde que sejam solúveis em uma fase líquida. Desta maneira, a cromatografia líquida apresenta grande versatilidade e também possibilita a separação de ampla gama de compostos com propriedades físico-química distintas, devido a utilização de diferentes modos de eluição e disponibilidade de grande diversidade de fases estacionárias.

Ao desenvolver métodos cromatográficos, buscam-se condições cada vez mais rápidas, visando à redução de custos operacionais, melhor aproveitamento de equipamentos e recursos humanos. Perfis cromatográficos de plantas medicinais exigem métodos abrangentes, que representem a totalidade dos constituintes químicos da amostra analisada e, portanto, grande

número de compostos separados. A alta complexidade das amostras de PNs torna tal desenvolvimento uma tarefa não trivial.

No desenvolvimento do método cromatográfico a otimização das condições baseadas em um único parâmetro não é garantia de sucesso e pode levar a métodos com baixa eficiência de separação e/ou resolução, uma vez que a capacidade de pico (número de picos dentro do espaço cromatográfico) depende da interação entre as variáveis que impactam a separação como por exemplo pH, tipo de solvente, modificador orgânico, vazão e etc ⁵⁷. Desta forma, uma alternativa é a utilização de planejamento experimental, que permite o desenvolvimento multivariado, ou seja, a avaliação concomitante de vários fatores e suas interações.

A grande variedade de programas estatísticos, que permitem a automatização e a análise multivariada dos resultados, vem popularizando a utilização do planejamento fatorial no desenvolvimento de métodos cromatográficos ^{58,59}. Adicionalmente, novas tecnologias na confecção de fases estacionárias com tamanho de partículas cada vez menores tem propiciado análises rápidas sem perda de eficiência e resolução cromatográfica ^{60,61}.

Desta maneira, o advento das novas tecnologias aumentaram significativamente a obtenção de condições cromatográficas com alta eficiência que, aliadas às técnicas de detecção, como espectrometria de massas, ressonância magnética e outras, possibilitam a identificação abrangente inclusive de compostos isobáricos ou diastereoisoméricos ⁶².

3.2.3 - Técnicas hífenadas para identificação de marcadores químicos em matrizes vegetais

A razão para o sucesso na descoberta de medicamentos à base de produtos naturais provavelmente pode ser explicada pela alta diversidade química destas moléculas, efeitos da evolução para criar moléculas biologicamente ativas, e/ou à similaridade estrutural de alvos proteicos em muitas espécies ⁶³. Esta grande diversidade química também está diretamente ligada a uma alta variabilidade de suas propriedades físico-químicas que tornam a detecção universal desafiadora. Além disso, os metabólitos secundários

podem estar presentes em concentrações altas ou traços e, de acordo com o tipo de estudo (quantificação, padronização, autenticação vegetal, *fingerprinting*, triagem, análise de traços, etc.), métodos muito sensíveis e seletivos podem ser necessários para detecção destes componentes fitoquímicos ⁶⁴.

Para identificação abrangente de compostos em uma matriz vegetal sem a necessidade de isolamento e purificação o acoplamento da cromatografia líquida a alguns detectores, como arranjo de diodos (LC-DAD), espectrômetros de massas (LC-MS) e/ou ressonância magnética nuclear (LC-NMR) se faz necessário. Uma abordagem utilizada é a caracterização preliminar dos metabólitos por meio da interpretação dos dados do MS (massa molecular, perfil de fragmentação e/ou comparação com um padrão analítico) e espectros de absorção de ultravioleta (UV). Em etapa seguinte, análises por LC-NMR podem ser empregadas visando a obter informações estruturais mais detalhadas dos compostos que apresentaram atividade em ensaios biológicos, por exemplo ⁶⁵⁻⁶⁷.

3.2.3.1 - LC-MS

O acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas (LC-MS) é vastamente utilizado na análise qualitativa e quantitativa de extratos de Produtos Naturais ^{62,68,69}. LC-MS combina a capacidade de separação de diferentes compostos da cromatografia líquida com a de análise da espectrometria de massas que se fundamenta na medida da relação massa-carga (m/z) dos íons provenientes dos analitos em fase gasosa oferecendo vantagens quando comparados com sistemas de LC acoplados aos detectores ópticos. De forma geral, é possível determinar a partir da m/z a massa molecular de um composto químico, devido a abundância isotópica dos átomos, bem como a informação estrutural por experimentos de fragmentação (MS^n). Adicionalmente, é possível explorar as capacidades analíticas do LC e MS, resultando em maior rapidez nas análises como a possibilidade de avaliar a pureza das bandas cromatográficas e capacidade de analisar vários compostos no mesmo tempo de retenção, devido a elevada seletividade, possibilitando a detecção de compostos em baixas concentrações (pico- e fentogramas) ⁷⁰.

O espectrômetro de massas consiste em fonte de íons, analisador de massas e detector. No estudo de desreplicação em produtos naturais utiliza-se tipicamente cromatógrafo líquido acoplado a fontes de ionização de *electrospray* (ESI) pela capacidade de analisar compostos de média e alta polaridade como flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos e etc ^{64,71}.

Os analisadores de massas utilizados são de baixa e/ou alta resolução. A resolução é definida como: $R = m/\Delta m$ em que $m = m/z$ (relação massa/carga) observado no espectro de massas e Δm é a diferença de dois íons que podem ser separados. A espectrometria de massas de alta resolução possibilita a determinação com elevada exatidão de m/z devido a seletividade e especificidade da medida, ou seja, a medida realizada é obtida com um número suficiente de casas decimais, normalmente três ou quatro, e desta forma quanto maior a exatidão na determinação de uma massa maior será o grau de conformidade do valor medido experimentalmente (massa acurada) com o valor determinado teoricamente (massa exata) ⁷².

Assim, a alta resolução proporciona a separação dos íons com massa acurada muito próximas sendo crucial não apenas para identificar a fórmula molecular correta, mas também para diminuir o número de fórmulas possíveis, o que é vital na caracterização da composição de matrizes complexas ¹. Equipamentos de alta resolução como o TOF ($R = 30000-40000$) ⁷³, com exatidão geralmente menor que 2mDa (milidaltons), permitem encontrar as fórmulas moleculares dos composto com massa acuradas muito próximas e que podem estar coeluídos cromatograficamente. Adicionalmente, outras informações são obtidas em experimentos de fragmentação (MS/MS) em que íons produtos são gerados na própria fonte de ionização ou utilizando-se analisadores híbridos como QqTOF, no qual o quadrupolo funciona como célula de colisão por CID (dissociação induzida por colisão) ⁷⁴.

A alta sensibilidade, o poder de resolução de massas, a exatidão e a aquisição de espectros de fragmentação tornam os analisadores QqTOF muito úteis em experimentos de identificação de marcadores em espécies vegetais. Na literatura encontramos diferentes trabalhos relacionados à caracterização de biomarcadores por LC-QqTOF para controle de qualidade, autenticação/padronização ou diferenciação de espécies vegetais ^{47,75-77}.

Em analisadores de massas que utilizam CID (dissociação induzida por colisão) os mecanismos de fragmentação de moléculas protonadas ou desprotonadas (modos positivo e negativo, respectivamente) podem ser distinguidas em dois grupos: i) reações fragmentação por retenção de carga (CRF) e ii) por migração de carga (CMF). A CRF ocorre em um local fisicamente distante da localização da carga e sem sua participação direta no mecanismo, e pode ser classificada em nove mecanismos principais de reação: rearranjo remoto de hidrogênio (RHR), retro-diels-alder (RDA), reações retro-eno (RR), reações retro-heteroeno (RRH), fragmentação de carga remota (FCR), eliminações aromáticas (EA), outros processos pericíclicos (OPP), eliminações de monóxido de carbono de compostos carbonílicos (EMC) e fragmentações radiculares (RF). As reações de fragmentação CRF dos íons negativos são similares àsquelas dos íons positivos, porque ocorrem em posições distantes do local da carga. As CMF são reações de fragmentação nas quais a carga é deslocada do íon precursor, e em íons negativos é significativamente diferente dos íons positivos. A CMF no modo positivo pode ser classificada em cinco mecanismos: clivagens indutivas simples, clivagens indutivas assistidas por heteroátomos adjacentes, reações de deslocamento, clivagens indutivas assistidas por remoção de β -hidrogênio e fragmentação de Grob-Wharton. No modo negativo, em quatro mecanismos: α -eliminações; γ e ϵ -eliminações, reações de deslocamento, eliminações assistidas pela remoção de β -hidrogênio

78.

Como em produtos naturais não existe um padrão estrutural, a exemplo dos peptídeos, a caracterização das substâncias presentes neste tipo de matriz é uma tarefa desafiadora⁷¹. No entanto, espectrômetros de massa de alta e baixa resolução hifenados a LC têm sido empregados com sucesso para caracterização química de diversas classes de compostos tais como: fenólicos, flavonoides, alcaloides, terpenoides, esteroides, cumarinas e lignanas^{64,79-84}.

Uma vez que dados de MS não são suficientes para caracterizar inequivocamente PN, o padrão de anotação dos compostos são descritos da seguinte forma⁶²: i) Compostos identificados: aqueles baseados na comparação de duas ou mais propriedades ortogonais (UV, IR, MS, NMR e métodos quirais óticos, por exemplo) e/ou com um padrão químico analítico^{80,85,86}; ii) compostos inferidos (em inglês podemos encontrar termos como *annotated* ou *putative* por

exemplo) baseado em propriedades físico-químicas, similaridade com bibliotecas de espectros públicos/comerciais, sem referência a um padrão químico autêntico ^{83,87}; iii) classes de compostos inferidas: baseada em propriedades físico-químicas características de uma classe química de compostos ou por similaridade espectral com compostos conhecidos de uma classe química ⁸⁸ e iv) Compostos desconhecidos - embora não identificados ou não classificados podem ser utilizados para diferenciação de espécies vegetais e quantificação com base em dados espectrais para autenticação vegetal e/ou controle de qualidade por exemplo ⁸⁹.

3.2.3.2 - LC-MS e métodos quimiométricos não supervisionados para diferenciação de espécies vegetais

Os dados obtidos de análises de plantas medicinais a partir de instrumentos de massas de alta resolução, como o QqTOF, são volumosos e complexos, portanto, muito difíceis de serem interpretados sem ajuda de softwares. A FIGURA 3.5 mostra um gráfico de superfície (*Survey View*) obtido no QqTOF em que o eixo X é o tempo de retenção, Y massa exata (m/z) e Z a intensidade de m/z .

A fim de facilitar a visualização da similaridade ou diferença de espécies vegetais, faz-se necessário métodos quimiométricos para o agrupamento de informações com os quais realiza-se a manipulação, pré e processamento, pós processamento e análise estatísticas dos dados ^{90,91}.

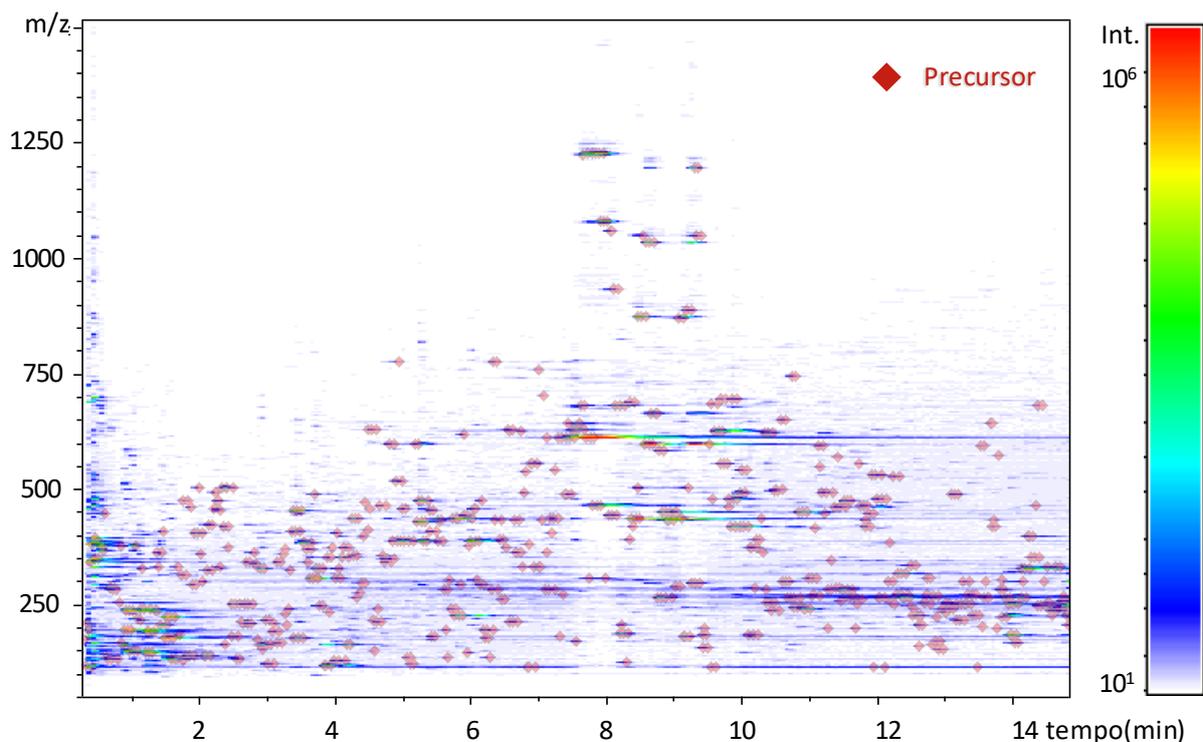


FIGURA 3.5– Figura ilustrativa do gráfico de superfície(SV) da análise cromatográfica no modo negativo e autoMS de *B. affinis*. Eixo X tempo de retenção (min), Y relação massa/carga (m/z) e Z intensidade.

Em estudos abrangentes de produtos naturais, os dados de LC-MS podem ser extraídos como área do pico do íon extraído^{89,92} ou com o uso de softwares, por exemplo, que extraem as características moleculares⁹³. Adicionalmente, estes dados podem ser pré-processados para adequar as amostras ao conjunto de maneira a maximizar ou minimizar o efeito de certas variáveis no todo, pois, podem existir fontes de variação sistemática ou aleatória que mascaram a variação de interesse. O pré-processamento pode ser das amostras como alisamento ou suavização (*smoothing*) de sinais ruidosos (utilizado para remover variações aleatórias), normalização, ponderação e correção da linha de base (utilizados para remover variações sistemáticas), como também pré-processamento das variáveis que consiste em centrar na média, autoescalamento e etc^{94,95}.

A análise multivariada corresponde a métodos e técnicas matemáticas que utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação teórica e visualização gráfica de um grande conjunto de dados. Quando o interesse é verificar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto estas são semelhantes segundo as variáveis utilizadas, dois métodos não

supervisionados (aqueles que nenhuma informação com relação à identidade das amostras é levada em consideração) podem ser utilizados, sendo eles: a análise hierárquica de grupos (HCA) e a análise por componentes principais (PCA)^{96,97}.

A HCA classifica amostras em um conjunto de dados com base em sua similaridade. O objetivo do HCA é agrupar objetos (por exemplo, plantas da mesma família, gênero e/ou espécie), de modo que os que sejam relativamente semelhantes estejam no mesmo cluster (agrupamento) e os que são relativamente diferentes fiquem separados em outros clusters. A entrada para HCA é uma matriz de distância ou dissimilaridade que representa as diferenças entre os objetos com base nos dados obtidos para cada objeto. O resultado é um dendrograma (uma árvore), que tem como objetivo dividir os elementos da amostra, ou população, em grupos, de forma que as amostras pertencentes a um mesmo grupo sejam similares entre si com relação às variáveis (características) que neles foram medidas, e os elementos em grupos diferentes sejam heterogêneos em relação a estas mesmas características (FIGURA 3.6)^{98,99}.

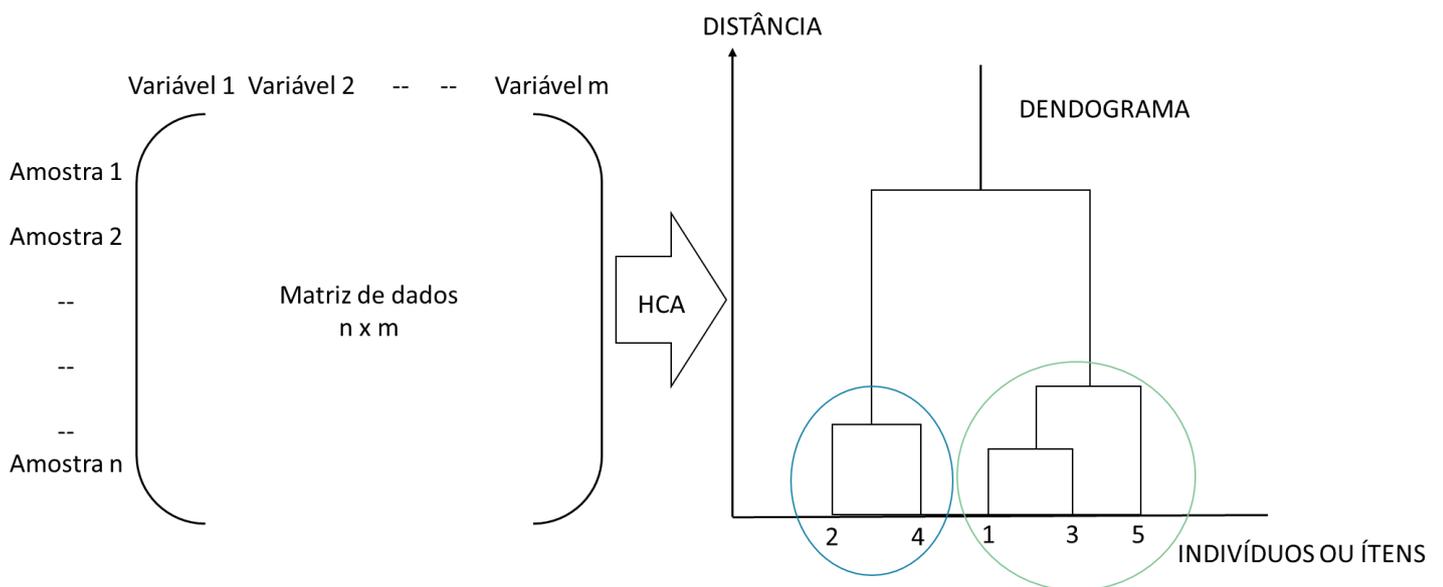


FIGURA 3.6- Figura ilustrativa da análise hierárquica de grupos (HCA).

Na análise de componentes principais (PCA), os dados extraídos são representados por um conjunto de novas variáveis conhecidas como componentes principais (PCs), FIGURA 3.7. As similaridades e variâncias das

amostras de acordo com os dados são mostradas em um gráfico de *scores* e a influência de cada variável (por exemplo metabólitos vegetais) é visualizada pelo gráfico de *loadings* da PCA ¹⁰⁰.

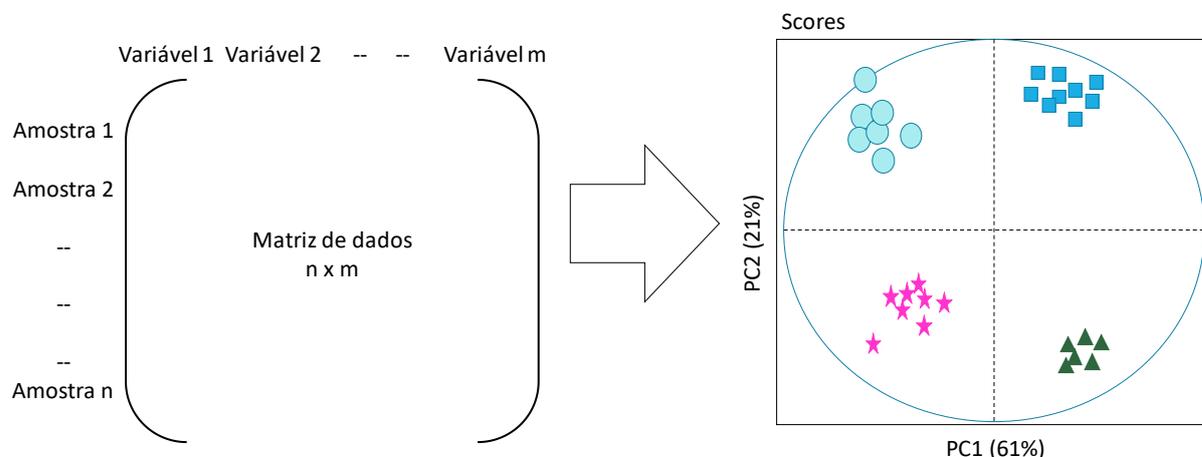


FIGURA 3.7- Figura ilustrativa da análise de componentes principais (PCA).

3.2.4 - LC-NMR

A utilização de técnicas hífenadas como LC-MS fornece dados estruturais importantes, contudo não propicia elucidações estruturais inequívocas, principalmente para compostos inéditos. Nesse sentido, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), com sua grande diversidade de experimentos uni e multidimensionais, fornece informações estruturais que complementam as informações obtidas por MS e/ou viabilizam a sua caracterização mais completa ^{101,102}. No entanto, é reconhecidamente menos sensível que o MS, mesmo após o desenvolvimento de magnetos supercondutores mais potentes, sondas de fluxo com volumes reduzidos e crio sondas (nas quais os componentes eletrônicos são resfriados a 20 K, diminuindo o ruído eletrônico) que aumentam significativamente a sensibilidade dos equipamentos de NMR reduzindo, portanto, a quantidade de material necessário e/ou o tempo de aquisição do espectro ^{101,103}.

Existem diversos modos de hífenação entre LC e NMR, contudo, os mais utilizados são: vazão contínua, vazão parada, armazenamento em alça de amostragem e em cartuchos de extração de fase sólida (SPE). No modo de

vazão contínua, a aquisição dos espectros de NMR inicia concomitantemente à corrida cromatográfica. No modo de vazão parada, as bandas cromatográficas são sequencialmente transferidas para a sonda após detecção por UV ou MS, sendo a vazão interrompida quando o composto se encontra na região de detecção. Na técnica de LC-SPE-NMR os compostos são eluídos para um cartucho de SPE em que o analito é retido. Os cartuchos são então secos com N_2 e os compostos são desorvidos com solventes deuterados. O uso exclusivo de solvente deuterado torna a supressão do sinal do solvente mais fácil ou mesmo desnecessária. Adicionalmente, a utilização pós-coluna de cartuchos de SPE possibilita realização de múltiplas corridas cromatográficas permitindo a concentração dos analitos e conseqüentemente diminuindo o tempo de experimentos bidimensionais ^{74,101}. É importante dizer, que as separações cromatográficas, para isolamento por LC-SPE-NMR, devem se assemelhar as separações em escalas multimiligramas e não às separações analíticas em baixas concentrações usadas em LC-MS ¹⁰⁴.

Uma vez isolados a determinação das estruturas químicas podem ser realizadas com experimentos uni (1D) e bi-dimensionais (2D) como: i) 1H -NMR (1D) - capaz de obter informações do número de hidrogênios, tipo químico destes; acoplamento hidrogênio-hidrogênio e conformação/estereoquímica através das constantes de acoplamento; ii) 1H COSY (2D) - acoplamento hidrogênio-hidrogênio de 2 a 4 (algumas vezes mais) ligações; iii) ^{13}C , 1H HSQC (2D) - acoplamento carbono 13-hidrogênio a uma ligação; iv) ^{13}C , 1H HMBC (2D) - acoplamento carbono 13-hidrogênio de duas a três ligações ¹⁰⁵.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Solventes

Os solventes grau LC (J.T. Baker, Philipsburg, EUA) foram utilizados nas análises cromatográficas e não foram filtrados para as análises por LC-MS. A água ultrapura tipo 1 usada no preparo dos extratos e na composição das fases móveis foi obtida no sistema MILLI-Q (Millipore, São Paulo, Brasil). As pesagens foram realizadas em balança analítica (AND®, modelo HR 200), com precisão de 0,1 mg. Para o preparo de soluções, os volumes dos diluentes e reagentes foram pipetados com micropipetas Gilson®. No procedimento de preparo de amostras os solventes utilizados foram grau LC.

4.2 - Material Vegetal

Amostras vegetais de folhas de *B. forficata* (obtidas do Centro Multidisciplinar de Pesquisa em Química Biológica e Agrícola – CPQBA - SP – Brasil - 22,79 ° S; 47,11"W), *B. longifolia* e *B. variegata* (obtidas do Instituto Agrônômico de Campinas - IAC - SP – Brasil - 22, 87 ° S; 47,07 ° W) foram coletadas por V. A. P. Carvalho¹⁰⁶ e a *B. affinis* (obtida na Área de preservação ambiental - APA da Ponta do Araçá - Porto Belo – SC - 27.13 ° S; - 48.52W) foi coletada por A. N. da Silva (Universidade Federal de Santa Catarina). Todas as espécies foram identificadas pela pesquisadora Dra. Angela Studart de F. Vaz, do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Um espécime de *B. forficata* (nº. 755), *B. longifolia* (nº. 8325) e *B. Variegata* (nº 7650) foram depositados no herbário da Universidade Federal de São Carlos (SPSC) e *B. affinis* (nº. 1884)¹⁰⁷ foi depositada no herbário do jardim botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) e herbário do departamento de botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC - FLOR61387). O material vegetal coletado foi seco em estufa de circulação de ar forçado a 40°C durante 7 dias. As amostras vegetais foram pulverizadas em liquidificador industrial (Skymesen®, modelo TA-02) e a padronização da granulometria dos pós foi feita em peneira de 60 mesh Bertel®.

4.3 - Preparo da amostra

Foram pesados 500 mg dos pós das folhas das espécies de *Bauhinia* e extraídos com 5 mL de etanol, em tubos cônicos de 50 mL, usando o homogeneizador Ultraturrax® (IKA®, modelo T18 basic) na velocidade 6 por 5 minutos. Após a extração, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 10000 x rpm utilizando centrífuga Jouan® (modelo, BR4i) reservando o sobrenadante (S1). O S1 foi seco utilizando o equipamento speed-vac (Savant®, modelo SPD131DDA). O extrato seco de S1 foi identificado, pesado e diluído para 50 mg/mL em 85:15 MeOH: H₂O (v/v).

Estes extratos diluídos (D1) foram fracionados (*clean up*), utilizando extração em fase sólida (SPE) para eliminar clorofilas e outros compostos de baixa polaridade ⁴⁵. Foi utilizado para o SPE cartuchos C18 (100 mg) end-capped (Varian®) com volume de 1 mL e sistema manifold a vácuo de 20 portas acoplado a uma bomba de vácuo Tecnal® (modelo TE-058). Para a realização do SPE a fase estacionária foi ativada com 2 mL de metanol (MeOH), equilibrada com 2 mL de MeOH: H₂O 85:15 (v/v), carregada com 500 µL de D1 e assim a eluição foi realizada e o eluato foi recolhido, seco na speed-vac e ressuspendido em MeOH: H₂O 85:15 (v/v) de acordo com a concentração necessária para as análises cromatográficas. Adicionalmente, as amostras foram centrifugadas a 9300 x g e o sobrenadante límpido foi transferido para vials. O preparo da amostra foi realizado para cada experimento individualmente.

O sistema cromatográfico analítico utilizado foi: Cromatógrafo líquido SHIMADZU (Kyoto, Japão), composto de uma bomba LC-20AT, com válvula solenoide de quatro linhas, degaseificador DGU-20A5, autoinjeter SIL-10A, detector de arranjo de diodos SPDM10Avp e de ultravioleta SPD-20A com todas as unidades controladas através de uma interface CBM 20A, computador e os cromatogramas gravados e processados pelo software LC Solution.

As condições cromatográficas para avaliação do preparo da amostra foram: Coluna Fenil-Hexil home-made (100 mm x 4.6 mm x 10 µm x 120 Å); fase móvel solvente A – água e B – metanol na vazão 1 ml/min. O Perfil do gradiente: 0 - 60 min, 5 - 100% B; 60 - 75min, 100% B; 75 - 90min, 25 mg/mL volume de injeção de 20 µL.

4.4 - Desenvolvimento das condições cromatográficas

O sistema utilizado foi o UHPLC (modelo Nexera®, Shimadzu) composto por duas bombas quaternárias LC-30AD, degaseificador DGU-20A_{5R}, autoinjeter SIL-30AC, detector de arranjo de diodos SPD-M30A, forno CTO-20AC, válvula seletora para a comutação de colunas de 6 portas, sistema *Method Scouting Solution*® para desenvolvimento da sequência de análise, com todas as unidades controladas através de uma interface CBM 20A, computador e os cromatogramas gravados e processados pelo software LabSolutions®.

O planejamento experimental, executado em três etapas, foi elaborado afim de produzir a condição cromatográfica que apresentasse o maior número de bandas. Na primeira etapa foi realizado um planejamento completo, onde considerou-se todas as variáveis e níveis, apresentados na TABELA 4.1, na execução do experimento e dos cálculos. Assim, na etapa 1 foram realizados 51 experimentos, dentre eles 21 eram réplicas. Adicionalmente, nesta etapa a inclinação do gradiente e temperatura foram fixados em 10 min e 40 °C. Na etapa 2 foram selecionadas as melhores condições cromatográficas da etapa 1 e mais 8 experimentos foram realizados em 30 minutos de tempo de gradiente linear. A melhor condição da etapa 2 foi utilizada na etapa 3 em que foi variado a vazão e a temperatura, afim de diminuir o tempo da análise.

TABELA 4.1– Variáveis e níveis utilizados na etapa 1.

F _s	Coluna	Modificador Orgânico		pH aquoso
0	Bifenil – Kinetex (100mm x 2.1mm x 2.7µm)	Metanol (MeOH)	3,7	Formiato de amônio 10mM
9	Bifenil – Raptor (100mm x 2.1mm x 2.7µm)	Acetonitrila (MeCN)	4,2	Ácido Fórmico 200uM
20	Ascentis Express F5 (100mm x 2.1mm x 2.7µm)		5,3	Acetato de amônio 10 mM
29	Ascentis Express C18 (100mm x 2.1mm x 2.7µm)		7,4	Bicarbonato de amônio 10mM

Para o cálculo de número de bandas cromatográficas a integração automática com mesmos critérios foi utilizada para todos os cromatogramas e o comprimento de onda foi fixado em 254 nm devido ao *cutoff* do solvente em diferentes pHs e a absorvidade dos compostos presente nesta matriz vegetal. Os softwares utilizados para os cálculos foram o Excel® e o Matlab®,

4.5 - Análise por LC-HRMS

O sistema UHPLC (Nexera, Shimadzu), descrito no item 4.1.4, foi acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo QqTOF (Bruker Daltonics - Impact, Rheinstetten, Alemanha) equipado com fonte ESI (LC-HRMS). A aquisição e processamento dos dados foi realizada utilizando o software Data Analysis® (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanha) e os parâmetros das fontes serão colocados nos itens abaixo de acordo com o experimento realizado.

4.5.1 - Caracterização de *B. longifolia*

Foi realizada a transferência das condições UHPLC para HPLC. Os solventes utilizados foram: Solvente A - água/ácido fórmico (100 µM) e B - metanol/ácido fórmico (100 µM). A eluição gradiente foi realizada nas seguintes condições 0-60 min, 5-80% B; 60-70 min, 100% B; 70-80 min, 5% B a uma vazão de 1,0 mL/min. A coluna analítica utilizada foi bifenil restek® (5 µm, 150 mm x 4.6 mm) e pré-coluna Phenomenex® C18 (4 mm x 3 mm). Os extratos de concentração 77 mg/ml foram centrifugados a 9300 x g, posteriormente o sobrenadante límpido foi transferido para vials. O volume de injeção foi de 1µL. A vazão da fase móvel foi dividida utilizando conector tipo T, direcionando 330 µL/min para o espectrômetro de massas. As condições da fonte foram: capilar 4000 V, offset da placa final a -500 V, nebulizador a 3 bar, 12 L/min e 300°C vazão e temperatura do gás de secagem (N₂). Os espectros foram registrados no modo negativo de ionização de 50 e 1200 *m/z*. As análises foram realizadas no modo *full scan* e *autoMS*. Para realizar a aquisição no modo MS / MS automatizado o número de precursores selecionados para a fragmentação foram iguais a 5.

Os dados de MS e MS/MS foram processados por meio do software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonik®), que forneceu uma lista de possíveis fórmulas elementares usando o Bruker Smart Formula. O limiar de precisão para confirmação de composições elementares foi estabelecido abaixo de 5 ppm. A calibração do espectrômetro de massa externo foi realizada com clusters de formiato de sódio (formiato de sódio 5 mM em água:2-propanol 1/1 (v/v)) em

modo de regressão quadrática de alta precisão de calibração (HPC). A solução de calibração foi injetada após a análise cromatográfica, registrada no mesmo cromatograma e todos os espectros foram calibrados antes da identificação.

4.5.2 - Análise de componentes principais das 4 espécies de *Bauhinia*.

As análises das 4 espécies de *Bauhinia* foram realizadas utilizando o método desenvolvido no planejamento experimental nas seguintes condições: Coluna bifenil kinetex® Phenomenex (100 mm x 2.1 mm x 2,7 µM x 90 Å); fase móvel solvente A – água/ácido fórmico 100µM e B – metanol/ácido fórmico 100µM na vazão 0,7 ml/min e temperatura 50°C. O Perfil do gradiente: 0 - 20 min, 5 - 70% B; 20,1 - 25min, 100% B (limpeza da coluna); 5 - 5%B 25 - 30min (condicionamento), volume de injeção de 0,5µL de 30 mg/mL do extrato de cada espécie, preparado como apresentado no item 4.3. Inicialmente, as amostras foram analisadas nos modos positivos e negativos em *full scan* em uma faixa de relação massa carga de 50 a 1500 *m/z*. Usando um divisor tipo T, a vazão que chegava até o espectrômetro era de 118 uL/min.

Nas análises multivariadas as amostras foram preparadas em triplicatas de extração e em duplicata de *clean up* (SPE) produzindo seis amostras para cada uma das quatro espécies estudadas.

A obtenção das características moleculares (CM), pré-processamento e a análise multivariada (PCA e HCA) foram realizadas utilizando o software Profile Analysis® 2.1 (Bruker Daltonics GmbH, Alemanha). Adicionalmente, os demais cálculos e gráficos foram feitos utilizando o Excel®.

4.5.3 - Diferenciação das 4 espécies de *Bauhinia*

Para diferenciação das 4 espécies de *Bauhinia* o método cromatográfico utilizado foi o descrito na seção 4.5.2. Experimentos de íons totais e de íons produtos (auto MS/MS) foram realizados no modo negativo de ionização na faixa de massas de 50 a 1500 *m/z* de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. Affinis*. Outros 10 experimentos de íons produtos foram feitos variando a energia de fragmentação. As energias foram 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 eV. As condições da fonte ionização (ESI) foram: nebulizador 1,0

bar, 8 L/min vazão e temperatura do gás de secagem (N_2), voltagem do *end plate* e capilar de 500 V e 4000 V, respectivamente. Para realizar a aquisição no modo MS / MS automatizado o número de precursores selecionados para a fragmentação foram iguais a 5. Os dados de MS e MS/MS foram processados da mesma maneira que foi apresentado na seção 4.5.1.

4.6 - Análise por LC-SPE/NMR para caracterização de *Bauhinia longifolia*

As análises utilizando LC-DAD-SPE/NMR foram realizadas na mesma condição cromatográfica do LC-HRMS (seção 4.5.1), sem o divisor de vazão, com a coluna analítica bifenil Restek® (5 μ m, 150 mm x 4.6 mm) no sistema cromatográfico líquido Agilent (série 1200, Agilent GmbH) equipado com bomba quaternária (G1311A), degaseificador (G1322A), detector de arranjo de diodos de comprimento (G1315D), amostrador (G1329A), CTO-10ASvp. O LC foi acoplado ao sistema automatizado de troca de cartucho (ACE™ Spark Holland, Alemanha), este sistema possui bomba (Knauer) que diluiu a fase móvel com água, diminuindo a força da fase móvel, antes que as frações fossem retidas no cartucho, na unidade SPE Prospekt II®. O LC-SPE foi controlado por computador e software HyStar® 2.3 (Bruker).

Trinta (30) corridas cromatográficas consecutivas, vazão de 1,0 mL/min, foram realizadas com injeções de 1 μ L. A coleta das frações foi realizada por fatiamento de tempo (*time-slice*) em que a largura do fatiamento foi de 6 ou 12 segundos dependendo da largura da banda cromatográfica. Os compostos foram trapeados em cartucho HySphere Resin GP (10 mm x 2 mm 10 μ m) de fase esférica constituído de polidivinilbenzeno. Após o processo de adsorção, os cartuchos foram secos com gás nitrogênio (N_2) por 30 min para remoção do solvente residual da corrida cromatográfica e trapeamento. Utilizou-se 250 μ L de metanol- d_4 deuterado (99,8%) para eluir os compostos dos cartuchos de SPE diretamente em tubos de NMR (Deutero, 3 mm o.d).

Os espectros de NMR 1D 1H , ^{13}C e 2D dos compostos retidos foram primeiramente analisados em experimento de hidrogênio, afim de verificar se tinha intensidade de sinal suficiente para realizar os experimentos bidimensionais. Os compostos com a intensidade adequada foram submetidos

a experimentos 2D (COSY, HSQC e HMBC). Todos os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Advance III (14,1 Tesla 600 MHz, Ultrashield Plus) equipado com cryoprobe inversa tripla de ressonância de 5 mm ($^1\text{H} / ^{13}\text{C} / ^{15}\text{N}$) com gradiente de campo z. A probe foi ajustada com unidade automática de *tuning* e *matching*. A coleta e o processamento de dados foram realizados utilizando o software Bruker Topspin versão 3.2.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Desenvolvimento analítico

O procedimento de preparo da amostra é muito importante em LC-MS uma vez que a limpeza pode aumentar o tempo de vida útil da coluna analítica, além de minimizar o efeito de supressão de sinal do MS devido ao efeito de matriz. Desta maneira, neste trabalho foi usada a extração em fase sólida (SPE) para remoção de clorofila ⁴⁵.

Os resultados do antes e após o procedimento de preparo da amostra é apresentado na FIGURA 5.1. Em que a FIGURA 5.1A representa o cromatograma antes do procedimento de SPE, e neste percebe-se que há a presença de uma banda de 400 à 500nm referente a presença de clorofilas¹⁰⁸. No cromatograma após o procedimento de SPE (FIGURA 5.1B) verifica-se a ausência desta banda, e portanto, é possível dizer que este procedimento foi efetivo na remoção de clorofila, e assim foi utilizado nas análises posteriores.

No desenvolvimento das condições cromatográficas de amostras complexas em que há uma grande quantidade de analitos com diferentes propriedades físicas e químicas a eluição gradiente é indicada, pois, o intervalo de retenção excede o objetivo preferido para a separação isocrática ($1 \leq k \leq 10$) ¹⁰⁹. No modo de eluição gradiente a resolução (separação de dois picos) e/ou capacidade de pico (número máximo de picos que podem ser inseridos dentro do espaço cromatográfico - PC) é utilizada para medir a qualidade da separação da análise cromatográfica.

Quando não se tem um alvo definido, como é o caso de desenvolvimento de método para encontrar marcadores que diferenciem espécies vegetais, fica difícil ater-se a melhora da resolução, pois não se sabe no primeiro momento quais são os compostos que irão discriminar as espécies. Além disso, quando se altera um parâmetro como, por exemplo o tempo de gradiente, a resolução de alguns picos pode permanecer a mesma ou aumentar, e de outras bandas cromatográficas podem diminuir; além do que a inversão da ordem de eluição é possível devido as diferentes propriedades físico-químicas dos compostos presentes nas amostras ¹¹⁰.

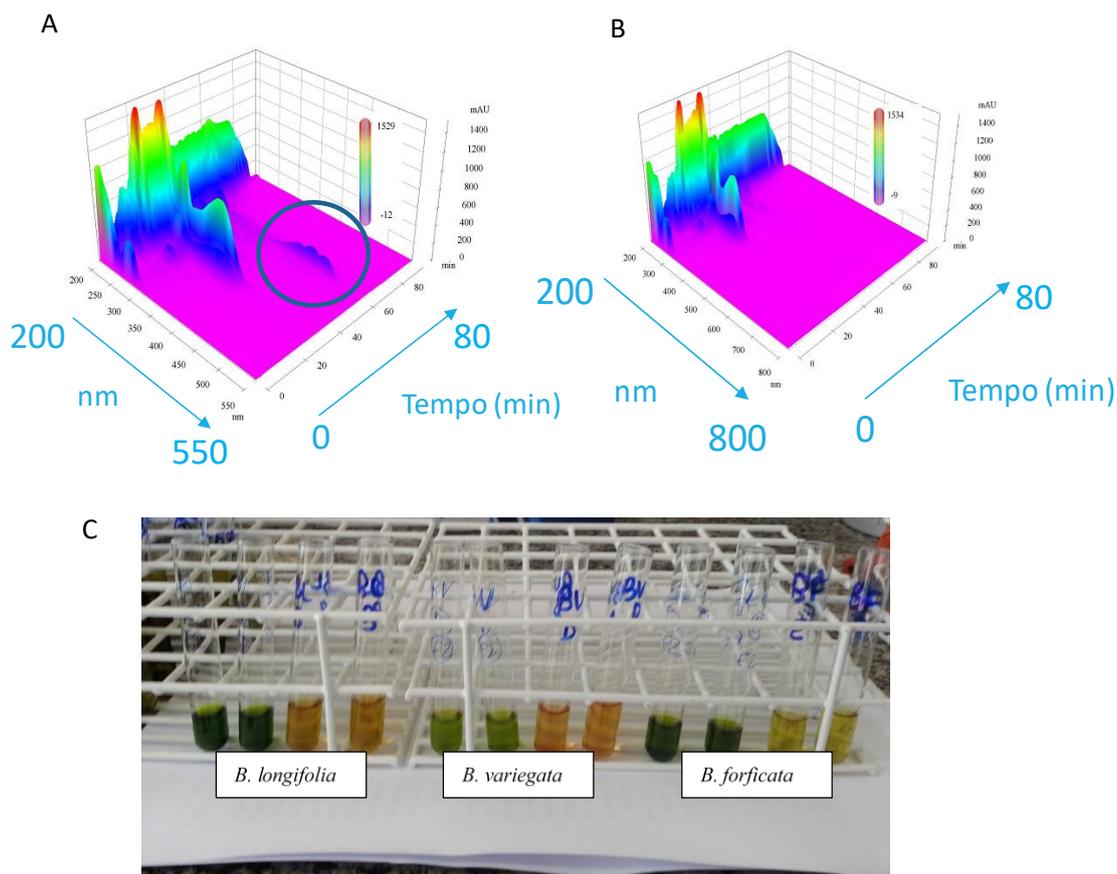


FIGURA 5.1 – Cromatogramas do extrato etanólico de folhas da espécie *Bauhinia forficata*. A - Antes da extração por SPE; B - após extração por SPE; C – Extratos etanólicos (em duplicata) de folhas de *Bauhinia forficata* antes e após o procedimento de tratamento das amostras.

Na eluição gradiente, a capacidade de pico pode ser expressa pela seguinte EQUAÇÃO 5.1 ¹⁰⁹:

$$PC = \left(\frac{2.3}{4}\right) N^{*0.5} \log \alpha^* \left[\frac{k^*}{1+k^*}\right] \text{ EQUAÇÃO 5.1}$$

Onde N^* é o número de pratos teóricos, α^* é seletividade (capacidade de separação) e k^* fator de retenção e * indica que todas as variáveis são no modo gradiente de eluição. Majoritariamente mudança nos valores de (α^*) podem ser obtidas variando: tipo do modificador orgânico (B-solvente, por exemplo, metanol e acetonitrila), temperatura, tipo de coluna, pH da fase móvel, concentração de tampão ou concentração do reagente pareador iônico ¹¹¹.

Desta maneira, três etapas (FIGURA 5.2) foram utilizadas para o desenvolvimento das condições cromatográficas. Sendo elas: 1) triagem das variáveis e níveis que mais impactam na seletividade; 2) ajuste fino da capacidade de pico e 3) otimização do tempo de análise.

Etapa 1 – Triagem das variáveis e níveis que mais impactam na seletividade: fase estacionária, pH, modificador orgânico.

Etapa 2 – Ajuste fino da capacidade de pico – Melhores condições da etapa 1 e variação do tempo do gradiente.

Etapa 3 – Otimização do tempo da análise. Diminuir o tempo de retenção sem perder a separação: aumento da vazão e temperatura.

FIGURA 5.2- Etapas no desenvolvimento das condições cromatográficas.

A matriz vegetal escolhida para o desenvolvimento do método foi a *B. forficata* por esta espécie ser reconhecida como verdadeira pata-de-vaca¹⁹. O modo reverso de eluição foi utilizado devido as propriedades dos analitos presentes em matrizes vegetais (de média polaridade a apolares) e pelos mesmos motivos o uso de pareador iônico não foi selecionado como variável.

Os valores de ortogonalidades para as fases estacionárias foram obtidos dos resultados de F_s encontrados na página da internet da Farmacopeia Americana, que se baseia na teoria da subtração hidrofóbica desenvolvido por Snyder e colaboradores¹¹²⁻¹¹⁵. Assim, a coluna bifênil kinetex® ($F_s=0$) foi escolhida para ser comparada a outras 3 colunas sendo elas uma similar, bifênil raptor®, e duas colunas ortogonalmente diferentes a bifênil kinetex® ($F_s>10$)^{110,113,116}. A fase estacionária bifênil foi selecionada devido aos compostos fenólicos relatados em espécies de *Bauhinia*.

O modificador orgânico foi selecionado de acordo com o triângulo da seletividade de Snyder-Rohrchner^{113,117} que leva em consideração as diferentes interações químicas das misturas de solventes – acidez, basicidade e dipolo. Em modo reverso de eluição metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano (THF) são utilizados, pois apresentam seletividade diferentes. Neste trabalho, somente o uso de metanol e acetonitrila foram investigados devido a incompatibilidade do THF com os equipamentos modernos de LC.

Na etapa 1 foi realizado o planejamento completo, em que todas as variáveis, suas interações e níveis foram consideradas nos cálculos¹⁰⁰, e 3 variáveis que afetam majoritariamente a seletividade cromatográfica^{57,109} foram consideradas, sendo elas: i) tipo de fase estacionária (coluna); ii) tipo de

modificador orgânico e iii) variação de pH. Todas as variáveis e seus níveis são mostrados na TABELA 5.1.

TABELA 5.1 - Variáveis e níveis normalizados utilizados na etapa 1 do desenvolvimento das condições cromatográficas.

F _s	Coluna	Níveis	Modificador Orgânico	Níveis	pH efetivo	Níveis
0	Bifenil – Kinetex® (100mm x 2.1mm x 2.7µm)	-1	Metanol (MeOH)	1	3,7	Formiato de amônio 10mM
9	Bifenil – Raptor® (100mm x 2.1mm x 2.7µm)	-0.3791	Acetonitrila (MeCN)	-1	4,2	Ácido Fórmico 200uM
20	Ascentis Express F5® (100mm x 2.1mm x 2.7µm)	0.3791			5,3	Acetato de amônio 10 mM
29	Ascentis Express C18® (100mm x 2.1mm x 2.7µm)	1			7,4	Bicarbonato de amônio 10mM

Os resultados, variáveis e níveis codificados da etapa 1 encontram-se na TABELA 8.1(apêndice), e os dados da análise de variância (ANOVA) são mostrados na TABELA 5.2. Verificou-se que o modelo para escolha das variáveis foi significativo, pois a média quadrática da regressão (MQR) e resíduo (MQR) se mostraram estatisticamente diferentes com um F₁ calculado > F₁ tabelado no nível de confiança de 95%.

TABELA 5.2 – Análise de variância da etapa 1.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Fcal (95%)	Ftab (95%)	R ²
Regressão (R)	7045,81	9	782,87	10,09	2,12	0,69
Resíduo (r)	3180,23	41	77,57			
Erro Puro (EP)	175,01	19	9,21	14,83	2,13	
Falta de ajuste (Faj)	3005,22	22	136,60			
Total	10226	50	204,52			

F₁

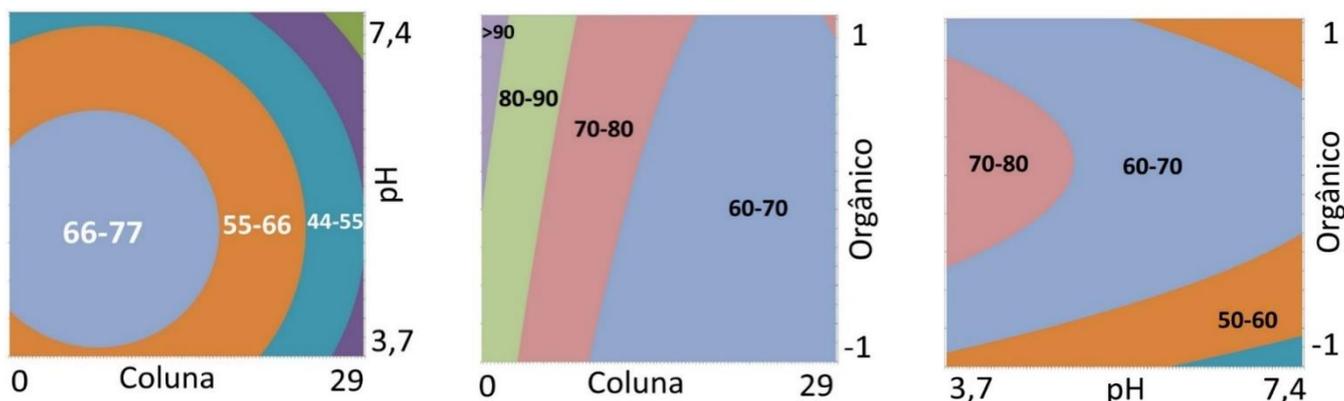
Desta forma, foi possível obter o modelo matemático, uma equação de segunda ordem, que descreveu os resultados desta primeira etapa (EQUAÇÃO 5.2).

$$Y = 67,86 - 12,14C - 6,22pH + 4,29O + 10,63C^2 - 11,99pH^2 \quad \text{EQUAÇÃO 5.2}$$

(±6,93) (±3,58) (±3,69) (±2,79) (±6,08) (±7,67)

Onde Y é a variável dependente (número de bandas cromatográficas), C (tipo de coluna), pH (pH aquoso), O (tipo de modificador

orgânico). E com a EQUAÇÃO 5.2 construiu-se o gráfico de contorno mostrado na FIGURA 5.3.



*Os valores no gráfico de contorno são referentes ao número de bandas cromatográficas. Modificador orgânico -1= acetonitrila e 1= metanol. *condição fixa: temperatura 40°C e vazão 0,5mL/min.

FIGURA 5.3 Gráficos de contorno obtidos na etapa 1 do planejamento experimental.

Os resultados apresentados nos gráficos de contorno (Figura 5.3) mostram que em níveis mais baixos de pH e com a coluna bifenil kinetex® foi possível obter maiores número de bandas cromatográficas. Desta maneira, na etapa 2 foi utilizado como variáveis e níveis o pH (3 a 5), modificador orgânico (metanol e acetonitrila) e tempo de gradiente linear de 10 e 30 min (TABELA 5.3). Assim, foram realizadas mais 8 análises, com 2 replicas, utilizando a coluna bifenil kinetex®, temperatura 40°C e vazão 0,5mL/min.

TABELA 5.3 - Variáveis utilizadas na etapa 2 do desenvolvimento das condições cromatográficas.

Tempo (min)	Orgânico	pH aquoso	
30 min	Metanol (MeOH)	3,7	Formiato de amônio 10mM
10 min	Acetonitrila (MeCN)	4,2	Ácido Fórmico 200uM
		5,3	Acetato de amônio 10 mM

*condição fixa: coluna bifenil kinetex®, temperatura 40°C e vazão 0,5mL/min

Os resultados da etapa 2 (TABELA 8.2, apêndice) foram submetidos à ANOVA e após aplicar o teste t (com 4 graus de liberdade), verificou-se que dentro das condições testadas que o pH não foi significativo, então esta variável foi fixada em ácido fórmico 200µM uma vez que testes foram realizados no espectrômetro de massas, e este pH apresentou maior intensidade de sinal no modo negativo de ionização.

A análise de variância foi calculada e os resultados estão presentes na TABELA 5.4 em que a MQFaj (média quadrática da falta de ajuste) e MQEP (média quadrática do erro puro) foram estatisticamente iguais com um F_2 calculado $< F_2$ tabelado evidenciando que o modelo não apresentou falta de ajuste. Além disso, as MQR e MQr se mostraram estatisticamente diferentes, ou seja, o modelo foi significativo com o F_1 calculado $> F_1$ tabelado e o valor de R^2 foi igual a 0,96 (razão entre as SQR e SQT) indicando um ajuste adequado do modelo às respostas observadas uma vez que quanto mais perto de 1 estiver o R^2 melhor é o ajuste ao modelo matemático proposto ¹¹⁸. Em todos os cálculos o nível de confiança utilizado foi de 95%.

TABELA 5.4 – Análise de variância da etapa 2.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Fcal (95%)	Ftab (95%)	R^2
Regressão (R)	7799,53	4	1949,89	81,43	3,36	0,97
Resíduo (r)	263,41	11	23,95	0		
Erro Puro (EP)	24	4	6	5,70	6,09	
Falta de ajuste (Faj)	239,41	7	34,21	0		
Total	8062,94	15	537,53	0		

F_1

F_2

Após aplicar o teste t (com 12 graus de liberdade), verificou-se que tanto a inclinação do gradiente (I) quanto o tipo de modificador orgânico (O) foram significativos. Assim, com a EQUAÇÃO 5.3 construiu-se o gráfico de contorno (FIGURA 5.4) evidenciando que em maiores tempos de análise e usando metanol como modificador orgânico obtém-se o maior número de bandas separadas.

$$Y = 111,56 + 21,85I + 4,32O \quad \text{EQUAÇÃO 5.3}$$

$(\pm 5,36) \quad (\pm 3,44) \quad (\pm 3,58)$

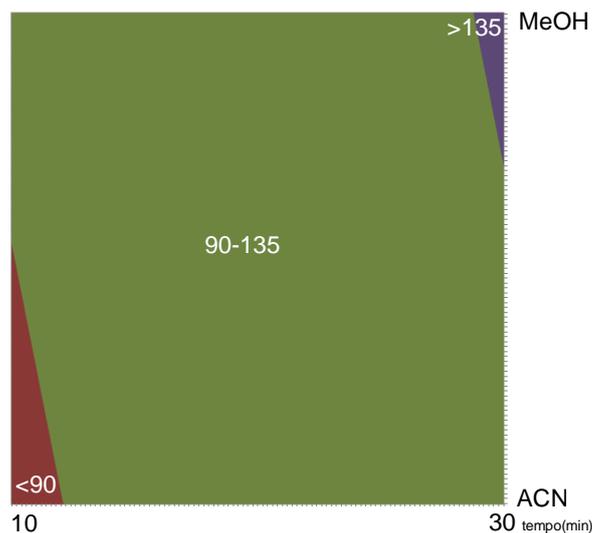


FIGURA 5.4 Gráfico de contorno obtido na etapa 2. (* Os valores no gráfico de contorno são referentes ao número de bandas cromatográficas. **condição fixa: coluna bifenil kinetex®, pH 4,2 (Ácido Fórmico 200µM), temperatura 40°C e vazão 0,5mL/min).

Na etapa 3, foram realizados ajustes para de diminuir o tempo de análise, e preservando-se o número de bandas cromatográficas, a vazão de 0,5 mL/min e temperatura 40°C foram aumentadas, respeitando a temperatura máxima da coluna, para 0,7 mL/min e temperatura 50°C. A condição cromatográfica final é mostrada na FIGURA 5.5. Além disso, foi desconsiderado tempos de retenção referente à concentração de metanol maiores que 70%, correspondente os espaços vazios no final da análise cromatográfica, no UV, e à presença de interferentes presentes no metanol, lipídeos, que foram observados nos experimentos de branco (sem a injeção da amostra vegetal) da análise no espectrômetro de massas.

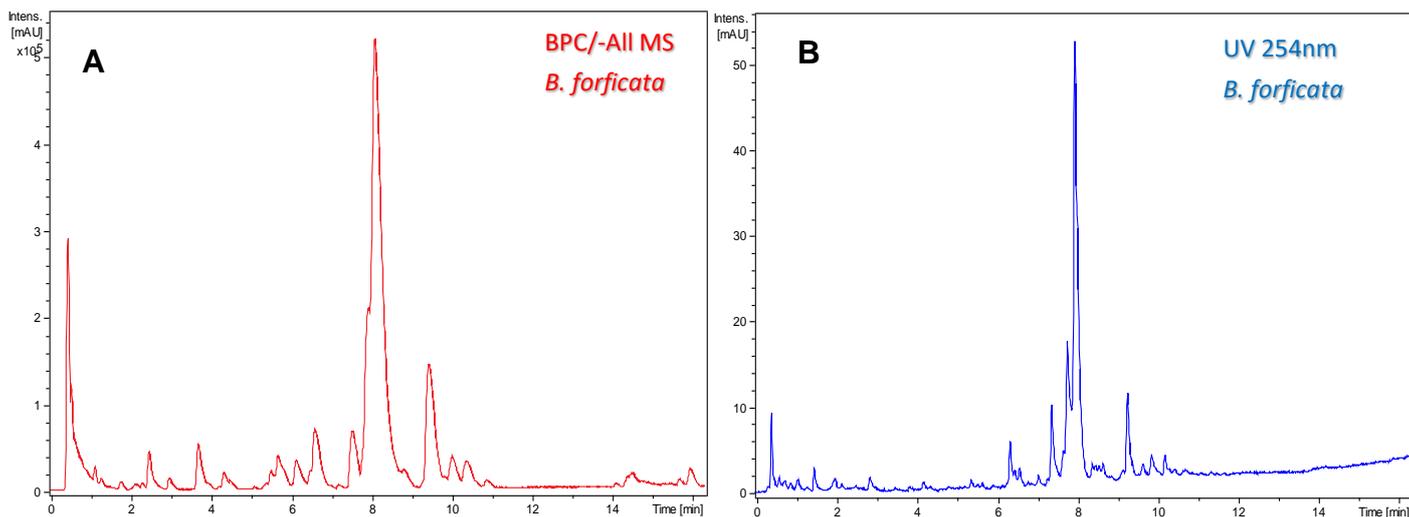


FIGURA 5.5 – Cromatograma final após a etapa 2 do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia forficata* (A) cromatograma do pico base no modo negativo de ionização (-All/MS), e (B) por UV em 254nm. Condições cromatográficas: Coluna bifenil kinetex®, vazão 0,7 ml/min, temperatura 50°C. Gradiente: 5-70%B.

5.2 - Perfil cromatográfico das quatro espécies de *Bauhinia*

As condições cromatográficas desenvolvidas (item 5.1.1) foram utilizadas para as análises dos extratos etanólicos de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*, por LC-HRMS, conforme descrito no item do materiais e método 4.5.2, afim de identificar e verificar os compostos que diferenciavam estas espécies. Os cromatogramas e os gráficos de superfície (SV) obtidos são mostrados na FIGURA 5.6.

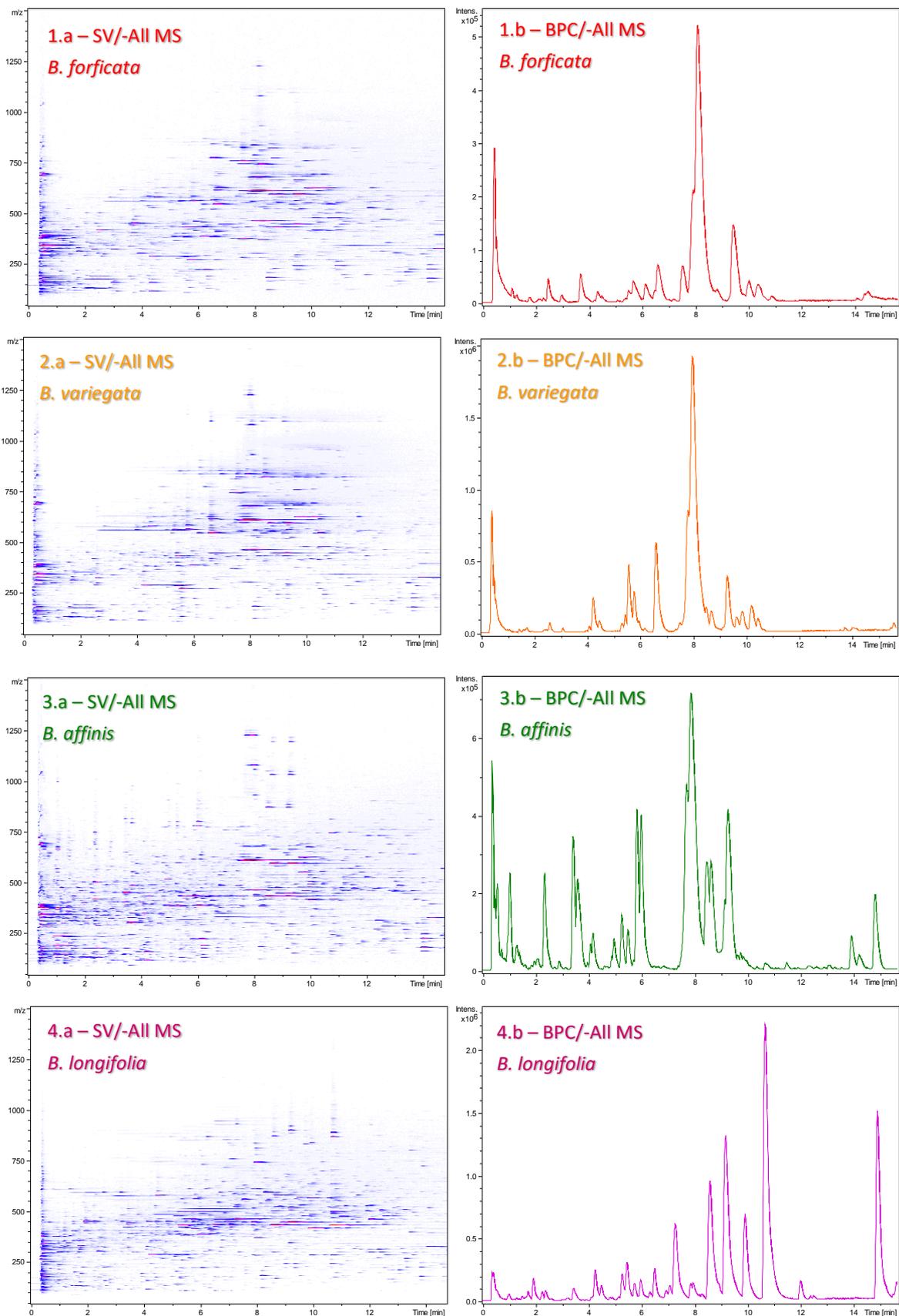


FIGURA 5.6 - Gráfico de superfície (SV) e cromatogramas de pico base (BPC) no modo negativo de ionização (-All/MS) para as espécies *B. forficata* (1a e b), *B. variegata* (2a e b), *B. affinis* (3a e b) e *B. longifolia* (4a e b).

Devido ao grande número de dados obtidos para as quatro espécies, diferença dos perfis cromatográficos e poucos compostos caracterizados na literatura para *B. longifolia*, dois estudos foram realizados sendo um para a caracterização da *B. longifolia*, por LC-HRMS e LC-SPE/NMR, e outro para diferenciação química das quatro espécies de *Bauhinia* por LC-HRMS utilizando ferramentas quimiométricas não supervisionadas.

5.3 - Caracterização química do extrato etanólico de *B. longifolia* por LC-HRMS e LC-SPE/NMR

Para caracterização do extrato etanólico de folhas de *B. longifolia* primeiramente o método foi transferido de UHPLC para HPLC e foi realizado as mesmas condições cromatográficas por LC-HRMS e LC-SPE com a coluna bifenil raptor® 5 µm, 150 mm x 4.6 mm, (FIGURA 5.7) similar ($F < 10$) a coluna bifenil kinetex® selecionada nas condições do desenvolvimento cromatográfico.

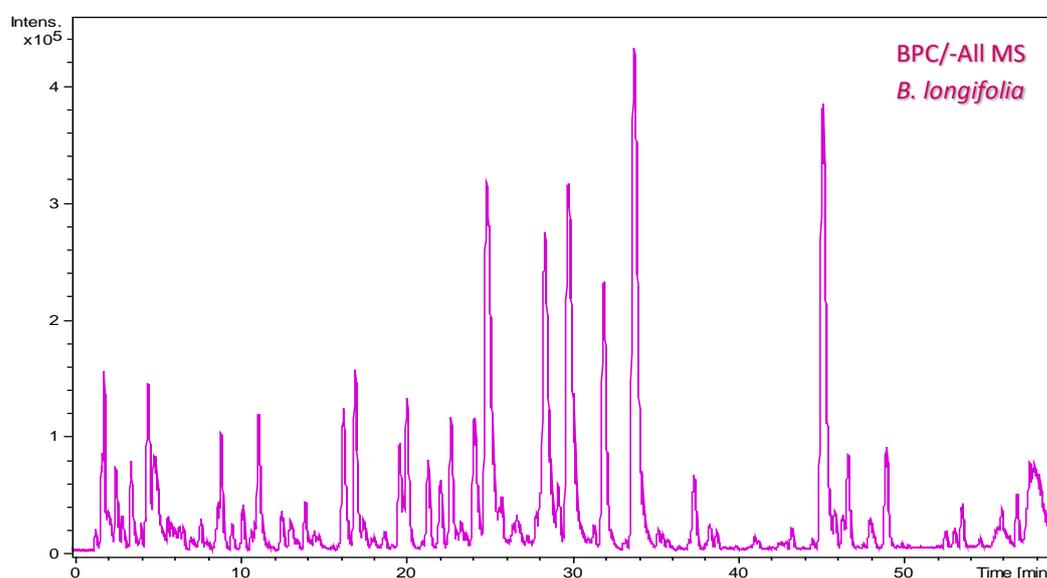


FIGURA 5.7 - Cromatograma de pico de base (BPC) obtido por LC-HRMS no modo de ionização negativo do extrato etanólico de folhas de *Bauhinia longifolia*. Condição cromatográfica: 0-60 min, 5-80% B; 60-70 min, 100% B; 70-80 min, 5% B, vazão de 1,0 mL/min e temperatura 50°C. Coluna analítica: bifenil restek® (5 µm, 150 mm x 4.6 mm).

Os espectros de *full scan*, MS² e as estruturas dos compostos inferidos estão no apêndice 8.2. Na TABELA 5.5 estão presentes os compostos, organizados por similaridade espectral, identificados para *B. longifolia*. Nela observa-se que os ácidos fenólicos foram encontrados no início do cromatograma (HPLC) até 19,10 minutos, os taninos condensados (proantocianidinas) e seus derivados de 7,3 a 25,7 minutos, os flavonoides com a aglicona miricetina e seus derivados foram encontrados de 20 a 37 minutos, caempferol e derivados de 21,9 a 34 minutos, quercetina e derivados de 23,1 a 42,2 minutos, metilquercetina e derivado em 30 e 38,5 minutos, respectivamente. Adicionalmente, o tempo de retenção da bauhiastatina 2 foi 45,5 minutos.

Com as condições apresentadas na Figura 5.6(4.b) foi possível inferir 69 (sessenta e nove compostos) compostos do extrato etanólico de folhas de *B. longifolia* por LC-HRMS e outros 6 (seis) isolados por LC-SPE e identificados por LC-HRMS e NMR. Os compostos foram caracterizados excluindo os adutos, clusters e fragmentos do íon precursor no mesmo tempo de retenção. Isômeros com a mesma massa exata, padrão de fragmentação e diferentes tempos de retenção foram nomeados igualmente e adicionados os números I, II e III.

TABELA 5.5 - Dados LC-HRMS no modo negativo de ionização dos compostos identificados ou inferidos do extrato etanólico de folhas de *B. longifolia*.

Pico	Composto	HPLC (min)	UHPLC (min)	Ion Precursor [M-H] ⁻	Erro (ppm)	Fórmula molecular [M-H] ⁻	Energia de Colisão (eV)	Ion Fragmento (%)
1	Ácido gálico-hexosídeo	3,50	-	331,0670	0,3	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀	35	169,0137 (100,0); 125,0246 (81,8)
2	Ácido gálico	3,60	0,60	169,0141	0,6	C ₇ H ₅ O ₅	35	124,0170 (100,0); 125,0242 (70,3)
3	Ácido dihidroxibenzoico-hexosídeo (I)	4,60	0,50	315,0721	0,1	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	35	108,0215 (100,0); 152,0114 (64,3)
4	Ácido dihidroxibenzoico-hexosídeo (II)	5,40	-	315,0723	-0,6	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	35	109,0288 (100,0); 153,0189 (71,7)
5	Ácido dihidroxibenzoico (I)	5,60	0,90	153,0191	1,2	C ₇ H ₅ O ₄	35	109,0290 (100,0);
6	Ácido dihidroxibenzoico(II)	6,20	-	153,0191	1,4	C ₇ H ₅ O ₄	35	108,0215 (100,0); 109,0255 (7,6)
7	Ácido hidroxibenzoico (I)	9,40	1,70	137,0244	0,4	C ₇ H ₅ O ₃	35	93,0348 (100,0); 65,0395 (39,1); 124,0144 (4,1)
8	Ácido siríngico-hexosídeo (I)	10,10	1,70	359,0984	0,0	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	25	197,0454 (100,0); 153,0555 (41,9); 138,0321 (41,6); 182,0218 (35,2)
9	Ácido hidroxibenzoico-hexosídeo	11,40	1,70	299,0771	0,4	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	35	137,0243 (100,0); 93,0343 (34,9)
10	Ácido cafeico (I)	13,20	2,40	179,0352	1,2	C ₉ H ₇ O ₄	35	134,0373 (100,0); 135,0449 (98,4)
11	Ácido hidroxibenzoico (II)	13,80	-	137,0243	0,6	C ₇ H ₅ O ₃	35	93,0346 (100,0); 65,0398 (63,3)
12	Ácido siríngico-hexosídeo (II)	13,60	3,30	359,0978	1,6	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀	35	59,0141 (100,0); 153,0540 (59,3); 197,0451 (46,9)
13	Ácido coumárico-hexosídeo (I)	13,80	2,60	325,0927	0,7	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	35	119,0502 (100,0); 163,0397 (25,5)
14	Ácido vanílico	14,50	2,80	167,0349	0,3	C ₈ H ₇ O ₄	20	152,0113 (100,0); 108,0211 (68,4)
15	Ácido siríngico	17,80	3,80	197,0455	0,3	C ₉ H ₉ O ₅	20	121,0293 (100,0); 166,9985 (95,8); 182,0218 (94,9); 123,0087 (93,7); 138,0319 (31,9); 153,0558 (19,4)
16	Ácido coumárico	19,10	4,10	163,0402	-0,9	C ₉ H ₇ O ₃	35	119,0502 (100,0); 117,0345 (11,8)
17	(epi)galocatequina- (epi)galocatequina	7,30	1,40	609,1250	-0,0	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	20	441,0826 (100,0); 609,1259 (71,6); 423,0715 (64,6); 305,0661 (49,3); 483,0906 (11,6)
18	(epi)galocatequina- (epi)catequina	11,00	2,60	593,1301	-0,1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	20	425,0878 (100,0); 593,1298 (50,4); 289,0714 (34,4); 407,0771 (28,9); 467,0977 (12,5)
19	Galocatequina	11,20	2,40	305,0670	-1,0	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	20	125,0243 (100,0); 167,0349 (44,1); 219,0662 (34,2); 221,0452 (17,6); 261,0768 (17,1); 287,0545 (2,8)
20	(Epi)catequina- (Epi)galocatequina	12,70	3,20	593,1303	-0,4	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	35	305,0666 (100,0); 125,0246 (79,8); 423,0718 (59,4); 137,0244 (26,8); 161,0243 (20,3)
21	(Epi)galocatequina- (Epi)galocatequina-ácido gálico	12,80	3,40	761,1354	0,7	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₈	20	761,1368 (100,0); 423,0733 (38,0); 591,1177 (29,8); 443,1926 (7,4); 169,0152 (7,4); 609,1313 (6,8); 303,0537 (6,7); 457,0758 (6,6)
22	(Epi)galocatequina- (Epi)catequina-ácido gálico	13,00	3,50	745,1413	0,4	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₇	35	177,0190 (100,0); 125,0240 (97,0); 289,0707 (95,0); 407,0761 (43,9); 285,0406 (28,7)
23	(Epi)catequina- (Epi)galocatequina-ácido gálico	16,20	4,70	745,1409	0,1	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₇	20	745,1443 (100,0); 575,1195 (48,7); 423,0716 (34,7); 457,0778 (25,8); 169,0150 (20,7); 593,1222 (19,3)
24	(Epi)catequina- (Epi)catequina (I)	16,40	4,50	577,1351	-0,4	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	20	305,0668 (100,0); 425,0880 (60,2); 577,1357 (60,0); 289,0718 (41,4); 407,0774 (29,8); 451,1035 (23,6); 125,0244 (13,6)
25	Catequina	17,10	4,30	289,0720	-0,9	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	20	289,0715 (100,0); 245,0818 (91,7); 203,0711 (55,5); 125,0244 (42,1); 205,0505 (39,6); 151,0402 (30,6); 221,0818 (30,4)
26	(Epi)galocatequina- (Epi)catequina-galoil	17,10	5,00	745,1408	0,2	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₇	20	745,1419 (100,0); 577,0990 (24,8); 407,0761 (13,4); 441,0831 (11,3); 559,0909 (9,2); 303,0515 (8,5); 169,0141 (7,5)
27	galocatequina-galoil	17,60	4,80	457,0775	0,4	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₁	20	169,0145 (100,0); 125,0247 (44,2); 161,0245 (7,7); 305,0658 (4,6)
28	(Epi)afzelequina- (Epi)galocatequina-galoil	18,50	5,60	729,1462	0,1	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆	35	305,0662 (100,0); 125,0246 (99,4); 161,0237 (38,0); 287,0546 (35,4); 177,0192 (33,4); 169,0138 (30,0); 137,0241 (20,9); 423,0710 (19,4)
29	(Epi)catequina- (Epi)catequina-galoil	19,60	6,00	729,1479	1,3	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆	20	729,1469 (100,0); 730,1506 (39,9); 441,0825 (29,3); 577,0998 (16,7); 407,0763 (13,6); 731,1535 (8,6); 559,0872 (8,0); 289,0712 (7,7)
30	(Epi)afzelequina- (Epi)catequina (I)	20,00	5,70	561,1402	-0,9	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₁	20	289,0720 (100,0); 561,1407 (21,2); 271,0612 (13,2); 435,1082 (10,2); 407,0774 (6,2); 425,0873 (4,7)
31	catequina-galato	23,40	7,00	441,0828	-0,2	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	35	169,0141 (100,0); 125,0243 (42,5); 289,0711 (27,0); 245,0811 (14,3)
32	(Epi)catequina- (Epi)catequina (II)	25,70	7,90	577,1346	1,0	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	20	289,0721 (100,0); 425,0886 (87,9); 577,1368 (61,4); 125,0246 (46,2); 407,0781 (39,9); 451,1033 (28,4)
33	(Epi)afzelequina- (Epi)catequina (II)	29,50	9,20	561,1396	1,2	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₁	35	289,0707 (100,0); 137,0235 (23,1); 245,0808 (19,6); 125,0246 (17,9); 109,0288 (15,5); 271,0604 (11,3); 164,0104 (8,6); 151,0401 (7,6); 407,0775 (6,5)

TABELA 5.5 (Continuação)

34	Caempferol-hexosídeo-deoxihexosídeo	21,90	6,80	593,1502	1,6	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	30	285,0405 (100,0); 447,0930 (49,9); 446,0859 (36,1); 593,1521 (32,4)
35	Caempferol-454*	25,60	7,90	739,2085	0,8	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	35	284,0323 (100,0); 227,0347 (88,4); 255,0296 (79,7); 285,0382 (37,4); 739,2078 (19,0)
36	Caempferol-308* (I)	26,80	8,20	593,1501	1,8	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	35	284,0325 (100,0); 227,0350 (40,6); 255,0297 (27,6); 183,0447 (6,0)
37	Caempferol-308* (II)	27,20	8,40	593,1510	0,3	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	35	284,0327 (100,0); 227,0349 (44,8); 285,0385 (39,1); 255,0297 (33,1)
38	Caempferol-deoxihexosídeo	29,20	8,80	447,0926	1,5	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	35	284,0323 (100,0); 227,0349 (36,3); 255,0293 (25,3); 151,0033 (1,4); 178,9995 (0,8)
39	Caempferol-278* (I)	31,40	9,80	563,1403	0,6	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	35	284,0325 (100,0); 227,0349 (36,1); 255,0296 (24,9); 563,1396 (7,7)
40	B8 - Juglanina (caempferol 3-O-α-arabinofuranosídeo)	32,00	9,80	417,0823	1,1	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	35	227,0351 (100,0); 255,0300 (95,5); 284,032 (13,9); 285,0394 (7,4)
41	Caempferol-200*	32,10	10,00	485,0693	1,6	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₁₄	35	284,0318 (100,0); 285,0392 (64,2); 227,0355 (47,6); 255,0300 (29,5)
42	Caempferol-278* (II)	33,00	10,50	563,1408	-0,4	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₄	35	284,0322 (100,0); 227,0344 (31,8); 285,0367 (22,4); 255,0287 (20,8)
43	Caempferol-214*	33,60	10,80	499,0861	4,2	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₂	35	285,0392 (100,0); 284,0323 (71,0); 227,0352 (33,3); 255,0284 (31,7)
44	Caempferol-182*	33,70	-	467,0743	-2,3	C ₂₂ H ₁₅ N ₂ O ₁₀	35	285,0395 (100,0); 227,0342 (40,7); 431,0960 (34,4); 255,0278 (30,6)
45	B9 - Afzelina (caempferol-3-O-α--ramnosídeo)	33,80	10,60	431,0988	1,1	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	35	255,0303 (100,0); 227,0353 (95,5); 284,0331 (22,7); 285,0399 (15,5)
46	Miricetina-455*	20,60	-	771,1987	0,2	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	35	316,0234 (100,0); 271,0233 (43,2); 259,0244 (27,4); 287,0189 (26,0)
47	Miricetina -hexosídeo	22,70	-	479,0828	0,6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃	35	316,0214 (100,0); 317,0258 (22,3); 271,0240 (7,0); 287,0170 (5,1)
48	Miricetina-pentosídeo (I)	23,60	-	449,0727	-0,3	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	35	316,0221 (100,0); 317,0285 (15,9); 271,0221 (7,0); 269,0442 (5,9); 178,9991 (4,9); 287,0198 (4,2)
49	Miricetina -279*	23,70	7,00	595,1301	0,6	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	35	316,0221 (100,0); 317,0260 (15,3); 271,0244 (12,4); 259,0245 (10,2); 287,0190 (9,0)
50	Miricetina-202*	24,10	7,00	517,0598	4,9	C ₂₃ H ₁₇ O ₁₄	35	316,0215 (100,0); 317,0271 (42,3); 449,0690 (21,6); 359,1493 (14,9); 271,0227 (13,4); 287,0216 (12,4)
51	Miricetina-pentosídeo (II)	24,20	6,90	449,0726	-0,1	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	35	316,0225 (100,0); 317,0278 (28,1); 271,0244 (7,7); 287,0198 (4,3)
52	Miricetina -309*	24,70	6,60	625,1413	-0,4	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	35	316,0217 (100,0); 317,0264 (34,4); 287,0201 (21,0); 271,0246 (20,1); 625,1409 (18,2)
53	Miricetina -133*	24,70	-	447,1291	1,2	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀	35	316,0218 (100,0); 317,0252 (13,7); 271,0245 (11,8); 287,0196 (10,9)
54	B4 - Miricitrina	25	7,3	463,0874	1,6	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	35	316,0224 (100,0); 317,0279 (35,4); 271,0244 (7,5); 287,0194 (4,2)
55	Miricetina -279*	25,50	7,60	595,1288	2,8	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₆	35	316,0218 (100,0); 317,0252 (13,7); 271,0245 (11,8); 287,0196 (10,9)
56	Miricetina-pentosídeo (III)	26,40	-	449,0722	0,8	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	35	316,0218 (100,0); 317,0258 (18,0); 271,0233 (5,9); 287,0175 (3,4)
57	Miricetina-175*	27,00	-	491,0828	0,7	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₃	35	316,0221 (100,0); 317,0277 (28,5); 271,0237 (16,4); 287,0193 (12,8)
58	Miricetina-217*	37,10	-	533,0927	1,9	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄	35	316,0221 (100,0); 317,0248 (15,4); 287,0189 (10,1); 271,0237 (9,0)
59	Quercetina-455*	23,10	7,10	755,2045	-0,6	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀	35	300,0272 (100,0); 271,0243 (73,7); 255,0289 (25,3); 243,0293 (24,6)
60	Quercetina-309 (I)*	24,00	7,80	609,1456	0,8	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	35	300,0265 (100,0); 271,0243 (31,5); 243,0297 (16,9); 255,0288 (10,4)
61	Quercetina-309 (II)*	26,30	8,00	609,1449	2,0	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	35	300,0269 (100,0); 271,0241 (46,4); 243,0282 (24,2); 609,1450 (22,2); 255,0281 (16,4)
62	Quercetina-279 (I)*	27,90	8,60	579,1346	1,6	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅	35	300,0280 (100,0); 271,0248 (26,0); 255,0298 (9,6); 579,1366 (8,4)
63	B6 - Avicularina - Quercetina-3-O-arabinofuranosídeo	28,30	8,40	433,0784	-1,8	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	35	300,0278 (100,0); 271,0248 (16,1); 255,0296 (8,0); 243,0299 (4,7); 151,0036 (4,2)
64	Quercetina-196*	28,30	-	496,0733	1,0	C ₂₁ H ₁₄ N ₅ O ₁₀	35	300,0268 (100,0); 301,0336 (88,4); 271,0236 (23,0); 243,0287 (19,2); 433,0761 (16,2)
65	Quercetina-201*	28,60	8,70	501,0640	-1,1	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₁₅	35	300,0271 (100,0); 301,0328 (89,2); 302,0378 (24,2); 271,0247 (23,0); 243,0272 (19,3); 433,0728 (18,3); 227,0334 (8,8); 255,0274 (7,1)
66	Quercetina-279 (II)*	29,00	-	579,1343	2,1	C ₂₆ H ₂₇ O ₁₅	35	300,0268 (100,0); 271,0242 (21,5); 301,0308 (19,6); 243,0295 (16,2); 255,0291 (8,6); 579,1343 (5,6); 227,0340 (4,3)
67	Quercetina-210*	29,70	-	510,0881	1,5	C ₂₁ H ₂₀ NO ₁₄	35	300,0259 (100,0); 301,0337 (74,6); 447,0928 (33,1); 271,0242 (23,9); 243,0291 (16,0)
68	B7 - Quercitrina - Quercetina-3-O-ramnosídeo	29,90	9,10	447,0935	-0,4	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	35	300,0273 (100,0); 301,0341 (64,5); 271,0244 (12,6); 255,0294 (6,5)
69	Quercetina-pentosídeo	30,00	-	433,0773	0,8	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	35	300,0267 (100,0); 301,0329 (20,7); 253,0500 (15,1); 271,0236 (13,4)
70	Quercetina-desoxyhexosídeo-68	30,00	9,10	515,0807	4,7	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₃	35	301,0330 (100,0); 300,0265 (75,9); 271,0245 (24,3); 447,0922 (17,7)
71	Quercetina-175*	34,20	10,70	475,0876	1,4	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₂	35	300,0271 (100,0); 301,0302 (15,8); 271,0240 (11,6); 243,0299 (5,0)
72	Quercetina-217*	42,20	-	517,0969	3,6	C ₂₄ H ₂₁ O ₁₃	35	300,0261 (100,0); 301,0297 (17,7); 271,0249 (16,2); 243,0303 (10,5); 255,0281 (6,6)
73	metilquercetina-hexosídeo	30,90	9,50	477,1040	-0,3	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂	35	299,0188 (100,0); 315,0502 (56,3); 300,0234 (25,1); 462,0793 (24,3); 271,0242 (19,2)
74	Metilquercetina	38,50	12,20	315,0503	2,2	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	35	271,0241 (100,0); 300,0270 (39,8); 255,0292 (38,5); 243,0287 (24,7)
75	B12 - Bauhiniastatina 2	45,50	14,60	299,0919	2,0	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	35	225,0556 (100,0); 197,0605 (83,1); 241,0505 (75,3); 210,0320 (36,1); 196,0525 (27,2)

*Números após as agliconas referem-se a diferença do radical [Y₀]⁻ ou ion molecular desprotonado da aglicona [Y₀]⁻ e a massa exata do íon desprotonado do composto [M-H]⁻.

5.3.1 - Ácidos fenólicos e derivados (1-16)^a

Os picos cromatográficos **8**, **12** e **15** foram identificados como ácido siríngicos e ácido siríngico-hexosídeo (I) e (II) com ion molecular desprotonado ([M-H]⁻) 359,0984, 359,0978 e 197,0455, respectivamente. O MS² de **8** e **12** possui o íon produto com *m/z* 197 e padrão de fragmentação de ácido siríngico¹¹⁹ com a perda de dois radicais metila ($\bullet\text{CH}_3$) e perda da massa exata 162,053 características de hexosídeos. Adicionalmente, esses compostos já foram descritos em outra espécie de *Bauhinia*¹²⁰.

Os picos **5** e **6** foram caracterizados como isômeros de ácido dihidroxibenzoico por terem a mesma massa exata, diferentes tempos de retenção (5,6 e 6,2 minutos respectivamente) e padrão de fragmentação com *m/z* 108,0215 [M-H-45-H]⁻ (perda de HCO₂) e 109 [M-H-44]⁻ (perda de CO₂), dependendo da energia de colisão, característica do ácido dihidroxibenzoicos e de isômeros como ácido gentísico e ácidos protocatecuicos ambos já anteriormente relatados para o gênero *Bauhinia*^{121,122}. Os compostos **3** e **4** apresentou o íon molecular desprotonado 153,0189, 152,0114 e perda de hexosídeo [M-H-162,053]⁻, sendo caracterizados como ácido dihidroxibenzoico-hexosídeo (I) e (II).

Os isômeros do ácido hidroxibenzoico (**7**, **11**) são encontrados em diferentes gêneros de *Bauhinia*^{123,124}, e em nossa condição de análise, o tempo de retenção foi de 9,4 e 13,2 minutos, respectivamente. Estes compostos foram caracterizados devido à presença do íon fragmento *m/z* 93,034¹²⁵ originado pela perda de dióxido de carbono [M-H-44]⁻. Além disso, o composto **9** apresentou o íon molecular desprotonado *m/z* 299,0771 (C₁₃H₁₅O₈) com os íons fragmentos *m/z* 137,0243 e 93,0343 característicos do ácido hidroxibenzoico com a perda de hexosídeo.

A perda de CO₂ [M-H-44]⁻ também foi observada no ácido gálico (**2**) com íon [M-H]⁻ *m/z* 169,014¹²⁶, ácido cafeíco (**10**) *m/z* 179,035¹²⁷, ácido vanílico (**14**) *m/z* 167,0333¹²⁸, ácido cumárico (**16**) *m/z* 163,040¹²⁹, ácido gálico-hexosídeo (**1**) *m/z* 331,067 e cumárico-hexosídeo (**13**) *m/z* 325,093 com perda de hexosídeo típica 162,053. Estes compostos também já foram descritos em *Bauhinia ssp*^{40,120,130}. Desta maneira, foram identificados 16 ácidos fenólicos e derivados.

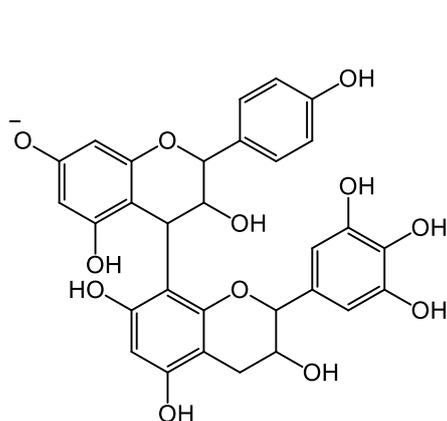
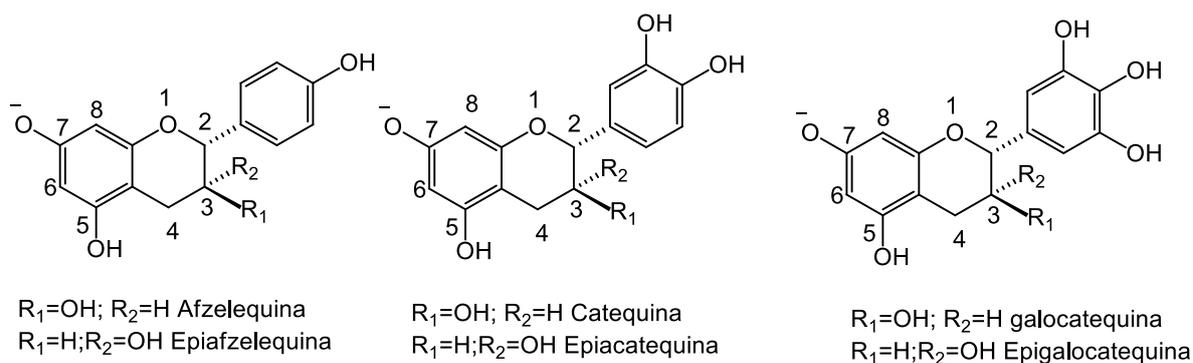
^a Espectros nas páginas 99 a 106.

5.3.2 - Flavan-3-ols e Protoantocianidinas (17-33)^b

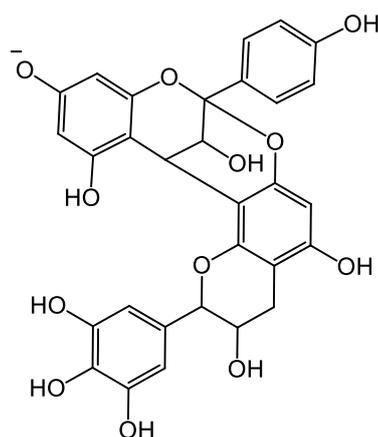
Proantocianidinas ou oligômeros de protoantocianidinas (PAs), FIGURA 5.8, são compostos fenólicos construídos a partir de monômeros de flavan-3-ols afzelequina, catequina, galocatequina e seus epímeros. Os oligômeros de protoantocianidinas podem ser dímeros, trímeros até heptâmeros e são geralmente referidos como oligômeros (n) 2~7, enquanto as cadeias maiores são geralmente referidas como poliméricas ou taninos (n) 8~24. Estas unidades podem ser esterificadas com ácido gálico para formar O-galatos. PAs tipo B são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol ligados principalmente através de ligações C4→8 ou às vezes C4→6. Quando uma ligação éter adicional é formada entre C2→7, os compostos são chamados PAs tipo A. Esta subclasse de compostos tem dois hidrogênios a menos que os PAs do tipo B e pode ser prontamente reconhecida pelos seus íons com diferença de massa de 2 Da ¹³¹.

Os monômeros de flavan-3-ols, galocatequina e catequina (**19** e **25**) foram identificados pela comparação dos íons obtidos no modo de ionização negativo com espectros e fragmentos característicos já relatados na literatura ^{55,132,133}. O composto **25** catequina [M-H]⁻ m/z 289,0720 apresentou os fragmentos m/z 245,0818 [M-H-CO₂]⁻ devido à perda de CO₂, m/z 203,0711, 205,0505 e 151,0402 (proveniente da fragmentação Retro-Diels-Alder). A galocatequina (**19**) com íon pseudomolecular [M-H]⁻ m/z 305,0670 e íons fragmentos MS² com m/z 261,0768 [M-H-CO₂]⁻, 221,0452, 219,0662 e 167,0349 (originado da fragmentação Retro-Diels-Alder). Para ambos os compostos (catequina e galocatequina) foi verificado o fragmento m/z 125,024 formado da fragmentação do anel heterocíclico B ou C, e perda de floroglucinol ^{134,135}.

^b Espectros nas páginas 109 a 115.



$C_{30}H_{25}O_{12}^-$
 577,1351
 Protoantocianidina - Tipo B



$C_{30}H_{23}O_{12}^-$
 575,1195
 Protoantocianidina - Tipo A

FIGURA 5.8– Exemplos de protoantocianidinas, epímeros e dímeros adaptado de Li et. al. 2007¹³¹.

A identificação dos dímeros de proantocianidinas foram baseadas no padrão de fragmentação^{78,131} como ilustrado na FIGURA 5.9. Por exemplo, (epi)catequina-(epi)catequina I e II, **24** e **32**, (proantocianidina tipo B) exibiu o íon molecular desprotonado com m/z 577,1365 e íons fragmentos em 20eV m/z 425 provenientes de clivagem pelo o mecanismo de fragmentação por retenção de carga (CRF) por retro-Diels-Alder (RDA), m/z 451 e 289 obtidos por fragmentação por migração de carga CMF via ϵ -eliminação indicando unidade de ligação carbono-carbono e (epi)catequina, respectivamente. Além disso, a perda de 170 (ácido gálico) foi observada nos compostos **21** a **23**. Os PAs existem em uma ampla gama de produtos derivados de plantas, e esses compostos possuem potenciais benefícios para a saúde, como resultado de suas ações antioxidantes, anticarcinogênicas e anti-inflamatórias^{136,137}.

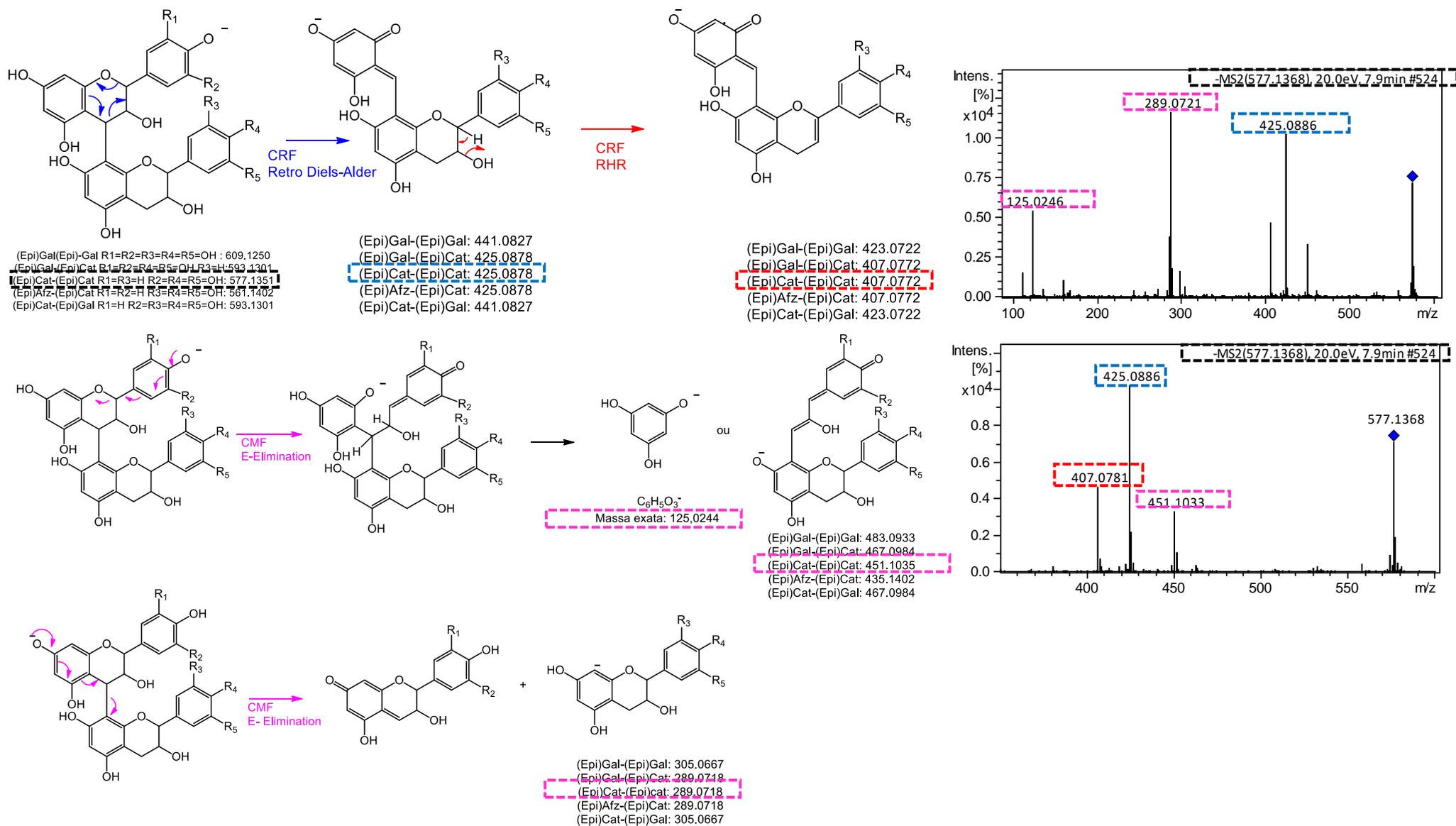


FIGURA 5.9 - Mecanismo de fragmentação no modo negativo (QqTOF) dos dímeros de proantocianidinas ^{78,131,138}.

5.3.3 - Flavonoides, derivados e Bauhiniastatina 2 (34-75)^c

Os flavonoides possuem uma estrutura central de fenilbenzopirano ($C_6C_3C_6$) de três anéis e suas principais subclasses são chalcona, flavona, isoflavona, flavonona e flavonol. As modificações usuais da estrutura básica do núcleo incluem hidroxilação e/ou metilação nas posições C-3, C-5, C-7, C-3', C-4' e/ou C-5'. Embora os padrões de fragmentação por MS possam variar com a instrumentação utilizada, diferentes autores relataram que os principais caminhos de fragmentação dos flavonoides são aparentemente independentes dos tipos de analisadores aplicados (QqQ, IT ou QqTOF) e diferenças significativas podem ser observadas em relação à abundância relativa dos íons fragmentos quando diferentes instrumentações são utilizadas. Os modelos baseados na detecção da presença ou ausência de íons fragmentos distintos são preferidos aos que dependem apenas das alterações de intensidade relativas observadas para os compostos isoméricos ¹³⁹⁻¹⁴².

Assim, a identificação de agliconas O-glicosiladas (FIGURA 5.10) foram baseadas na fragmentação do radical $[Y_0]^-$ e/ou dos íons moleculares desprotonados $[Y_0]^-$ das agliconas no modo negativo de ionização. Os fragmentos com m/z 284,0326, 300,0276, 315,0505, 316,0225 foram caracterizados como radical dos íons moleculares desprotonados $[Y_0]^-$ das agliconas caempferol, quercetina, metilquercetina e miricetina, respectivamente.

A aglicona metilquercetina foi inferida pela perda dos radicais metila (\bullet CH_3) com a diferença de 15,027Da ($315,0502 \rightarrow 300,0270$). Os íons produtos com m/z 255,0301 $[Y_0-CO-H]^-$ e 227,0352 $[Y_0-C_2O_2-H]^-$ levou a confirmar o flavonol caempferol. E foi possível observar a presença dos fragmentos $[Y_0-CO-2H]^-$ e $[Y_0-CO_2-2H]^-$ característicos de quercetina, miricetina e metilquercetina. Adicionalmente, as agliconas foram confirmadas por experimentos MS^2 com mudança na energia de colisão, onde foi possível verificar os íons fragmentos m/z 178,9989 e 137,0244 ou 121,0296 de miricetina e quercetina respectivamente, provenientes da reação de fragmentação retrocíclica de $^{1,3}A_0^-$ e $^{1,2}A_0^-$, e o íon 151,0036 da eliminação do monóxido de carbono ^{78,139,140}.

O mecanismo de fragmentação dos flavonoides O-derivados (glicosilados ou com outras perdas) utilizados para esta caracterização é mostrado na (FIGURA 5.10) ^{78,139} e este envolveu a transferência de prótons do açúcar para o

^c Espectros nas páginas 116 a 135.

oxigênio glicosídico e clivagem heterolítica da ligação glicosídica hemiacetal ou clivagem homolítica por fragmentação de retenção de carga (CRF) através da fragmentação radicalar. Assim, as perdas de um, dois ou três hexosídeo (162), 146 (deoxihexosídeo) ou 132 (pentosídeo) foram utilizadas para identificar os flavonoides O-glicosilados ¹⁴³, adicionalmente houveram perdas que não puderam ser identificadas, de todo modo a massa exata foi usada para atribuir a fórmula molecular, e o padrão de fragmentação de $[Y_0]^-$ a aglicona. Para estes compostos a nomenclatura dada foi da aglicona mais números após as agliconas referindo-se a diferença do radical $[Y_0]^-$ (ou ion molecular desprotonado da aglicona $[Y_0]^-$) e a massa exata do íon desprotonado do composto $[M-H]^-$.

5.3.4 - Identificação de compostos usando LC-SPE/NMR

Nas condições cromatográficas, ilustradas na FIGURA 5.7 e apêndice seção 8.3 (cromatograma de trapeamento no comprimento de onda 203 e 230 nm), vinte (20) frações foram trapeadas por SPE das quais seis (6) compostos (**40**, **45**, **54**, **63**, **68** e **75**) foram identificados e os valores dos deslocamentos químicos, multiplicidade de sinais e constante de acoplamento do experimento de ¹H NMR e HSQC são apresentados na TABELA 5.6. Dos seis compostos caracterizados quatro são inéditos para esta espécie: miricitrina (**54**), juglanina (**40**), afzelina (**45**) e bahiniastatina 2 (**75**). Os espectros obtidos de ¹H-NMR, HSQC e HMBC estão no apêndice seção 8.3.

O composto **54** com tempo de retenção de 25 minutos e fórmula molecular do íon desprotonado igual a C₂₁H₂₀O₁₂, apresentou por NMR os deslocamentos químicos característicos do hidrogênio aromático de 6,07, 6,19 e 6,91 Hz. Os dois primeiros sinais são característicos de flavonoides hidroxilados di-substituído nas posições 6 e 8 do anel A e o último sinal é característico das posições 2 'e 6' do anel B tri substituído evidenciando a mirecitrina como aglicona. A atribuição feita para miricetina ramosídeo foi baseada no espectro de hidrogênio e experimentos de HSQC que mostraram um dubleto $\delta_H = 0,94$ ppm (3H, d, J = 6,0 Hz) e o sinal em $\delta_C = 18,7$ (C-6"), típico do grupo metila da ramnose. Adicionalmente, os espectros apresentaram os sinais relacionados com o hidrogênio do carbono anomérico em $\delta_H 5.28$ e $\delta_C 104.1$ ppm (C-1"), respectivamente. A presença do singlete largo sugeriu que a ramnose é

ligada a aglicona com uma ligação tipo α . A comparação dos resultados com os dados da literatura caracterizou o composto **54** como miricetina 3-O- α -ramnosídeo ¹⁴⁴.

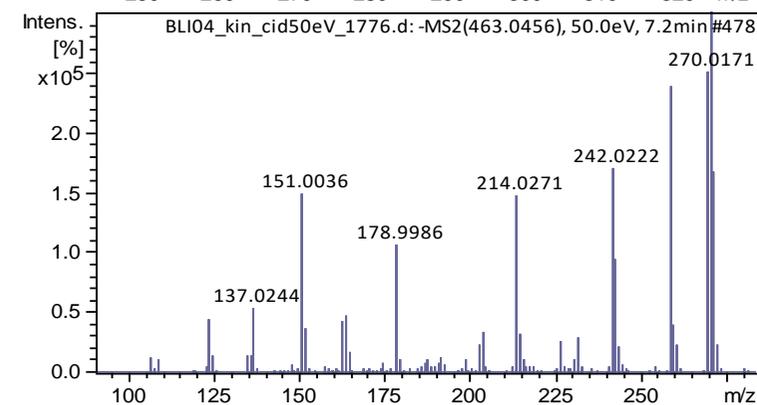
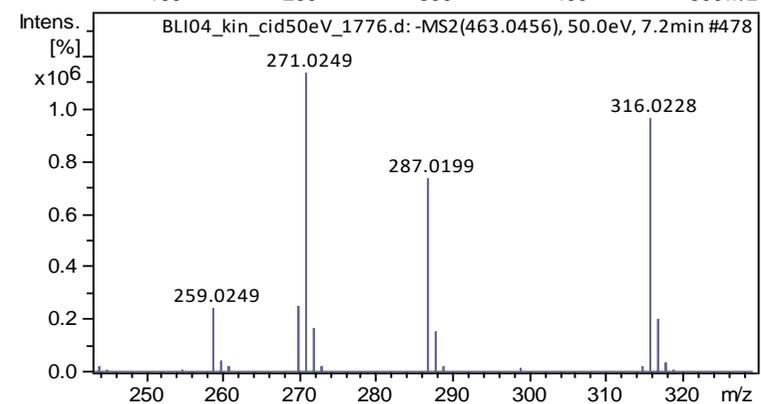
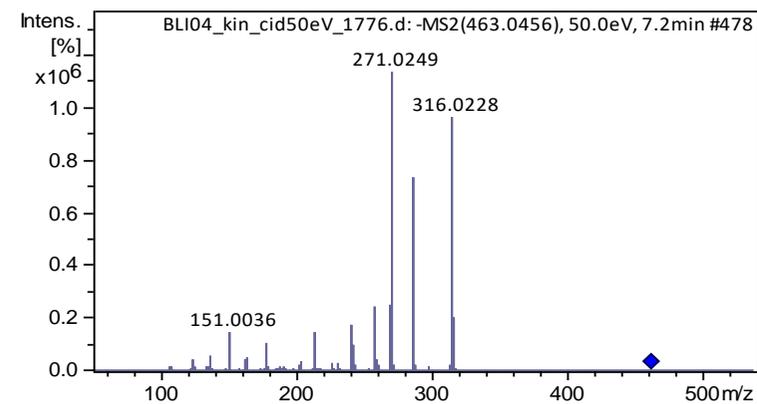
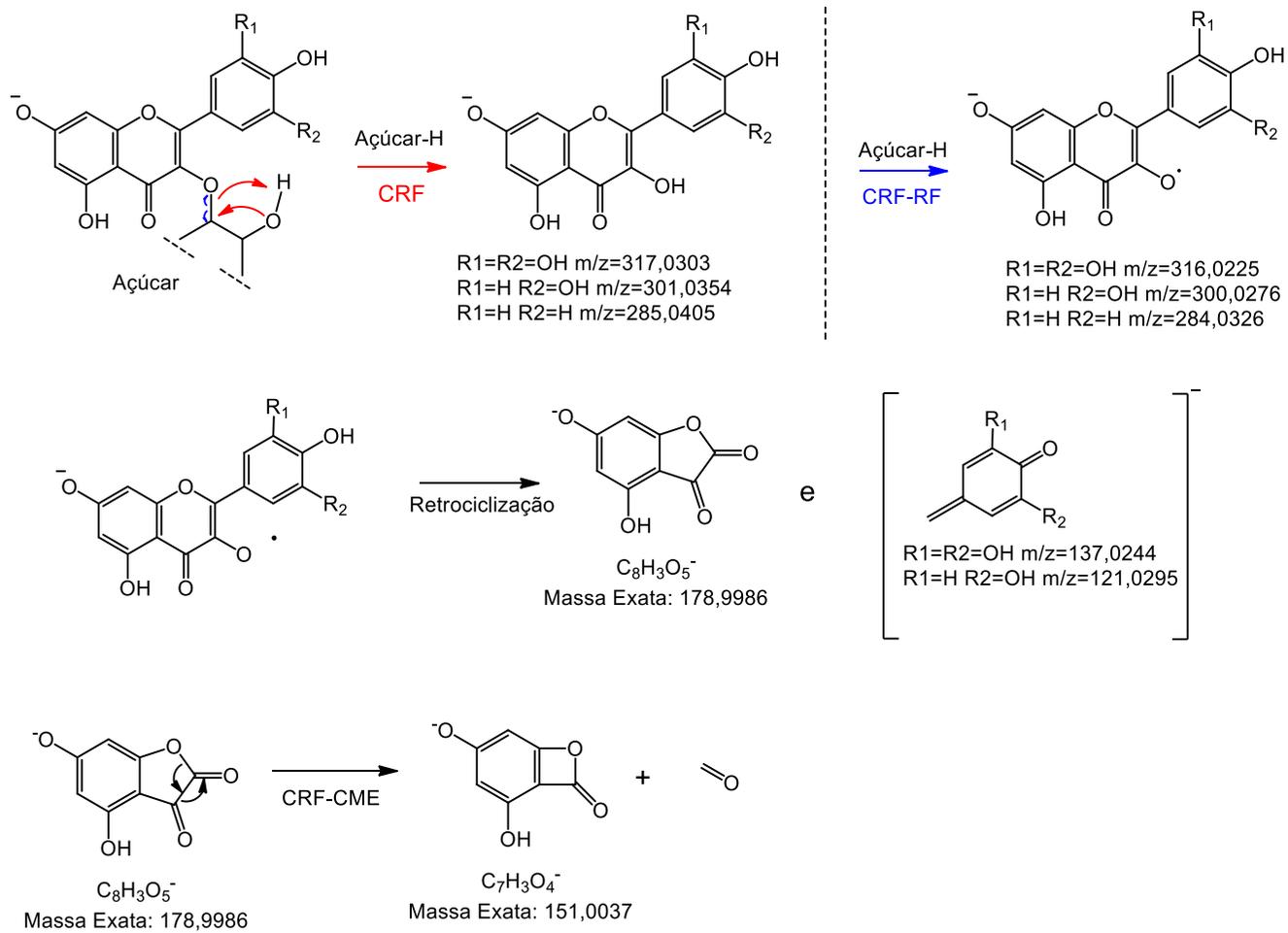


FIGURA 5.10 - Mecanismo de fragmentação no modo negativo (QqTOF) flavonoide O-mono/di ou tri-glicosilado (derivado) ^{78,139,140}.

O composto **63** (C₂₀H₁₈O₁₁) apresentou deslocamentos químicos característicos de hidrogênios aromáticos em 6,06, 6,20, 7,48, 7,45 e 6,86 ppm. Os dois primeiros sinais são característicos de flavonoides hidroxilados dissustituídos nas posições 6 e 8 do anel A, enquanto os sinais em 7,48, 6,86 e 7,45 são característicos de 2', 5' e 6' de anel B dissustituído, respectivamente, o que evidencia a aglicona quercetina. Os espectros de NMR ¹H, ¹³C e HSQC revelaram um conjunto de sinais característicos de um derivado arabinofuranosídico da quercetina, cujos sinais relativos ao hidrogênio e carbono anomérico foram observados em δ_H 5,39 sbr e δ_C 110,1 ppm (C-1'), respectivamente. Por sua vez, a presença do singlete largo de hidrogênio anomérico sugere uma configuração α para a arabinose. Desta forma, este composto foi caracterizado como quercetina 3-α-O-arabinofuranosídeo (avicularina) já relatada para *B. longifolia*³⁷.

TABELA 5.6 - Deslocamentos químicos, multiplicidades de sinais e constantes de acoplamento dos espectros de ¹H NMR e HSQC dos flavonoides O-glicosilados identificados.

C/H	54		63		68		40		45	
	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C						
6	6,07 (s br)	---	6,06 (s)	---	6,13 (d; 1,6)	102,1	6,11 (s)	---	6,15 (d; 2)	101,9
8	6,19 (s br)	---	6,20 (s)	---	6,29 (d; 1,8)	96,4	6,28 (s)	---	6,31 (d; 2)	96,5
2'	6,91 (s)	110,8	7,48 (d;2,1)	116,7	7,31 (d; 2)	116,9	7,93 (d; 8,8)	132,5	7,74 (d; 8,7)	132,6
3'	---	---	---	---	---	---	6,9 (d; 8,8)	117,4	6,92 (d; 8,7)	117,5
5'	---	---	6,86 (d; 8,5)	116,7	6,89 (d; 8,3)	116,5	6,9 (d; 8,8)	117,4	6,92 (d; 8,7)	117,5
6'	6,91 (s)	110,9	7,45 (dd; 2,1, 8,5)	123,0	7,28 (dd; 2,1; 8,5)	122,9	7,93 (d; 8,8)	132,5	7,74 (d; 8,7)	132,6
1''	5,28 (s br)	104,1	5,39 (s br)	110,1	5,33 (d; 1,4)	103,7	5,39 (s br)	110,1	5,36 (d; 1,7)	104,3
2''	4,21 (s br)	72,7	4,3 (s br)	84,1	4,2 (dd; 1,7; 3,3)	72,3	4,33 (dd; 3; 1)	83,9	4,20 (dd; 1,75; 3,33)	72,9
3''	3,78 (dd; 3,2; 9,4)	72,6	3,9 (s br)	79,7	3,74 (dd; 3,3; 9,4)	72,2	3,89 (dd; 2,9; 5)	79,3	3,69 (dd; 3,27; 9,39)	72,3
4''	3,35 (m)	74,1	3,9 (s br)	88,9	3,30 (m)	73,4	3,82 (m)	88,8	3,3 (m)	73,4
5''	3,5m	---	3,5 (m)	62,9	3,5 (m)	72,2	3,47 (dd; 1,4; 4,8)	63,2	3,3 (m)	72,3
6''	0,94d (J=6,1 Hz)	18,7	---	---	0,93 (d; 6,3)	17,7	---	---	0,91 d (J=5,57 Hz)	18,3

¹H m* (δ in ppm; J in Hz), m*=multiplicidade (s= singlete, s br= singlete largo, d=doubleto, t= triplete, dd= duplo doubleto, m=multiplicidade); ¹³C (δ em ppm).

O Composto **68** (C₂₁H₂₀O₁₁) apresentou deslocamentos químicos característicos dos hidrogênios aromáticos de 6,13, 6,29, 7,31, 6,89 e 7,28 ppm. Os dois primeiros sinais são característicos de flavonoides hidroxilados dissustituídos nas posições 6 e 8 do anel A enquanto os sinais 7,31, 6,89 e 7,28 são característicos de 2', 5' e 6' do anel B dissustituído, respectivamente, o que

caracteriza a quercetina. Os espectros de hidrogênio e HSQC mostraram ser uma quercetina ramnosídeo, dado o dubleto em δ_H 0,93 ppm (3H, d, $J = 6,3$ Hz) e o sinal a δ_C 17,7 (C-6"), típico do grupo metila da ramnose. Adicionalmente, os espectros mostraram os sinais relacionados ao hidrogênio e ao carbono anomérico em δ_H 5,33 e δ_C 103,7 ppm (C-1"), respectivamente. A presença do um singlete largo sugere que a ramnose está ligada a aglicona com uma ligação do tipo α , de modo que foi possível identifica-lo como quercetina 3- α -O-ramnosídeo (quercitrina) previamente registrada para esta espécie ³⁷.

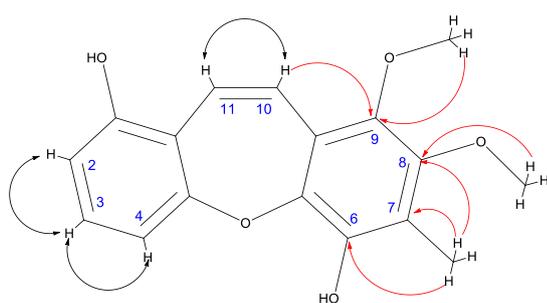
O composto **40** (C₂₀H₁₈O₁₀) apresentou os deslocamentos químicos característicos do hidrogênio aromático de 6,11, 6,28, 7,93 e 6,9, e os sinais característicos (6,11, 6,28) dos flavonoides hidroxilados dissustituídos nas posições 6 e 8 do anel A, além dos sinais do anel B monossustituído (7,93 para o carbono 2' e 6' e o 6,9 para 3' e 5') típicos da aglicona caempferol. Os espectros de NMR de ¹H, ¹³C e HSQC revelaram um conjunto de sinais característicos de um derivado arabinofuranosídico de caempferol, cujos sinais relativos a hidrogênio e carbono anomérico foram observados em δ_H 5,39 e δ_C 110,1 ppm (C-1'), respectivamente. Por sua vez, a presença do singlete largo de hidrogênio anomérico sugere uma configuração α para a arabinose. Os dados obtidos e a comparação com os dados da literatura caracterizou o composto **40** como juglanina (caempferol-3-O- α -L-arabinofuranosídeo) ¹⁴⁵.

O composto **45** (C₂₁H₂₀O₁₀), apresentou os sinais característicos da aglicona caempferol. Os espectros de hidrogênio e HSQC mostraram um dubleto em δ_H 0,91 ppm (3H, d, $J = 5,57$ Hz) e um sinal em δ_C 18,3 (C-6"), típico do grupo metila da ramnose indicando um caempferol ramnosídeo. Adicionalmente, os espectros de hidrogênio e carbono mostraram os sinais relacionados ao hidrogênio e carbono anomérico em δ_H 5,36 e δ_C 104,3 ppm (C-1"), respectivamente. A presença do um singlete largo sugere que a ramnose está ligada a aglicona com uma ligação do tipo α , de modo que foi possível caracteriza-lo como afzelina (caempferol-3- α -L-ramnosídeo) ¹⁴⁶.

O espectro de hidrogênio para o composto **75** (C₁₇H₁₆O₅) evidenciou o anel aromático da estrutura apresentado na FIGURA 5,11 através dos deslocamentos químicos (6,86, 7,06 e 6,59 ppm), multiplicidade e constante de acoplamento característicos dos hidrogênios 2, 3 e 4. Ademais, os experimentos de COSY mostrou a correlação do hidrogênio 3 com os

hidrogênios das posições 2 e 4. Para o anel central, os hidrogênios referentes às posições 10 e 11 mostrou constante de acoplamento alta (11,6Hz) característica de hidrogênios vinílicos. As duas metoxilas, a hidroxila e metila foram verificadas pelos sinais de ^1H NMR. A correlação do carbono a uma ligação (^1J -HSQC) e HMBC confirmam a posição de cada substituinte no anel e, assim foi caracterizado o composto como bauhiniastatina 2. Pettit et. al. (2006) relatou a presença de bauhiniastatina 2 em *B. purpúrea* com atividade de inibição de crescimento significativa contra de linhas celulares de câncer humano¹⁴⁷.

FIGURA 5.11 - Estrutura e dados de NMR da Bauhiniastatina 2 (75)



	^1H m* (δ in ppm; J in Hz)	^{13}C (δ in ppm)
2	6,86 (dd; 8,0; 1,0)	114,2
3	7,06 (t; 8,0)	131,5
4	6,59 (dd; 8,0; 1,0)	113,6
10	6,95 (d; 11,6)	126,5
11	6,83 (d; 11,6)	125,3
CH ₃ -7	2,13 (s)	9,6
OCH ₃ -8	3,75 (s)	61,8
OCH ₃ -9	3,73 (s)	62,5

* multiplicidade (s = singleto, d = dubleto, t = tripleto, dd = duplo dubleto)

5.4 - Diferenciação química utilizando ferramentas quimiométricas

5.4.1 - Estudo das características moleculares

Para a caracterização dos compostos que diferenciam as 4 espécies de *Bauhinia* por LC-HRMS, inicialmente realizou-se a organização dos dados em matriz numérica para posterior análises por HCA e PCA. Utilizando o software *Profile analysis*®, foi possível calcular os “buckets” (características moleculares - CM) que são valores numéricos obtidos a partir do resultado do agrupamento dos íons por tempo de retenção (t_R) e distância dos isótopos, unificando m/z distintos de um mesmo íon (íons com carga diferentes, adutos ou clusters)¹⁴⁸. Adicionalmente, as intensidades foram normalizadas pela soma dos valores dos “buckets” e estes foram tabelados. Foram calculados 220 “buckets” com os parâmetros da TABELA 5.7. Destes, cento e vinte três (123)

foram fragmentados nos experimentos de *autoMS* e/ou experimentos com mudança de energia de colisão.

TABELA 5.7 - Parâmetros para cálculos das características moleculares, análise hierárquica de grupos (HCA) e análise de componentes principais (PCA)

Tratamento	Parâmetro	Valor Limiar
Por análise (amostras) e cálculo dos <i>buckets</i>	Relação sinal/ruído (S/N)	15
	Limiar de Coeficiente de correlação	0,7
	Largura mínima do sinal de MS*	15
	Advanced bucket	0,4 min e 1mDa
	Normalização	Soma dos valores dos <i>buckets</i> nas análises >=6 <i>buckets</i> dentro do grupo <i>Bauhinia</i>
	Filtro de bucket	Substituir valores perdidos dos <i>buckets</i> nos cálculos pelas médias do grupo <i>Bauhinia</i>
	Smoothing width	7
Aduetos e clusteres	[M-H] ⁻ ; [M+HCOOH-H] ⁻ ; [M+CH ₃ COOH-H] ⁻ ; [2M-H] ⁻ ; [2M+HCOOH-H] ⁻ ; [2M+CH ₃ COOH-H] ⁻ ; [3M-H] ⁻ .	
Variáveis (<i>buckets</i>)	PCA e HCA	Variance
Cálculo de componentes principais	Gráfico de %variância explicada	

Assim, todos os íons fragmentos foram estudados objetivando identificar o maior número de compostos nas quatro espécies de *Bauhinia*. Esta caracterização foi realizada considerando os compostos identificados em *B. longifolia* e espectros (adquiridos em equipamentos com fontes de ESI e analisador com câmeras de colisão tipo CID) presentes em bases de dados (<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>; <http://www.massbank.jp/>; <https://msbi.ipb-halle.de/>; <https://metlin.scripps.edu>). Todos os compostos identificados foram consultados na base de dados HMDB (<http://www.hmdb.ca/>), afim de saber se os mesmos estavam presentes no reino das plantas e/ou na família das espécies de *Bauhinia*, Fabaceae. Adicionalmente, os compostos foram inferidos excluindo aqueles que eram fragmentos dos íons precursores no mesmo tempo de retenção. Foram identificados mais 24 compostos e estes estão listados na ordem numérica na TABELA 5.8 de acordo com os tempos de retenção e serão discutidos nas próximas seções. Isômeros com a mesma massa exata, padrão de fragmentação e diferentes tempos de retenção foram nomeados igualmente

e adicionados os números I, II e III. Os espectros (MS²) estão no apêndice seção 8.2.

5.4.1.1 - **Ácido quínico e derivados (76, 83, 86)^d**

O ácido quínico (**76**) foi diferenciado pela massa exata (191,0555) que conferiu-lhe a fórmula molecular do íon desprotonado C₇H₁₁O₆ com 3,2 ppm de erro e presença dos íons fragmentos *m/z* 173,0457 (perda de água) e *m/z* 127,0400 (perda de CO₂)¹⁴⁹. Derivados do ácido quínico também foram identificados, sendo eles: ácido clorogênico (**83**) e ácido quínico-cumaroil (**86**) com fórmulas moleculares dos íons desprotonados C₁₆H₁₇O₉ e C₁₆H₁₇O₈ e possivelmente, devido a fragmentação por CRF via RHR foi observado a perda neutra de 162,0296 proveniente da parte correspondente da molécula ao ácido cafeico e 146,0355 do ácido cumárico para (**83**) e (**86**), respectivamente. Adicionalmente, o ácido clorogênico apresentou o íon 191,0568 relativos ao ácido quínico e o ácido quínico-cumaroil apresentou os íons 163,0403 e 119,0503 devido a fragmentação do ácido cumárico.

5.4.1.2 - **Dissacarídeo (77)^e**

O dissacarídeo hexose-hexose (**77** - maltose, trealose ou outros isômeros) foi identificado devido a fragmentação do íon molecular desprotonado [M-H]⁻ com *m/z* 341,1077 (C₁₂H₂₁O₁₁) que produziu fragmentos com *m/z* 179,0564 (monossacarídeo desprotonado) e *m/z* 161,0453, devido à perda neutra de uma molécula do monossacarídeo, adicionalmente o espectro desse dissacarídeo foi comparado com a literatura^{150,151}.

5.4.1.3 - **Ácidos benzoicos (3, 78 e 84)^f**

Devido ao padrão de fragmentação com perda de HCO₂ e CO₂ as substâncias **3**, **78** e **84** foram caracterizadas como derivados dos ácidos benzoicos como ácido protocatecuíco-hexosídeo(I)^{152,153}, ácido vanílico-160^{128,154} e ácido hidroxibenzoico (III). O ácido vanílico-160^{128,154} apresentou

^d Espectros na página 106.

^e Espectros na página 107.

^f Espectros nas páginas 100, 101 e 105.

perda neutra de 160 e perda de metila (15,0237). Adicionalmente, estes ácidos já foram relatados para gênero *Bauhinia*^{121,122}.

TABELA 5.8 - Dados de LC-HRMS dos buckets inferidos de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*.

Pico	Composto	t _R (min)	m/z Exp [M-H] ⁻	Erro (ppm)	FM [M-H] ⁻	CE (eV)	Ion Fragmento (%)
76	ácido quínico	0,42	191,0555	3,2	C ₇ H ₁₁ O ₆	20	191,0563 (100,0); 127,0400 (7,3); 173,0457 (3,8); 171,0295 (2,7); 111,0444 (2,3)
77	hexose-hexose	0,45	341,1077	3,8	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁	20	179,0564 (100,0); 341,1084 (94,9); 191,0564 (47,8); 161,0453 (42,4); 113,0241 (40,5)
3	ácido protocatecuico-hexosídeo (I)	0,49	315,0727	-1,8	C ₁₃ H ₁₅ O ₉	30	152,0116 (100,0); 108,0214 (80,1); 153,0184 (34,1); 109,0287 (33,6); 315,0723 (5,8)
78	ácido vanílico-160	1,23	327,1089	-1,0	C ₁₅ H ₁₅ O ₈	30	167,0352 (100,0); 108,0213 (96,2); 152,0115 (79,8); 123,0450 (74,1); 150,0555 (41,4)
79	(E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenal	1,34	147,0448	0,4	C ₉ H ₇ O ₂	20	147,0433 (100,0); 108,0206 (41,7); 146,0359 (39,6); 129,0323 (39,3); 119,0485 (37,1)
80	(E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenal-44	1,34	191,0347	0,3	C ₁₀ H ₇ O ₄	10	147,0434 (100,0); 119,0487 (23,3); 191,0324 (20,9); 193,0484 (19,3); 129,0330 (17,3); 149,0588 (15,3); 105,0331 (11,6); 148,0480 (9,9)
81	Ácido metoxicinâmico o,m ou p	1,61	177,0556	0,1	C ₁₀ H ₉ O ₃	10	177,0535 (100,0); 133,0641 (70,8); 178,0567 (8,9); 134,0683 (7,0); 131,0481 (4,2)
82	ácido cafeico (II)-(ácido di-hidroxicinâmico)	1,73	179,0353	-1,6	C ₉ H ₇ O ₄	20	135,0451 (100,0); 134,0371 (12,1); 136,0484 (8,5); 133,0295 (6,3); 179,0358 (3,6); 105,0341 (3,2); 107,0499 (1,3)
83	ácido clorogênico	1,86	353,0865	3,7	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	40	191,0569 (100,0); 135,0460 (7,3); 192,0605 (7,2); 127,0404 (3,6); 173,0458 (3,4)
84	ácido hidroxibenzoico (III)	2,09	137,0239	0,5	C ₇ H ₅ O ₃	30	136,0148 (100,0); 108,0200 (87,8); 137,0222 (39,1); 93,0334 (25,6); 109,0266 (12,3)
13	cumaroil-hexosídeo	2,71	325,0922	2,1	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	20	163,0405 (100,0); 119,0501 (28,8); 164,0436 (8,5); 120,0535 (2,8); 165,0459 (1,0)
85	(Epi)afzalequina (2-->7,4-->8)-(Epi)galocatequina	3,13	575,1189	1,0	C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂	20	303,0508 (100,0); 439,0663 (54,2); 285,0396 (29,3); 575,1193 (25,8); 245,0085 (16,9); 440,0691 (14,5)
86	ácido quínico-cumaroil	3,26	337,0921	2,5	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	30	191,0566 (100,0); 163,0403 (18,5); 173,0461 (12,0); 119,0503 (11,5); 192,0599 (6,5)
87	Dihidroxicumarina	3,5	177,0191	0,3	C ₉ H ₅ O ₄	30	133,0278 (100,0); 177,0176 (64,5); 149,0231 (54,7); 105,0330 (45,2); 121,0285 (35,5)
88	cumaroil-hexosídeo (II)	3,98	325,0923	0,6	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	20	119,0487 (100,0); 163,0379 (7,8); 120,051 (5,4); 327,0480 (4,1); 325,0886 (3,2)
89	cumaroil-186	4,17	349,1862	0,6	C ₁₆ H ₂₅ O ₈	20	163,0380 (100,0); 185,0195 (29,1); 119,0486 (23,7); 347,1135 (21,9); 164,0422 (8,0)
25	catequina	4,26	289,0717	0,3	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	30	123,0454 (100,0); 109,0294 (75,4); 151,0402 (48,3); 125,0247 (45,7); 203,0718 (44,1); 221,0826 (39,5)
90	catequina-deoxihexosídeo	6,01	435,224	-0,9	C ₂₀ H ₃₅ O ₁₀	20	125,0245 (100,0); 289,0719 (74,3); 435,2239 (68,4); 151,0399 (64,7); 389,2181 (62,1)
34	caempferol-hexose-deoxihexose	6,68	593,1503	1,5	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	30	285,0406 (100,0); 447,0919 (48,1); 446,0854 (41,3); 593,1514 (29,4); 431,0997 (13,5)
51	miricetina-pentose (II)	6,93	449,0725	0,1	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₂	40	316,0223 (100,0); 271,0243 (27,2); 317,0272 (22,7); 287,0193 (15,4); 270,0166 (8,3); 178,9982 (5,0)
31	catequina-galato	7,05	441,0817	2,4	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	30	169,0142 (100,0); 289,0717 (44,0); 125,0244 (27,5); 245,0817 (15,2); 170,0179 (7,7)
54	miricitrina	7,27	463,0877	1,0	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	50	271,0249 (100,0); 316,0228 (84,9); 287,0199 (64,6); 270,0171 (22,2); 259,0249 (21,1)
91	miricetina-215	7,27	531,0747	-4,7	C ₃₁ H ₁₅ O ₉	50	316,0224 (100,0); 317,0278 (27,9); 271,0242 (15,9); 287,0199 (7,9); 270,0170 (4,8)
32	(Epi)catequina- (Epi)catequina (II)	8	577,1342	1,7	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	20	289,0721 (100,0); 425,0886 (87,9); 577,1368 (61,4); 125,0246 (46,2); 407,0781 (39,9)
92	NCGC00384841	8,1	539,2138	-0,8	C ₂₆ H ₃₅ O ₁₂	30	491,1924 (100,0); 165,0556 (32,1); 492,1962 (24,9); 195,0656 (21,0); 343,1390 (20,6)
93	ácido azelaico (ácido nonanodióico)	8,17	187,098	-2,1	C ₉ H ₁₅ O ₄	20	125,0969 (100,0); 187,0978 (16,1); 169,0872 (10,7); 123,0816 (10,2); 126,1003 (8,5)
94	Vitexina	8,31	431,0982	0,3	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	30	311,0564 (100,0); 341,0669 (47,3); 312,0605 (20,7); 164,0116 (16,1); 283,0611 (12,3); 271,0612 (11,1); 269,0455(4,8); 353,0669(4,0)
95	metilquercetina-455	8,57	769,2195	0,2	C ₃₄ H ₄₁ O ₂₀	50	314,0433 (100,0); 315,0488 (33,3); 299,0198 (10,8); 316,0522 (4,7); 769,2211 (4,0)
96	metilquercetina-309	8,96	623,1612	0,8	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆	50	314,0432 (100,0); 299,0195 (53,8); 315,0482 (29,4); 300,0252 (15,9); 271,0244 (13,8)
41	caempferol-200	9,9	485,0697	-2,4	C ₁₈ H ₁₇ N ₂ O ₁₄	20	417,0834 (100,0); 285,0410 (22,5); 418,0866 (18,2); 286,0442 (4,2); 488,1210 (3,7)
97	caempferol-133	10	415,1963	1,1	C ₂₀ H ₃₁ O ₉	20	284,0324 (100,0); 285,0386 (31,5); 255,0301 (9,4); 417,0830 (9,2); 227,0338 (7,3)
98	metilquercetina-hexose-pentose	10,08	609,1485	-4,0	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	40	300,0280 (100,0); 315,0510 (96,4); 314,0436 (78,2); 299,0208 (45,9); 609,1480 (36,4); 301,0340 (34,8)
33	B8 - Juglanina (caempferol 3-O-arabinofuranosídeo)	10,39	417,0824	0,8	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₀	30	284,0326 (100,0); 285,0388 (42,9); 255,0298 (14,5); 417,0825 (9,1); 256,0364 (7,5)
99	7,4'-Dimetoxi-5-hidroxi flavanona-203	11,86	503,1556	0,6	C ₂₅ H ₂₇ O ₁₁	30	284,0692 (100,0); 299,0925 (56,4); 283,0614 (21,2); 269,0451 (16,3); 285,0726 (13,8); 241,0507(6,0)
75	Bauhiniastatina 2	14,87	299,0926	-0,4	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	30	225,0560 (100,0); 241,0509 (55,8); 197,0607 (36,0); 269,0459 (33,1); 210,0324 (16,2)

5.4.1.4 - Cinamaldeídos (79, 80)^g

Os cinamaldeídos, hidroxicinamaldeído ((E)-3- (4-Hidroxifenil)-2-propenal) (79) e hidroxicinamaldeído-44 ((E)-3-(4-Hidroxifenil)-2-propenal-44) (80) foram inferidos por comparação com padrões de fragmentação descritos na literatura que mostram os fragmentos 129,0332 (perda H₂O) e 119,0494 (perda de CO) ¹⁵⁵.

5.4.1.5 - Derivados do ácido cinâmico (81, 82, 88, 13, 89)^h

Compostos derivados do ácido cinâmico identificados foram ácido metoxicinâmico(81), ácido di-hidroxicinâmico ou ácido cafeico(82), cumaroil-glicose(88), cumaroil-hexosídeo(13) e cumaroil-186(89) todos esses compostos foram caracterizados devido à perda de CO₂(44) e por suas respectivas massas exatas ^{127,156,157}.

5.4.1.6 - Protoantocianidinas (32, 85)ⁱ

A identificação dos dímeros de proantocianidinas foram baseados no padrão de fragmentação descrito na caracterização da *B. longifolia* (seção 5.3.2). O pico(32) foi caracterizado como (epi)catequina-(epi)catequina (II) (procianidina tipo B) e pico(85) foi atribuído a (epi)afzelequina-(2→7,4→8)-(epi)galocatequina, protoantocianidina tipo A, devido a presença dos fragmentos 303,0508 e 439,0663 e sua massa exata (575,1195) similares (epi)afzelequina-(4→8)-(epi)galocatequina que apresenta massa exata (577,1351) e fragmentos (305,0667 e 441,0827, respectivamente) com diferença de 2Da ¹³¹.

5.4.1.7 - Catequina-galato (31)^j

O composto 31 (catequina-galato) mostrou os íons fragmentos similares ao flavan-3-ol da catequina, e adicionalmente apresentou perda de 146,1421 típico de deoxihexose, sendo identificados como catequina-deoxihexosídeo.

^g Espectros na página 105.

^h Espectros nas páginas 104, 111 e 115.

ⁱ Espectros nas páginas 103 e 104.

^j Espectros na página 110.

5.4.1.8 - Flavonoides e derivados (94, 99)^k

O espectro de massas do composto **94** (vitexina, flavonoide C-glicosilado) apresentou [M-H]⁻ de *m/z* 431,0958. A fragmentação da vitexina mostrou cinco íons produtos, três dos quais correspondem à fragmentação do anel de glicosídico: *m/z* 353, 341 e 311; outros dois eram do íon benzila *m/z* 283, íon aglicona *m/z* 269. Além disso, dois íons, com *m/z* 161 e *m/z* 117, originados por fragmentação via RDA, também foram identificados ¹⁵⁸. A aglicona de 7,4'-Dimetoxi-5-hidroxi-flavanona-203 (**99**) foi inferida comparando os fragmentos da aglicona com o da base de dados MassBank¹⁵⁹ sendo eles 299,0925, 284,0692 (perda de CH₃), 269,0451 (perda de CH₃), 241,0507 (perda de C₂H₇O₁).

5.4.1.9 - Outros compostos identificados^l

Os compostos **87** (diidroxycumarina), **92** (NCGC00384841 - glicosídeo de lignana), **93** (ácido azeláico/ácido nonanedióico - ácido graxo de cadeia média), apresentaram os seguintes íons moleculares desprotonado [M-H]⁻ 177,0191, 539,2138 e 187,098, respectivamente. Os íons fragmentos 149,0231, 133,0278 e 105,0330 foram identificados como característicos de diidroxycumarina(**87**)¹⁶⁰. NCGC00384841(**92**) apresentou os fragmentos 491,1924, 343,1390 e 165,0556¹⁶¹ e ácido azeláico apresentou o fragmento 125,0975 ¹⁶².

5.4.2 - Classificação quimiométrica

Os trinta e cinco (35) compostos identificados da tabela de características moleculares (TABELA 5.8) foram utilizados para a classificação das espécies através dos métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados, análise de cluster (HCA) e análise de componentes principais (PCA). Adicionalmente, na TABELA 5.9 é mostrado a presença e ausência dos 35 compostos nos extratos etanólico de folhas de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*.

^k Espectros nas páginas 108 a 134.

^l Espectros nas páginas 107 a 109.

TABELA 5.9 – Distribuição dos *buckets* inferidos de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*.

Pico	Composto	Tr (min)	M-H-	<i>B. forficata</i>	<i>B. variegata</i>	<i>B. longifolia</i>	<i>B. affinis</i>
76	ácido quínico	0,42	191,0555	X	X	X	
77	hexose-hexose	0,45	341,1077	X	X	X	X
3	ácido protocatecuíco-hexosídeo (I)	0,49	315,0727	X	X	X	X
78	ácido vanílico-160	1,23	327,1089		X		
79	(E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenal	1,34	147,0448				X
80	(E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenal-44	1,34	191,0347				X
81	Ácido metoxicinâmico	1,61	177,0556				X
82	Ácido cafeico (II) - (ácido di-hidroxicinâmico)	1,73	179,0353	X		X	
83	ácido clorogênico	1,86	353,0865			X	
84	ácido hidroxibenzoico (III)	2,09	137,0239				X
13	cumaroil-hexosídeo (epi)afzalequina (2-->7,4-->8)- (epi)galocatequina	2,71 3,13	325,0922 575,1189	X	X	X	X
85	(epi)galocatequina	3,13	575,1189		X		
86	ácido quínico-cumaroil	3,26	337,0921	X		X	
87	diidroxicumarina	3,5	177,0191				X
88	cumaroil-hexosídeo (II)	3,98	325,0923				X
89	cumaroil-186	4,17	349,1862	X			X
25	catequina	4,26	289,0717	X	X	X	
90	catequina-deoxihexosídeo	6,01	435,224	X	X		
34	caempferol-hexose-deoxihexose	6,68	593,1503		X		
51	miricetina-pentose (II)	6,93	449,0725		X		
31	catequina-galato	7,05	441,0817		X		
54	miricitrina	7,27	463,0877		X		
91	mirecetina-215	7,27	531,0747		X		
32	(epi)catequina-(epi)catequina (II)	8	577,1342		X		
92	NCGC00384841	8,1	539,2138		X		
93	ácido azeláico (ácido nonanodióico)	8,17	187,098	X	X	X	X
94	vitexina	8,31	431,0982	X		X	
95	metilquercetina-455	8,57	769,2195	X			
96	metilquercetina-309	8,96	623,1612	X			
41	caempferol-200	9,9	485,0697		X		
97	caempferol-133	10	415,1963	X			X
98	metilquercetina-hexose-pentose B8 - juglanina (caempferol 3-O- arabinofuranosídeo)	10,08 10,39	609,1485 417,0824	X		X	
33	7,4'-dimetoxi-5-hidroxi-flavanona-203	11,86	503,1556		X		
99	7,4'-dimetoxi-5-hidroxi-flavanona-203	11,86	503,1556		X		
75	bauhiniastatina 2	14,87	299,0926	X	X	X	X

No dendograma obtido com a HCA (FIGURA 5.12) foi possível ver quatro grandes grupos formados com base nas semelhanças existentes em relação às variáveis analisadas, indicando diferenças claras entre as espécies de *Bauhinia*.

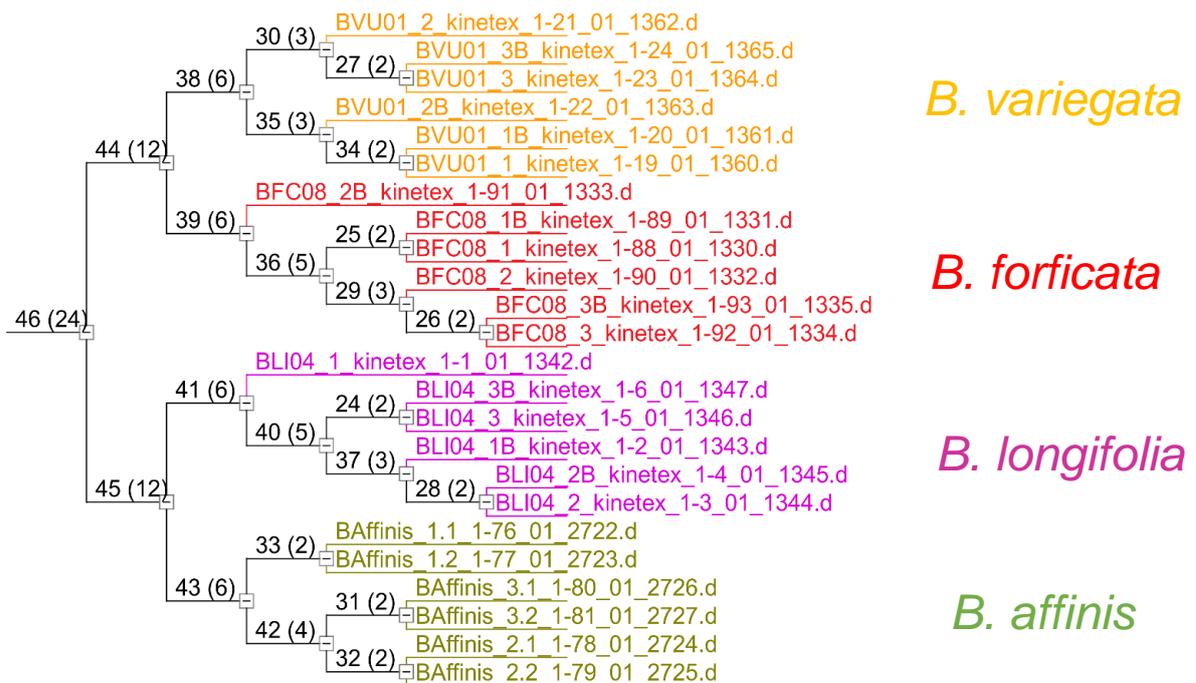


FIGURA 5.12- Dendrograma – Análise hierárquica de grupos das 4 espécies de *Bauhinia* estudadas.

Para obter uma melhor compreensão dos compostos que diferenciam os grupos, aplicou-se a PCA. O gráfico de variância explicada, obtido traçando-se a porcentagem da variância explicada por PC extraída, foi utilizado para identificar o número ideal de componentes principais (PCs) sendo o perfil da curva resultante usada para determinar o ponto de corte através da diminuição da declividade observada, que neste caso foi a terceira componente principal. Desta forma foram selecionados 3 PC's que explicaram 98,7% da variação total dos dados. Na FIGURA 5.13 verifica-se que a PC1 foi responsável por 80% da variância original dos dados, já a PC2 e PC3 corresponderam a 12,3 e 6%, respectivamente.

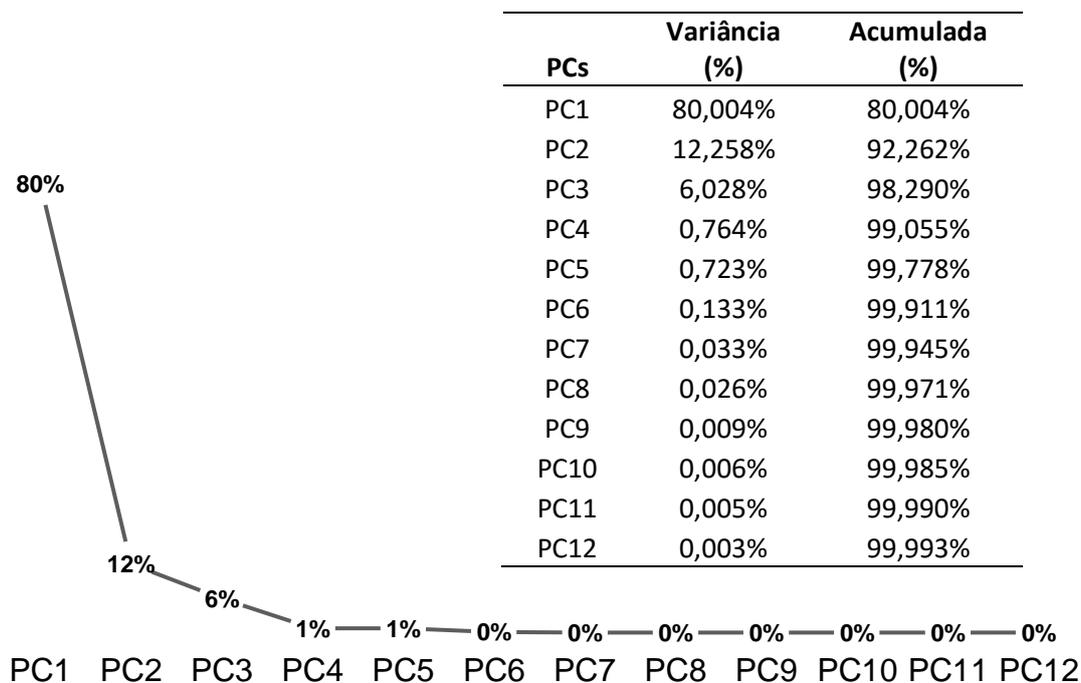


FIGURA 5.13 - Gráfico de variância explicada (%) para escolha de número de componentes principais utilizadas no tratamento dos dados de PCA.

As amostras de cada espécie foram agrupadas nos gráficos PC1 versus PC2 (gráfico de *scores*, FIGURA 5.14a) com separação entre as espécies *Bauhinia longifolia*, *affinis* e agrupamento entre a *Bauhinia forficata* e *variegata*. Na PC2 versus PC3 (gráfico de *scores*, FIGURA 5.14b) foi possível verificar a separação da *Bauhinia forficata*, *variegata* e *affinis*. Nos gráficos de *loadings* (FIGURA 5.14a e b) é possível ver os compostos que são responsáveis pelas distinções entre as espécies, dentro das condições estudadas neste trabalho.

Assim os metabólitos responsáveis pela diferenciação das espécies foram: i) *B. longifolia*: miricitrina (**54**), miricetina-pentose (II) (**51**), caempferol-200 (**41**), 7,4'-Dimetoxi-5-hidroxi-flavanona-203(**99**), (Epi)afzalequina (2-->7,4-->8) (Epi)galocatequina(**85**), mirecetina-215(**91**), catequina-galato(**31**), ácido vanílico-160(**78**), caempferol-hexose-deoxihexose(**34**), (Epi)catequina-(Epi)catequina-II(**32**), NCGC00384841(**92**) e Juglanin (caempferol 3-O-arabinofuranosídeo)(**33**). ii) *B. variegata*: ácido clorogênico(**83**), ácido quínico-cumaroil(**86**), cumaroil-hexosídeo(**13**), ácido protocatecuíco-hexosídeo-I(**3**), metilquercetina-hexose-pentose(**98**), vitexina(**94**), ácido azeláico(**93**), ácido di-hidroxicinâmico(**82**), ácido quínico (**76**), catequina(**17**) e hexose-hexose(**77**). iii) *B. forficata*: metilquercetina-309(**96**), catequina-deoxihexosídeo(**90**) e

metilquercetina-455(95). iv) *B. affinis*: ácido metoxicinâmico(81), (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenal(79), (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenal-44(80), ácido hidroxibenzoico-III(84), diidroxicumarina(87), cumaroil-hexosídeo-II(88), cumaroil-186(89) e caempferol-133(97).

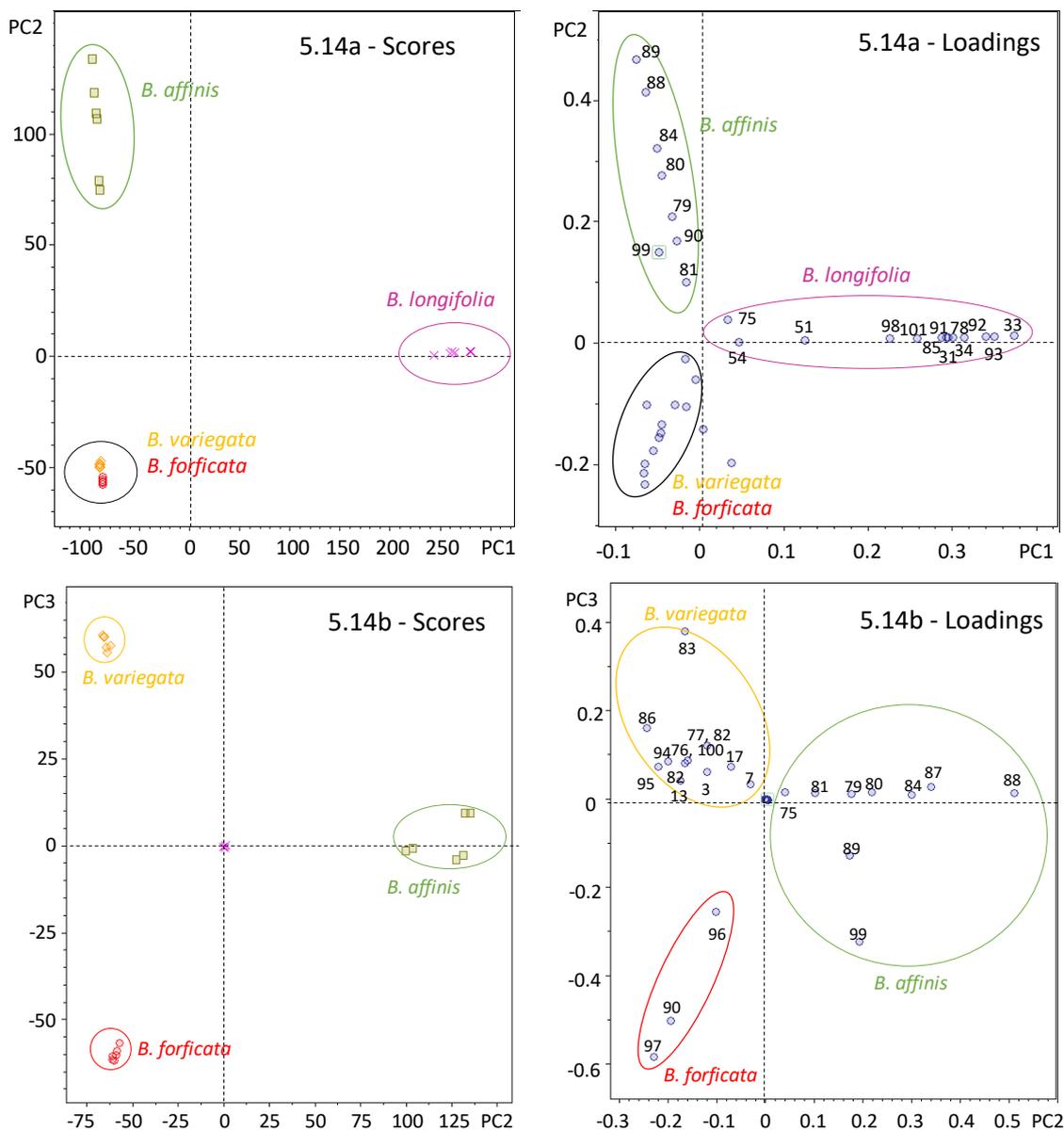


FIGURA 5.14 - Análise de componentes principais (PCA) com 35 compostos inferidos de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*. 5.14a(Scores e Loadings): PC1 versus PC2 e 5.14b(Scores e Loadings): PC2 versus PC3.

Desta forma, com os compostos inferidos por LC-MS foi possível diferenciar as 4 espécies de *Bauhinia* dentro das condições estudadas. Além disso, todos os 220 *buckets* calculados nesta análise também foram utilizados para

calcular a análise de componentes principais (FIGURA 5.15), e percebeu-se que há um melhor agrupamento das espécies ao considerá-los.

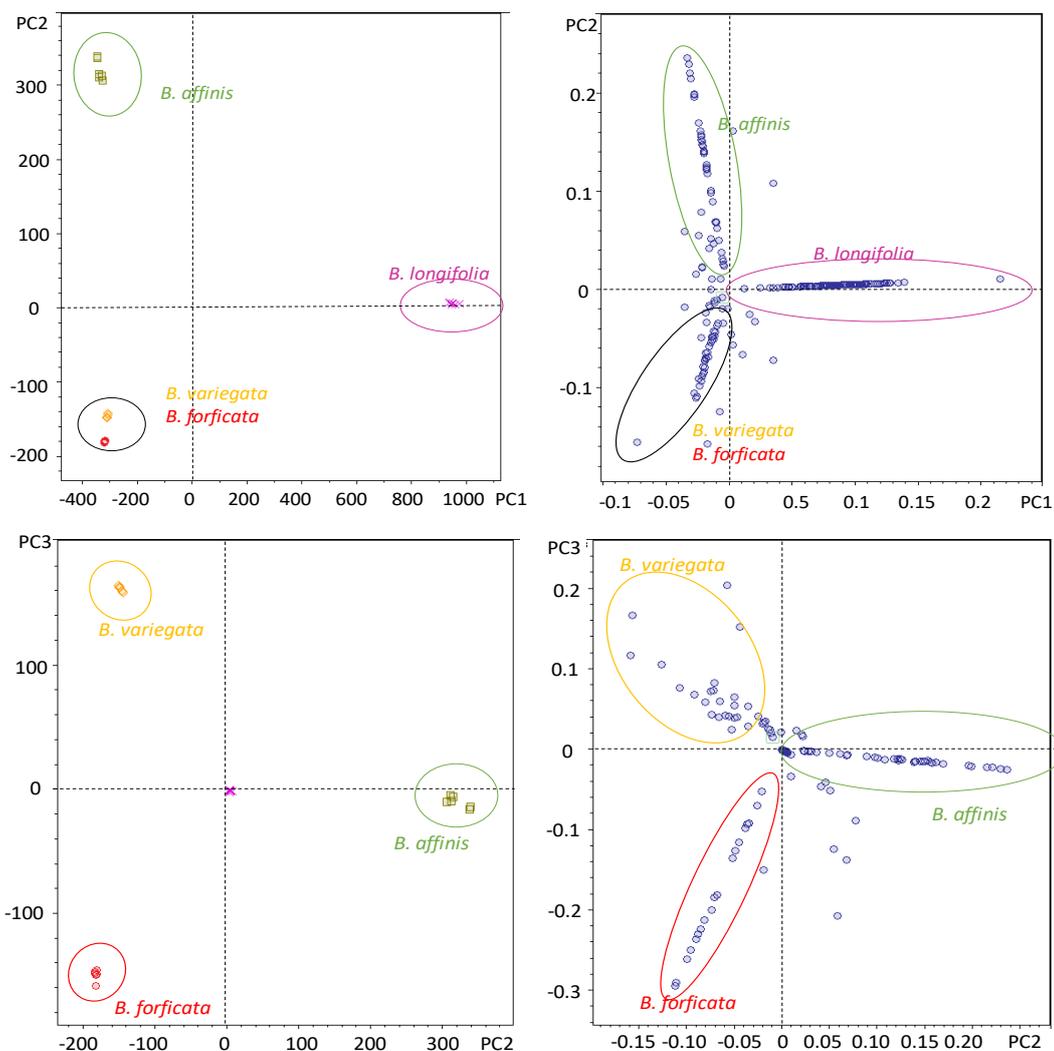


FIGURA 5.15- Análise de componentes principais (PCA) com 220 buckets de *B. forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*. 5.15a (Scores e Loadings): PC1 versus PC2 e 5.15b (Scores e Loadings): PC2 versus PC3.

Adicionalmente, extraindo o íon molecular desprotonado de m/z 577,1552[M-H]⁻ do cromatograma obtido com a coluna bifenil kinetex® (FIGURA 5.6) juntamente com seus adutos ([M-AF]⁻, [M-H₂O-H]⁻), clusteres ([2M-H]⁻, [3M-H]⁻, [2M+AF-H]⁻) (FIGURA 5.16) e analisando os fragmentos destes íons não foi possível inferir a presença da kaempferitrina, marcador químico da *Bauhinia forficata*¹⁶³. Os nossos dados corroboram com os encontrados por Ferreres et. al. (2012)³³ que em *B. forficata* Link subsp. pruinosa (Vogel) Fortunato & Wunderlin não encontrou esta substância. Bauhiniastatina 2 está presente em todas espécies estudadas neste trabalho (TABELA 5.9). Este composto foi

relatado em *B. púrpurea*, e suas propriedades medicinais está relacionada com atividade anticancerígenas, o que demonstra o potencial destas 4 espécies de *Bauhinia* para tal fim ¹⁴⁷.

Em todas as espécies foram identificadas uma ampla variedade de compostos fenólicos o que demonstra o potencial destas *Bauhinias* serem utilizadas para chás, no entanto até a presente data nenhum resultado de atividade biológica e toxicológica foram relatados para chás de *B. affinis* e poucos para os *B. longifolia* ^{37,38}, sendo necessários mais estudos para seu uso seguro.

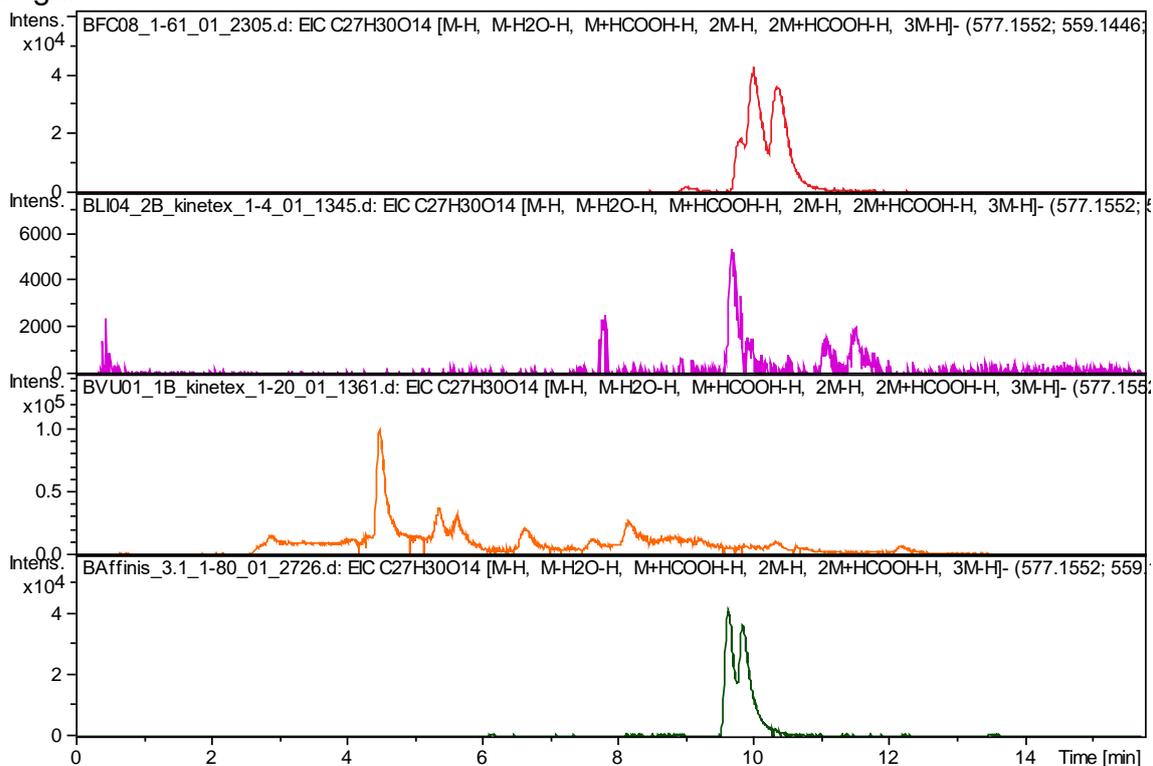


FIGURA 5.16 - Cromatograma do íon extraído (EIC) de Kaempferitrina (íon molecular desprotonado, adutos e clusteres).

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Os objetivos delineados para este trabalho foram todos atingidos. Neste contexto, *Bauhinia forficata* foi usada como modelo para o desenvolvimento do método cromatográfico utilizando planejamento estatístico. A condição cromatográfica desenvolvida associada ao uso da espectrometria de alta resolução possibilitou a identificação de 98 compostos entre as quatro espécies estudadas: *Bauhinia forficata*, *B. variegata*, *B. longifolia* e *B. affinis*.

Foram inferidos por LC-HRMS 74 metabólitos de folhas de *B. longifolia*. Além disso, foi isolado e identificado quatro compostos desconhecidos utilizando a técnica LC-SPE/NMR no modo fatiamento por tempo (*time slice*), sendo eles: miricitrina (**54**), juglanina (**40**), afzelina (**45**), *Bauhiniastatina 2* (**75**) e dois compostos conhecidos avicularina (**64**) e quercitrina (**68**).

Uma visão qualitativa geral foi obtida dos metabólitos presentes nas espécies *Bauhinia forficata*, *variegata*, *longifolia* e *affinis* em que foram identificados mais 24 compostos por LC-HRMS dentre eles ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, cinamaldeídos, protoantocianidina, catequina, flavonoides, cumarinas, lignana e derivado dioxaxepínico.

A diferenciação das quatro espécies estudadas foi obtida através da análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de grupos (HCA) usando 35 compostos da lista de características moleculares. O uso de todos os 220 *buckets* permitiu um melhor agrupamento das espécies.

Destarte, o trabalho aqui apresentado demonstrou de forma inequívoca que o uso de LC-HRMS associado a métodos quimiométricos não supervisionados é uma ferramenta poderosa para diferenciação de matrizes vegetais e pode ser usada em trabalhos de autenticação vegetal, demanda crescente no Brasil, principalmente nos últimos anos com o aumento expressivo da distribuição de fitoterápicos no SUS ¹⁶⁴.

REFERÊNCIAS

7 - REFERÊNCIAS

1. GUAN T-Y, LIANG Y, LI C-Z, XIE L, WANG G-J, SHENG L-S. "Recent Development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Allied Topics for Traditional Chinese Medicine Research". *Chin. J. Nat. Med.*,9 (5): 385, 2011.
2. HEINRICH, M.; ANAGNOSTOU, S. "From Pharmacognosia to DNA-Based Medicinal Plant Authentication – Pharmacognosy through the Centuries". *Planta Med.*,83 (14/15): 1110, 2017.
3. ANVISA. Farmacopéia brasileira. 5° ed.; 2010.
4. HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. "The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era". *Nat. Rev. Drug Discov.*,14 (2): 111, 2015.
5. WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, LAURA M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-NAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W-T.; CRÜSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C-C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTHEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELSBAK, L.; SOHLENKAMP, C.; PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C-C.; YANG, Y-L.; HUMPF, H-U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA P., CRISTOPHER A.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; O'NEILL, E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.; TRAXLER, M. F.; ENGINE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRÍGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P-M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L-F.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J-L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PERVEA, T.; NGUYEN, D-T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MÜLLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W.; LIU, X.; ZHANG, L.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B. Ø.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIÉRREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. "Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking". *Nat. Biotechnol.*,34 (8): 828, 2016.
6. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014". *J. Nat. Prod.*,79 (3): 629, 2016.
7. FELICIO, M. G. V. "Taxol - Química nova interativa". 2010. Disponível em:

- <http://qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=dqfxTPkXV778XYbxsf-pyXzVueq-0EAQnH8sYXb5TdVk4UyEud9a-dYZt7K392r0OuskewW0fz1uRaS2nf4rdQ==>. Acesso em: 8/4/2018.
8. THE NOBEL FOUNDATION. "Youyou Tu - Biographical". Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2015/tu-bio.html>. Acesso em: 13/4/2018.
 9. DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. "The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends". *Phytochem. Rev.*, 14 (2): 299, 2015.
 10. ZHU, C.; ZENG, Q.; MCMICHAEL, A.; EBI, K. L.; NI, K.; KHAN, A. S.; ZHU, J.; LIU, G.; ZHANG, X.; CHENG, L.; ZISKA, L. H. "Historical and experimental evidence for enhanced concentration of artemisinin, a global anti-malarial treatment, with recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide". *Clim. Change*, 132 (2): 295, 2015.
 11. MIOTO, R. "País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos". , 2010. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/ciencia/746386-pais-deixa-de-gerar-us-5-bi-por-ano-com-fitoterapicos.shtml>>. Acesso em: 19/2/2018.
 12. WHO. WHO traditional medicine strategy: 2014-2023. World Health Organization, 2015.
 13. PARREIRAS, M. "Mais de 180 cidades de Minas continuam a devastar a Mata Atlântica - Gerais - Estado de Minas". Disponível em: <https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2018/01/08/interna_gerais,929347/mais-de-180-cidades-de-minas-continuam-a-devastar-a-mata-atlantica.shtml>. Acesso em: 26/4/2018.
 14. PLANTZ, K. "Dados de satélite indicam que desmatamento está acelerando". Disponível em: <<https://exame.abril.com.br/tecnologia/dados-de-satelite-indicam-que-desmatamento-esta-acelerando/>>. Acesso em: 26/4/2018.
 15. BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde". 2012.
 16. PORTAL BRASIL. "População teve acesso a 1,4 bi de consultas médicas pelo SUS em um ano — Governo do Brasil". Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/06/populacao-teve-acesso-a-1-4-bi-de-consultas-medicas-pelo-sus-em-um-ano>>. Acesso em: 30/3/2018.
 17. MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Mais 10 práticas integrativas são inseridas na PNPIC". Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/portaldab/noticias.php?conteudo=_&cod=2872>. Acesso em: 30/3/2018.
 18. BRASIL - AGÊNCIA SAÚDE. "Ministério da Saúde (MS) elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS". , 2009. Disponível em: <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 19/2/2018.
 19. HENRIQUE DOMINGOS, A.; CAPELLARI JÚNIOR, L. "Plantas medicinais: patas-de-vaca". Piracicaba ESALQ - Div. Bibl., 29, 2016. Piracicaba. Disponível em: <<http://www4.esalq.usp.br/biblioteca/sites/www4.esalq.usp.br/biblioteca/files/publicacoes-a-venda/pdf/SPR60.pdf>>. Acesso em: 2/11/2017.
 20. QUATTROCCHI, U. CRC world dictionary of medicinal and poisonous

- plants : common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology. CRC, Taylor & Francis Group, 2012.
21. "*Bauhinia scandens* | renatapasqua". Disponível em: <<https://renatapasqua.wordpress.com/2011/12/09/bauhinia-scandens/>>. Acesso em: 2/11/2017.
 22. "Viveiro Ciprest - Plantas Nativas e Exóticas: Bauhinia Vermelha Galpini (*Bauhinia galpinii*)". Disponível em: <<http://ciprest.blogspot.com.br/2017/03/bauhinia-vermelha-galpini-bauhinia.html>>. Acesso em: 2/11/2017.
 23. "*Bauhinia forficata* Images - Useful Tropical Plants". Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/image.php?id=Bauhinia+forficata>>. Acesso em: 25/7/2018.
 24. VAZ, A. M. S. DA F. "Checklist of *Bauhinia* sensu stricto (Caesalpinaceae) in Brazil". *Plant Ecol. Evol.*, 143 (2): 212, 2010.
 25. VAZ, A. M. S. DA F.; LEWIS, G. P.; LEWIS, G. P. "Four new species of *Bauhinia* sect. *Pauletia* and a new description of *Bauhinia burchellii* Benth (Leguminosae) from Brazil". *Phytotaxa*, 239 (3): 264, 2015.
 26. SILVA, K. L. DA; CECHINEL FILHO, V. "Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico". *Quim. Nova.*, 25 (3): 449, 2002. SBQ.
 27. Re flora. Herbário Virtual. 2018. <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/>. Accessed July 25, 2018.
 28. NOGUEIRA, A. C. O.; SABINO, C. V. S. "Revisão do gênero *Bauhinia* abordando aspectos científicos das espécies *Bauhinia forficata* link e *Bauhinia Variegata* L. de interesse para a indústria farmacêutica.". *Rev. Fitos*, 7 77, 2012.
 29. *Bauhinia longifolia*; 2018. <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/BemVindoConsultaPublicaHVConsultar.do?modoConsulta=LISTAGEM&quantidadeResultado=20&genero=bauhinia&especie=longifolia>. Acesso em: 02/11/2017.
 30. "*Bauhinia affinis* - Flora de Santa Catarina". Disponível em: <<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/fabaceae/bauhinia-affinis>>. Acesso em: 29/3/2018.
 31. DE SOUZA, B. V. C.; MOREIRA ARAÚJO, R. S. D. R.; SILVA, O. A.; FAUSTINO, L. C.; GONÇALVES, M. F. B.; DOS SANTOS, M. L.; SOUZA, G. R.; ROCHA, L. M.; CARDOSO, M. L. S.; NUNES, L. C. C. "*Bauhinia forficata* in the treatment of diabetes mellitus: a patent review.". *Expert Opin. Ther. Pat.*, 28 (2): 129, 2018.
 32. DA CUNHA, A. M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A. G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M. W. "Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link". *Phytomedicine*, 17 (1): 37, 2010.
 33. 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.
 34. FILHO, V. C. "Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*". *Phyther. Res.*, 23 (10): 1347, 2009.
 35. JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E. DE; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. "Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on

- 14C-glucose uptake in rat soleus muscle". *Chem. Biol. Interact.*,149 (2–3): 89, 2004.
36. PEPATO, M. T.; KELLER, E. H.; BAVIERA, A. M.; KETTELHUT, I. C.; VENDRAMINI, R. C.; BRUNETTI, I. L. "Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats.". *J. Ethnopharmacol.*,81 (2): 191, 2002.
 37. ERNESTINA, A.; SANTOS, D.; BARRETO JUNIOR, C. B.; KUSTER, R. M. "Flavonoides e Atividade Antioxidante das Folhas de *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud". *Rev. Virtual Química*,9 (3): , 2017.
 38. DOS SANTOS, A. E.; KUSTER, R. M.; YAMAMOTO, K. A.; SALLES, T. S.; CAMPOS, R.; DE MENESES, M. D.; SOARES, M. R.; FERREIRA, D. "Quercetin and quercetin 3-O-glycosides from *Bauhinia longifolia* (Bong.) Steud. show anti-Mayaro virus activity". *Parasit. Vectors*,7 (1): 130, 2014.
 39. DUARTE-ALMEIDA, J.; NEGRI, G.; SALATINO, A. "Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae)". *Biochem. Syst. Ecol.*,32 (8): 747, 2004.
 40. FARAG, M. A.; SAKNA, S. T.; EL-FIKY, N. M.; SHABANA, M. M.; WESSJOHANN, L. A. "Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia L.* species from Egypt using UHPLC–PDA–qTOF-MS and chemometrics". *Phytochemistry*,119 41, 2015.
 41. SILVA, C. M. S. DA; HABERMANN, G.; MARCHI, M. R. R.; ZOCOLO, G. J. "The role of matrix effects on the quantification of abscisic acid and its metabolites in the leaves of *Bauhinia variegata L.* using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry". *Brazilian J. Plant Physiol.*,24 (3): 223, 2012.
 42. SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. "O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais". *Rev. Bras. Farmacogn.*,20 (3): 435, 2010.
 43. LI, S. P.; ZHAO, J.; YANG, B. "Strategies for quality control of Chinese medicines". *J. Pharm. Biomed. Anal.*,55 (4): 802, 2011.
 44. SIMÕES, C. M. O. *Farmacognosia : da planta ao medicamento*. Editora da UFSC, 2007.
 45. 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.
 46. DÍAZ-DE-CERIO, E.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. "Determination of guava (*Psidium guajava L.*) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS". *J. Funct. Foods*, **22** 376, 2016.
 47. ZHANG, X.; LV, H.; LI, Z.; JIANG, K.; LEE, M.-R. "HPLC/QTOF-MS/MS application to investigate phenolic constituents from *Ficus pandurata H.* aerial roots". *Biomed. Chromatogr.*,29 (6): 860, 2015.
 48. KUMAR, S.; SINGH, A.; KUMAR, B. "Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS". *J. Pharm. Anal.*,7 (4): 214, 2017.
 49. 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.

50. SOUZA, O. A.; CARNEIRO, R. L.; VIEIRA, T. H. M.; FUNARI, C. S.; RINALDO, D. "Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by Means of a Green Statistically Developed HPLC-PAD Method". *Food Anal. Methods*,1, 2018.
51. 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*,871 (2): 261, 2008.
52. MARK P. STYCZYNSKI; JOEL F. MOXLEY; LILY V. TONG; JASON L. WALTHER; KYLE L. JENSEN, AND; STEPHANOPOULOS*, G. N. "Systematic Identification of Conserved Metabolites in GC/MS Data for Metabolomics and Biomarker Discovery". 2006.
53. BONZANINI, F.; BRUNI, R.; PALLA, G.; SERLATAITE, N.; CALIGIANI, A. "Identification and distribution of lignans in *Punica granatum* L. fruit endocarp, pulp, seeds, wood knots and commercial juices by GC–MS". *Food Chem.*,117 (4): 745, 2009.
54. TORRAS-CLAVERIA, L.; BERKOV S.; JÁUREGUI, O.; CAUJAPÉ, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C.; BASTIDA J. "Metabolic profiling of bioactive *Pancreatium canariense* extracts by GC-MS". *Phytochem. Anal.*,21 (1): 80, 2010.
55. HAMED, A. I.; AL-AYED, A. S.; MOLDOCH, J.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. "Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun*-an ancient *Egyptian palm*) by LC-ESI-MS/MS". *J. Mass Spectrom.*,49 (4): 306, 2014.
56. ZHANG, T.; OMAR, R.; SIHERI, W.; AL MUTAIRI, S.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; EDRADA-EBEL, R.; WATSON, D. "Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of *African propolis*". *Talanta*,**120** 181, 2014.
57. KIRKLAND, J. J.; SNYDER, L. R. "Basic concepts and the control of separation". *Introduction to Mod. Liq. Chromatogr.* 3^o ed, p.19–80, 2010a.
58. FEKETE, S.; SADAT-NOORBAKHS, V.; SCHELLING, C.; MOLNÁR, I.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. "Implementation of a generic liquid chromatographic method development workflow: Application to the analysis of phytocannabinoids and *Cannabis sativa* extracts". *J. Pharm. Biomed. Anal.*,**155** 116, 2018.
59. FEKETE, S.; BECK, A.; FEKETE, J.; GUILLARME, D. "Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: Salt gradient approach". *J. Pharm. Biomed. Anal.*,**102** 33, 2015.
60. MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. "O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência". *Quim. Nova*,32 (1): 214, 2009.
61. FEKETE, S.; OLÁH, E.; FEKETE, J. "Fast liquid chromatography: The domination of core–shell and very fine particles". *J. Chromatogr. A*,**1228** 57, 2012.
62. WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. "Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts". *J. Chromatogr. A*,**1382** 136, 2015.
63. WOLFENDER, J.-L. "HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue". *Planta Med.*,75 (07): 719, 2009.
64. WU, H.; GUO, J.; CHEN, S.; LIU, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; XU, X.

- "Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **72** 267, 2013.
65. GU, W.-Y.; LI, N.; LEUNG, E. L.-H.; ZHOU, H.; YAO, X.-J.; LIU, L.; WU, J.-L. "Rapid identification of new minor chemical constituents from *Smilacis Glabrae Rhizoma* by combined use of UHPLC-Q-TOF-MS, preparative HPLC and UHPLC-SPE-NMR-MS techniques". *Phytochem. Anal.*, **26** (6): 428, 2015.
 66. CAKOVA, V.; URBAIN, A.; ANTHEAUME, C.; RIMLINGER, N.; WEHRUNG, P.; BONTÉ, F.; LOBSTEIN, A. "Identification of Phenanthrene Derivatives in *Aerides rosea* (Orchidaceae) Using the Combined Systems HPLC-ESI-HRMS/MS and HPLC-DAD-MS-SPE-UV-NMR". *Phytochem. Anal.*, **26** (1): 34, 2015.
 67. KLEIN-JÚNIOR, L. C.; VIAENE, J.; TUENTER, E.; SALTON, J.; GASPER, A. L.; APERS, S.; ANDRIES, J. P. M.; PIETERS, L.; HENRIQUES, A. T.; VANDER HEYDEN, Y. "The use of chemometrics to study multifunctional indole alkaloids from *Psychotria nemorosa* (*Palicourea comb. nov.*). Part II: Indication of peaks related to the inhibition of butyrylcholinesterase and monoamine oxidase-A". *J. Chromatogr. A*, **1463** 71, 2016.
 68. GANZERA, M.; STURM, S. "Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **147** 211, 2018.
 69. STEINMANN, D.; GANZERA, M. "Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **55** (4): 744, 2011.
 70. CARDOSO, J. DE O.; OLIVEIRA, R. V. "LC - MS/MS: fundamentos, vantagens e problemas do acoplamento". *Cromatogr. líquida Novas tendências e Apl.* 1º ed, p.58–88, 2015.
 71. GATES, P. J. "Electrospray mass spectrometry: Some tricks and tools for structural characterisation of natural products". *Eur. Pharm. Rev.*, **19** (2): 29, 2014.
 72. OLIVEIRA, R. V.; SILVA, B. F. DA. "Analisadores de massas de alta resolução". *Cromatogr. líquida Novas tendências e Apl.* p.93–122, 2015.
 73. GLAUSER, G.; VEYRAT, N.; ROCHAT, B.; WOLFENDER, J.-L.; TURLINGS, T. C. J. "Ultra-high pressure liquid chromatography–mass spectrometry for plant metabolomics: A systematic comparison of high-resolution quadrupole-time-of-flight and single stage Orbitrap mass spectrometers". *J. Chromatogr. A*, **1292** 151, 2013.
 74. 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.
 75. WANG, Y.; HE, S.; CHENG, X.; LU, Y.; ZOU, Y.; ZHANG, Q. "UPLC–Q-TOF-MS/MS fingerprinting of Traditional Chinese Formula SiJunZiTang". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **80** 24, 2013.
 76. XU, M.; HEIDMARSSON, S.; THORSTEINSDOTTIR, M.; KREUZER, M.; HAWKINS, J.; OMARSDOTTIR, S.; OLAFSDOTTIR, E. S. "Authentication of Iceland Moss (*Cetraria islandica*) by UPLC-QToF-MS chemical profiling and DNA barcoding". *Food Chem.*, **245** 989, 2018.

77. CHANG, X.; ZHANG, J.; LI, D.; ZHOU, D.; ZHANG, Y.; WANG, J.; HU, B.; JU, A.; YE, Z. "Nontargeted metabolomics approach for the differentiation of cultivation ages of mountain cultivated ginseng leaves using UHPLC/QTOF-MS". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **141** 108, 2017.
78. DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. "Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products.". *Nat. Prod. Rep.*, **33** (3): 432, 2016.
79. JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; GABALDÓN-HERNÁNDEZ, J. A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. "RP-HPLC–ESI–QTOF/MS2 based strategy for the comprehensive metabolite profiling of *Sclerocarya birrea* (marula) bark". *Ind. Crops Prod.*, **71** 214, 2015.
80. ZHAO, L.; YU, M.; SUN, M.; XUE, X.; WANG, T.; CAO, W.; SUN, L. "Rapid Determination of Major Compounds in the Ethanol Extract of Geopropolis from Malaysian Stingless Bees, *Heterotrigona itama*, by UHPLC-Q-TOF/MS and NMR". *Molecules*, **22** (11): 1935, 2017.
81. MALONGANE, F.; MCGAW, L. J.; NYONI, H.; MUDAU, F. N. "Metabolic profiling of four South African herbal teas using high resolution liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance". *Food Chem.*, **257** 90, 2018.
82. ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. "HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits". *Food Chem.*, **166** 179, 2015.
83. MOLINA-CALLE, M.; PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. "Characterization of Stevia leaves by LC–QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts". *Food Chem.*, **219** 329, 2017.
84. DÍAZ-DE-CERIO, E.; AGUILERA-SAEZ, L. M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; FERNÁNDEZ, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D. "Characterization of bioactive compounds of *Annona cherimola* L. leaves using a combined approach based on HPLC-ESI-TOF-MS and NMR". *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018.
85. SPRENGER, R. F.; THOMASI, S. S.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; BATISTA JUNIOR, J. M. "Solution-state conformations of natural products from chiroptical spectroscopy: the case of isocorilagin". *Org. Biomol. Chem.*, **14** (13): 3369, 2016.
86. AVULA, B.; WANG, Y.-H.; SMILLIE, T. J.; MABUSELA, W.; VINCENT, L.; WEITZ, F.; KHAN, I. A. "Comparison of LC–UV, LC–ELSD and LC–MS Methods for the Determination of Sesquiterpenoids in Various Species of *Artemisia*". *Chromatographia*, **70** (5–6): 797, 2009.
87. 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.
88. KLOSS, L. C.; ALBINO, A. M.; GUTIERREZ DE SOUZA, R.; LIMA, R. A. "Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE)". . Disponível em: <<http://repositorio.saolucas.edu.br:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1635/Laura Cristina Kloss - Identificação de classes de metabólitos>>

- secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. %28Piperaceae%29 .pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 18/5/2018.
89. GUO, H.; ZHANG, Z.; YAO, Y.; LIU, J.; CHANG, R.; LIU, Z.; HAO, H.; HUANG, T.; WEN, J.; ZHOU, T. "A new strategy for statistical analysis-based fingerprint establishment: Application to quality assessment of *Semen sojae praeparatum*". *Food Chem.*,258 189, 2018.
 90. BEISKEN, S.; EIDEN, M.; SALEK, R. M. "Getting the right answers: understanding metabolomics challenges". *Expert Rev. Mol. Diagn.*,15 (1): 97, 2015.
 91. MASIKE, K.; MHLONGO, M. I.; MUDAU, S. P.; NOBELA, O.; NCUBE, E. N.; TUGIZIMANA, F.; GEORGE, M. J.; MADALA, N. E. "Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids.". *Chem. Cent. J.*,11 (1): 29, 2017.
 92. SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; TASSOTTI, M.; DEL RIO, D.; HERNÁNDEZ, F.; MARTÍNEZ, J. J.; MENA, P. "(Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC–MS approach". *Food Chem.*,**212** 250, 2016.
 93. SENDKER, J.; ELLENDORFF, T.; HÖLZENBEIN, A. "Occurrence of Benzoic Acid Esters as Putative Catabolites of Prunasin in Senescent Leaves of *Prunus laurocerasus*". *J. Nat. Prod.*,79 (7): 1724, 2016.
 94. VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C. J.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. J. "Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data.". *BMC Genomics*,**7** 142, 2006.
 95. TUGIZIMANA, F.; STEENKAMP, P.; PIATER, L.; DUBERY, I. "A Conversation on Data Mining Strategies in LC-MS Untargeted Metabolomics: Pre-Processing and Pre-Treatment Steps". *Metabolites*,6 (4): 40, 2016.
 96. NETO, J. M. M. "Estatística multivariada Uma visão didática-metodológica". *Filos. da ciência*,1, 2004.
 97. CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. "Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos". *Quim. Nov.*,30 (2): 481, 2007.
 98. DRAISMA, H. H. M.; REIJMERS, T. H.; MEULMAN, J. J.; VAN DER GREEF, J.; HANKEMEIER, T.; BOOMSMA, D. I. "Hierarchical clustering analysis of blood plasma lipidomics profiles from mono- and dizygotic twin families.". *Eur. J. Hum. Genet.*,21 (1): 95, 2013.
 99. BORGATTI, S. P. "How to Explain Hierarchical Clustering". Disponível em: <<http://www.analytictech.com/networks/hiclus.htm>>. Acesso em: 7/5/2018.
 100. MARTINS, L. R. R.; PEREIRA-FILHO, E. R.; CARNEIRO, R. L. "Análise multivariada de dados cromatográficos: conceitos e aplicações". *Cromatogr. líquida Novas tendências e Apl.* 1º ed, p.225–248, 2015.
 101. JAROSZEWSKI, J. W. "Hyphenated NMR Methods in Natural Products Research, Part 1: Direct Hyphenation". *Planta Med.*,71 (8): 691, 2005.
 102. 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, 2003.
103. 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.
 104. MORAES, V. R. S.; THOMASI, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M. J.; CRUZ, E. M. O.; CASS, Q. B.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F. "Secondary Metabolites from an Infusion of *Lippia gracilis Schauer* Using the LC-DAD-SPE/NMR Hyphenation Technique". *J. Braz. Chem. Soc*, **28** (7): 1335, 2017.
 105. EVERETT, J. R. "Drug discovery and development: The role of NMR". *NMR Pharm. Sci.* p.1–20, 2015.
 106. CARVALHO, V. A. P. Caracterização química por cromatografia líquida e análise quimiométrica de espécies vegetais de Bauhinia com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de pata-de-vaca, 27. jul. 2011. Universidade Federal de São Carlos.
 107. VAZ, A. M. F. "Notas sobre a determinação B. affinis". , 2017. Disponível em: <<http://jabot.jbrj.gov.br/v2/ficha.php?chtestemunho=1322324>>. Acesso em: 5/5/2018
 108. COUTO, A. B.; RAMOS, A.; TADEU, É.; CAVALHEIRO, G. "Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química". *Quim. Nov.*, **21** (2): , 1998.
 109. KIRKLAND, J. J.; SNYDER, L. R. "Gradient elution". *Introduction to Mod. Liq. Chromatogr.* 3^o ed, p.403–474, 2010b.
 110. SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. *High-performance gradient elution : the practical application of the linear-solvent-strength model.* Wiley-Interscience, 2007.
 111. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography.* 3^o ed. WILEY, 2010.
 112. SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. "Optimizing selectivity during reversed-phase high performance liquid chromatography method development: Prioritizing experimental conditions". *J. Chromatogr. A*, **1302** 45, 2013.
 113. CASS, Q. B. "Ortogonalidade no modo reverso de eluição". *Cromatogr. líquida Novas tendências e Apl.* 1^o ed, p.1–17, 2015.
 114. USP. "PQRI Approach for Selecting Columns of Equivalent Selectivity | USP". Disponível em: <<http://www.usp.org/resources/pqri-approach-column-equiv-tool>>. Acesso em: 5/5/2018.
 115. SNYDER, L. R. "A New Look at the Selectivity of RPC Columns". *Anal. Chem.*, **79** (9): 3254, 2007.
 116. DOLAN, J. W.; MAULE, A.; BINGLEY, D.; WRISLEY, L.; CHAN, C. C.; ANGOD, M.; LUNTE, C.; KRISKO, R.; WINSTON, J. M.; HOMEIER, B. A.; MCCALLEY, D. V.; SNYDER, L. R. "Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure". *J. Chromatogr. A*, **1057** (1–2): 59, 2004.
 117. SNYDER, L. R.; CARR, P. W.; RUTAN, S. C. "Solvatochromically based solvent-selectivity triangle". *J. Chromatogr. A*, **656** (1–2): 537, 1993.
 118. NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. "Como variar tudo ao mesmo tempo". *Como fazer Exp.* 4^o ed, p.99–141, 2010. Bookman.
 119. KAKAZU, Y.; HORAI, H. "Syringic acid Mass Spectrum". Disponível em:

- <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=KO001814&dsn=Keio>>. Acesso em: 20/2/2018.
120. LIU, M.; DONG, J.; LIN, Z.; NIU, Y.; ZHANG, X.; JIANG, H.; GUO, N.; LI, W.; WANG, H.; CHEN, S. "Rapid screening of transferrin-binders in the flowers of *Bauhinia blakeana* Dunn by on-line high-performance liquid chromatography–diode-array detector–electrospray ionization–ion-trap–time-of-flight–mass spectrometry–transferrin–fluorescence detection system". *J. Chromatogr. A*, **1450** 17, 2016.
 121. COMPAORÉ, M.; LAMIEN, C. E.; LAMIEN-MEDA, A.; VLASE, L.; KIENDREBEOGO, M.; IONESCU, C.; NACOUKMA, O. G. "Antioxidant, xanthine oxidase and lipoxygenase inhibitory activities and phenolics of *Bauhinia rufescens* Lam. (Caesalpiniaceae)". *Nat. Prod. Res.*, **26** (11): 1069, 2012.
 122. NAGESHWAR, G.; ANURADHA, S. M. J.; RADHAKRISHNAIAH, M.; NARAYANA, L. L. "Distribution pattern of phenolic constituents in species of *Bauhinia* Linn. and its taxonomic significance". *Proc. Plant Sci.*, **96** (1): 1, 1986.
 123. SASHIDHARA, K. V.; SINGH, S. P.; SRIVASTAVA, A.; PURI, A. "Main extracts and hypolipidemic effects of the *Bauhinia racemosa* Lam. leaf extract in HFD-fed hamsters". *Nat. Prod. Res.*, **27** (12): 1127, 2013.
 124. SHANG, X.; LI, S.; WANG, Y.; WANG, S.; YANG, Y.; SHI, J. "[Chemical constituents of *Bauhinia aurea*]". *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **31** (23): 1953, 2006.
 125. MATSUDA, F.; SUZUKI, M.; SAWADA, Y. "4-Hydroxybenzoic acid Mass Spectrum". Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=PR100596&dsn=RIKEN>>. Acesso em: 20/2/2018a.
 126. KAKAZU, Y.; HORAI, H. "Gallic acid Mass Spectrum". Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=KO000889&dsn=Keio>>. Acesso em: 20/2/2018
 127. MATSUDA, F. "Caffeic acid Mass Spectrum". Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=KO000513&dsn=Keio>>. Acesso em: 20/2/2018.
 128. BEISKEN, S.; EARLL, M.; BAXTER, C.; PORTWOOD, D.; AMENT, Z.; KENDE, A.; HODGMAN, C.; SEYMOUR, G.; SMITH, R.; FRASER, P.; SEYMOUR, M.; SALEK, R. M.; STEINBECK, C. "Metabolic differences in ripening of *Solanum lycopersicum* 'Ailsa Craig' and three monogenic mutants". *Sci. Data*, **1** 140029, 2014.
 129. MATSUDA, F.; SUZUKI, M.; SAWADA, Y. "2-Coumaric acid Mass Spectrum". Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=KO000442&dsn=Keio>>. Acesso em: 20/2/2018b.
 130. VILLAVICENCIO, A. L. C. H.; HELENO, S. A.; CALHELHA, R. C.; SANTOS-BUELGA, C.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. "The influence of electron beam radiation in the nutritional value, chemical composition and bioactivities of edible flowers of *Bauhinia variegata* L. var. *candida alba* Buch.-Ham from Brazil". *Food Chem.*, **241** 163, 2018.
 131. LI, H.-J.; DEINZER, M. L.; AND, H.-J. L.; DEINZER*, M. L. "Tandem Mass Spectrometry for Sequencing Proanthocyanidins". *Anal. Chem.*, **79** (4): 1739, 2007.

132. BOETTCHER, C. "Catechin Mass Spectrum". Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=PB002430&ds n=IPB>>. Acesso em: 27/2/2018.
133. DRUGBANK. "Epigallocatechin MS/MS Spectrum - ESI-TOF 20V, Negative (DB03823) - DrugBank". Disponível em: <https://www.drugbank.ca/spectra/ms_ms/374093>. Acesso em: 27/2/2018.
134. MIKETOVA, P.; SCHRAM, K. H.; WHITNEY, J.; LI, M.; HUANG, R.; KERNS, E.; VALCIC, S.; TIMMERMANN, B. N.; ROURICK, R.; KLOHR, S. "Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea". *J. Mass Spectrom.*,35 (7): 860, 2000.
135. DELCAMBRE, A.; SAUCIER, C. "Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine". *J. Mass Spectrom.*,47 (6): 727, 2012.
136. PRAUD, D.; PARPINEL, M.; GUERCIO, V.; BOSETTI, C.; SERRAINO, D.; FACCHINI, G.; MONTELLA, M.; LA VECCHIA, C.; ROSSI, M. "Proanthocyanidins and the risk of prostate cancer in Italy". *Cancer Causes Control*,29 (2): 261, 2018.
137. "Proanthocyanidins | C31H28O12 - PubChem". Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Proanthocyanidins#section =Top>>. Acesso em: 21/5/2018.
138. GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; ZHANG, Z.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. "Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods". *J. Mass Spectrom.*,38 (12): 1272, 2003.
139. VUKICS, V.; GUTTMAN, A. "Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry". *Mass Spectrom. Rev.*,29 (1): n/a, 2008.
140. MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAO, X.-S.; ZHAO, X.; METCALFE, C. D. "A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry". *Int. J. Mass Spectrom.*,248 (1–2): 61, 2006.
141. 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.
142. DE RIJKE, E.; ZAPPEY, H.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U. A. T. "Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments". *J. Chromatogr. A*,984 (1): 45, 2003.
143. PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C. "Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications". *Phytochem. - A Glob. Perspect. Their Role Nutr. Heal.*, 2012.
144. DAVID, J. M.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S.; CHÁVEZ, J. P. "Flavonol Glycosides from *Davilla flexuosa*". *J. Braz. Chem. Soc.*,7 (2): 115, 1996.
145. LAVOIE, S.; CÔTÉ, I.; PICHETTE, A.; GAUTHIER, C.; OUELLET, M.; NAGAU-LAVOIE, F.; MSHVILDADZE, V.; LEGAULT, J. "Chemical composition and anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of

- extracts from *Cornus canadensis*". *BMC Complement. Altern. Med.*,17 (1): 123, 2017.
146. SHAN, M.; O'DOHERTY, G. A. "De novo asymmetric syntheses of SL0101 and its analogues via a palladium-catalyzed glycosylation.". *Org. Lett.*,8 (22): 5149, 2006.
 147. PETTIT, G. R.; NUMATA, A.; IWAMOTO, C.; USAMI, Y.; YAMADA, T.; OHISHI, H.; CRAGG, G. M. "Antineoplastic Agents. 551. Isolation and Structures of Bauhiniastatins 1-4 from *Bauhinia purpurea*". *J. Nat. Prod.*,69 (3): 323, 2006.
 148. BRUKER. "Profileanalysis 2.1 - User Manual". , 2013.
 149. METLIN. "Quinic acid - Metlin 3329". Disponível em: <https://metlin.scripps.edu/metabo_info.php?molid=3329>. Acesso em: 21/3/2018a.
 150. VALGIMIGLI, L.; GABBANINI, S.; MATERA, R. "Analysis of Maltose and Lactose by U-HPLC-ESI-MS/MS". *Diet. Sugars Chem. Anal. Funct. Eff.* p.443–463, 2012.
 151. GABBANINI, S.; LUCCHI, E.; GUIDUGLI, F.; MATERA, R.; VALGIMIGLI, L. "Anomeric discrimination and rapid analysis of underivatized lactose, maltose, and sucrose in vegetable matrices by U-HPLC-ESI-MS/MS using porous graphitic carbon". *J. Mass Spectrom.*,45 (9): 1012, 2010.
 152. MATSUDA, F.; SUZUKI, M.; SAWADA, Y. "Protocatechuic acid Mass Spectrum". Disponível em: <<https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=PR100601&dsn=RIKEN>>. Acesso em: 20/2/2018c.
 153. HMDB0001856. "Protocatechuic acid (HMDB0001856)". Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0001856>>.
 154. "Vanillic acid (HMDB0000484)". Disponível em: <<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000484>>.
 155. METLIN 44643. "Hydroxycinnamyl aldehyde". Disponível em: <<https://metlin.scripps.edu/showChart.php?molid=44643&h=240&colIE=20&lmode=p&etype=experimental>>. Acesso em: 27/3/2018.
 156. METLIN 6453. "Metlin 6453". Disponível em: <https://metlin.scripps.edu/metabo_info.php?molid=6453>. Acesso em: 27/3/2018.
 157. METLIN 984972. "Metlin 984972". Disponível em: <https://metlin.scripps.edu/metabo_info.php?molid=984972>. Acesso em: 27/3/2018.
 158. LI, K.; GAO, C.; LI, W. "Study on fragmentation of vitexin and isorhamnetin-3-O-beta-D-rutinoside using electrospray quadrupole time of flight mass spectrometry.". *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*,36 (2): 180, 2011.
 159. FINE, D.; WHERRITT, D.; SUMNER, L. "7,4'-Dimethoxy-5-hydroxyflavanone Mass Spectrum". Disponível em: <<https://msbi.ipb-halle.de/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=BS003500&dsn=BrukerSumner>>. Acesso em: 27/3/2018.
 160. MATSUDA, F.; SUZUKI, M.; SAWADA, Y. "6,7-Dihydroxycoumarin Mass Spectrum". Disponível em: <<http://www.massbank.jp/jsp/Dispatcher.jsp?type=disp&id=PR100938&site=1>>. Acesso em: 9/4/2018.
 161. MONA. "NCGC00384841". Disponível em:

- <<http://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00000846963>>. Acesso em: 9/4/2018.
162. METLIN. "Nonanedioic acid". Disponível em: <https://metlin.scripps.edu/metabo_info.php?molid=5750>. Acesso em: 9/4/2018b.
163. ENGEL, I. C.; FERREIRA, R. A.; CECHINEL-FILHO, V.; MEYRE-SILVA, C. "Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae)". *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18 (2): 258, 2008.
164. BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. "Plantas medicinais e fitoterápicos no SUS". Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnprmf/plantas-medicinais-e-fitoterapicos-no-sus>>. Acesso em: 7/6/2018.

APÊNDICES

8 - APÊNDICES

8.1 - Tabelas da otimização cromatográfica – Etapa 1 e 2

TABELA 8.1– Resultado etapa 1 – número de bandas cromatográficas por experimento.

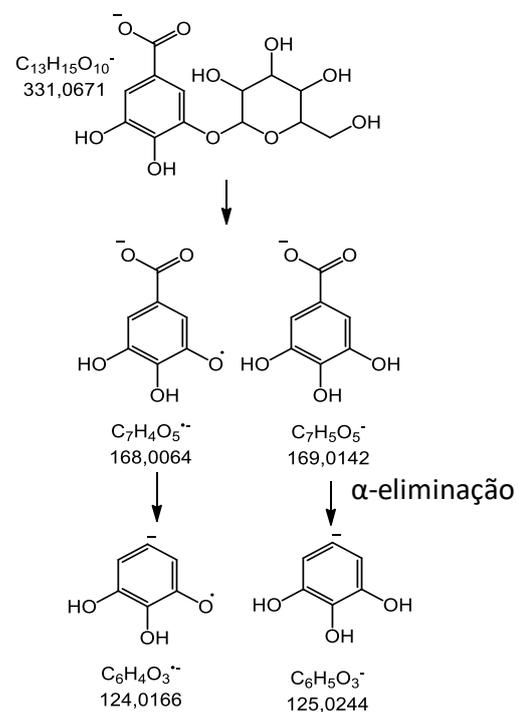
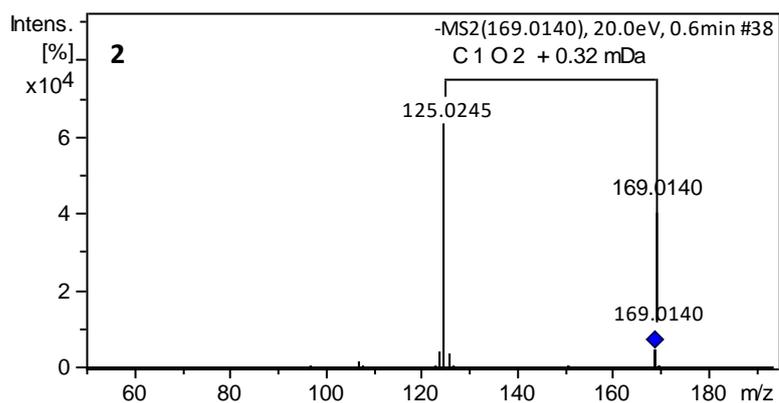
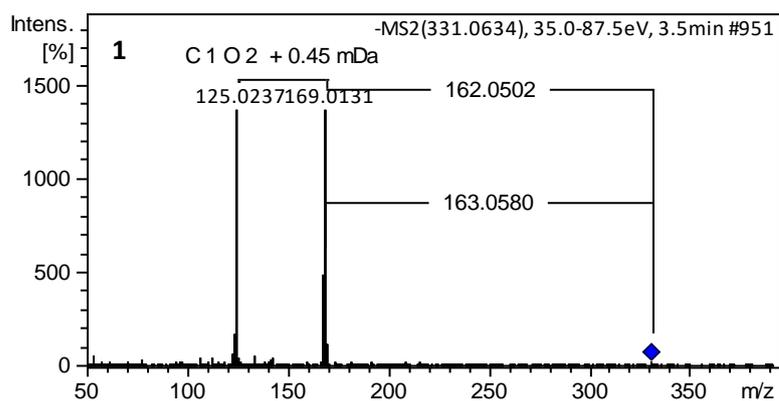
Coluna Real	Normalizado	pH Real	Normalizado	Orgânico Real	Normalizado	Respostas (nº de bandas cromatográficas)
BipHRaptor	-0,3791	5,3	-0,1351	Acetonitrila	-1	72
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Acetonitrila	-1	74
BipHRaptor	-0,3791	7,4	1	Acetonitrila	-1	48
BipHRaptor	-0,3791	7,4	1	Acetonitrila	-1	47
BipHRaptor	-0,3791	3,7	-1	Acetonitrila	-1	65
BipHRaptor	-0,3791	3,7	-1	Acetonitrila	-1	58
BipHRaptor	-0,3791	5,3	-0,1351	Metanol	1	84
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	81
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	80
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	82
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	84
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	87
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	85
BipHRaptor	-0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	85
BipHRaptor	-0,3791	7,4	1	Metanol	1	64
BipHRaptor	-0,3791	7,4	1	Metanol	1	57
BipHRaptor	-0,3791	3,7	-1	Metanol	1	77
BipHRaptor	-0,3791	3,7	-1	Metanol	1	67
SEP0004	-1	5,3	-0,1351	Acetonitrila	-1	82
SEP0004	-1	4,2	-0,7298	Acetonitrila	-1	90
SEP0004	-1	7,4	1	Acetonitrila	-1	77
SEP0004	-1	3,7	-1	Acetonitrila	-1	76
SEP0004	-1	5,3	-0,1351	Metanol	1	89
SEP0004	-1	4,2	-0,7298	Metanol	1	90
SEP0004	-1	4,2	-0,7298	Metanol	1	92
SEP0004	-1	4,2	-0,7298	Metanol	1	94
SEP0004	-1	7,4	1	Metanol	1	71
SEP0004	-1	7,4	1	Metanol	1	69
SEP0004	-1	3,7	-1	Metanol	1	89
SEP0007	0,3791	5,3	-0,1351	Acetonitrila	-1	51
SEP0007	0,3791	3,7	-1	Acetonitrila	-1	43
SEP0007	0,3791	5,3	-0,1351	Metanol	1	47
SEP0007	0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	80
SEP0007	0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	77
SEP0007	0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	75
SEP0007	0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	78
SEP0007	0,3791	4,2	-0,7298	Metanol	1	47
SEP0007	0,3791	7,4	1	Metanol	1	49
SEP0007	0,3791	3,7	-1	Metanol	1	40
SEP0022	1	5,3	-0,1351	Acetonitrila	-1	68
SEP0022	1	4,2	-0,7298	Acetonitrila	-1	67
SEP0022	1	7,4	1	Acetonitrila	-1	55
SEP0022	1	3,7	-1	Acetonitrila	-1	55
SEP0022	1	5,3	-0,1351	Metanol	1	62
SEP0022	1	4,2	-0,7298	Metanol	1	66
SEP0022	1	4,2	-0,7298	Metanol	1	69
SEP0022	1	4,2	-0,7298	Metanol	1	70
SEP0022	1	4,2	-0,7298	Metanol	1	71
SEP0022	1	4,2	-0,7298	Metanol	1	70
SEP0022	1	7,4	1	Metanol	1	61
SEP0022	1	3,7	-1	Metanol	1	60

TABELA 8.2 – Resultado etapa 2 – número de bandas cromatográficas por experimento

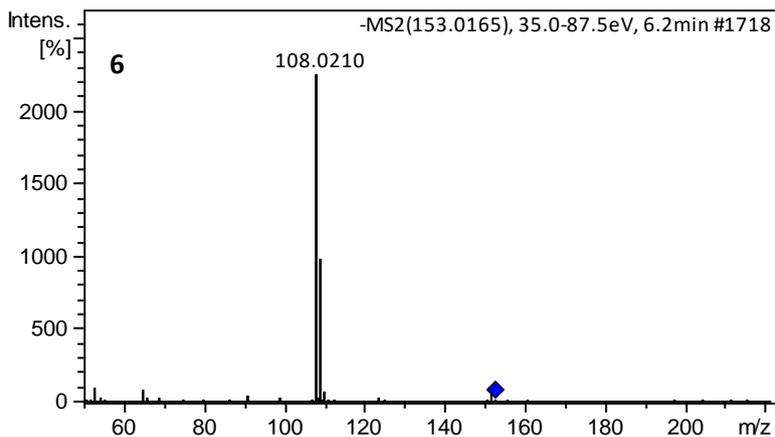
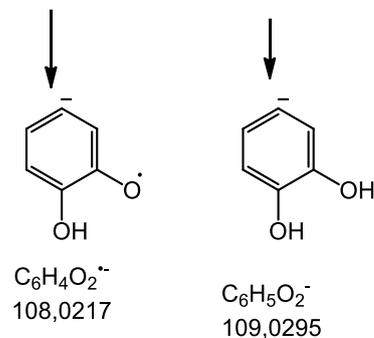
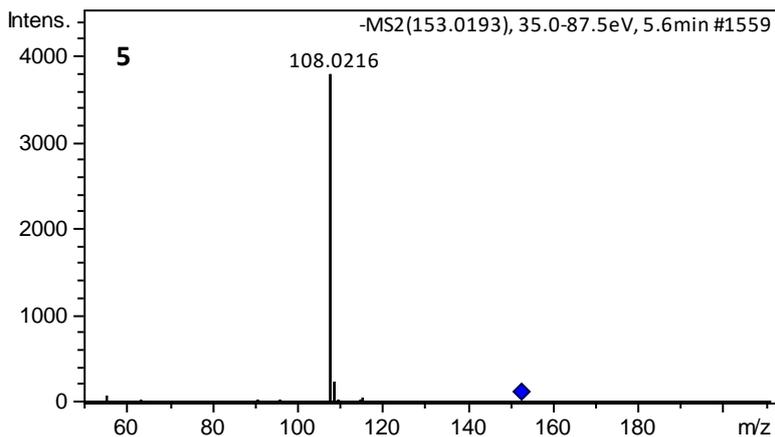
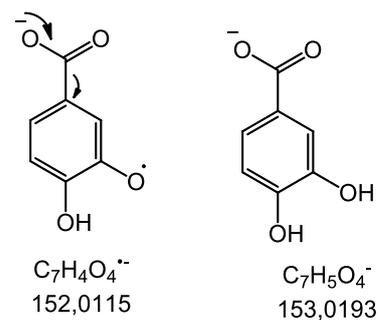
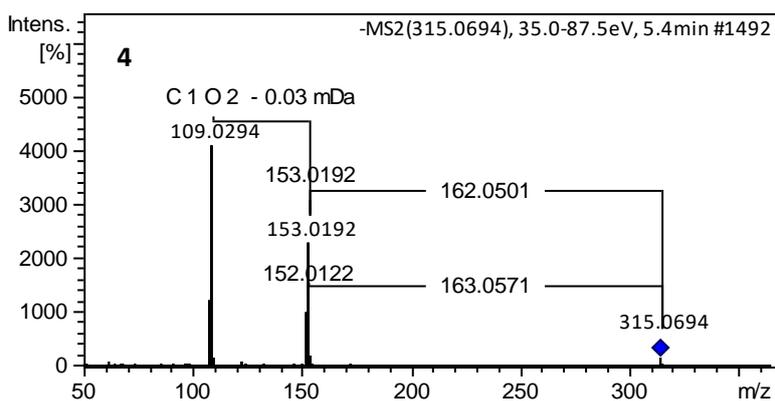
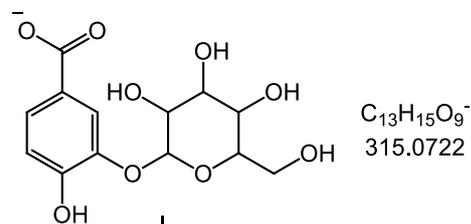
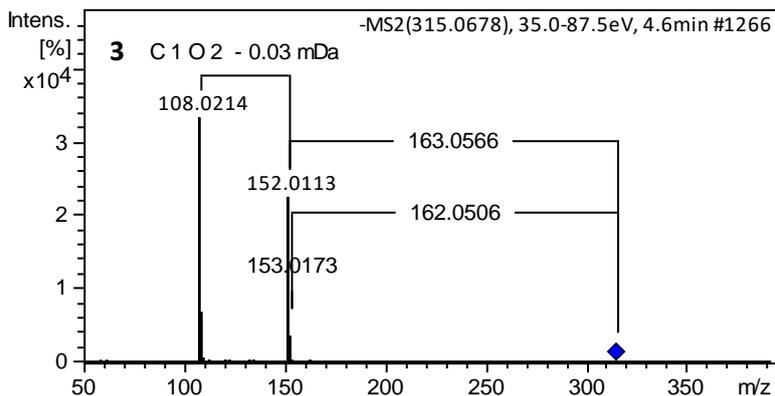
Tempo de gradiente (min)	Normalizado	pH	Normalizado	Orgânico	Normalizado	Respostas (n° de bandas cromatográficas)
10	-1	3	-1	Metanol	1	89
10	-1	3	-1	Acetonitrila	-1	76
10	-1	4,2	-0,375	Metanol	1	90
10	-1	4,2	-0,375	Metanol	1	92
10	-1	4,2	-0,375	Metanol	1	94
10	-1	4,2	-0,375	Acetonitrila	-1	90
10	-1	5	1	Metanol	1	89
10	-1	5	1	Acetonitrila	-1	82
30	1	3	-1	Metanol	1	122
30	1	3	-1	Acetonitrila	-1	119
30	1	4,2	-0,375	Metanol	1	137
30	1	4,2	-0,375	Metanol	1	133
30	1	4,2	-0,375	Acetonitrila	-1	134
30	1	5	1	Metanol	1	146
30	1	5	1	Acetonitrila	-1	124
30	1	5	1	Acetonitrila	-1	128

8.2 - Espectros de massa de alta resolução - LC-HRMS

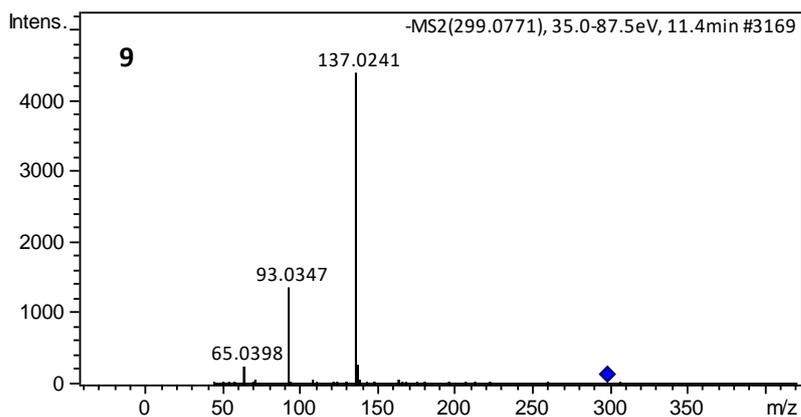
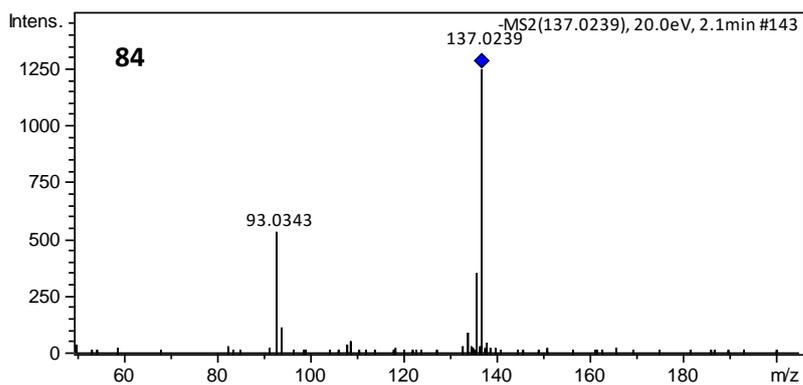
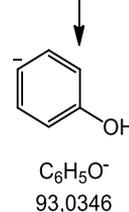
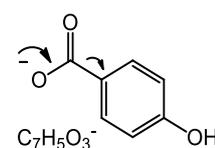
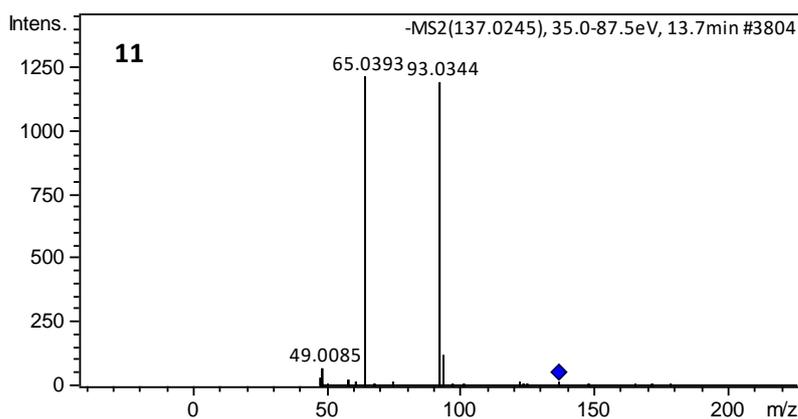
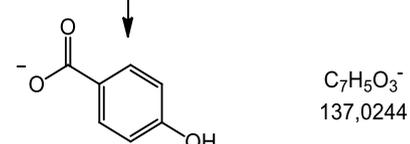
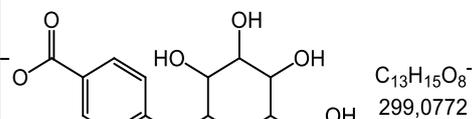
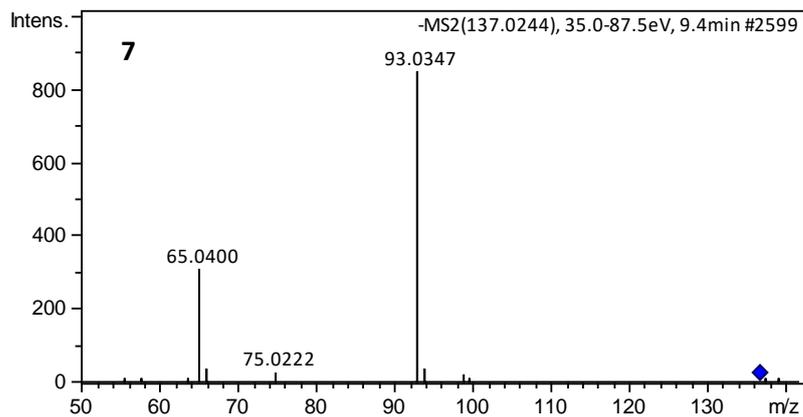
8.2.1 – Ácido gálico-hexosídeo(1) e ácido gálico(2)



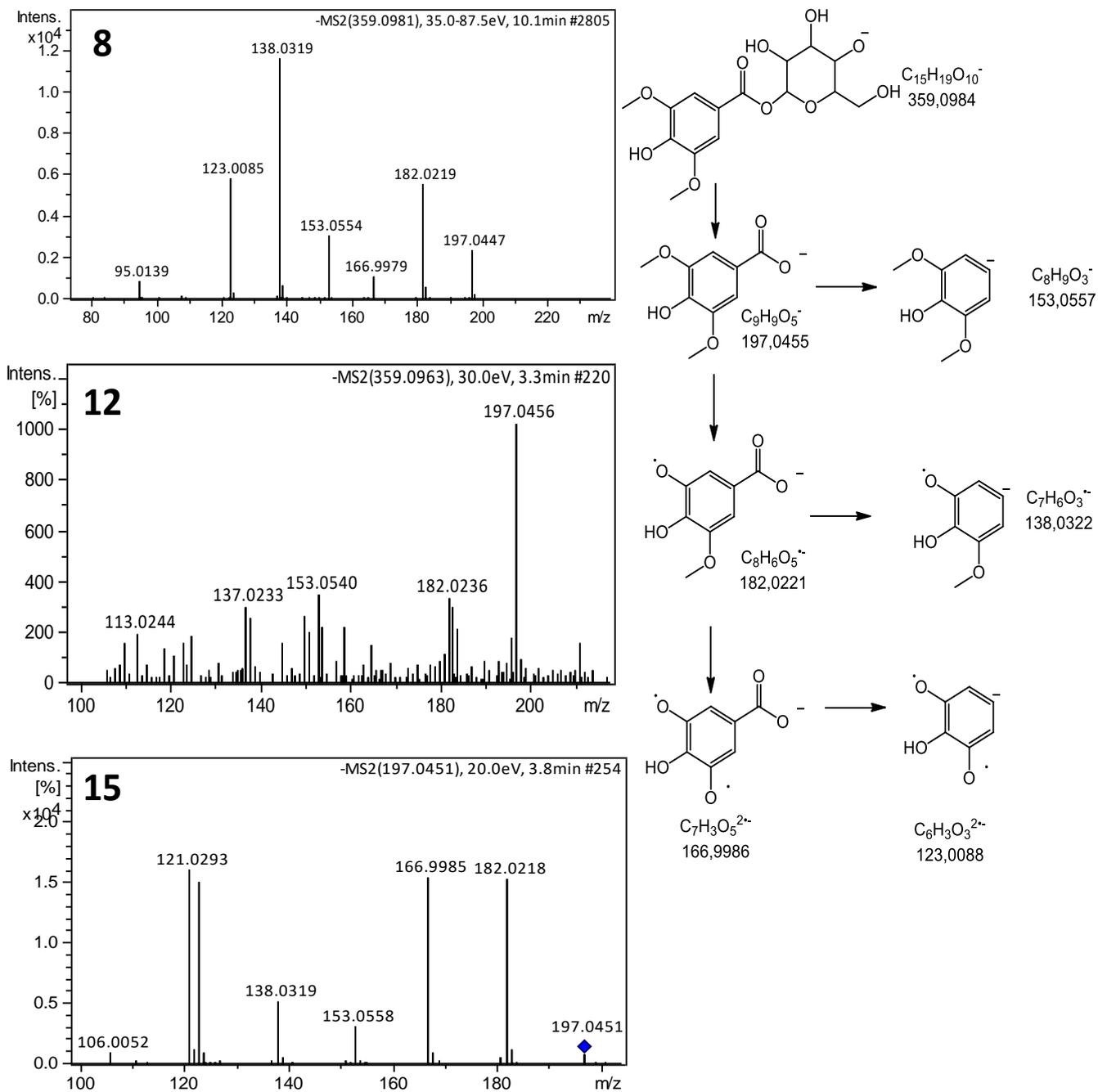
8.2.2 – Ácido protocatecúico (5,6) e ácido protocatecúico hexoxídeo (3,4)



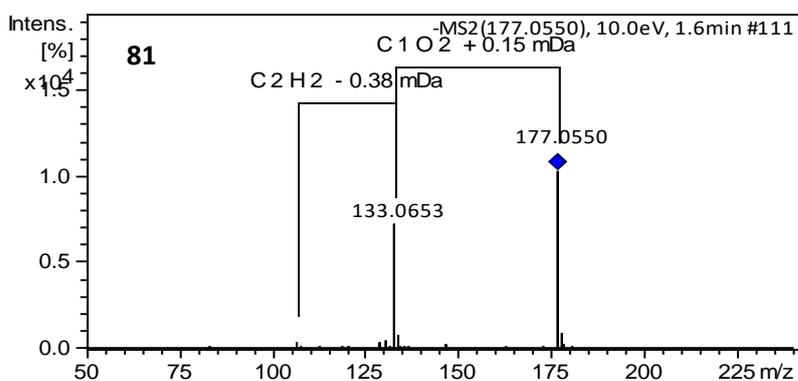
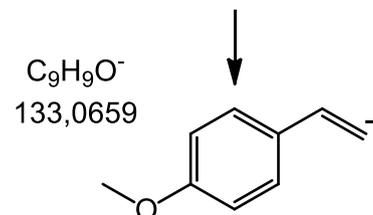
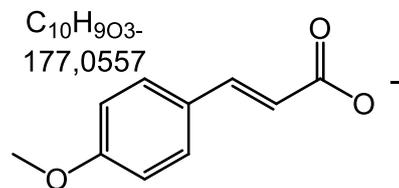
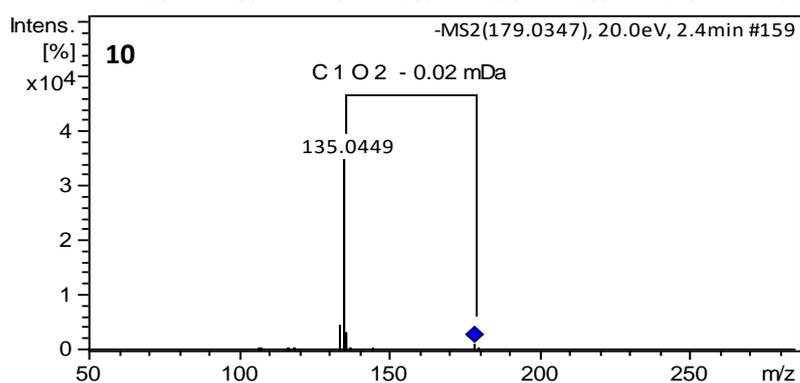
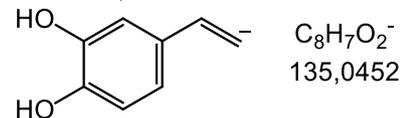
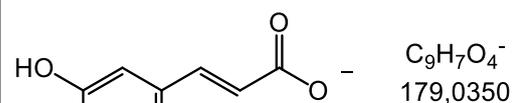
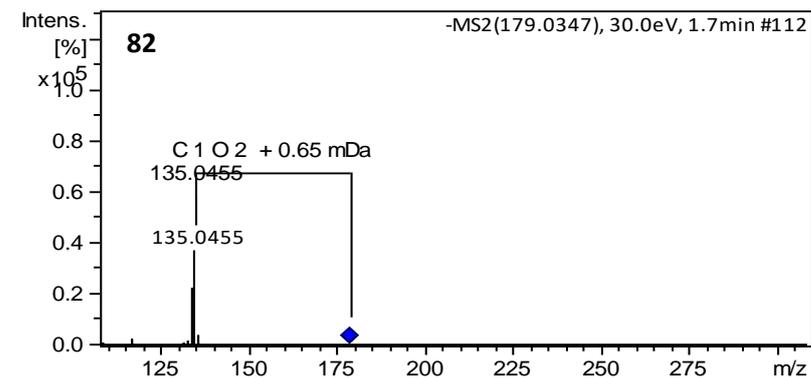
8.2.3 – Ácidos hidroxibenzoico(7,11,84) e ácido hidroxibenzoico–hexosídeo(9)



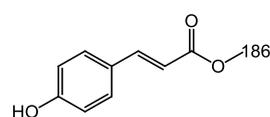
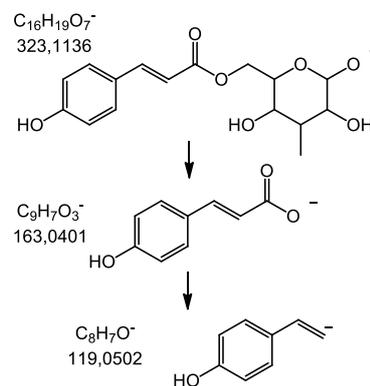
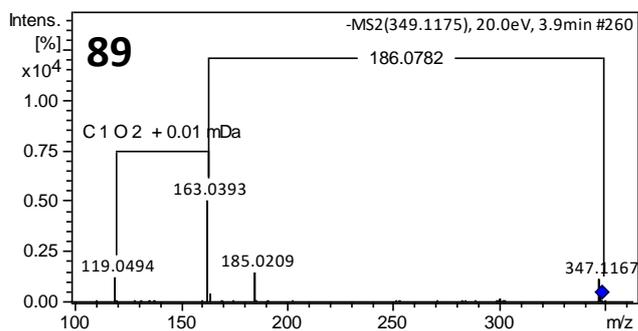
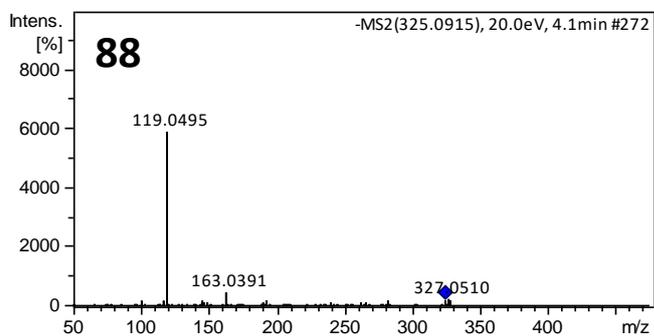
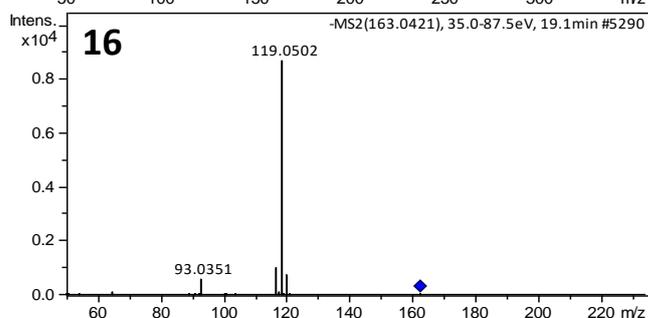
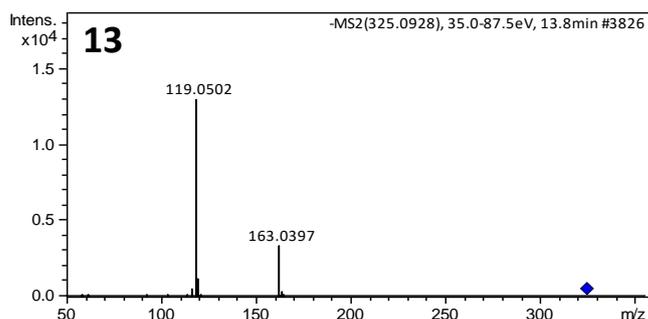
8.2.4 – Ácido siringíco(15) e ácido siringíco–hexosídeo(8,12)



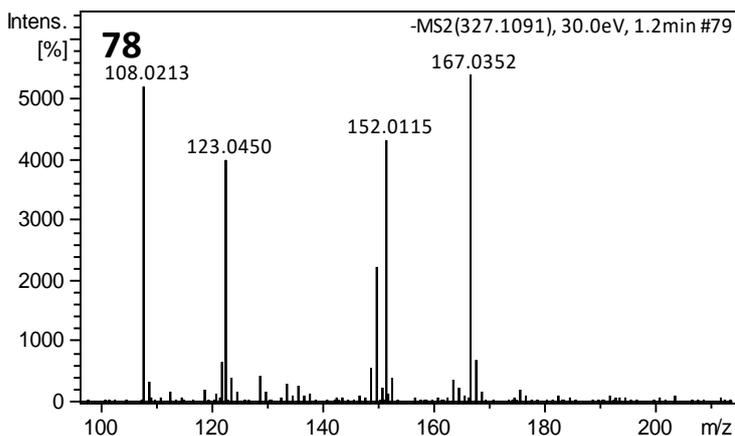
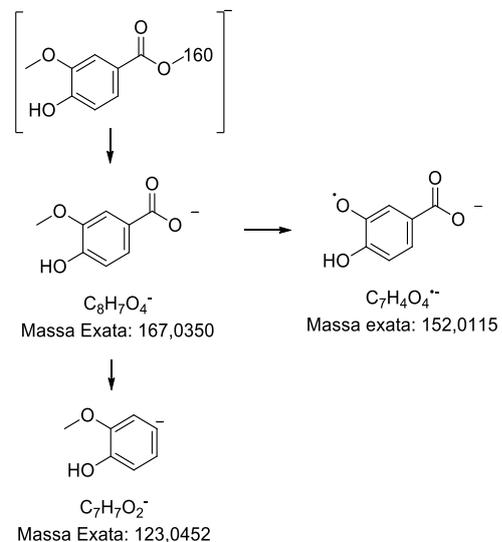
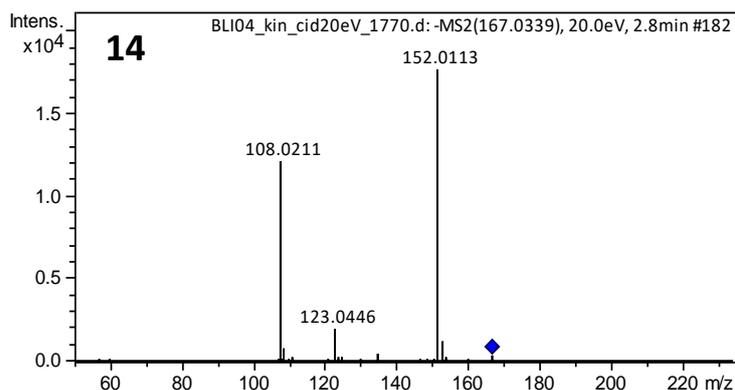
8.2.5 – Derivados do ácido cinâmico: (82, 10) – ácido dihidroxicinâmico/ (81) – ácido metoxicinâmico



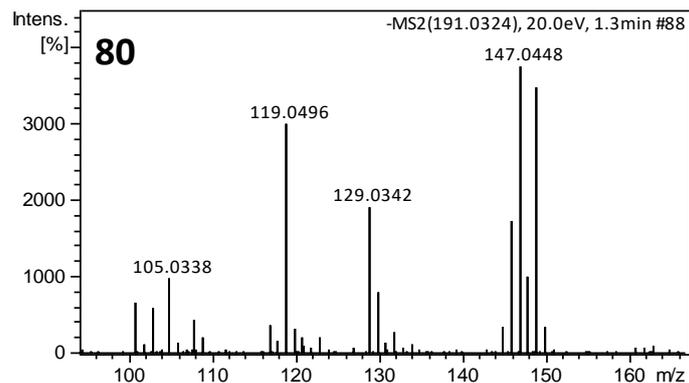
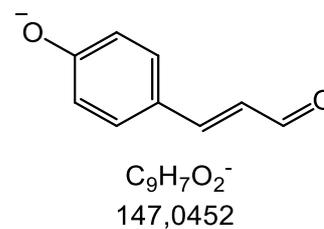
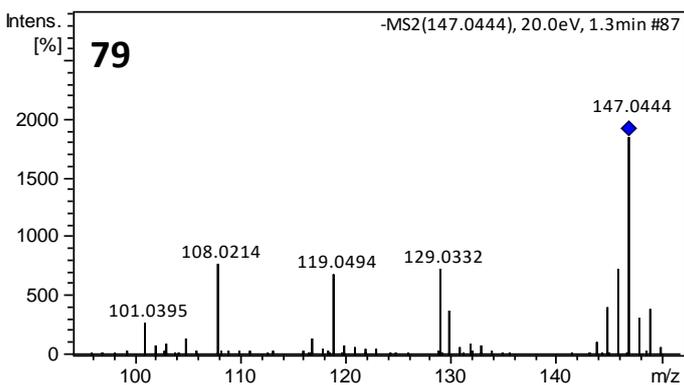
8.2.6 - Ácido cumárico(16), ácido cumárico-hexosídeo(13,88) e cumárico-186 (89)



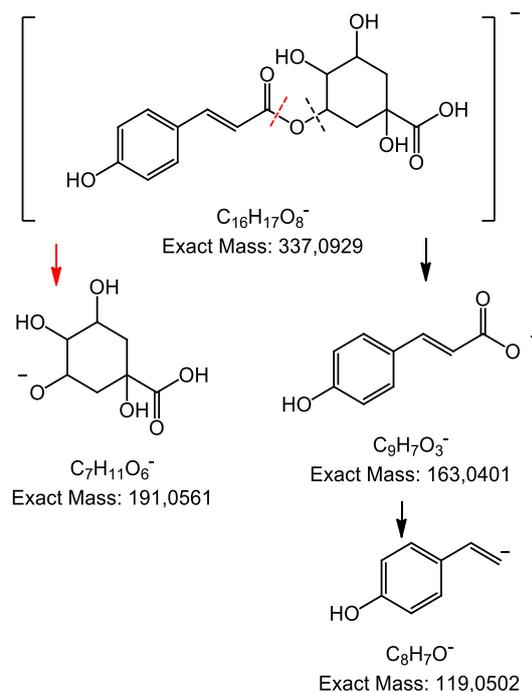
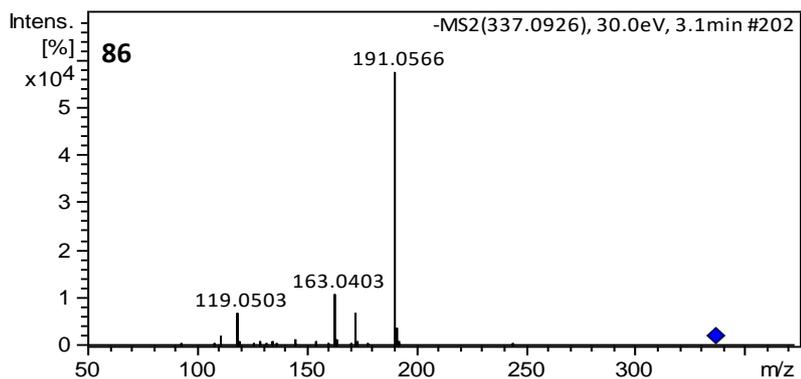
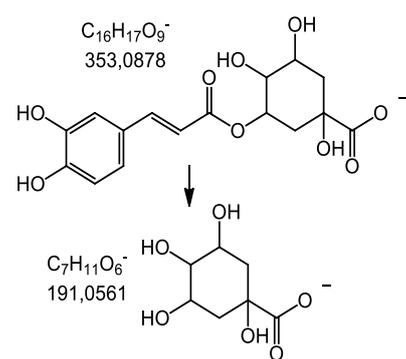
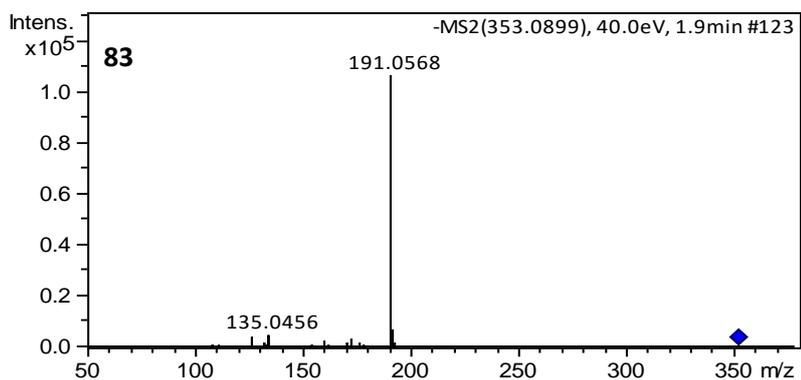
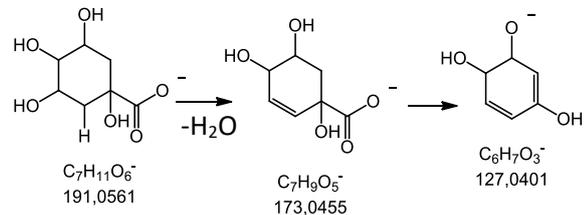
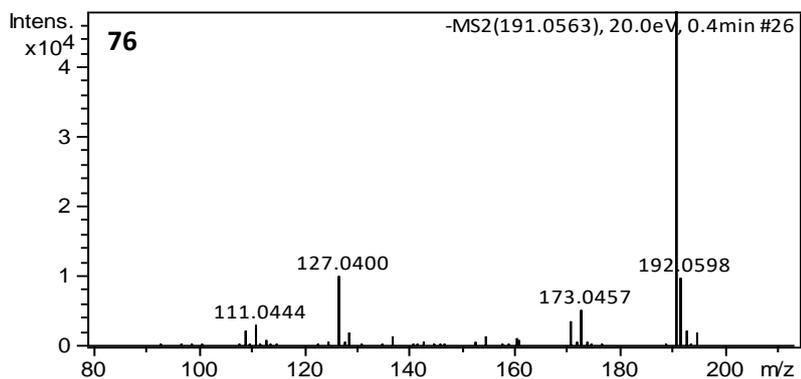
8.6.7 – Ácido vanílico(14) e Ácido vanílico-160(78)



8.6.8 - Cinamaldeídos (E)-3- (4-Hidroxifenil)-2-propenal (79) e (E)-3- (4-Hidroxifenil)-2-propenal+44 (80)

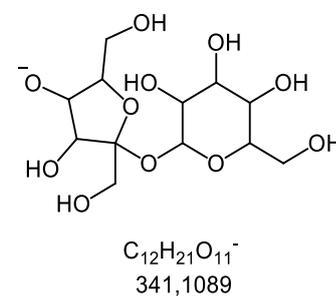
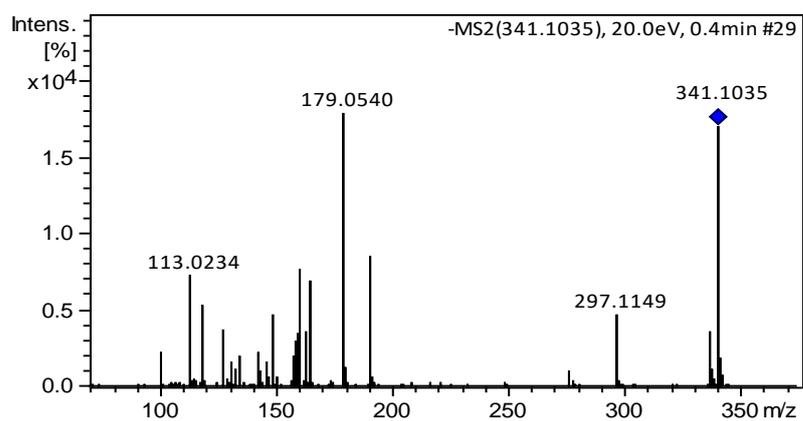


8.6.9 – Ácido quínico (76), ácido cafeoilquínico (83) e ácido cumaroil quínico (86)

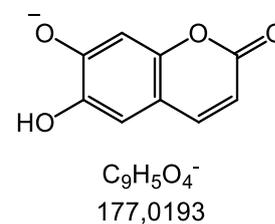
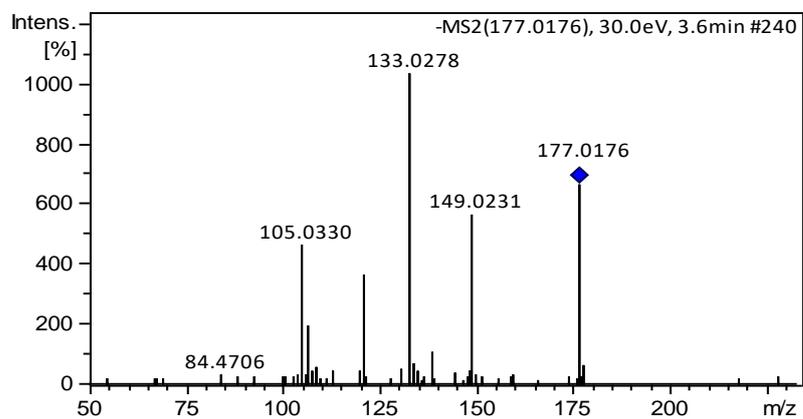


8.6.9 – Outros

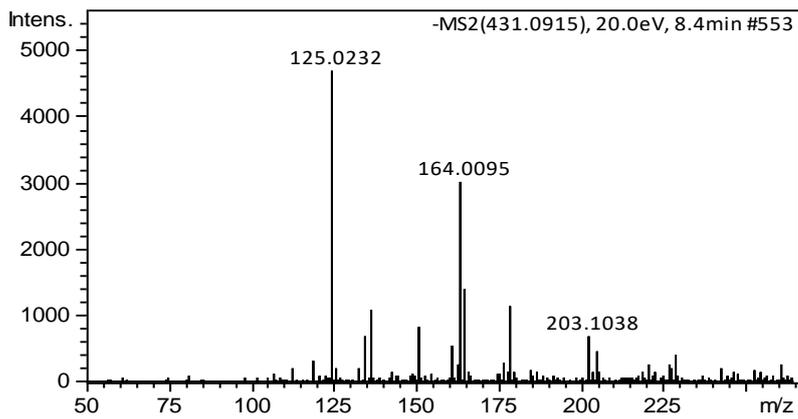
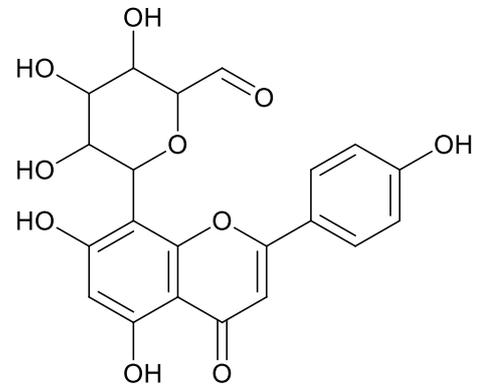
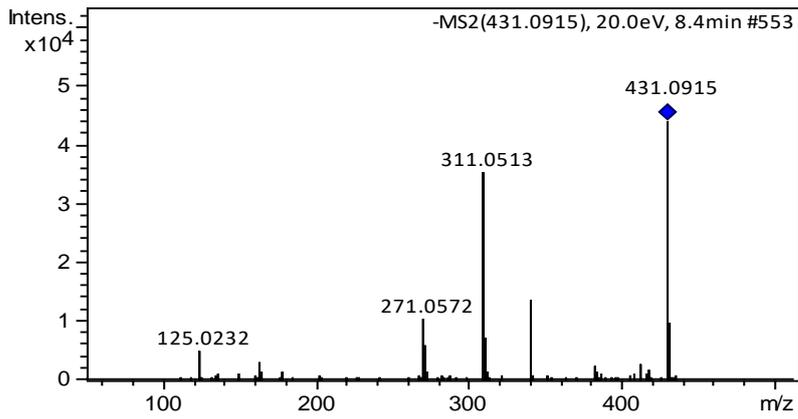
77 – Dissacarídeo: Hexose–hexose



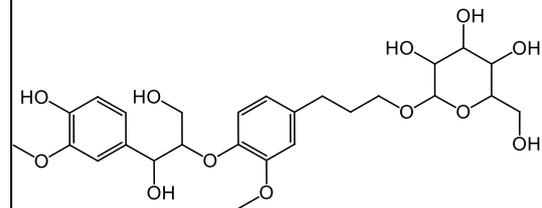
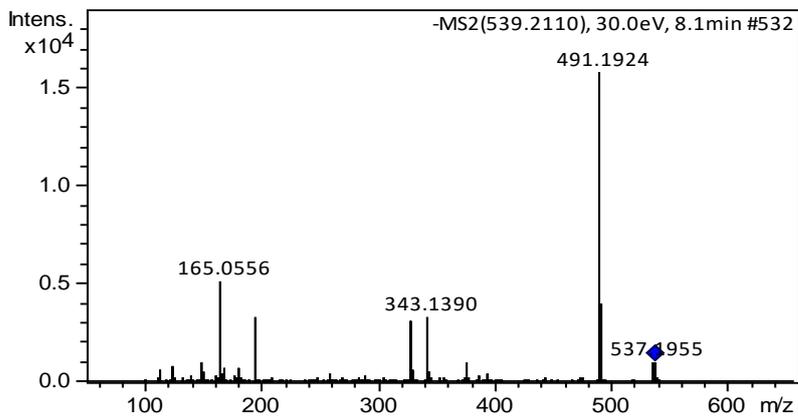
87 – Diidroxicoumarina



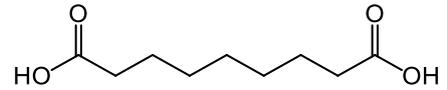
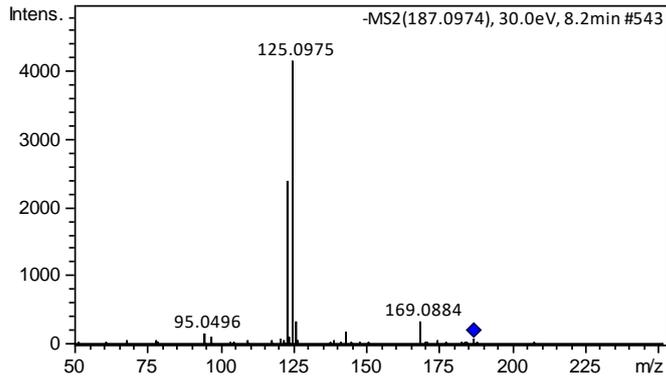
94 – Vitexina



92 – NCGC00384841

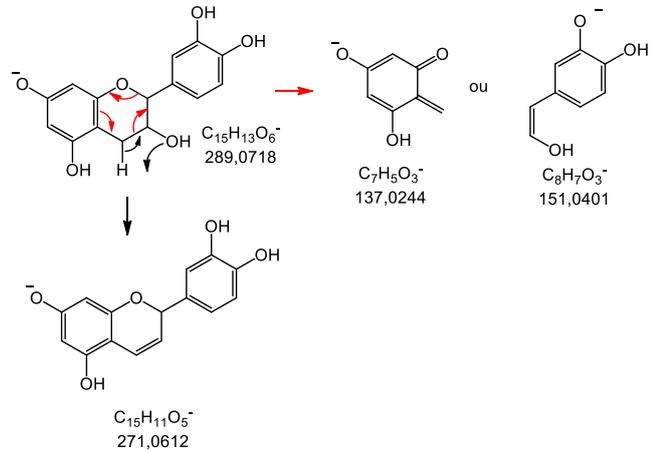
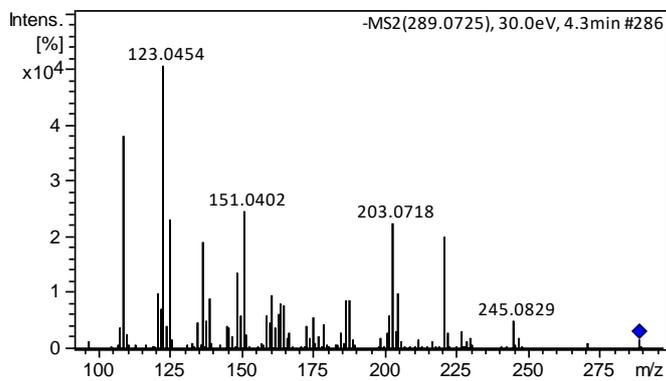


93 – Ácido azeláico

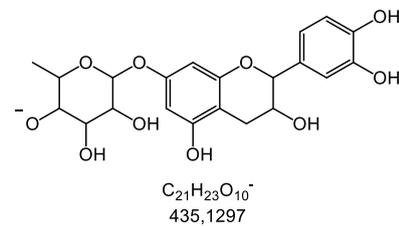
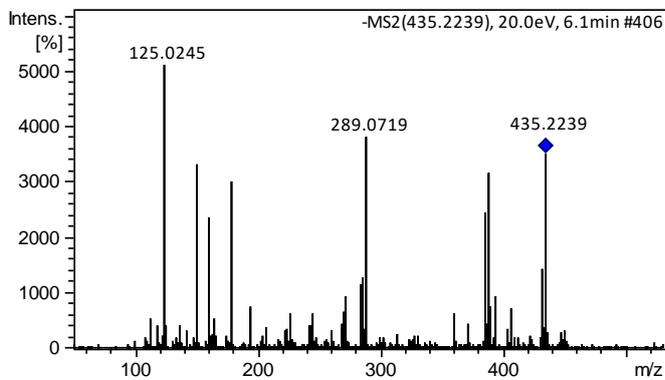


8.6.10 – Flavan-3-ol, protoantocianidinas e derivados

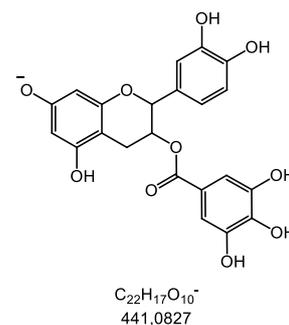
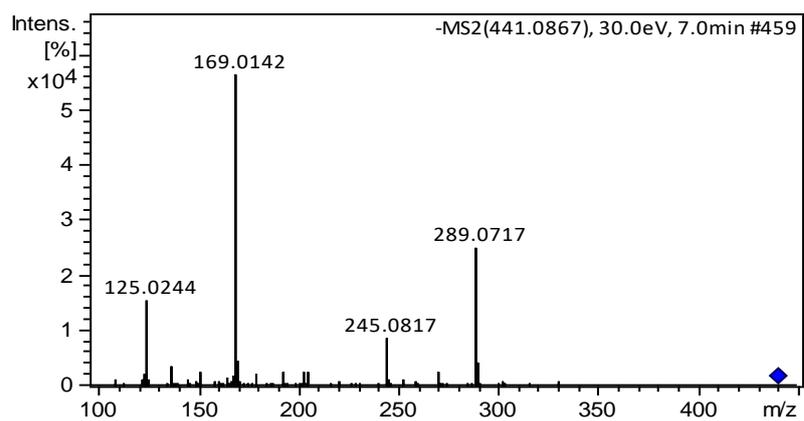
25 – Catequina



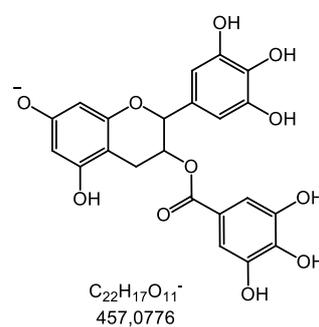
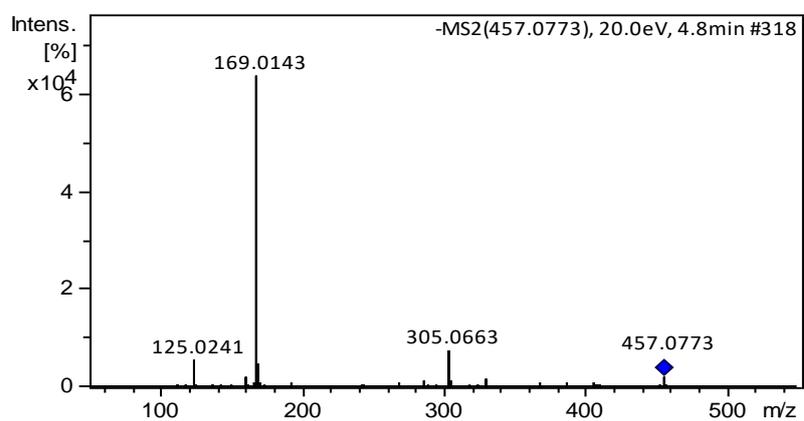
90 – Catequina-deoxihexosídeo



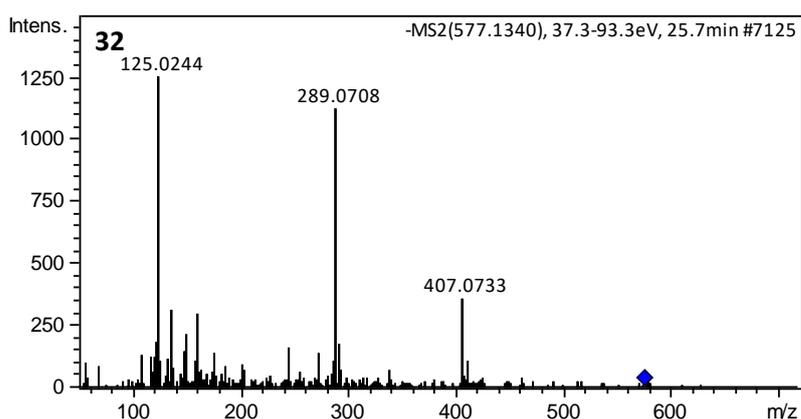
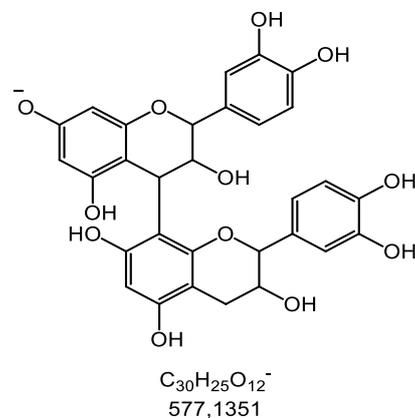
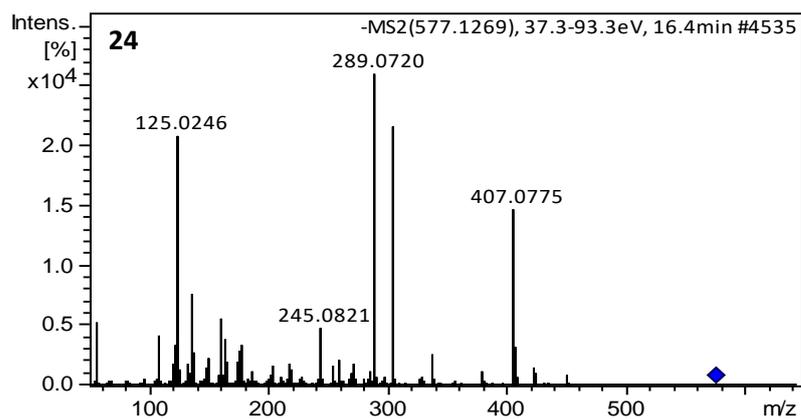
31 – Catequina–galato



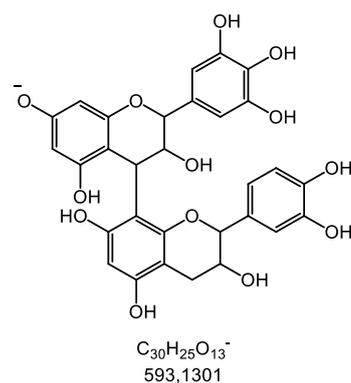
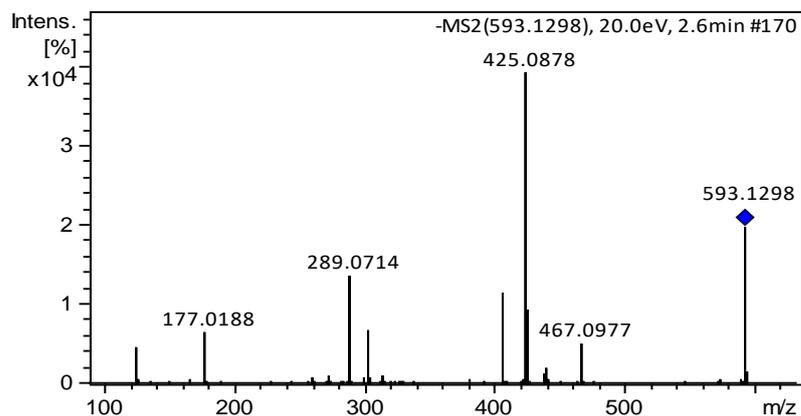
27 – Galocatequina–galato



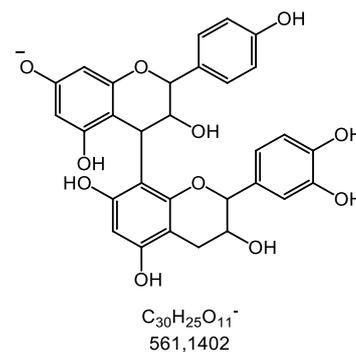
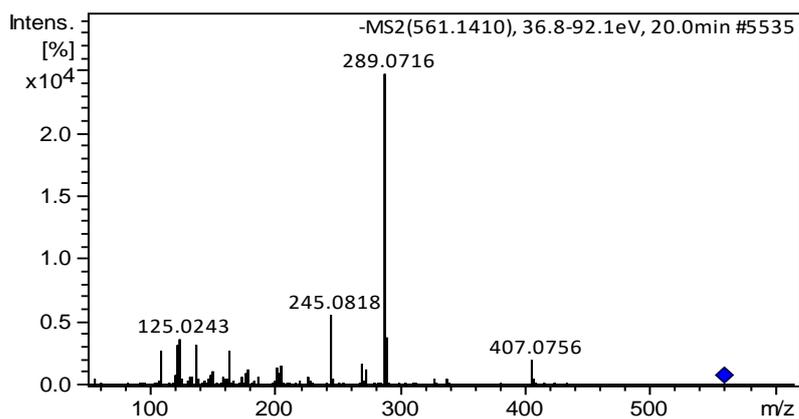
(epi)Catequina–(epi)Catequina (**24** e **32**)



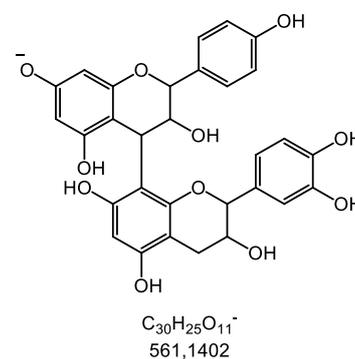
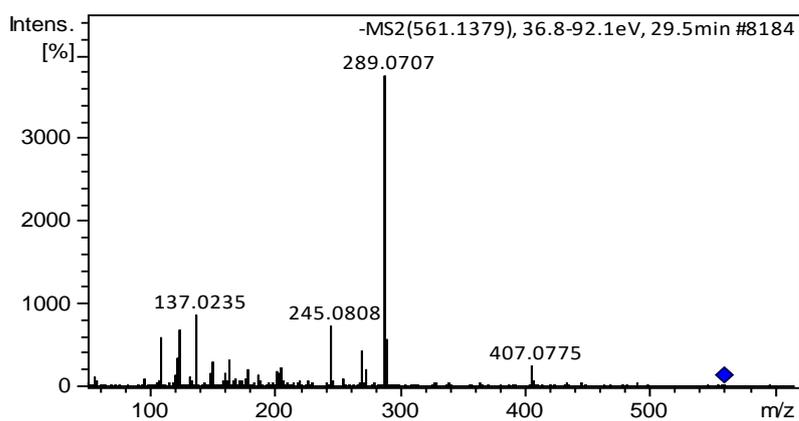
18 – (epi)Galocatequina–(epi)Catequina



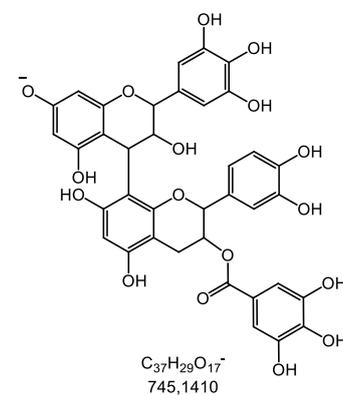
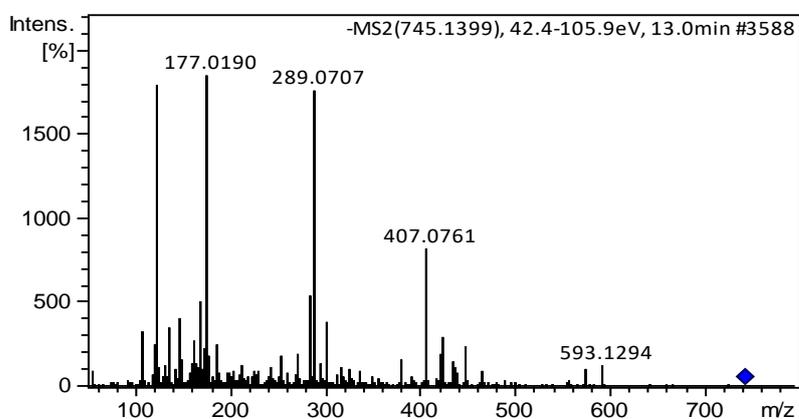
30 – (epi)Afzelequina–(epi)Catequina(I)



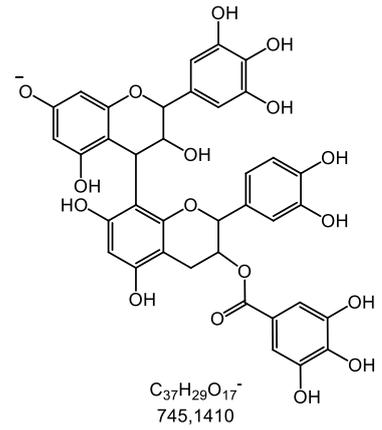
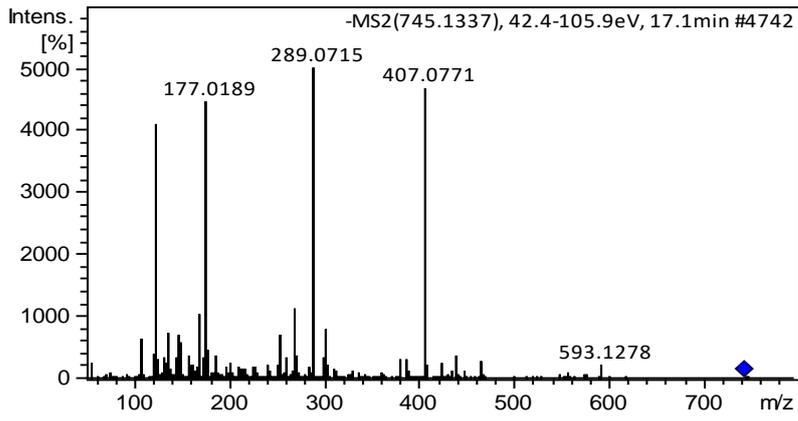
33 – (epi)Afzelequina–(epi)Catequina(II)



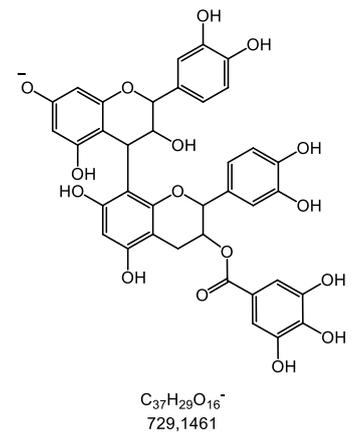
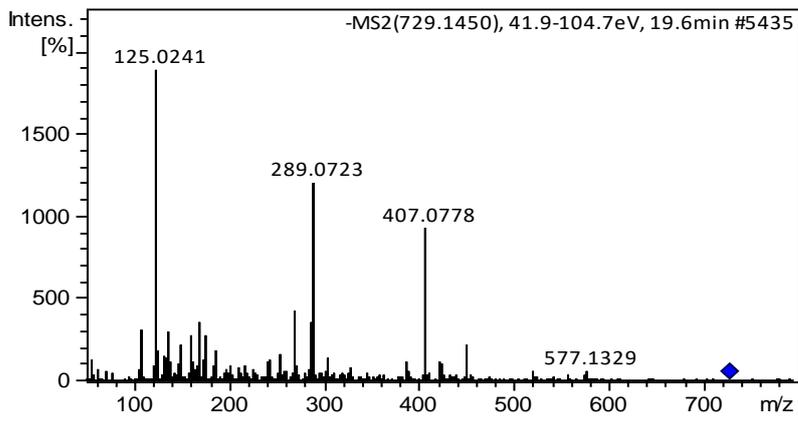
22 – (epi)Galocatequina–(epi)Catequina–galoil(I)



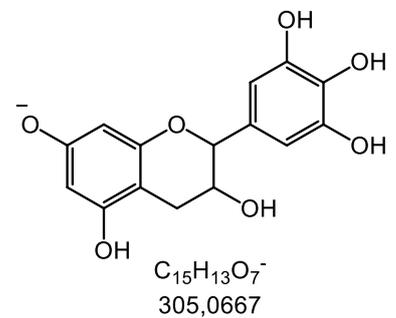
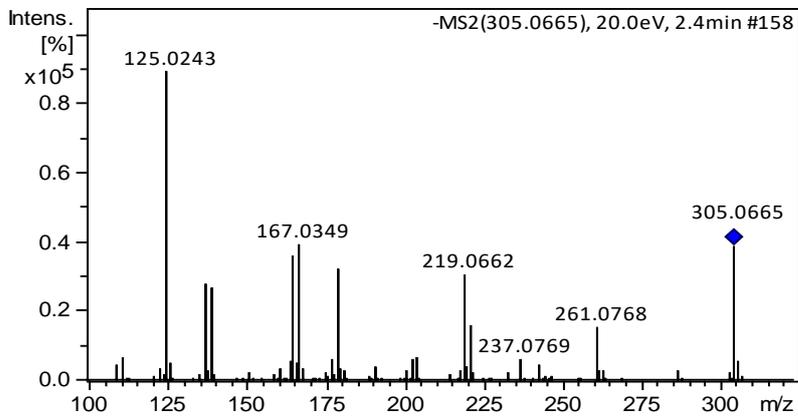
26 – (epi)Galocatequina–(epi)Catequina–galoil(II)



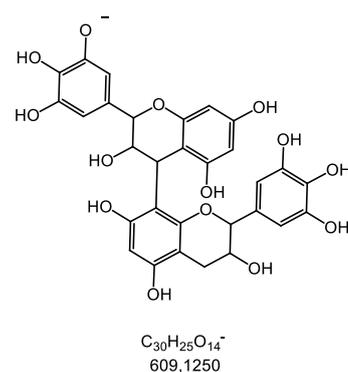
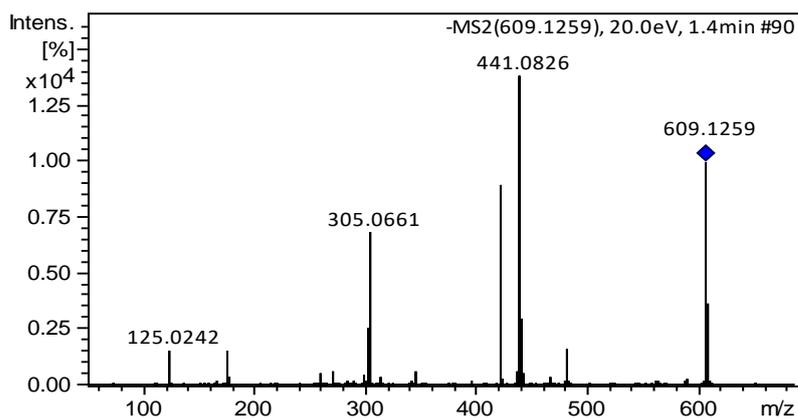
29 – (epi)Catequina–(epi)Catequina–galoil



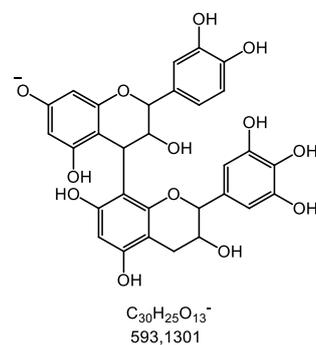
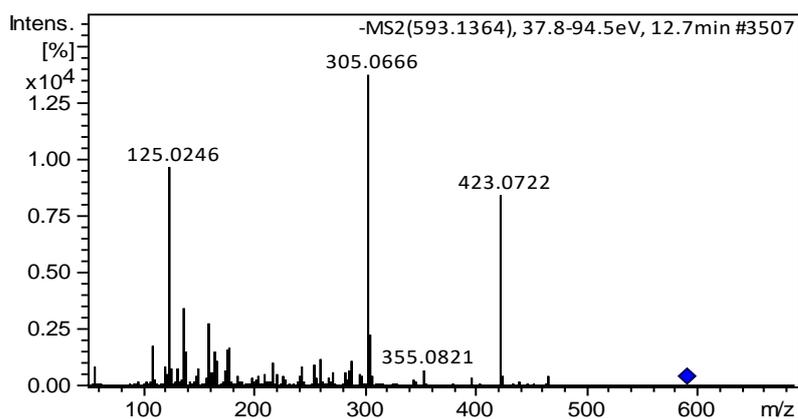
19 – Galocatequina



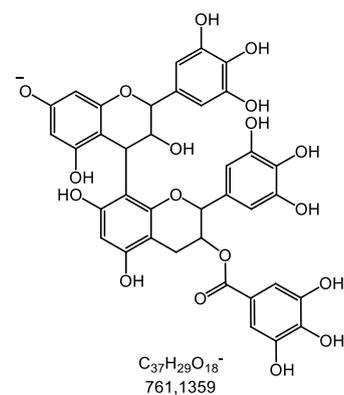
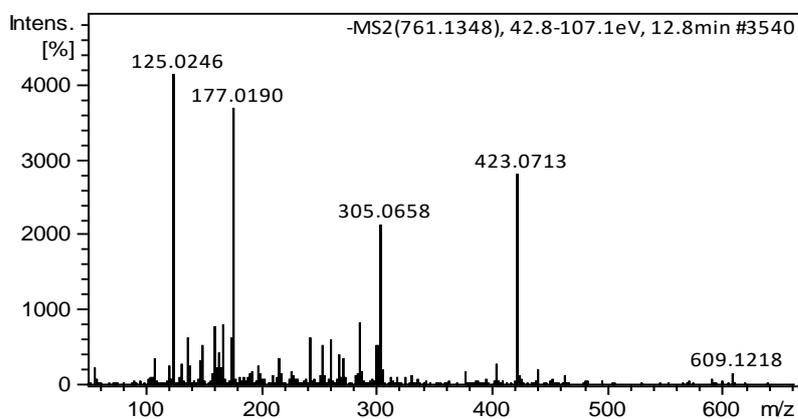
17 – (epi)Galocatequina–(epi)Galocatequina



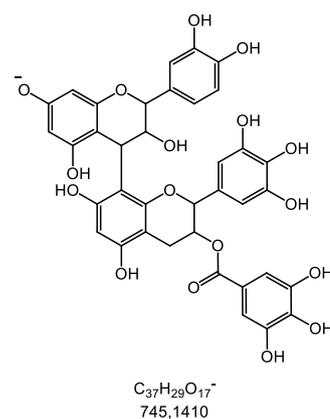
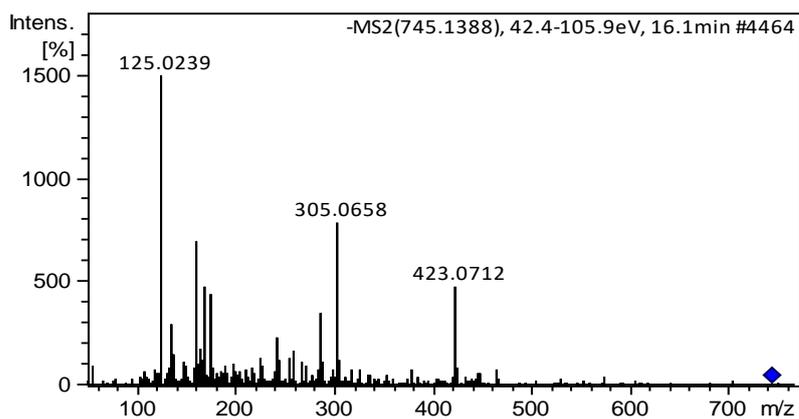
20 – (Epi)Catequina–(Epi)Galocatequina



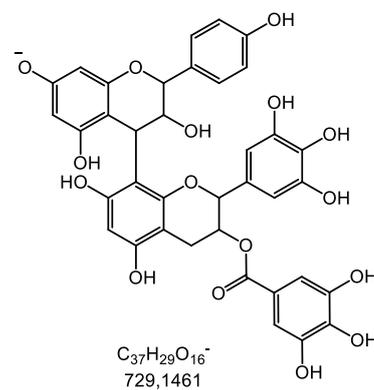
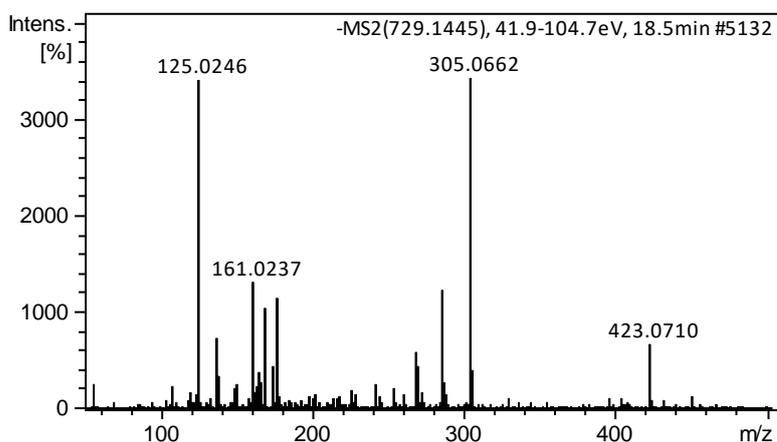
21 – (Epi)Galocatequina–(Epi)Galocatequina–Galoil



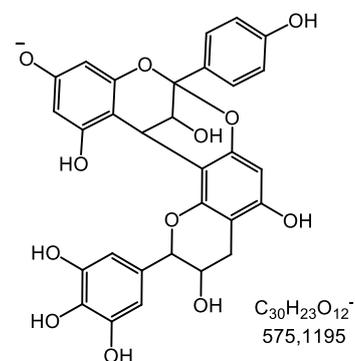
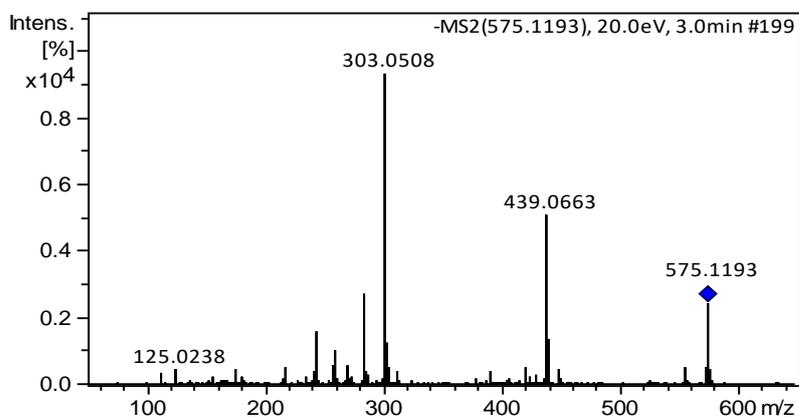
23 – (Epi)Catequina–(Epi)Galocatequina–Galoil



28 – (Epi)Afzelequina–(Epi)Galocatequina–galoil

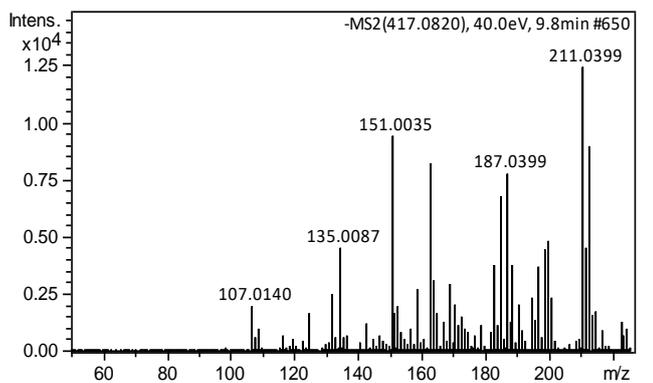
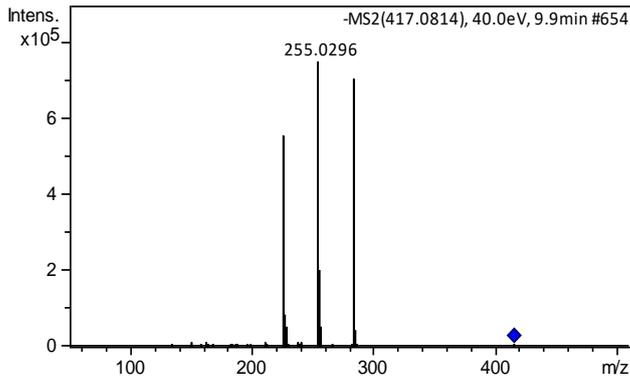
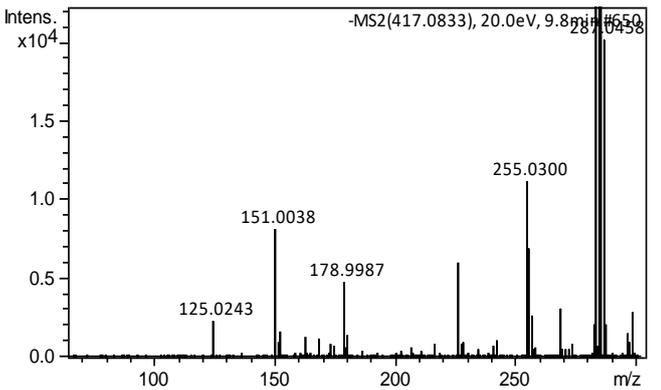
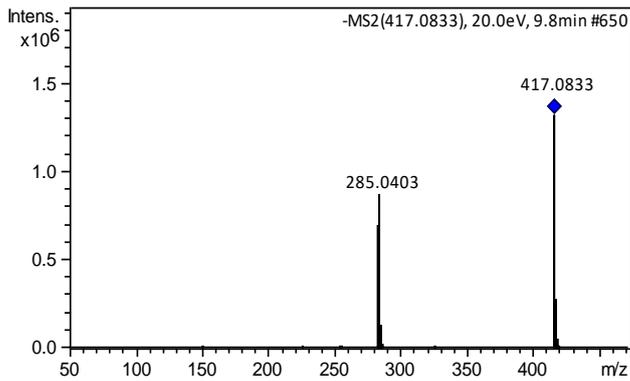
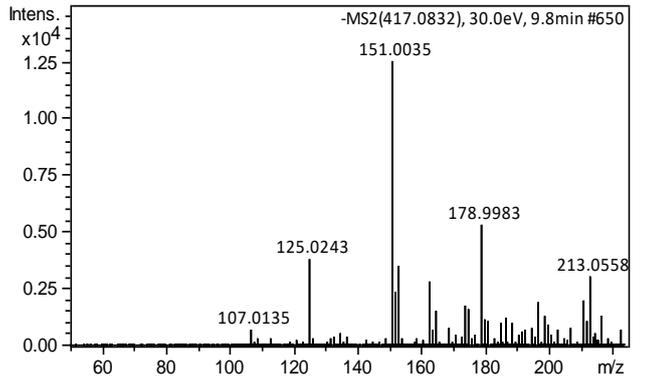
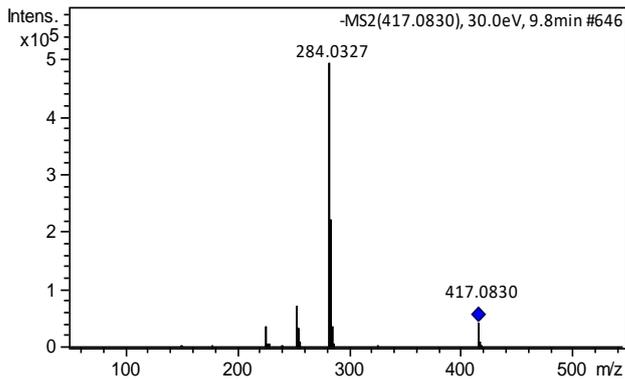
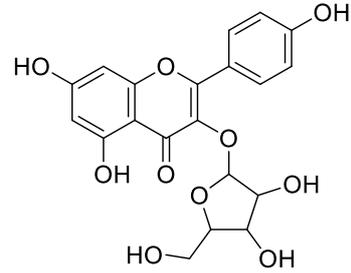
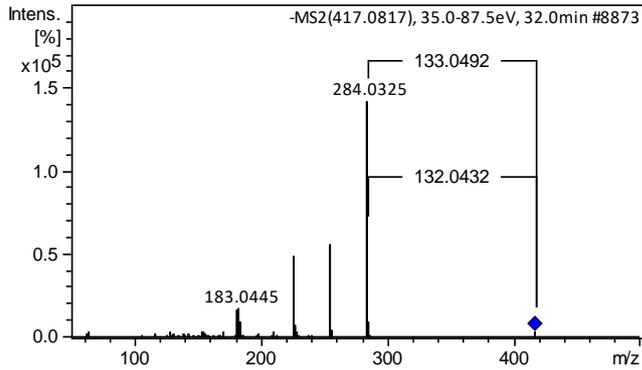


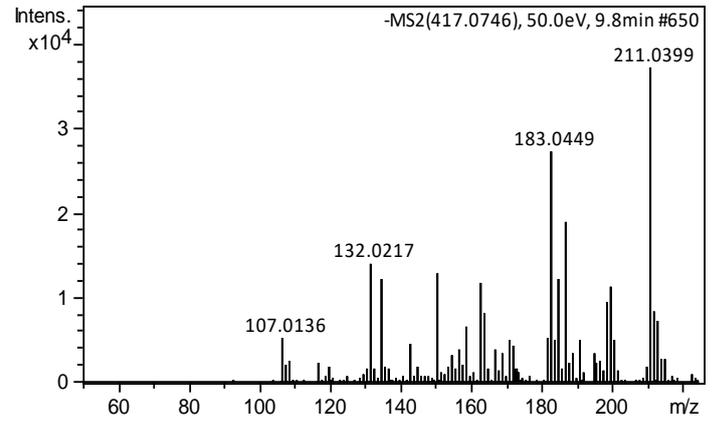
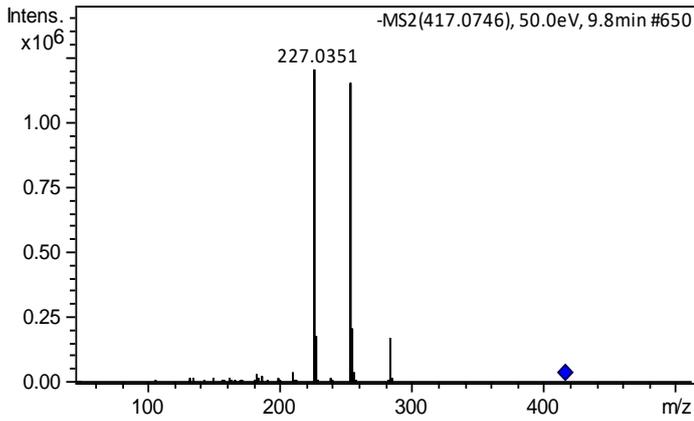
85 – (Epi)Afzalequina–(2→7,4→8)–(Epi)Galocatequina



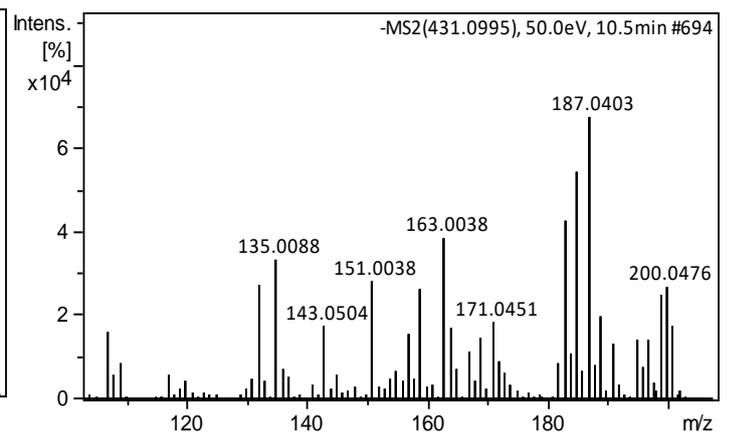
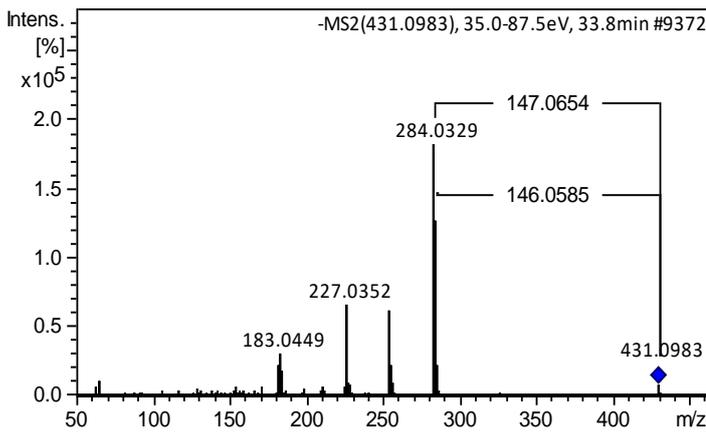
8.6.11 – Caempferol O-derivados

40 – B8 Caempferol-3-O- α -arabinofuranosídeo(Juglanina)

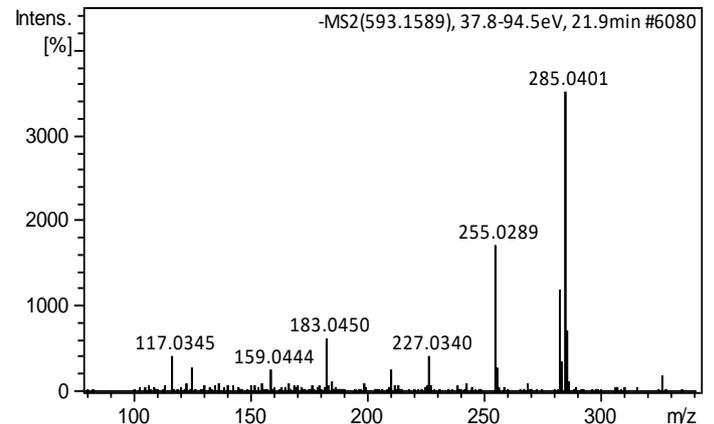
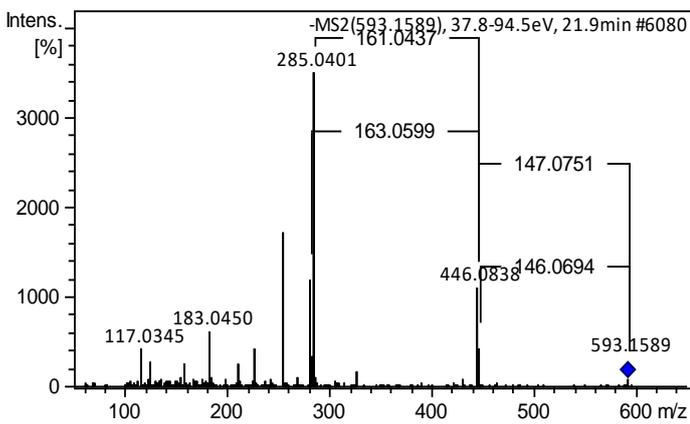




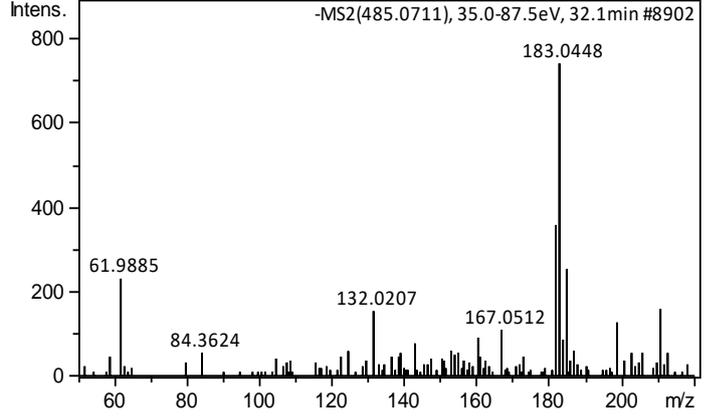
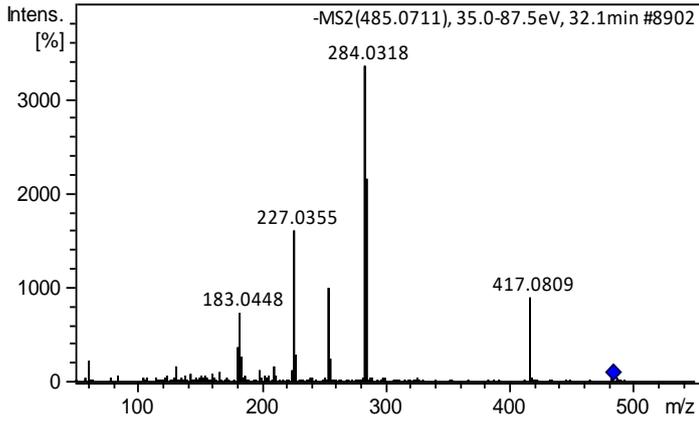
45 – Caempferol-3-O- α -ramnosídeo(Afelzina)



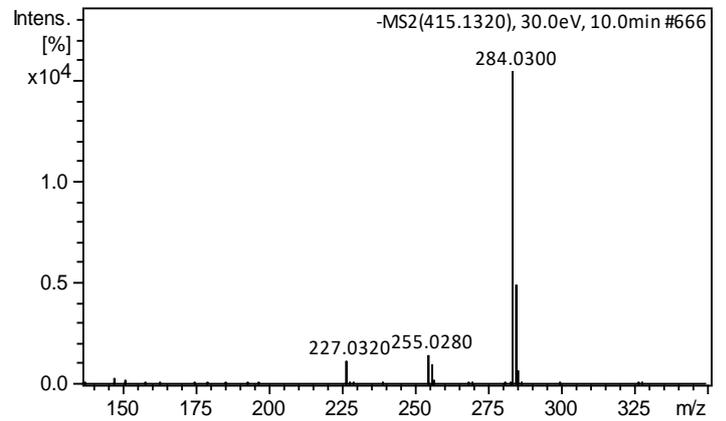
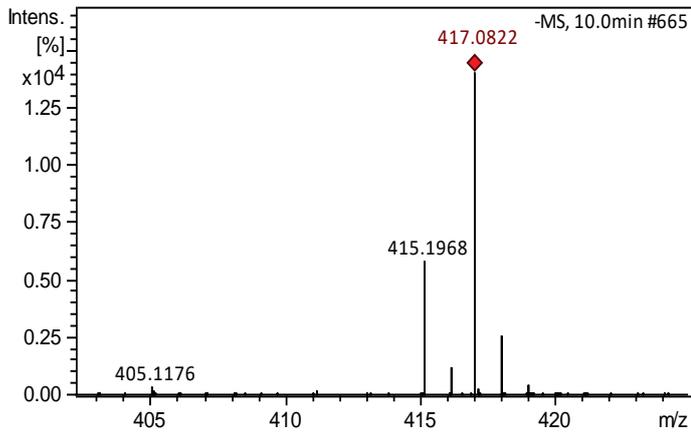
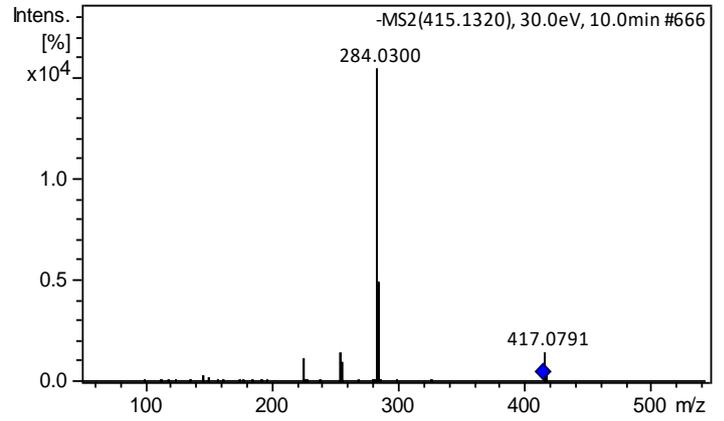
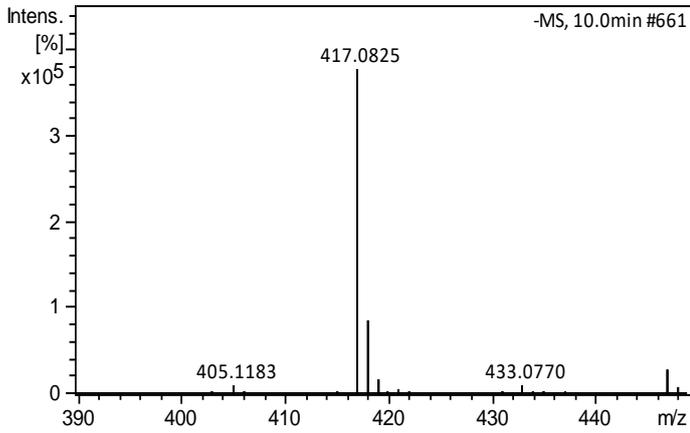
34 – Caempferol-hexosídeo-deoxihexosídeo



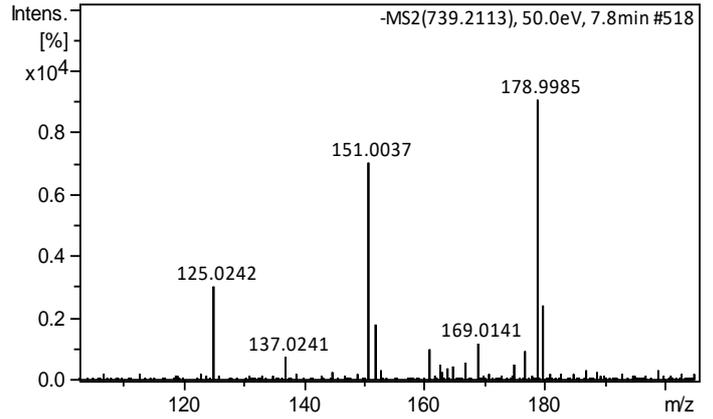
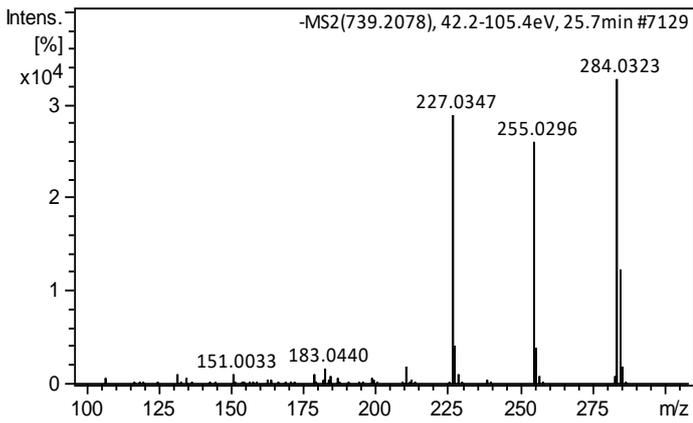
41 – Caempferol–200



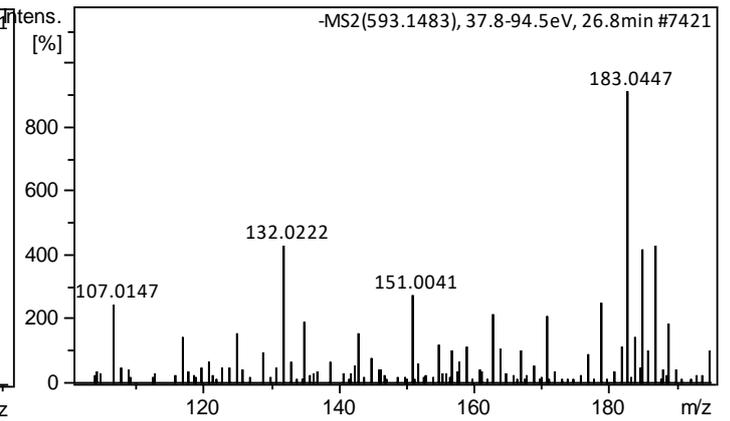
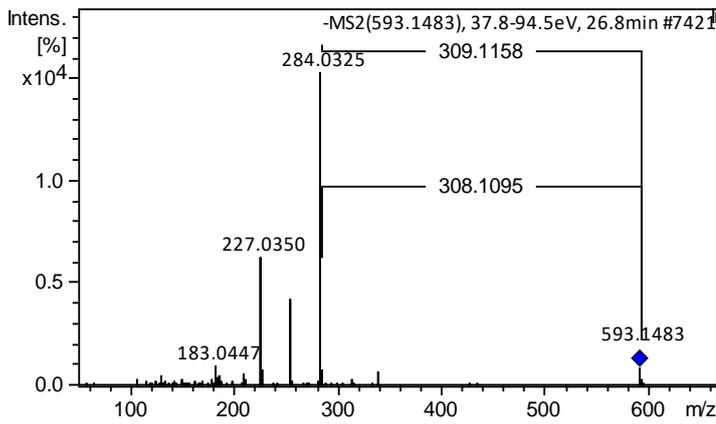
97 – Caempferol–133



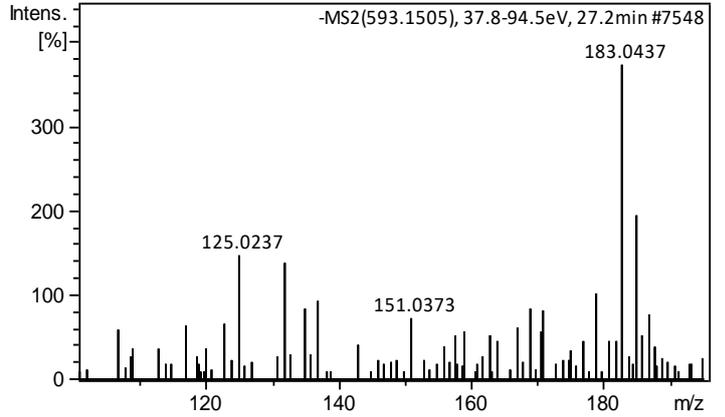
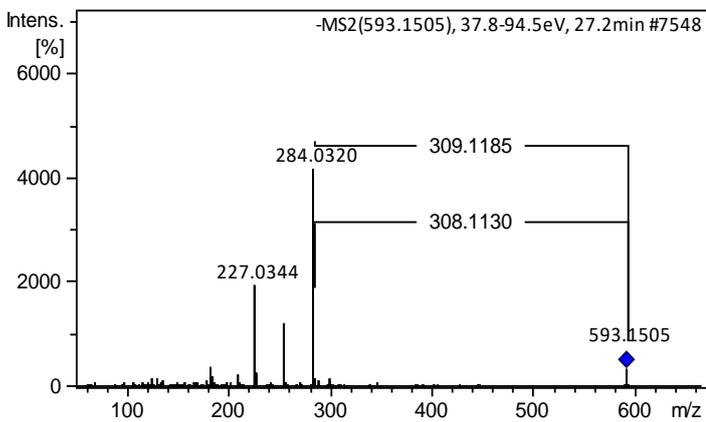
35 – Caempferol–454



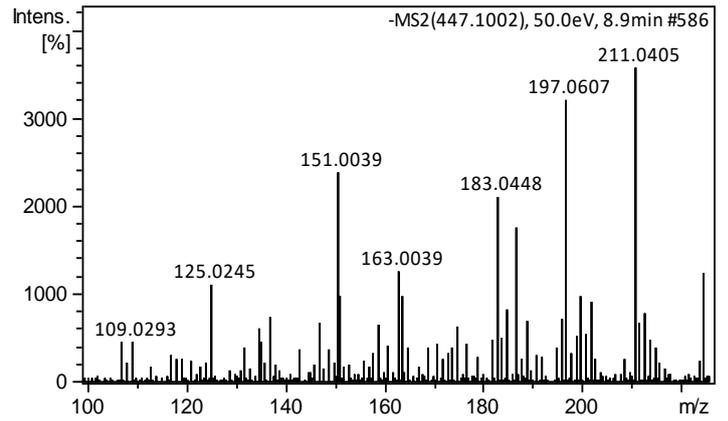
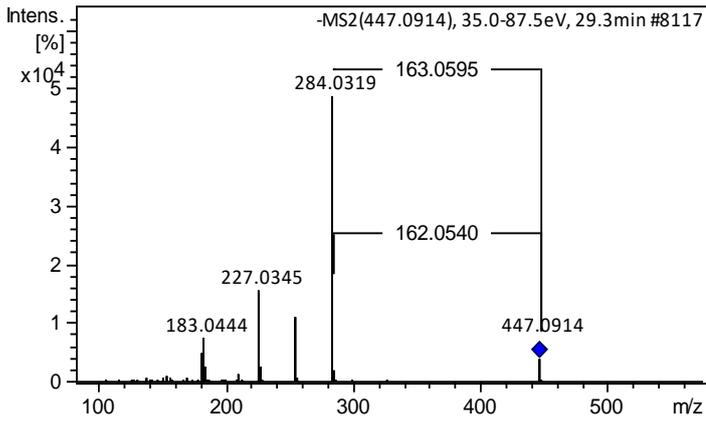
36 – Caempferol–308(I)



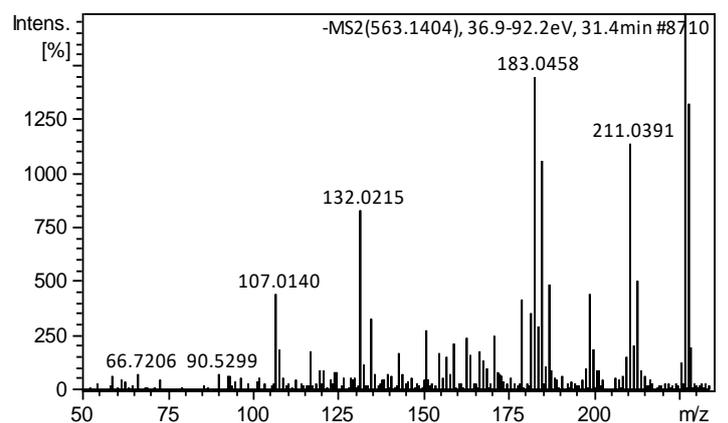
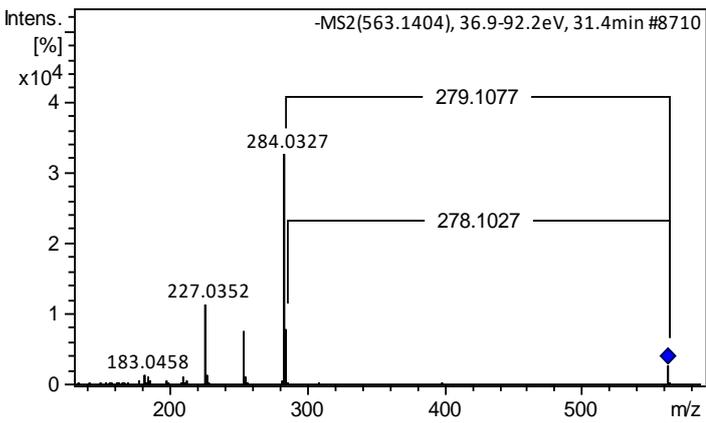
37 – Caempferol–308(II)



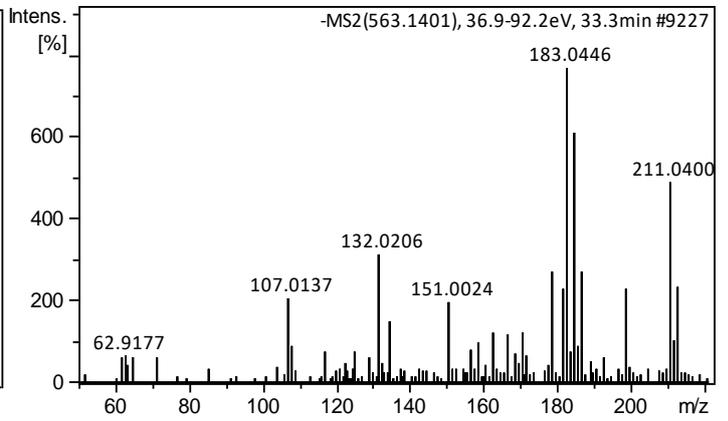
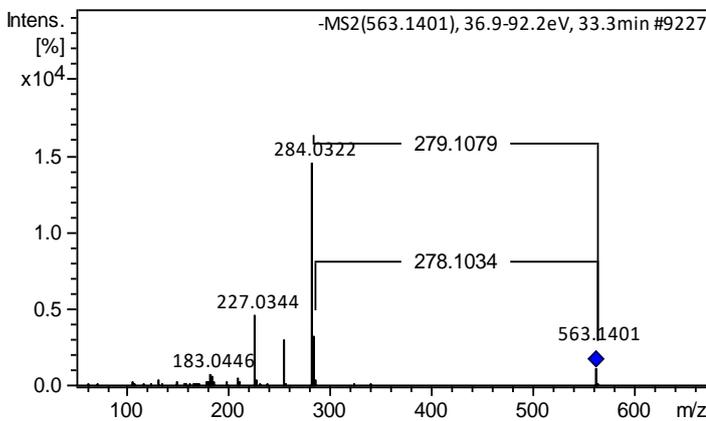
38 – Caempferol–deoxihexosídeo



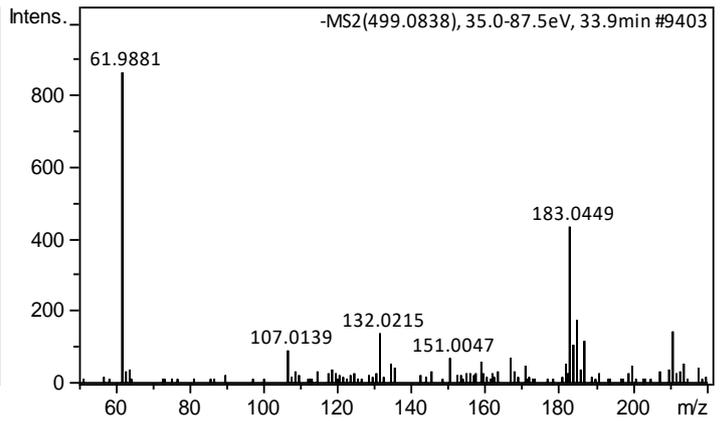
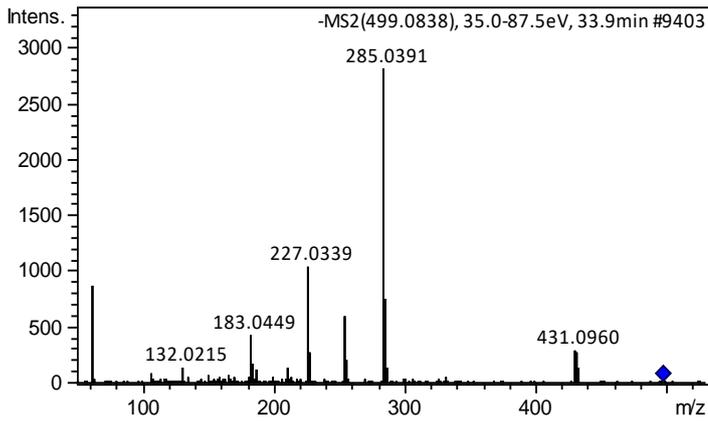
39 – Caempferol–278(I)



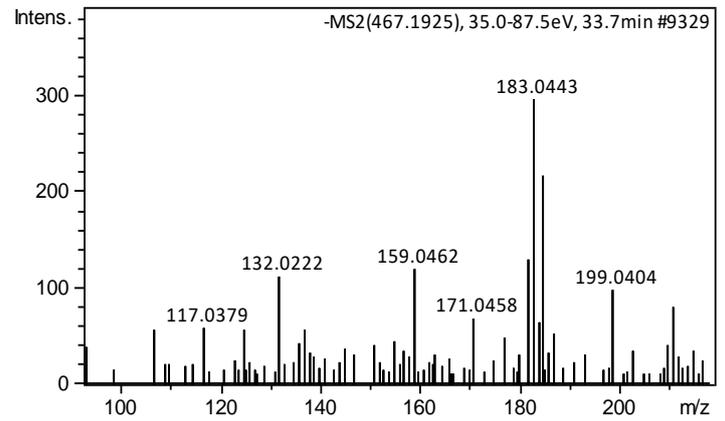
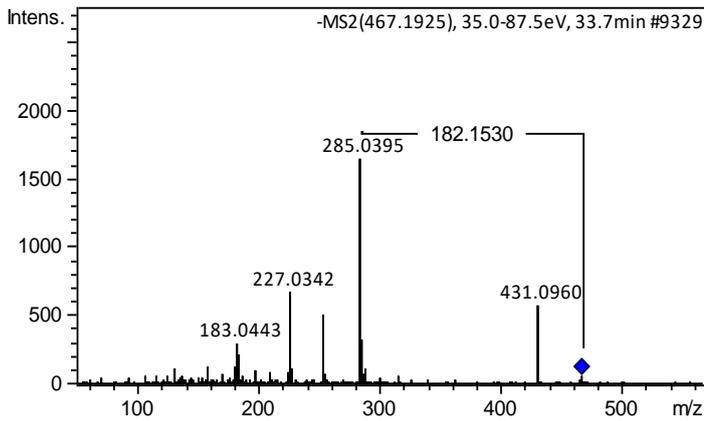
42 – Caempferol–278(II)



43 – Caempferol–214

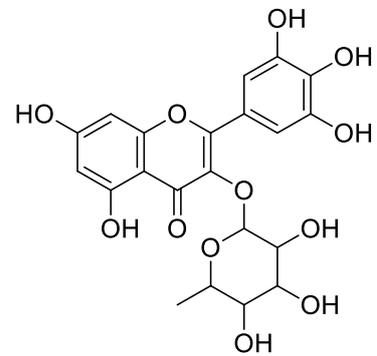
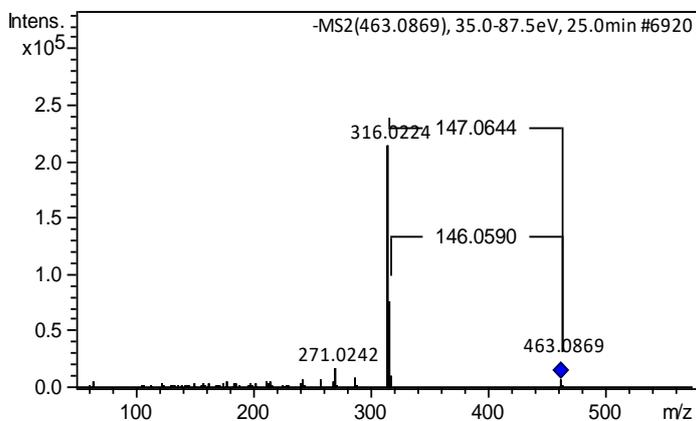


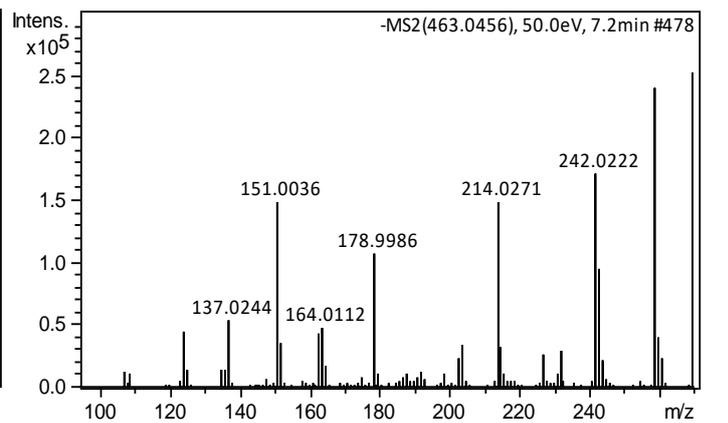
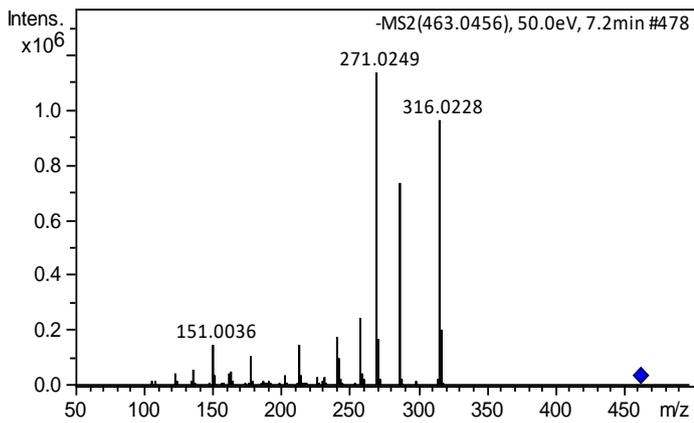
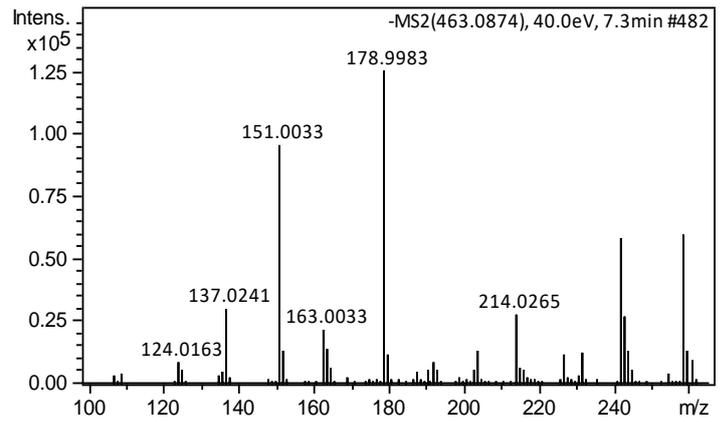
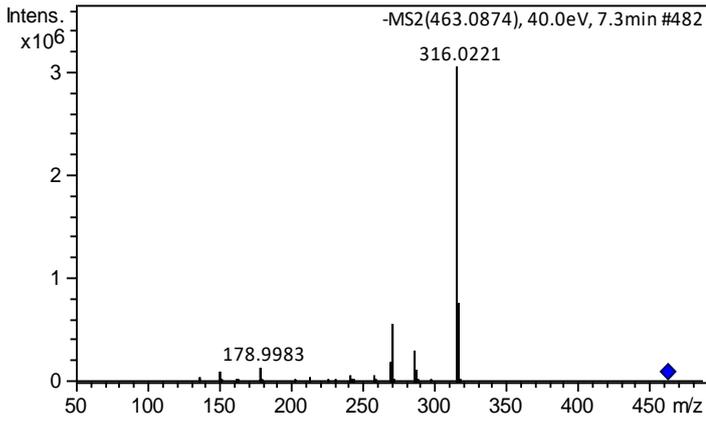
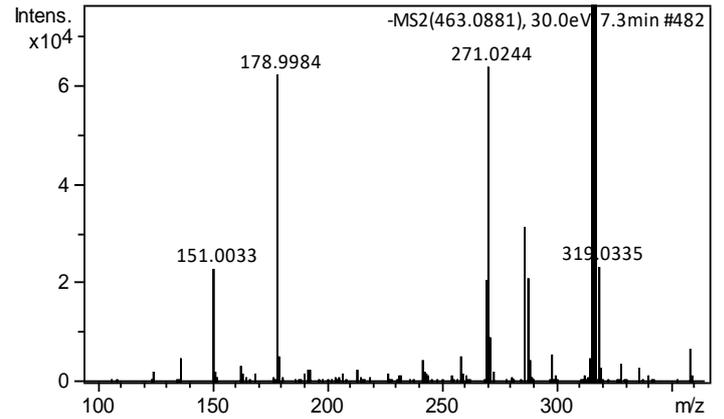
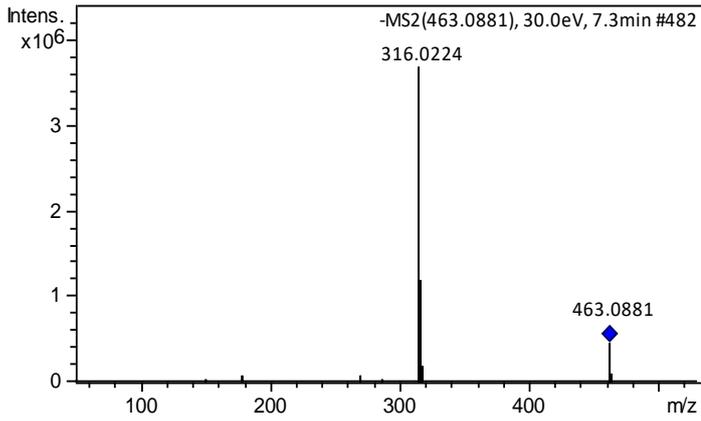
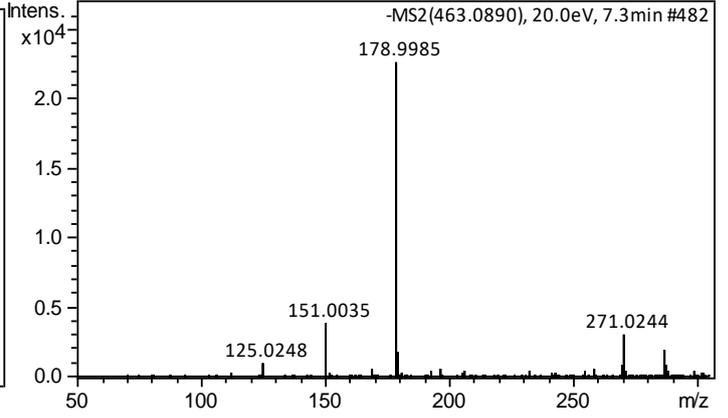
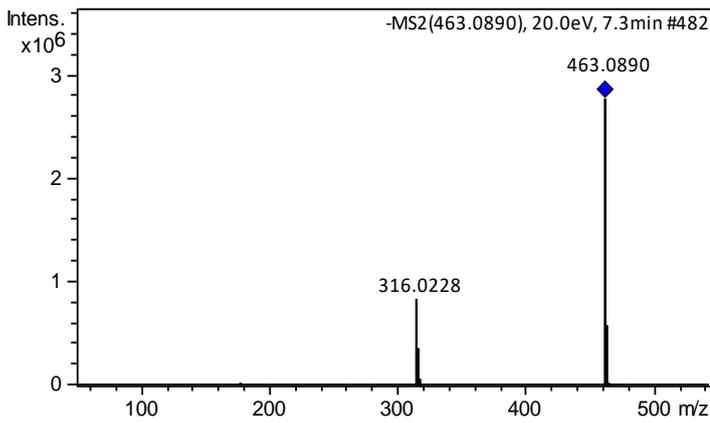
44 – Caempferol–182



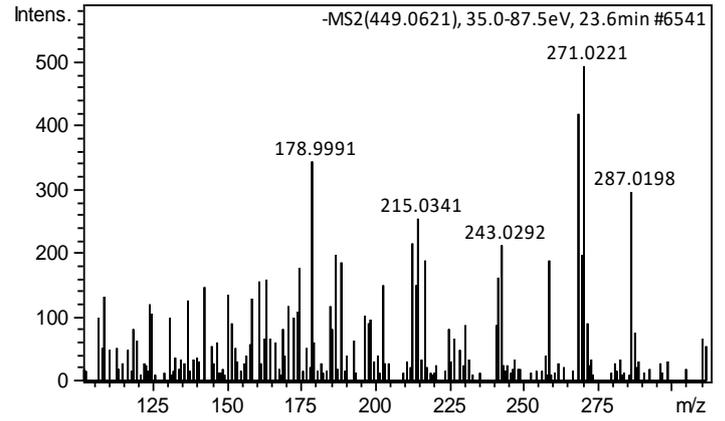
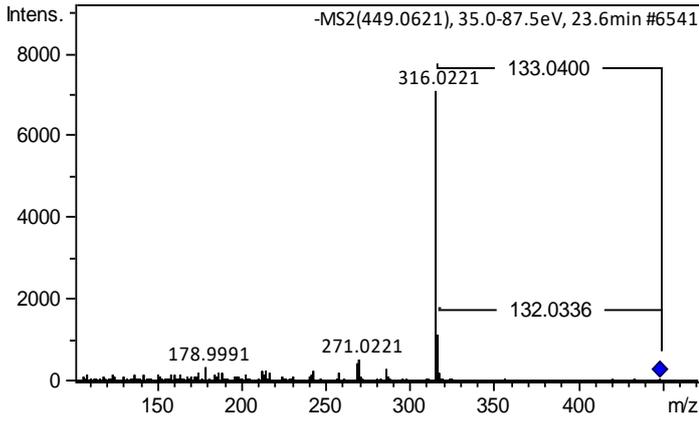
8.6.12 – Miricetina O-derivados

54 – Miricitrina(B4) – Miricetina–3–O–ramnosideo

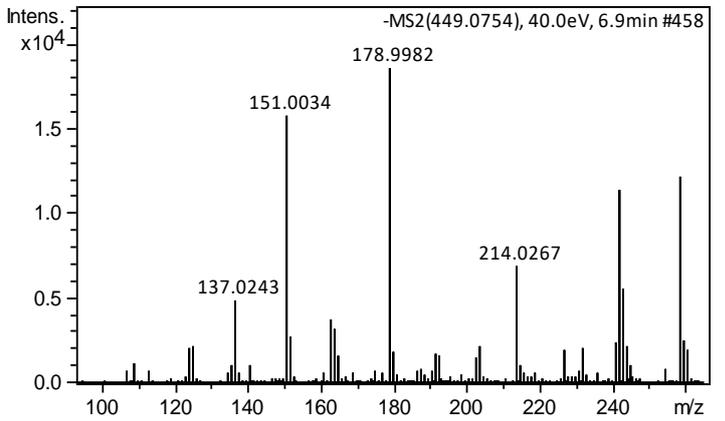
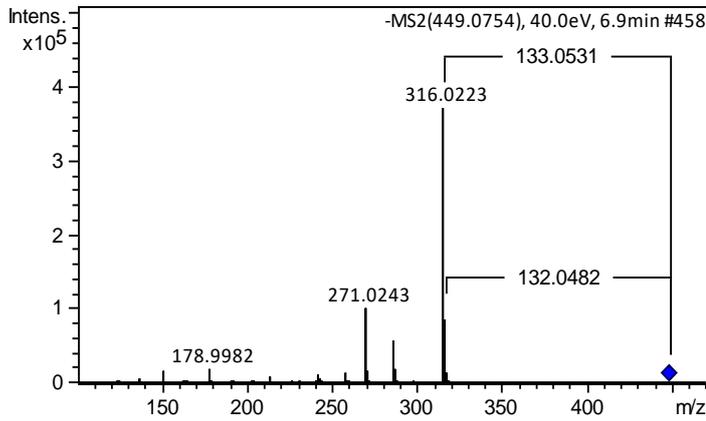




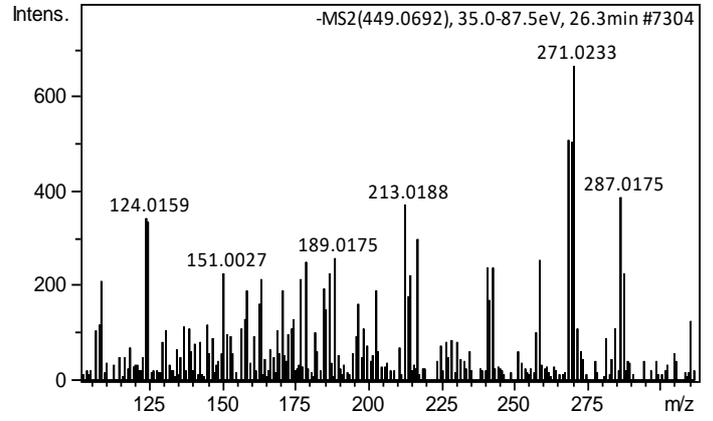
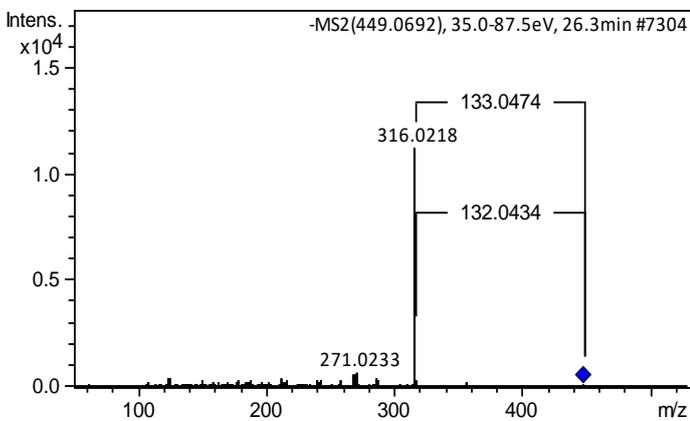
48 – Miricetina–pentosídeo(I)



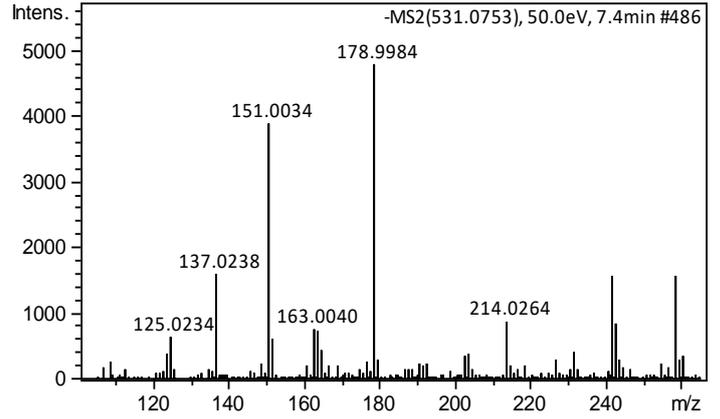
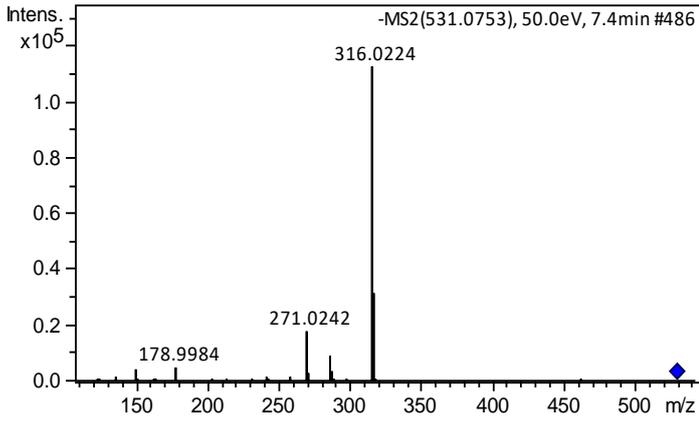
51 – Miricetina–pentosídeo(II)



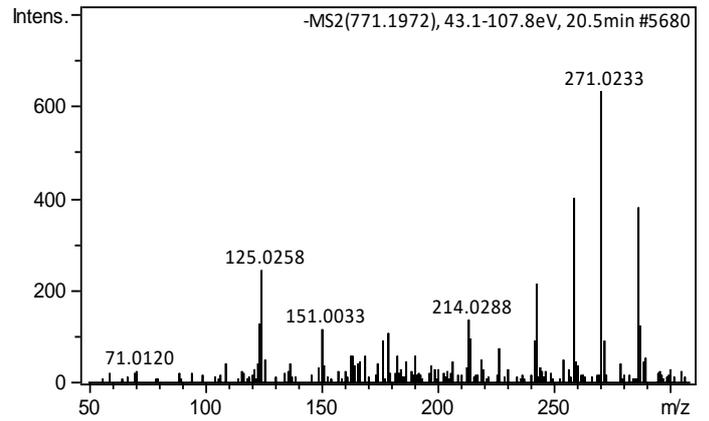
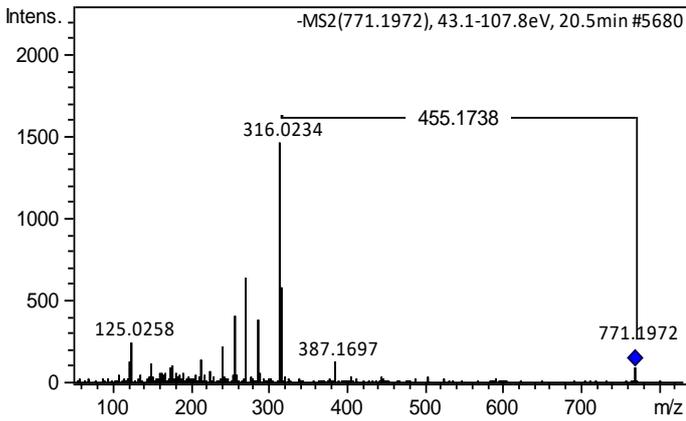
56 – Miricetina–pentosídeo(III)



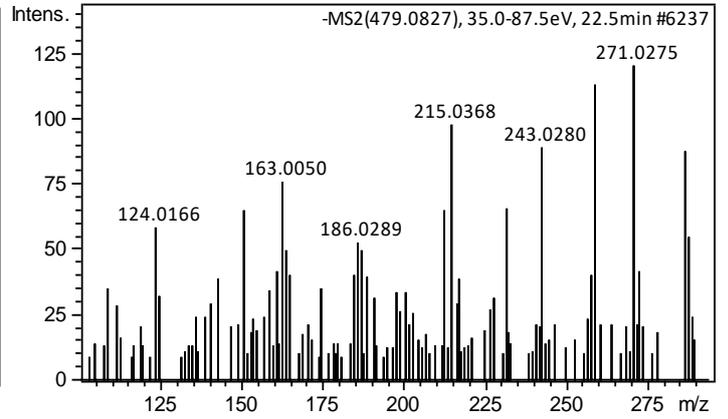
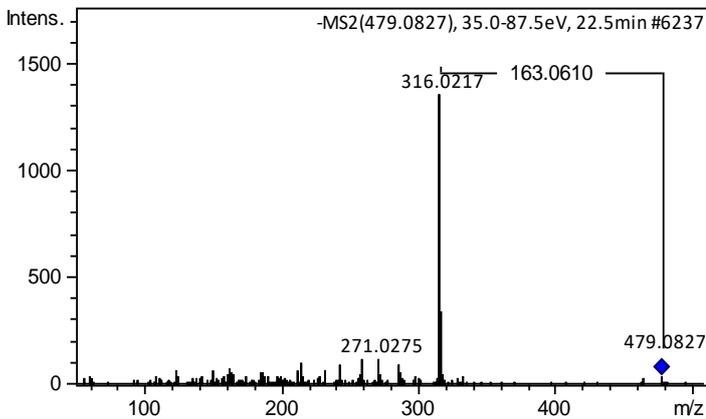
91 – Miricetina–215



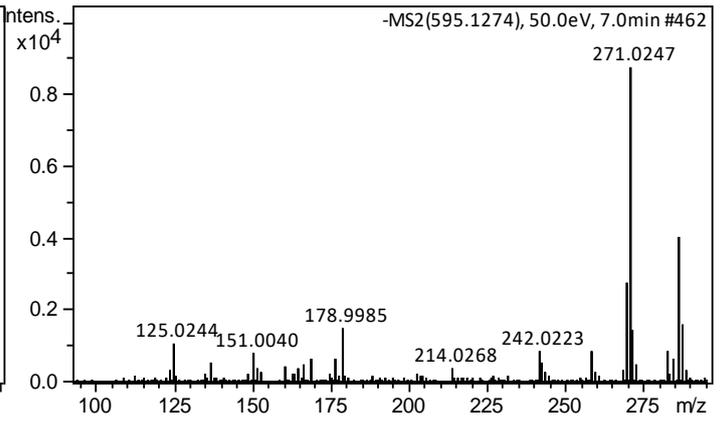
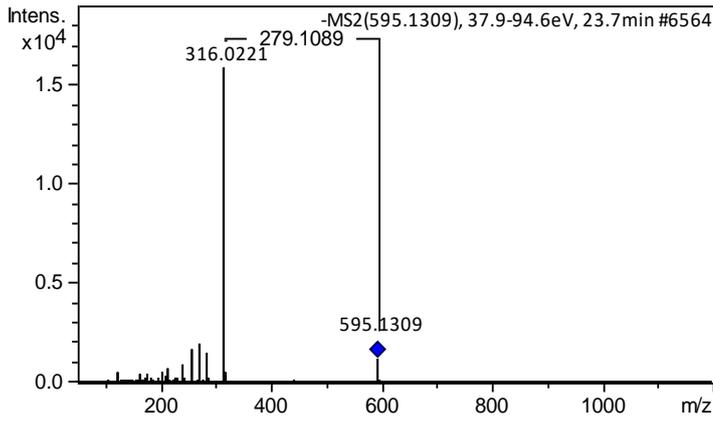
46 – Miricetina–455



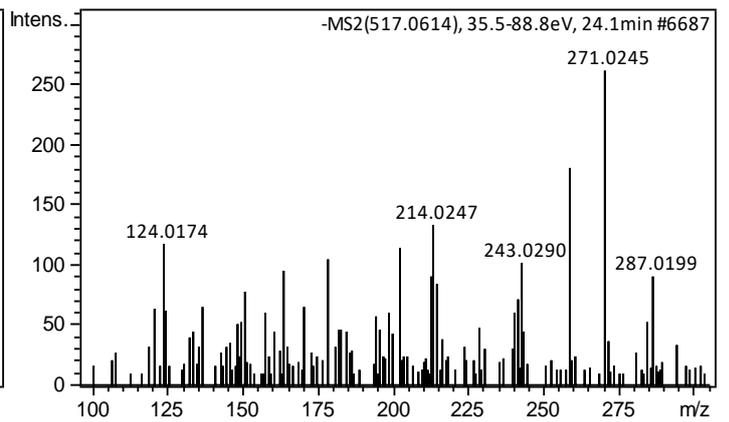
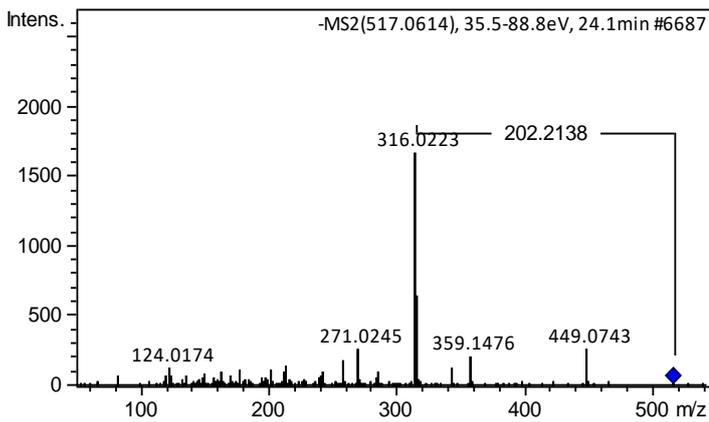
47 – Miricetina–hexosídeo



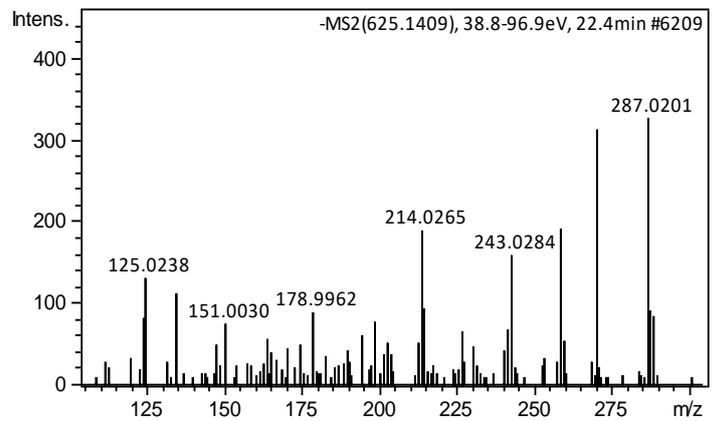
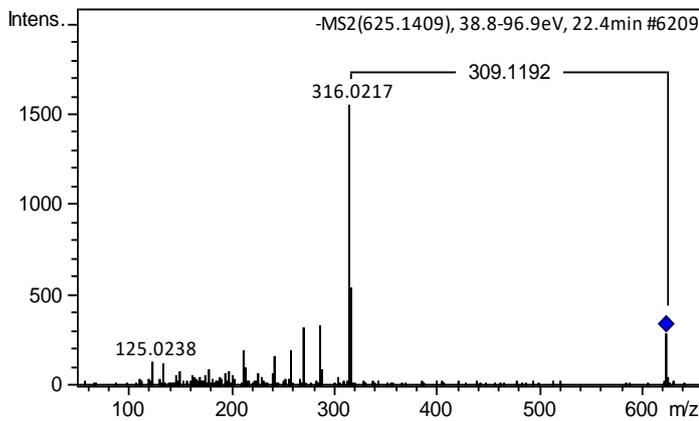
49 – Miricetina–279



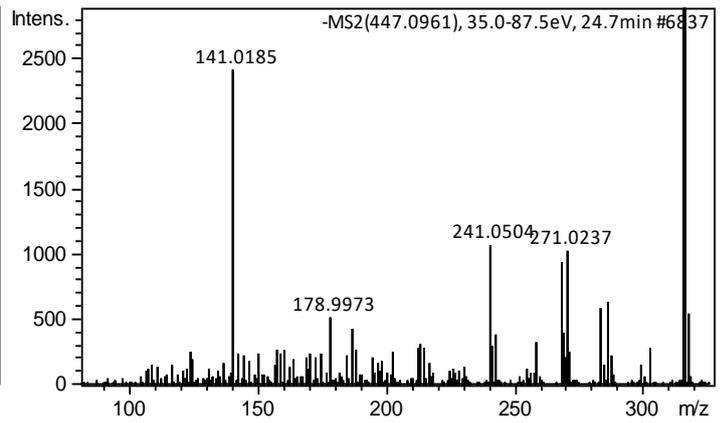
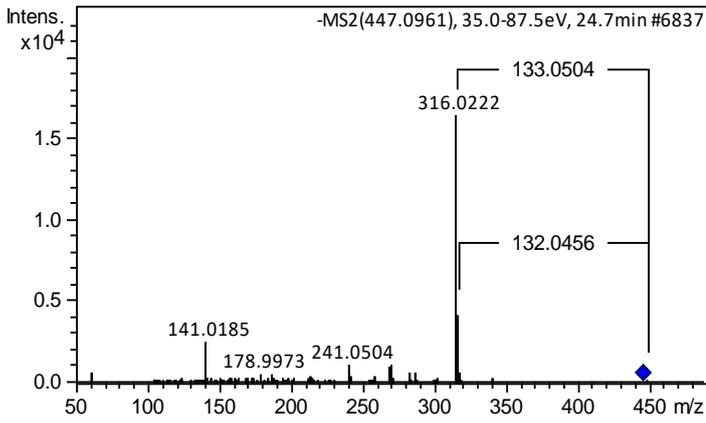
50 – Miricetina–202



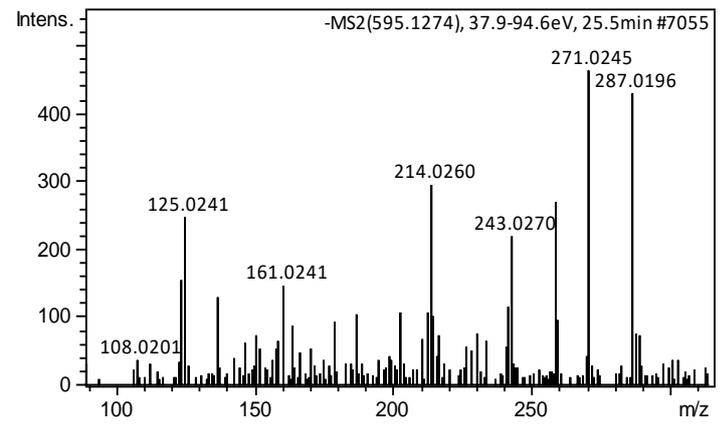
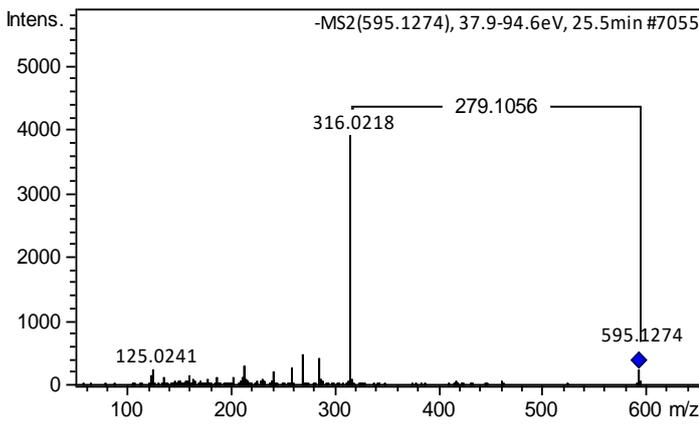
52 – Miricetina–309



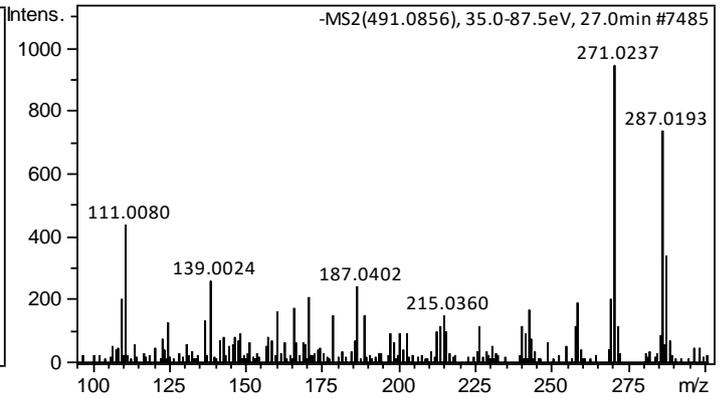
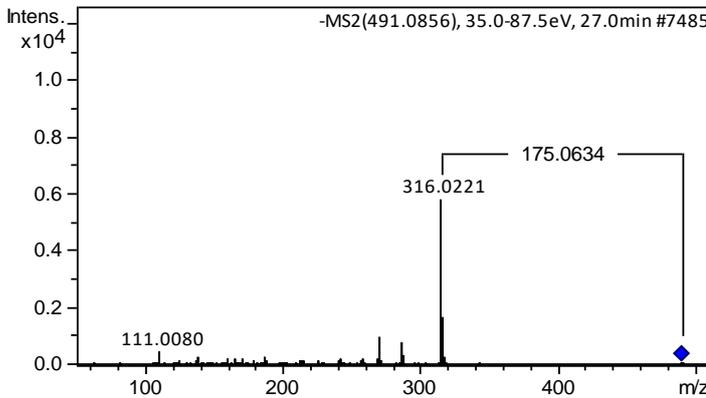
53 – Miricetina–133



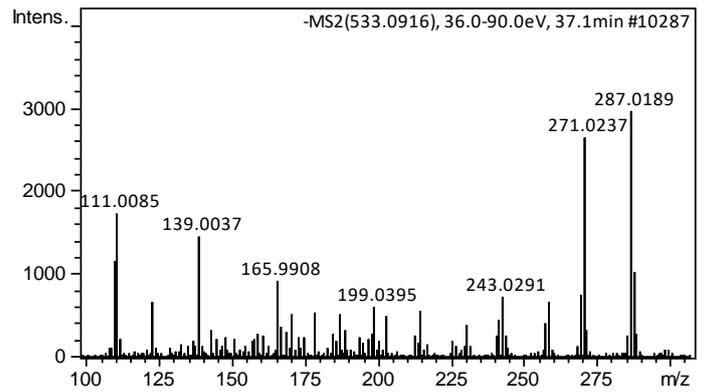
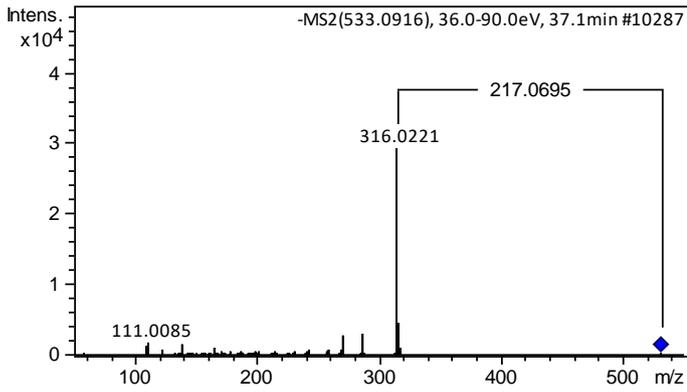
55 – Miricetina–279



57 – Miricetina–175

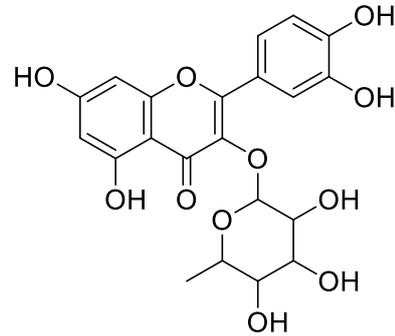
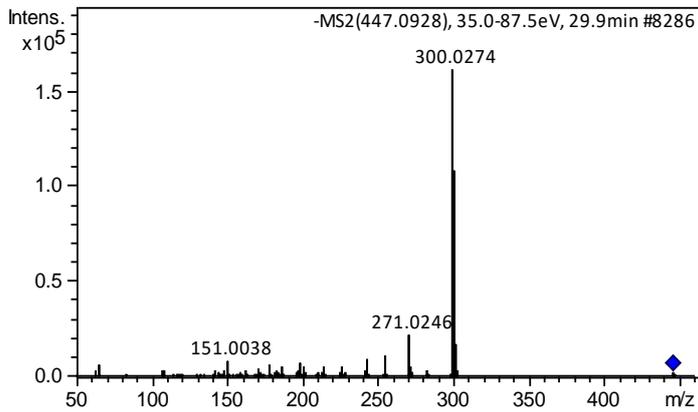


58 – Miricetina–217

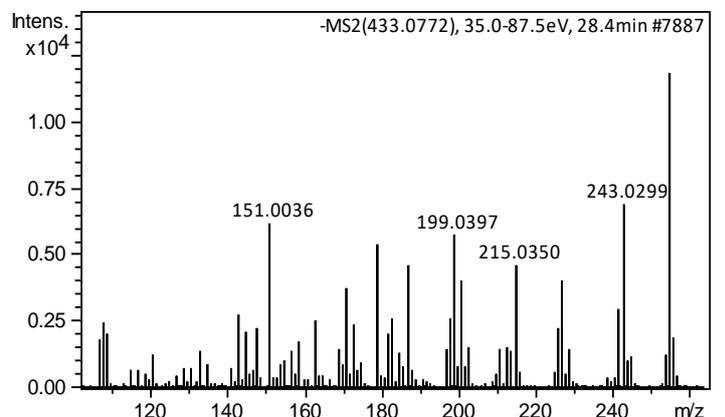
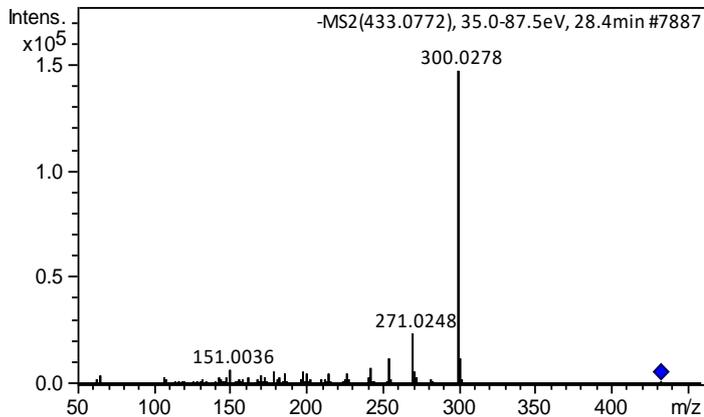


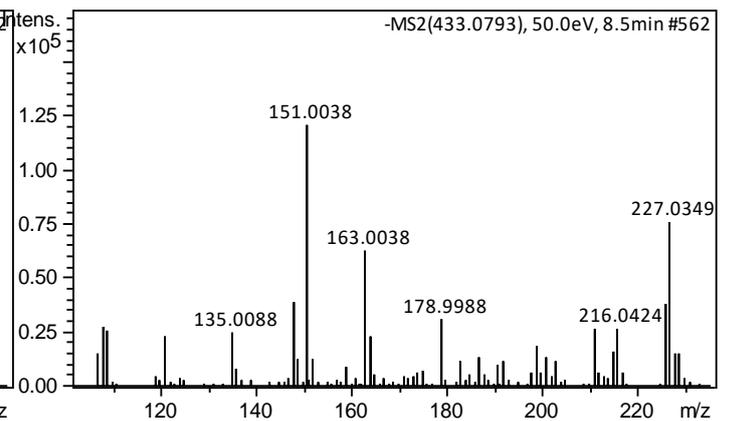
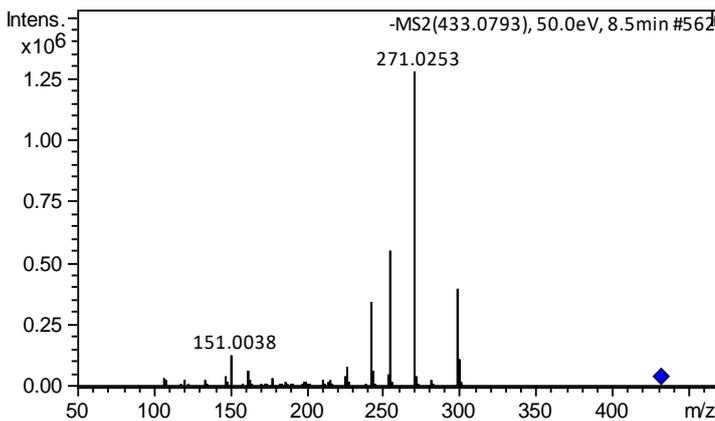
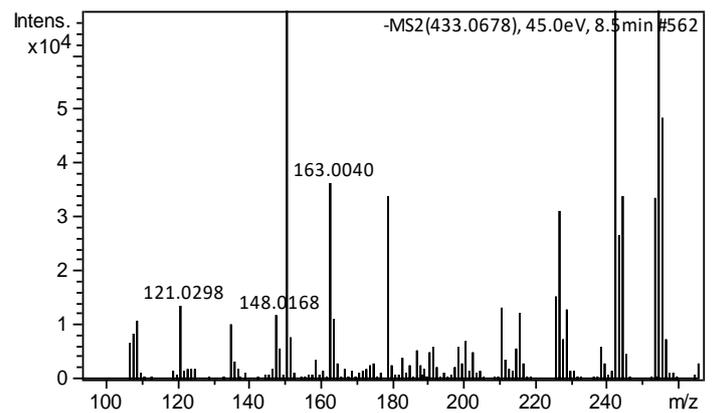
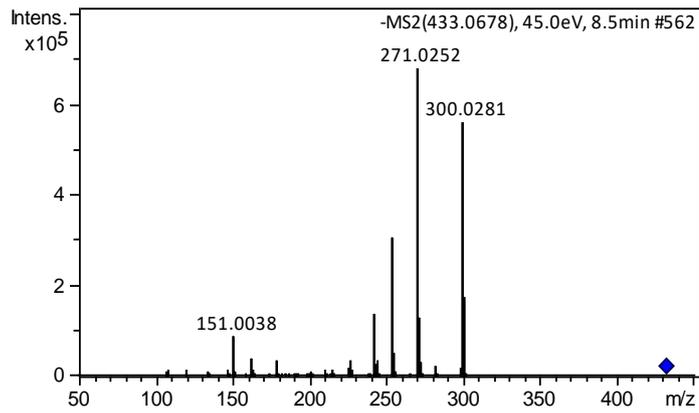
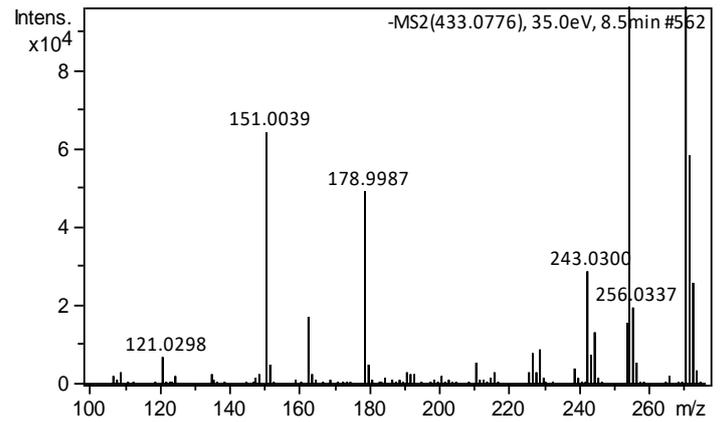
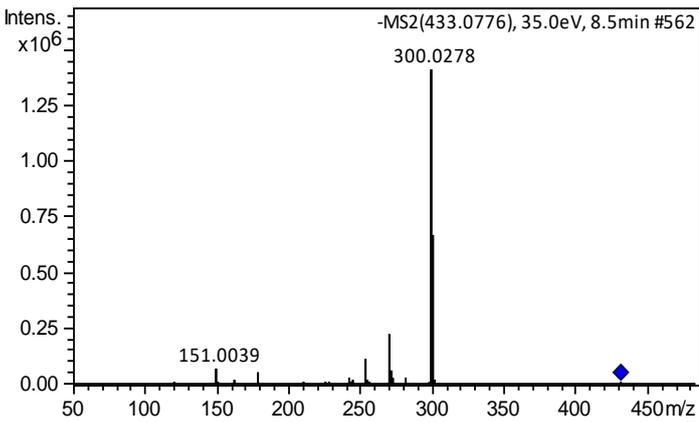
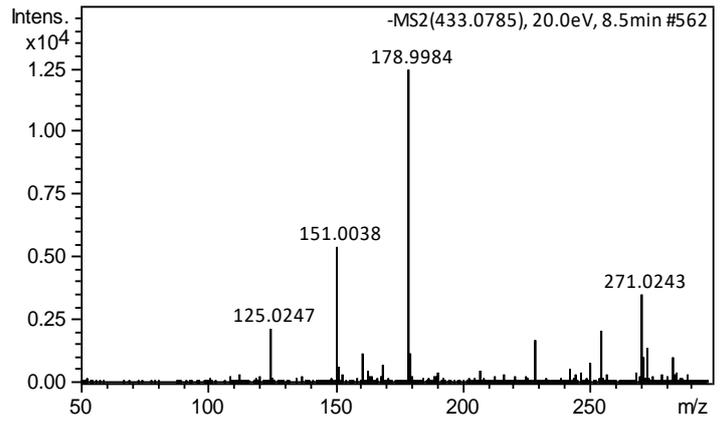
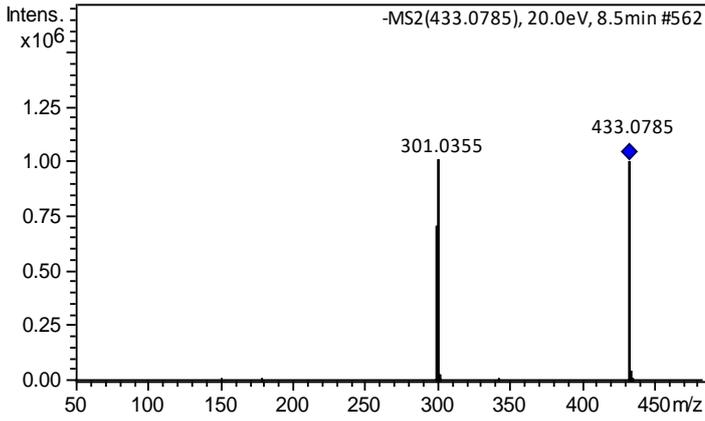
8.6.12 – Quercetina O-derivados

68 – B7 – Quercitrina – Quercetina–3–O–rhamnoside

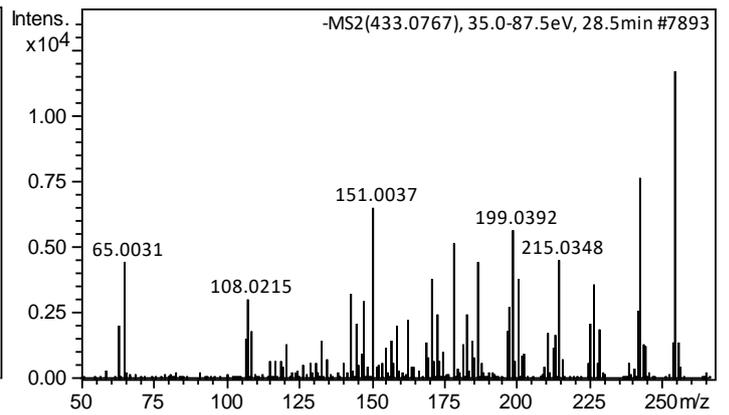
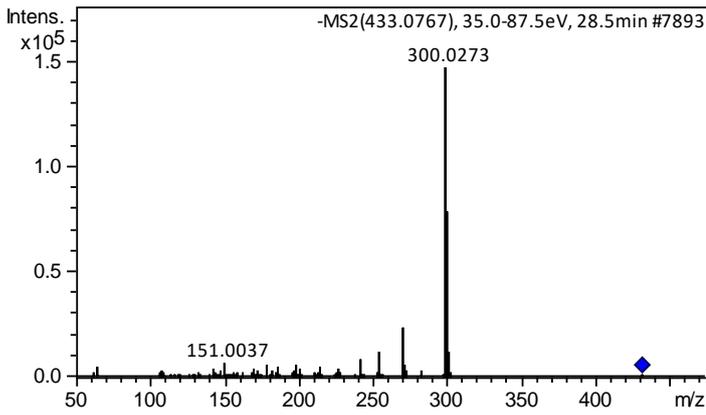


63 – B6 – Avicularina – Quercetina–3–O–arabinofuranosideo

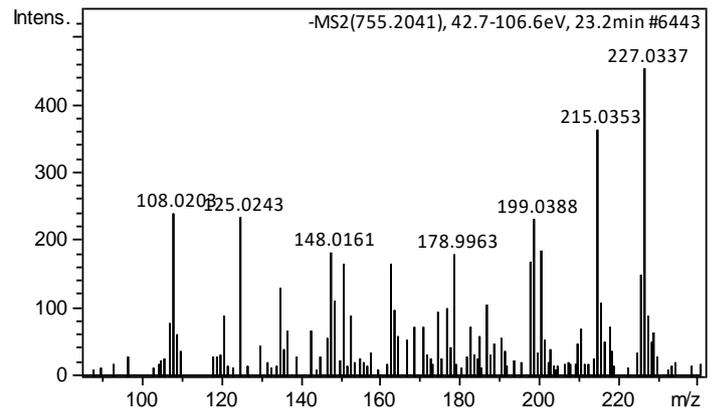
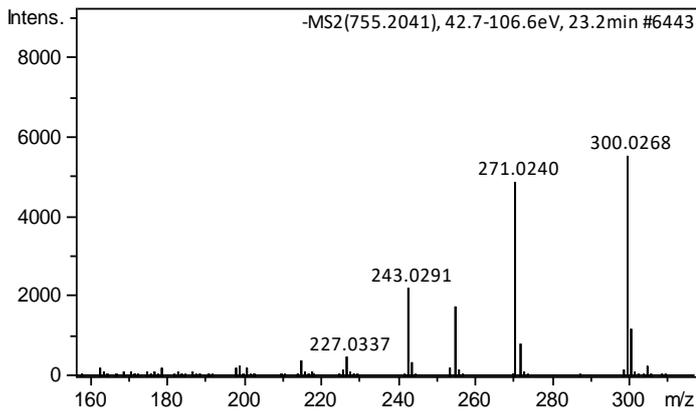




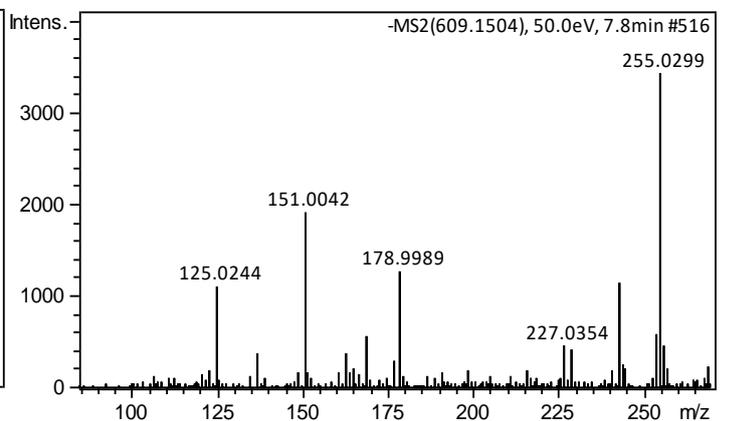
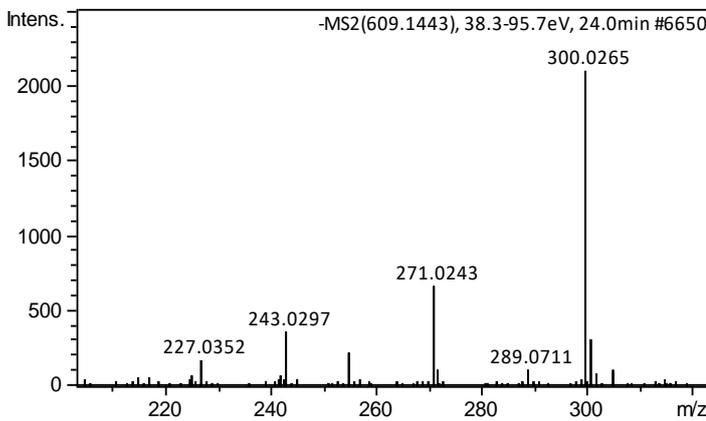
69 – Quercetina–pentosídeo



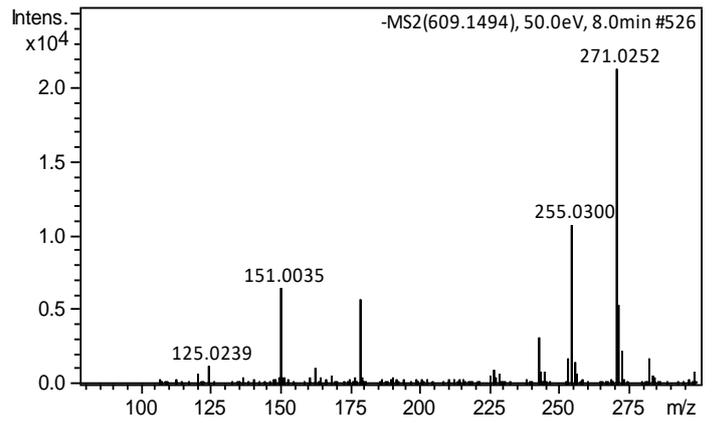
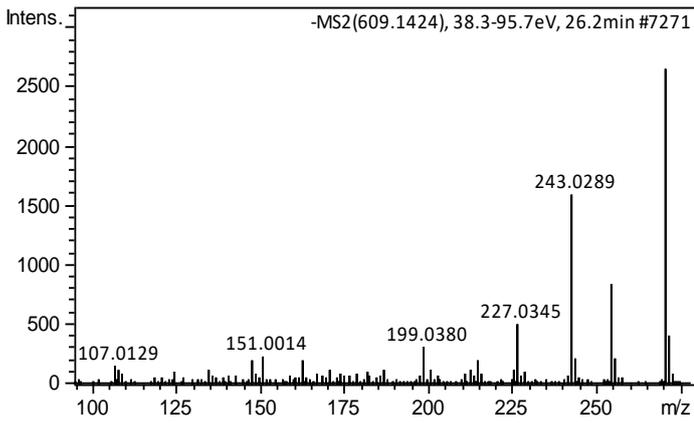
59 – Quercetina–455



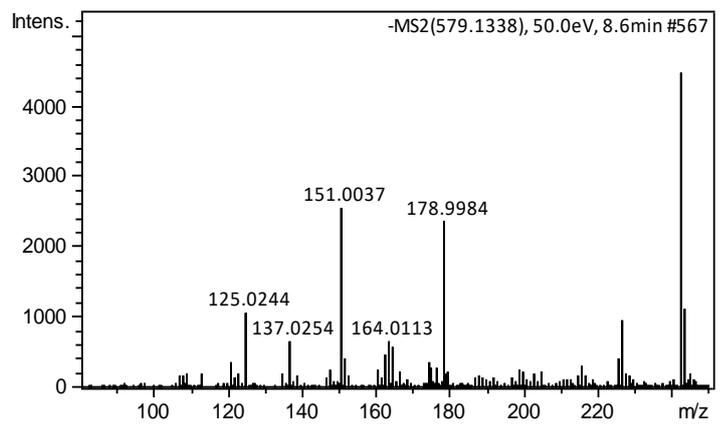
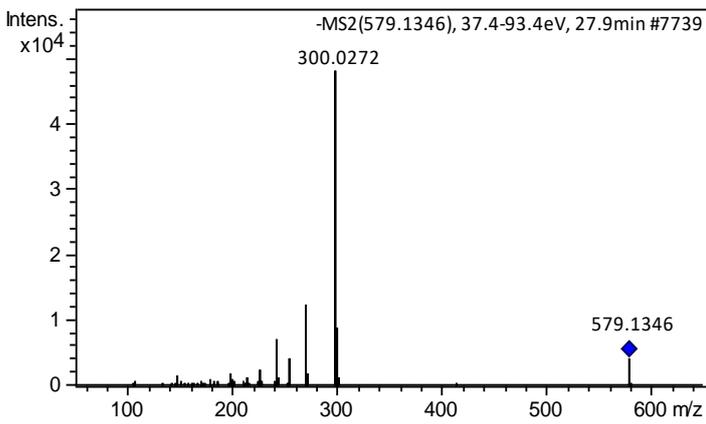
60 – Quercetina–309 (I)



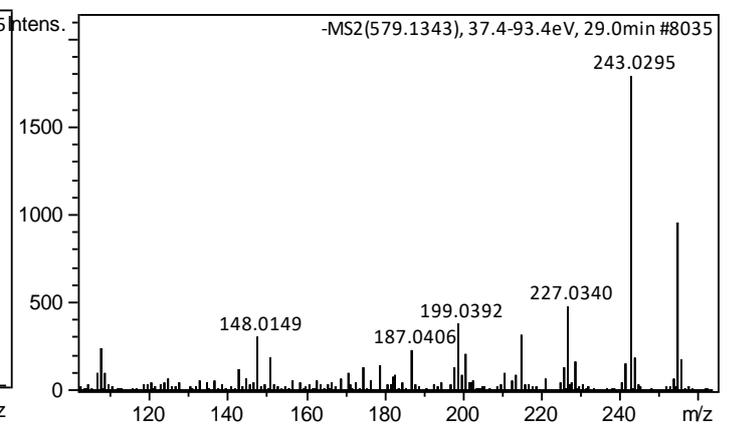
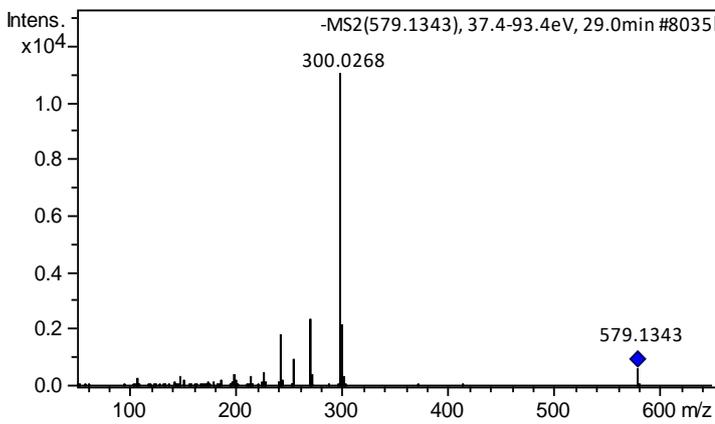
61 – Quercetina–309 (II)



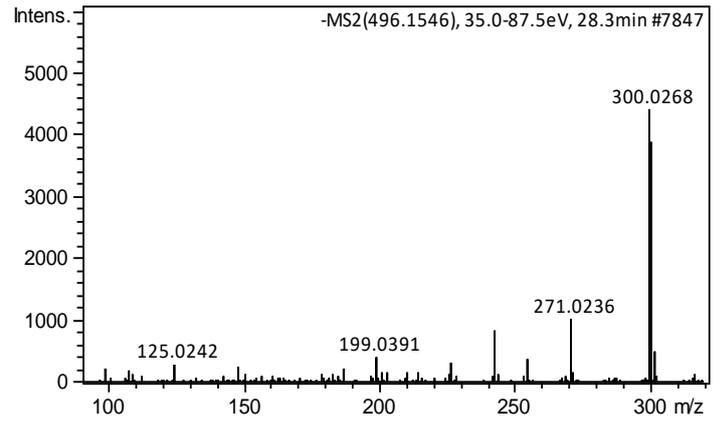
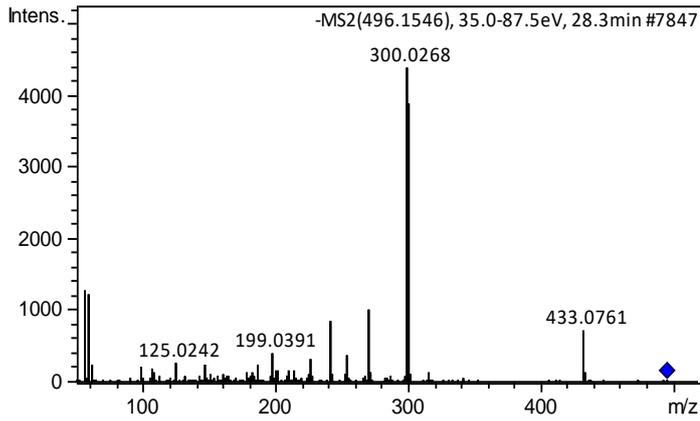
62 – Quercetina–279(I)



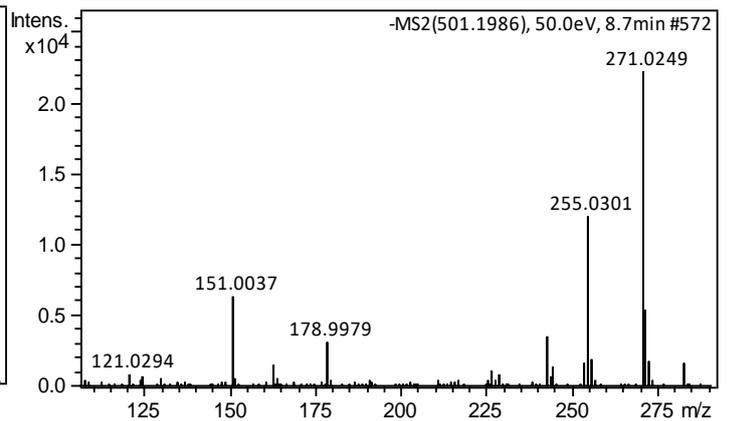
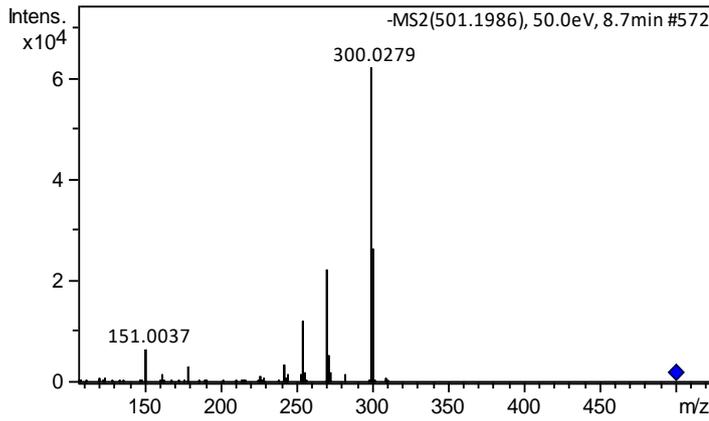
66 – Quercetina–279(II)



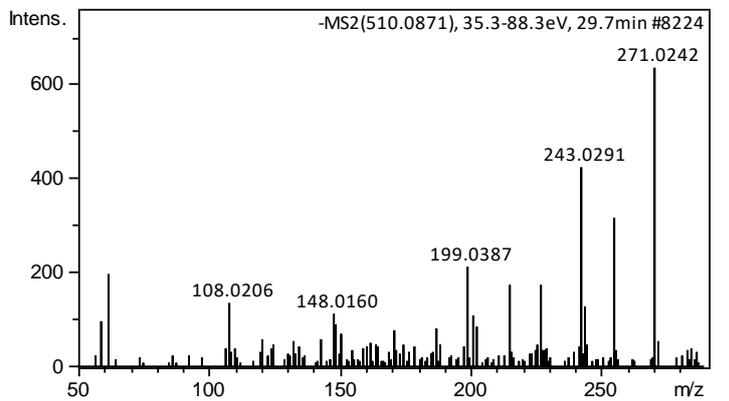
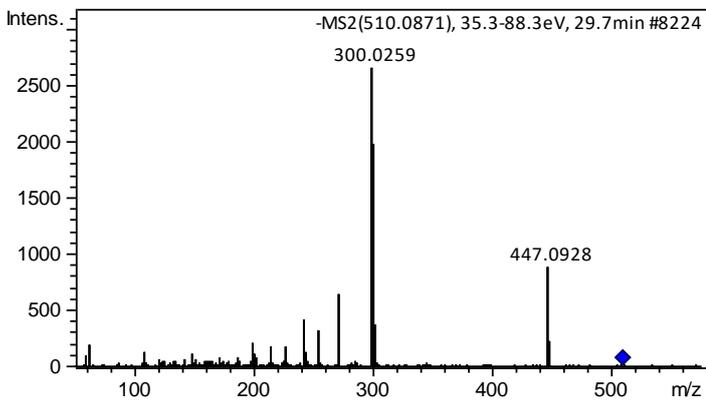
64 – Quercetina–196



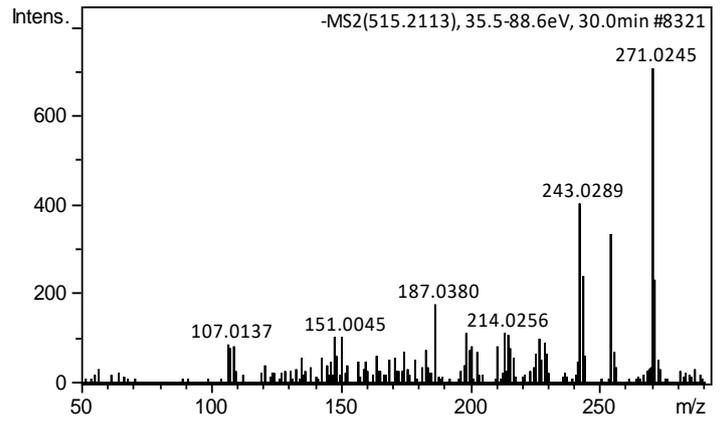
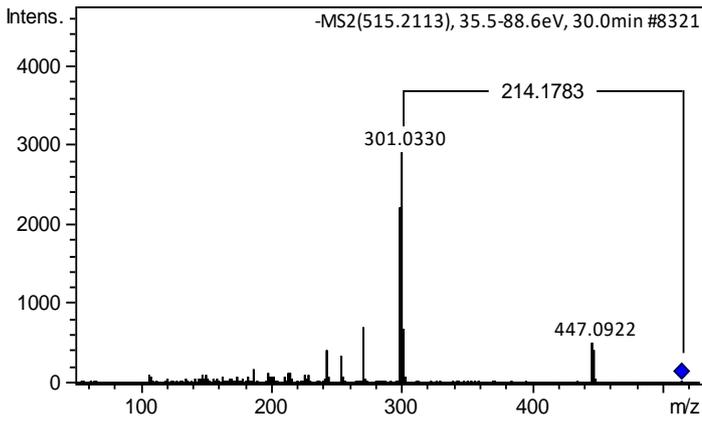
65 – Quercetina–201



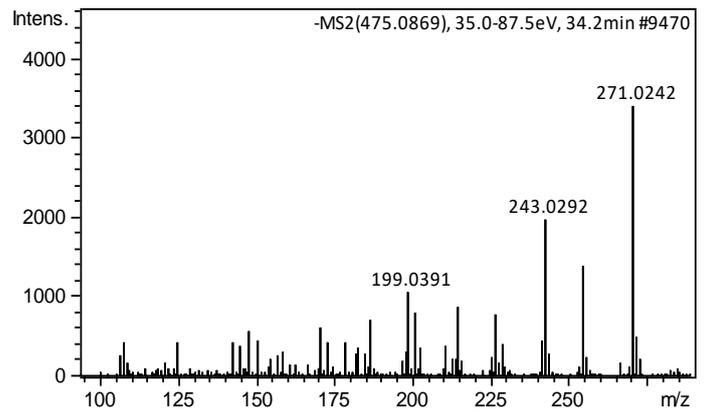
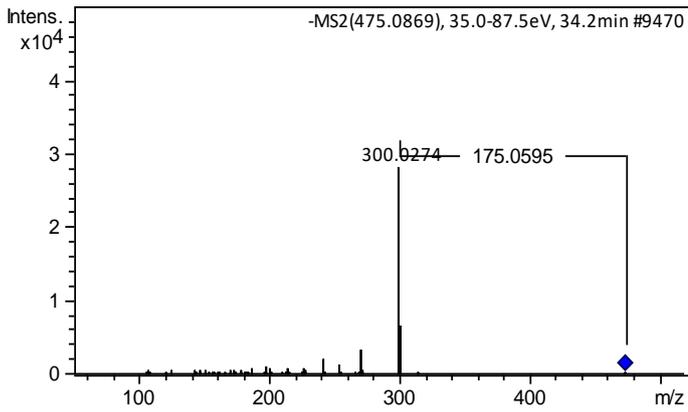
67 – Quercetina–210



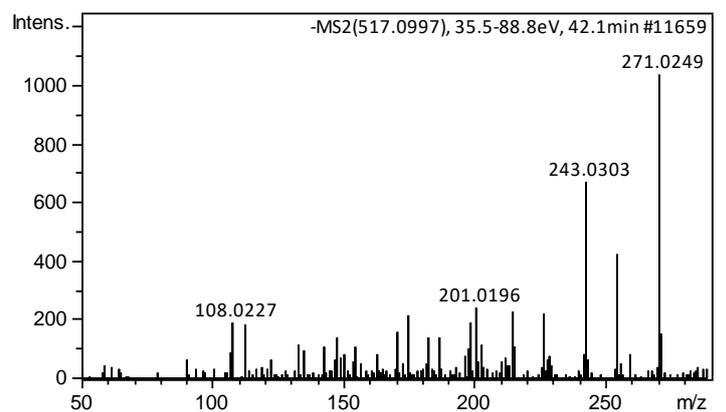
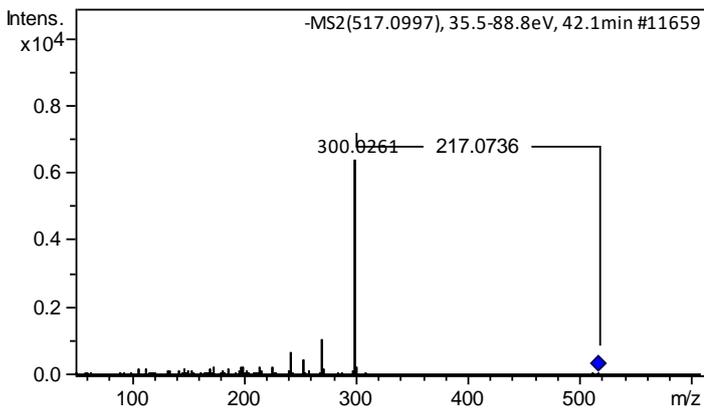
70 – Quercetina–214



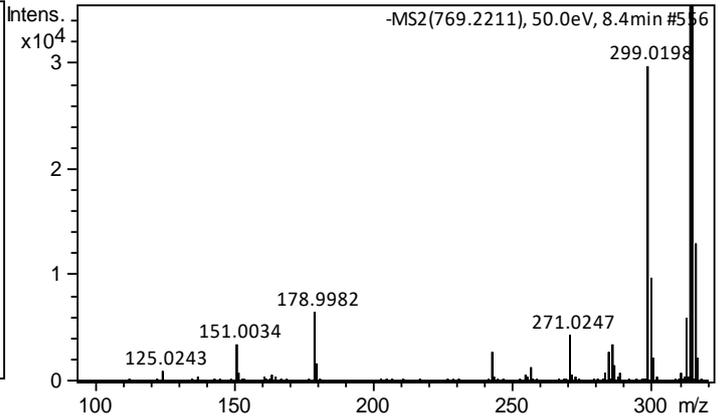
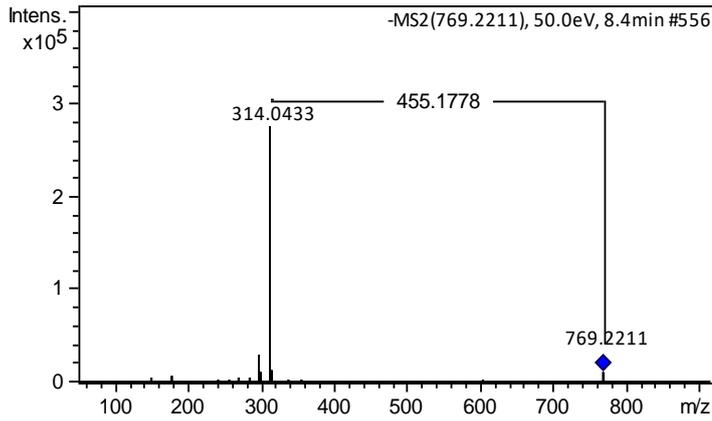
71 – Quercetina–175



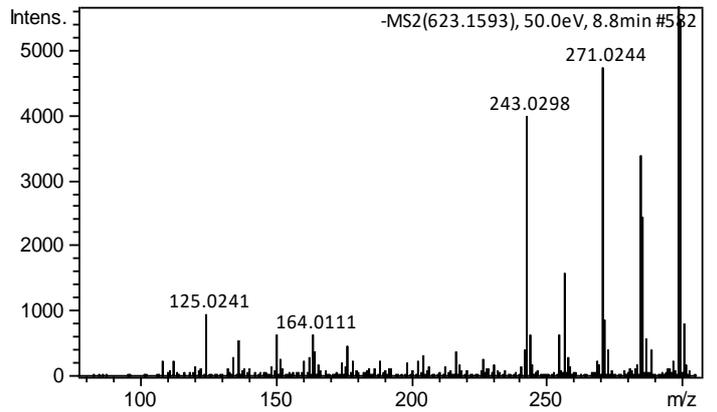
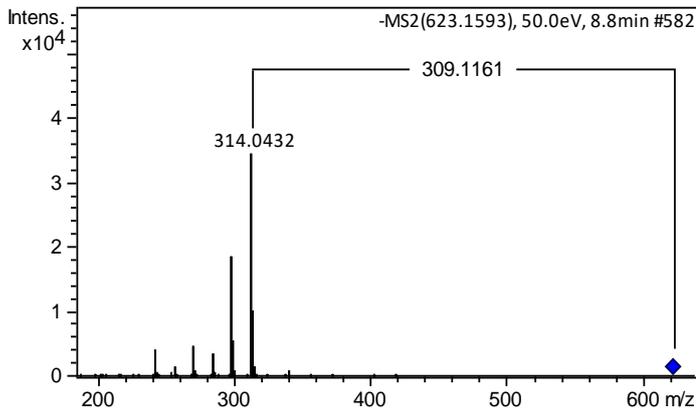
72 – Quercetina–217



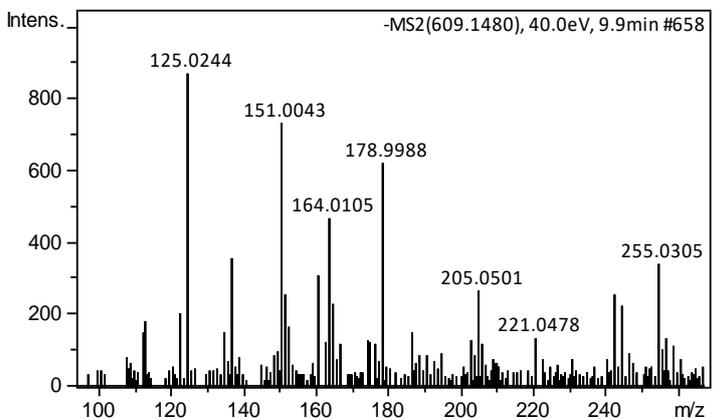
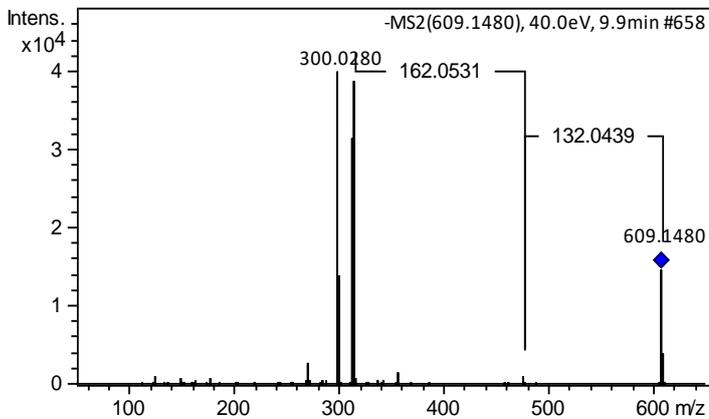
95 – Metilquercetina–455



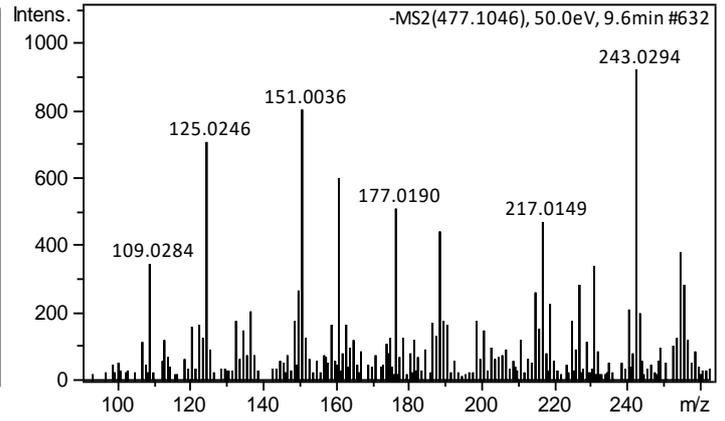
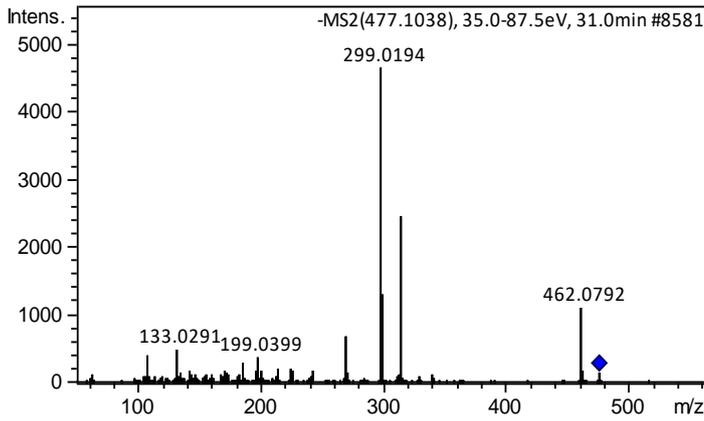
96 – Metilquercetina–309



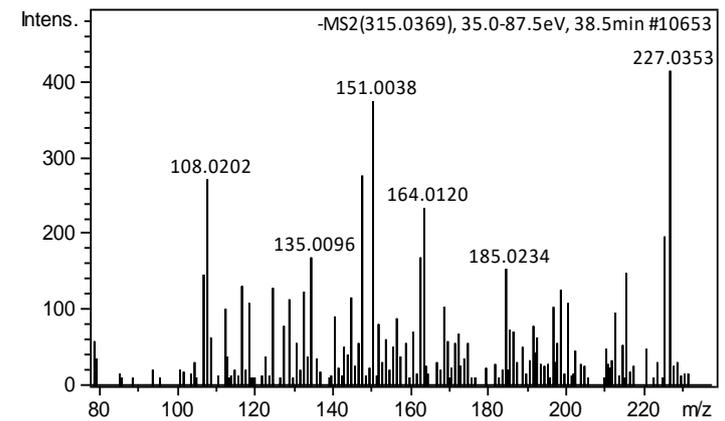
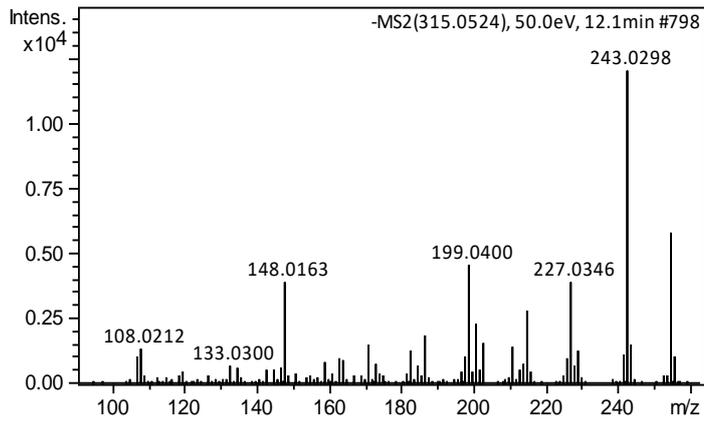
98 – Metilquercetina–hexose–pentose



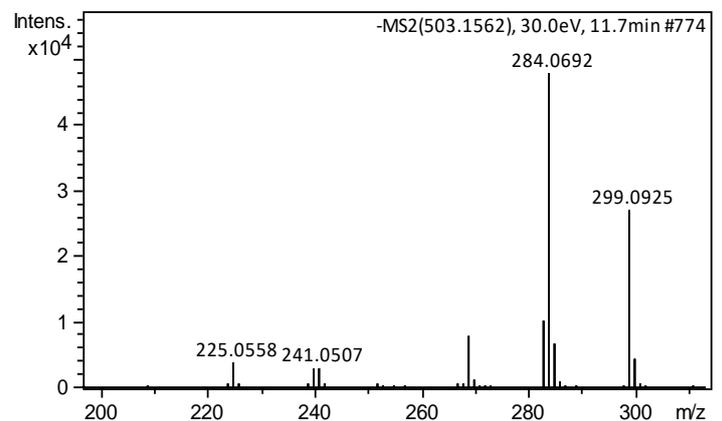
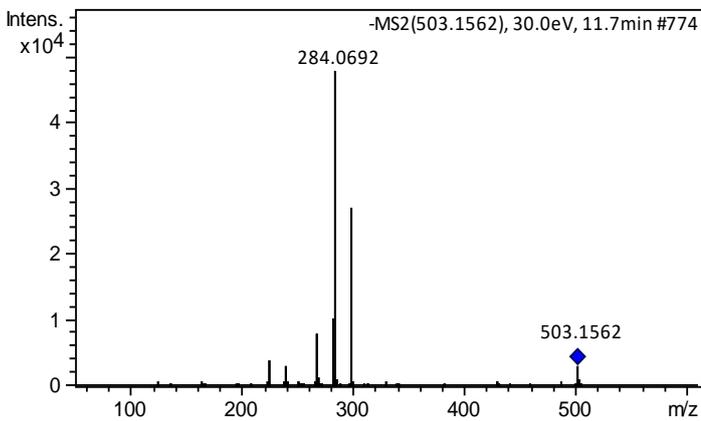
73 – Metilquercetina–hexosídeo



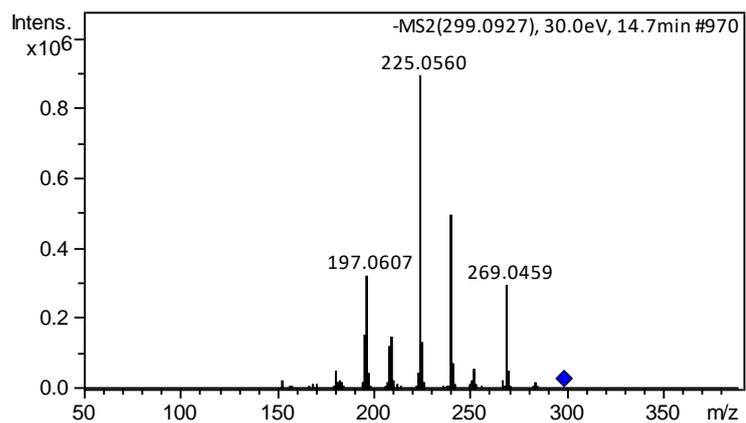
74 – Metilquercetina



99 – 7,4'–Dimetoxi–5–hidroxiflavanona–203



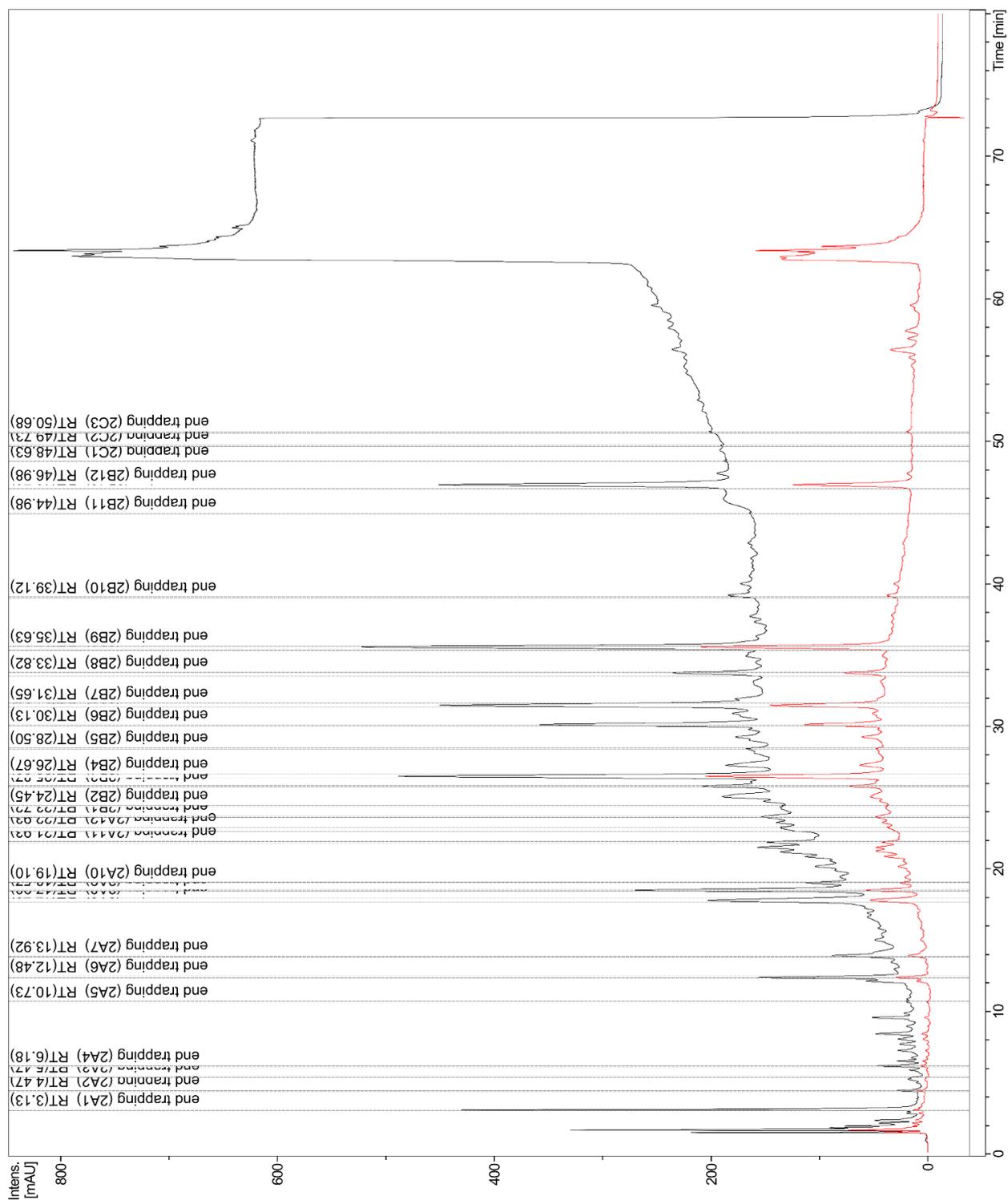
75 – Bauhiniastatina 2



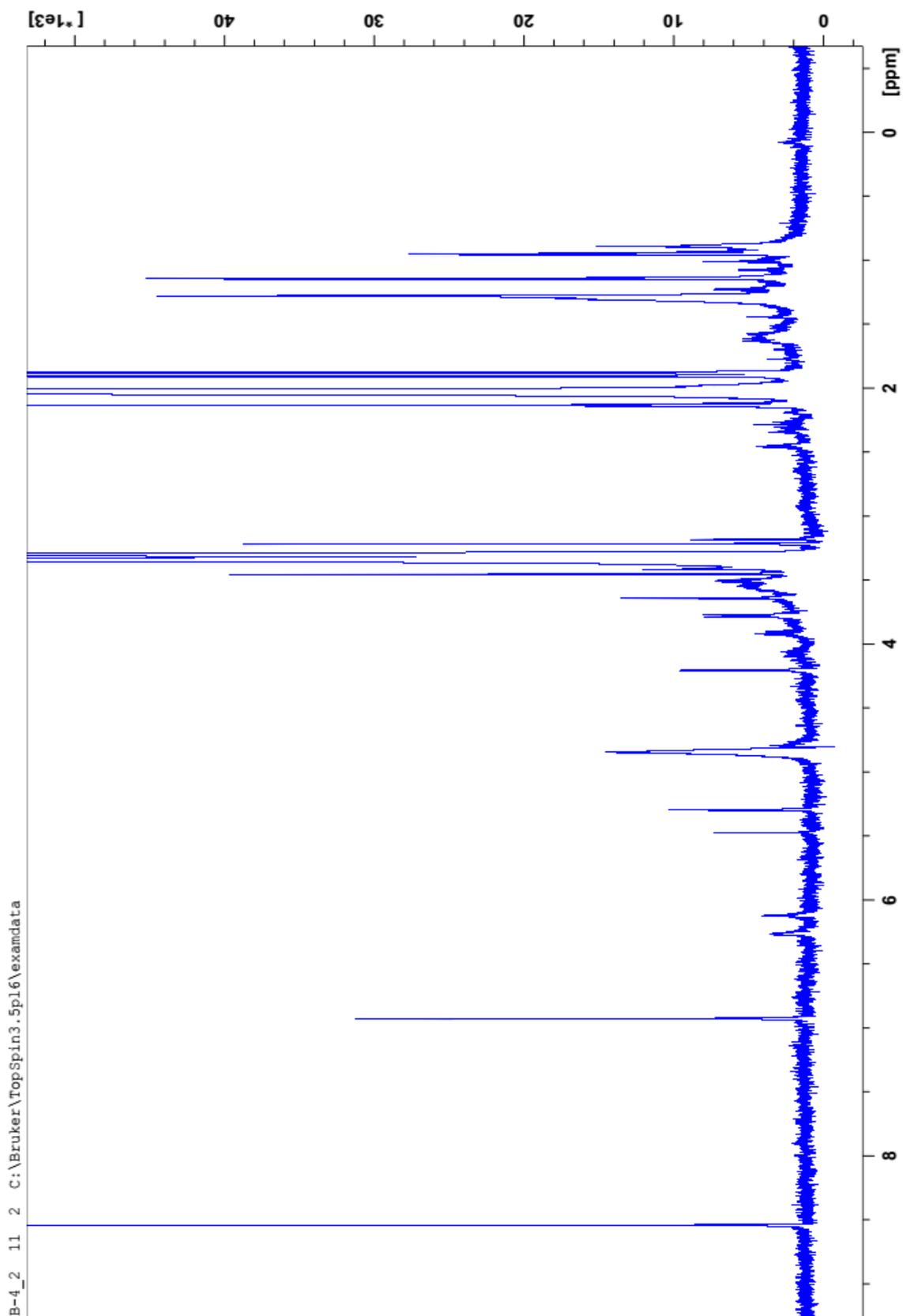
8.3 - Cromatograma e espectros de Ressonância Magnética

Nuclear 1D e 2D

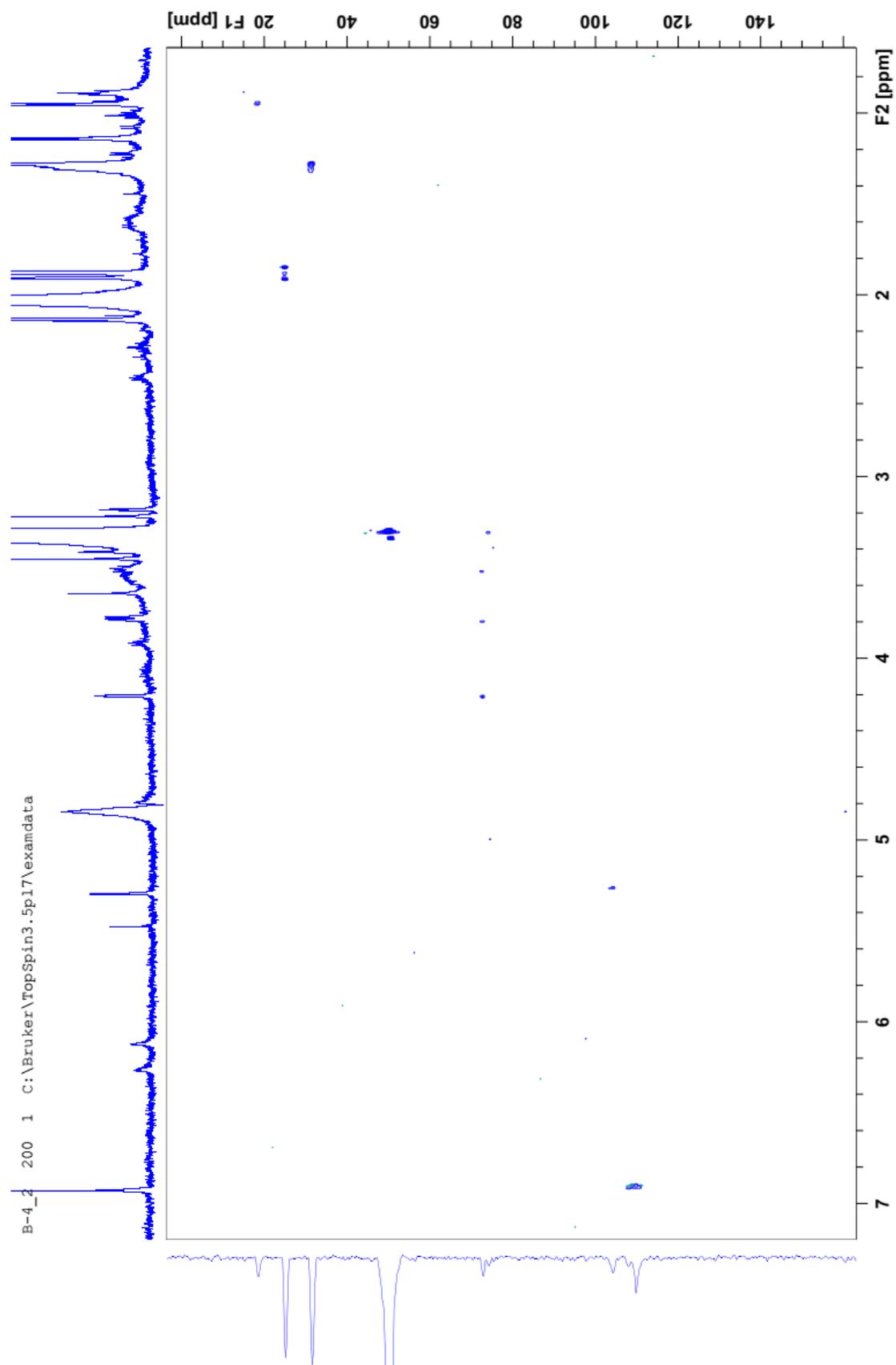
8.3.1 – Cromatograma do trapeamento – LC-SPE



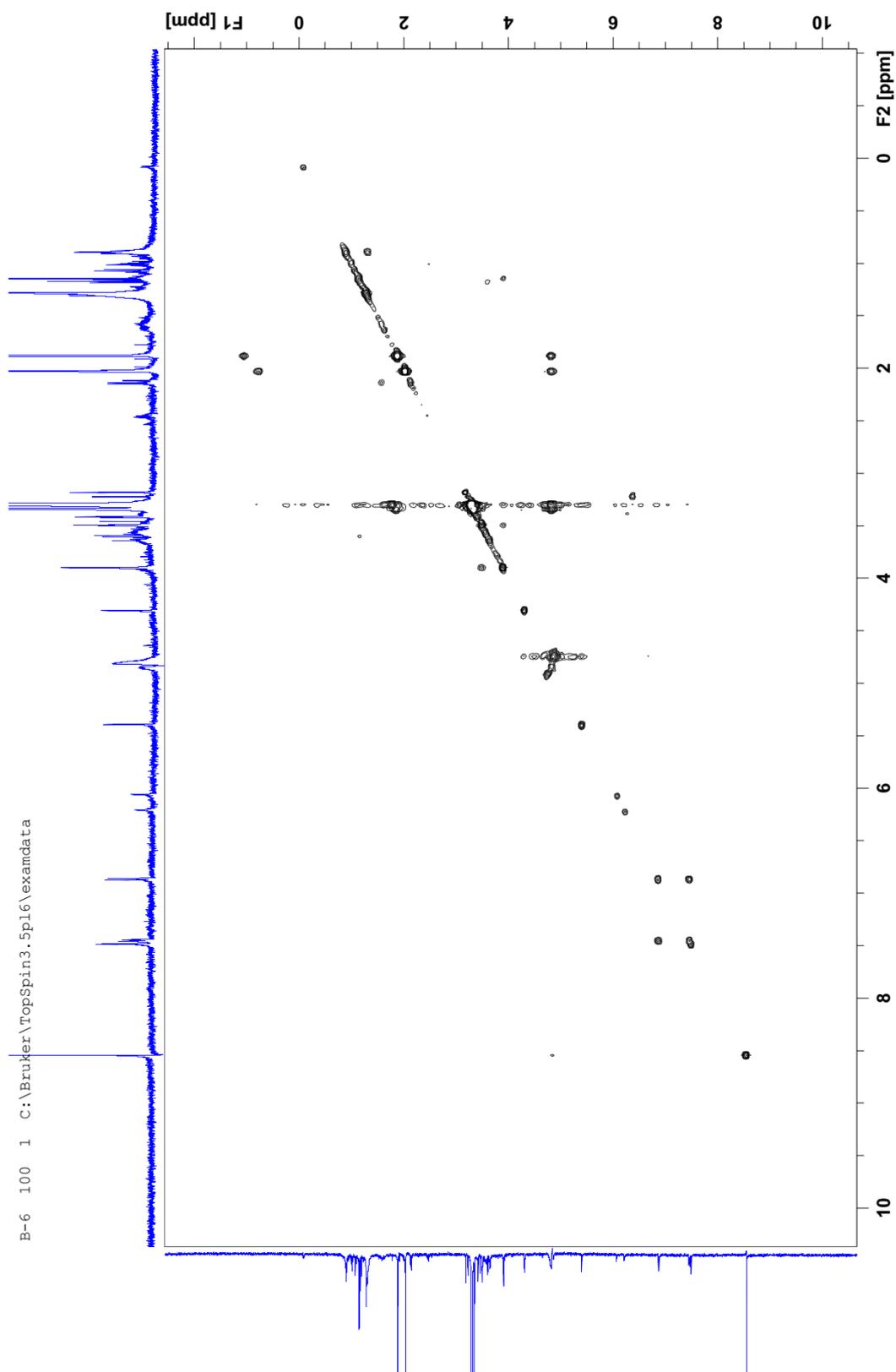
8.3.2 – Espectro de hidrogênio – B4 – Miricetina 3-O-ramnosídeo



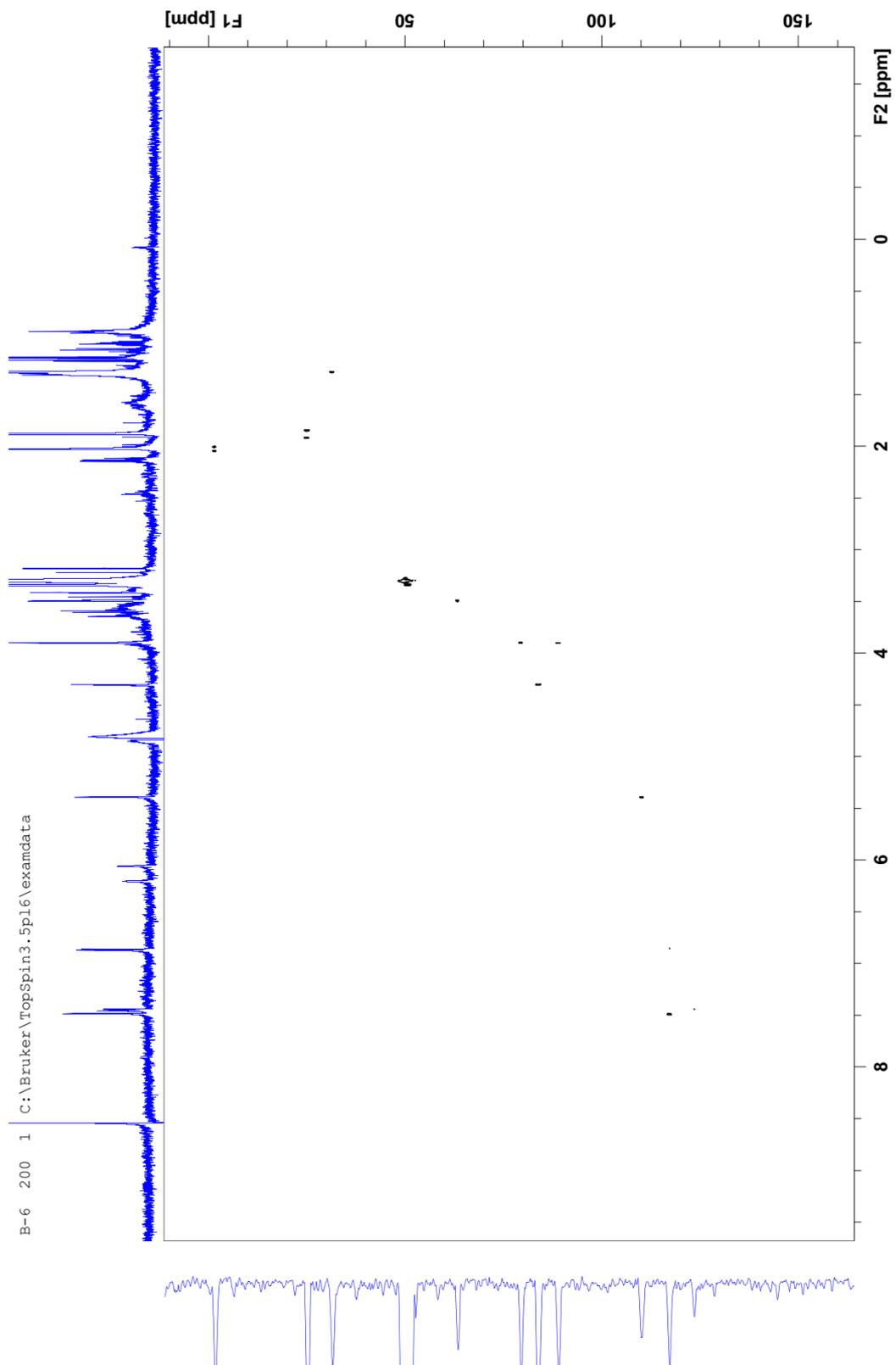
8.3.3 – Espectro HSQC – B4 – Miricetina 3-O-ramnosídeo



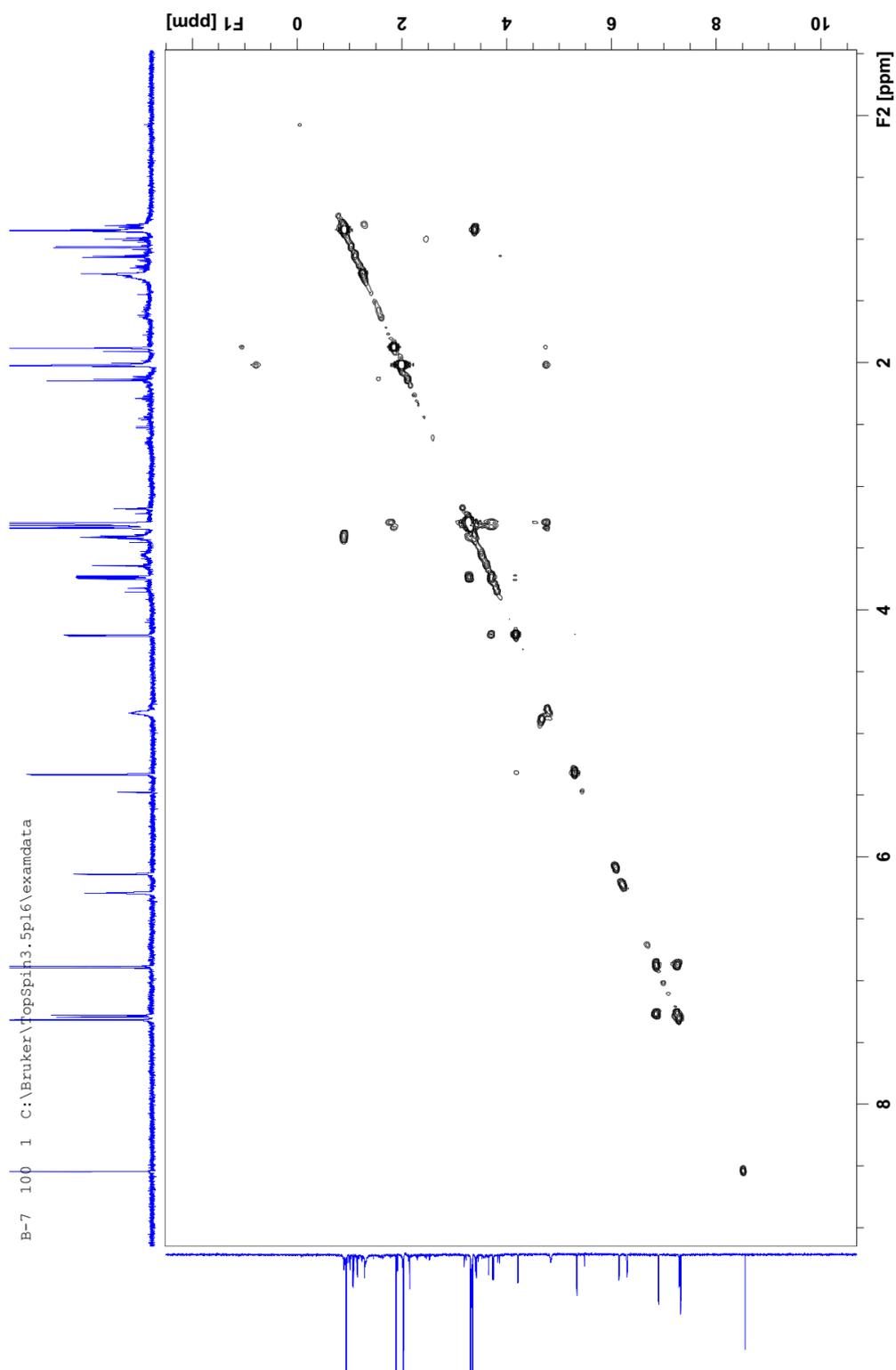
8.3.4 – Espectro de COSY – B6 – Avicularina



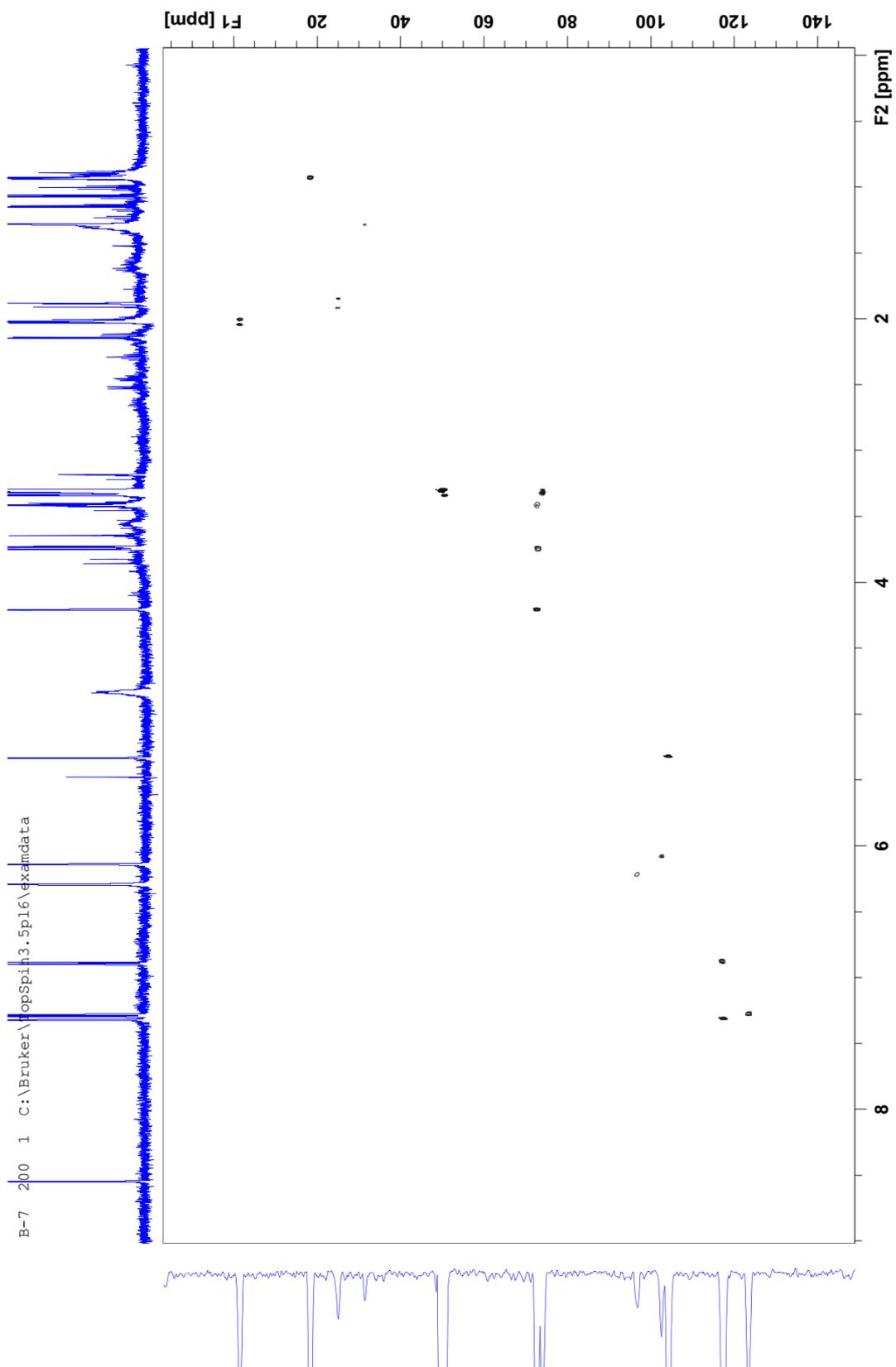
8.3.5 – Espectro HSQC – B6 – Avicularina



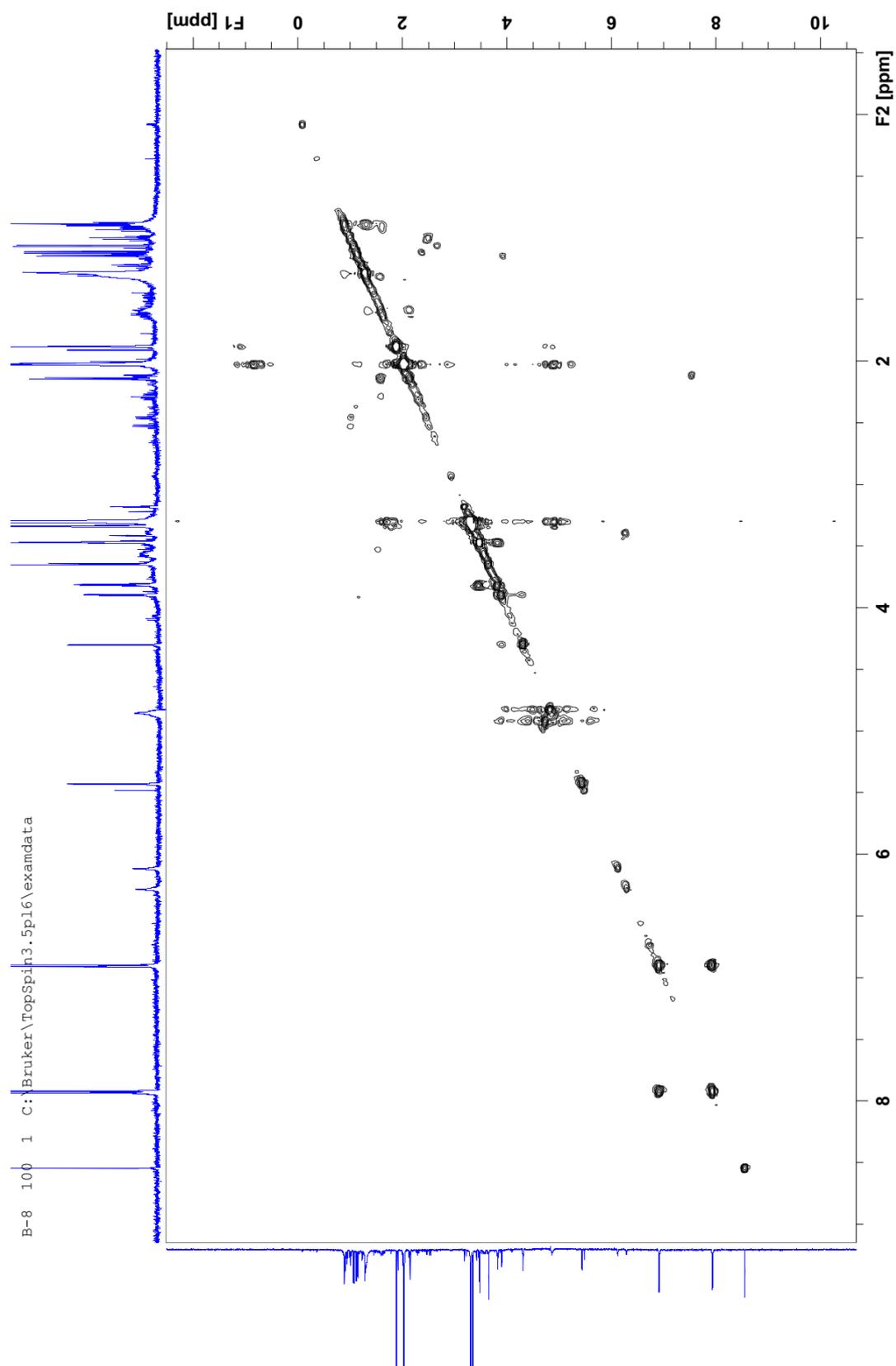
8.3.6 – Espectro COSY – B7 – Quercitrina



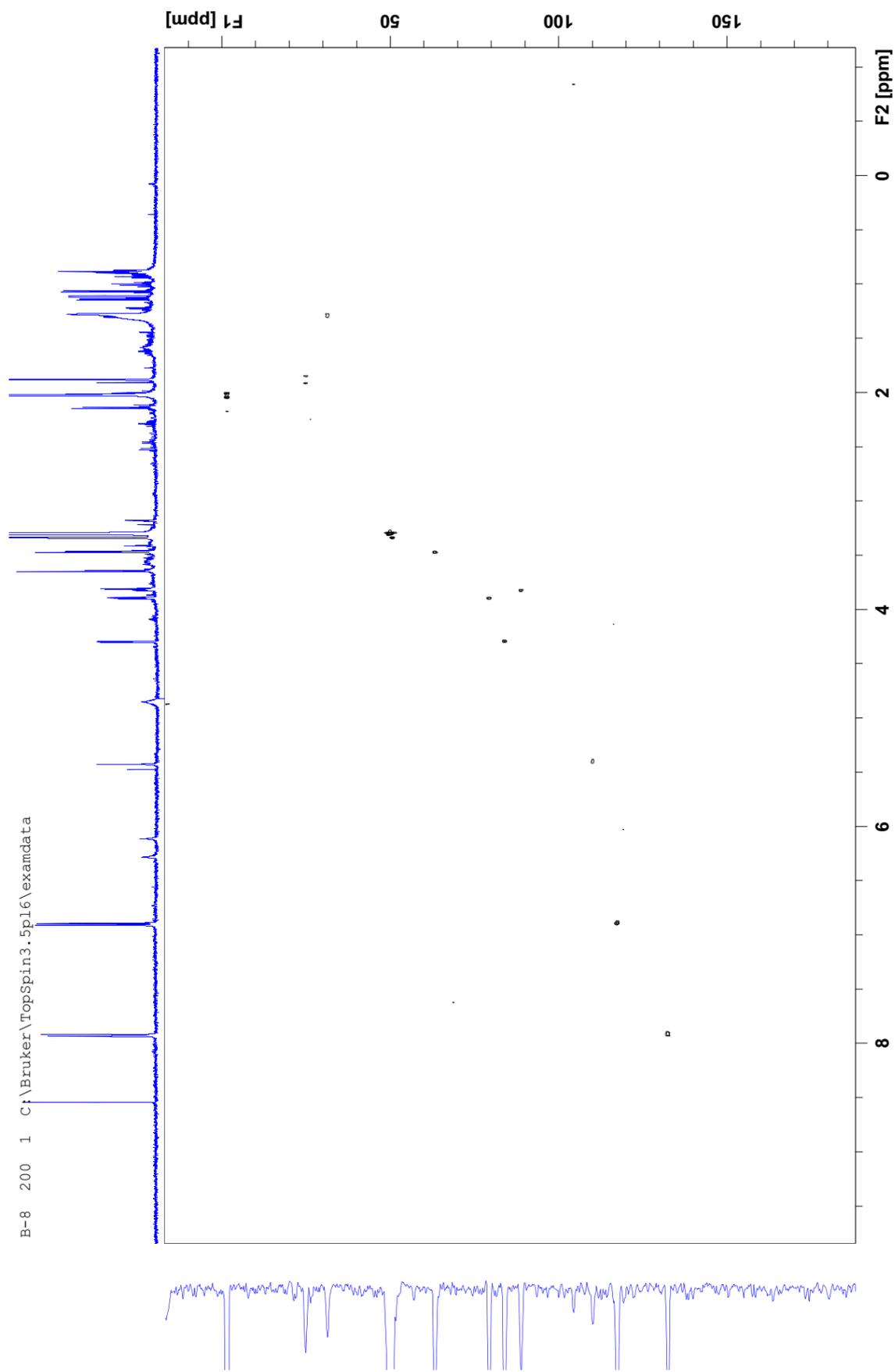
8.3.7 – Espectro HSQC – B7 – Quercitrina



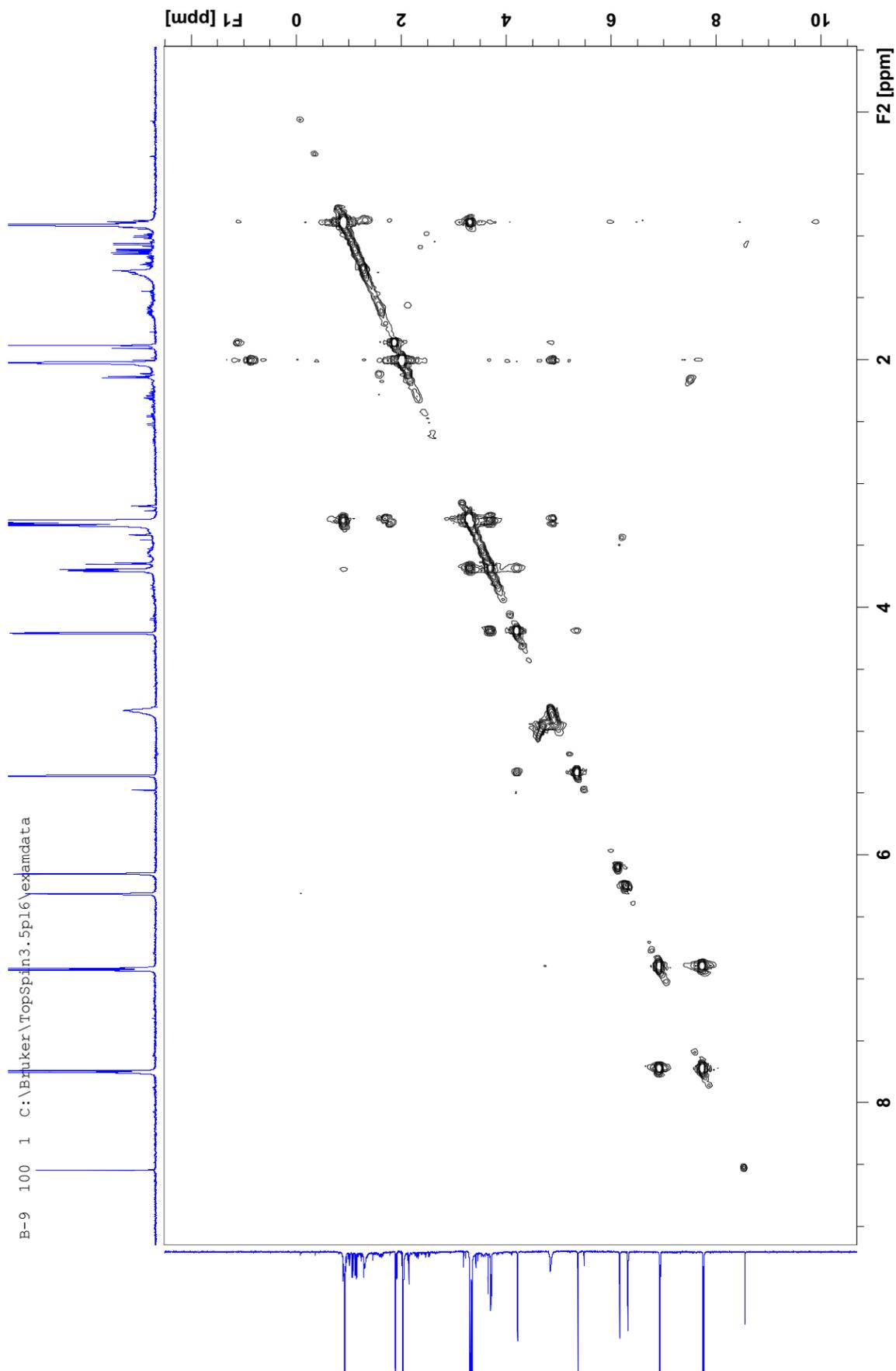
8.3.8 – Espectro COSY – B8 – Juglanina



8.3.9 – Espectro HSQC – B8 – Juglanina

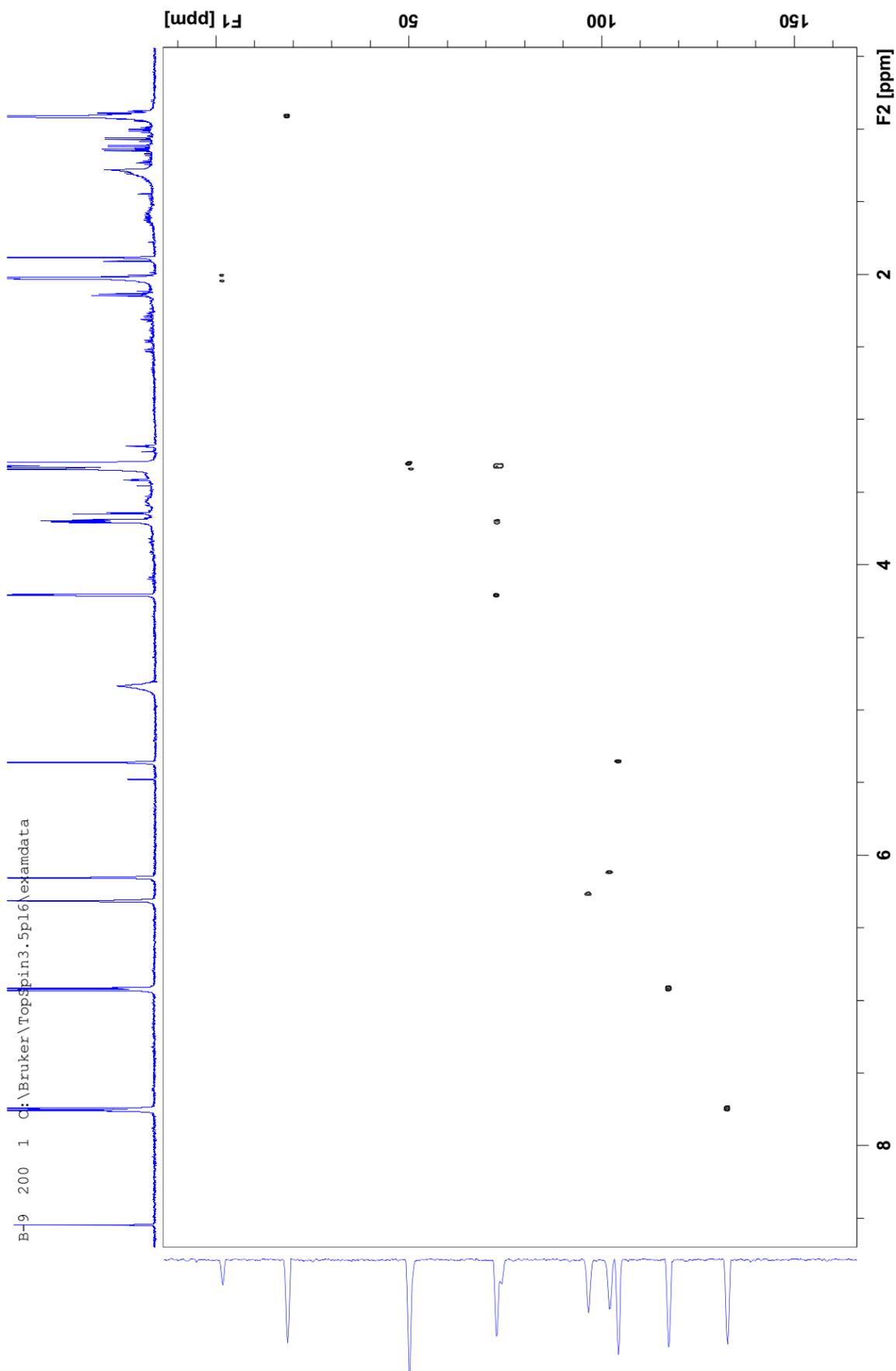


8.3.10 – Espectro COSY – B9 - Afzelina

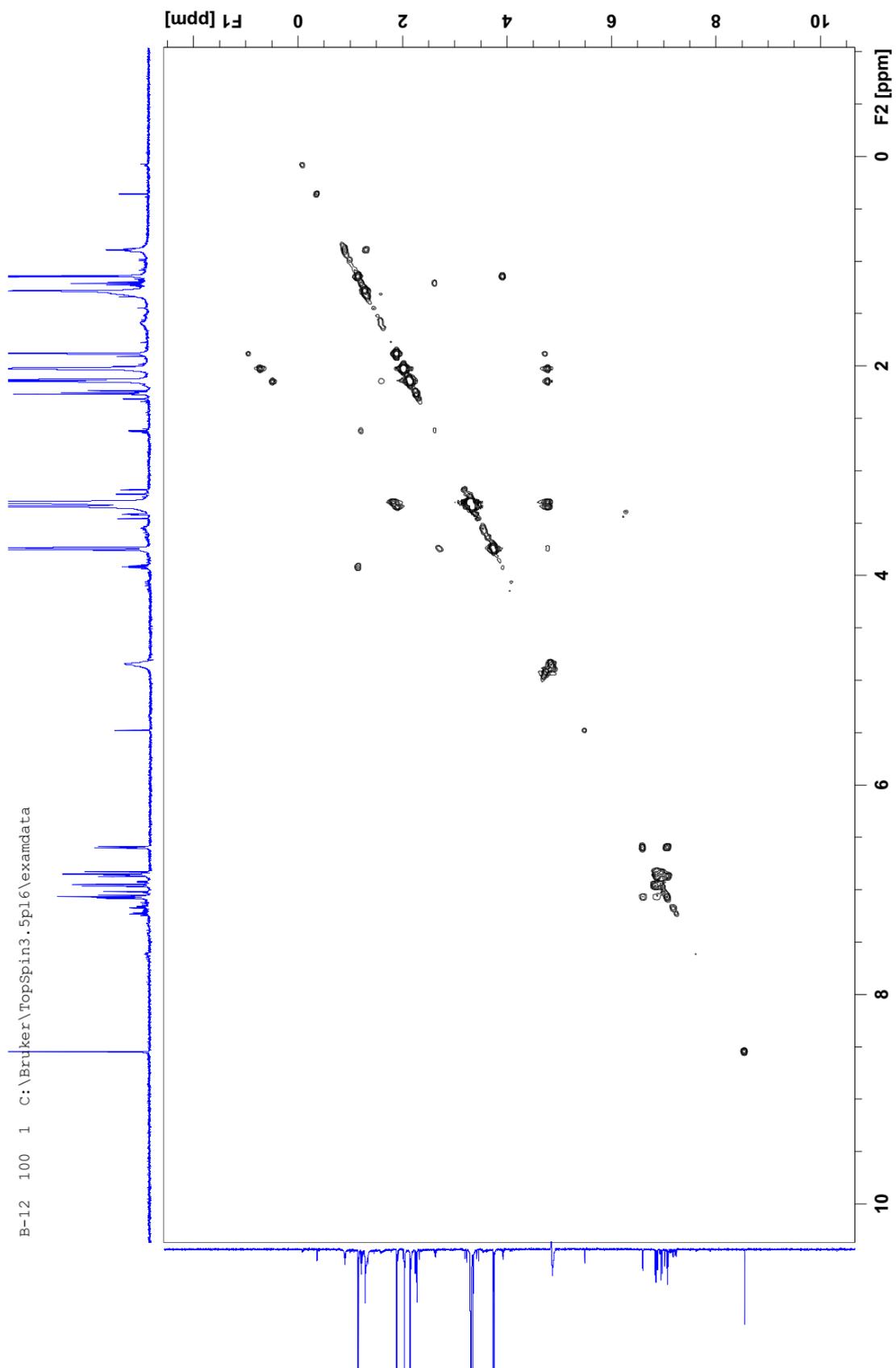


B-9 100 1 C:\Bruker\TopSpin3.5p16\examdata

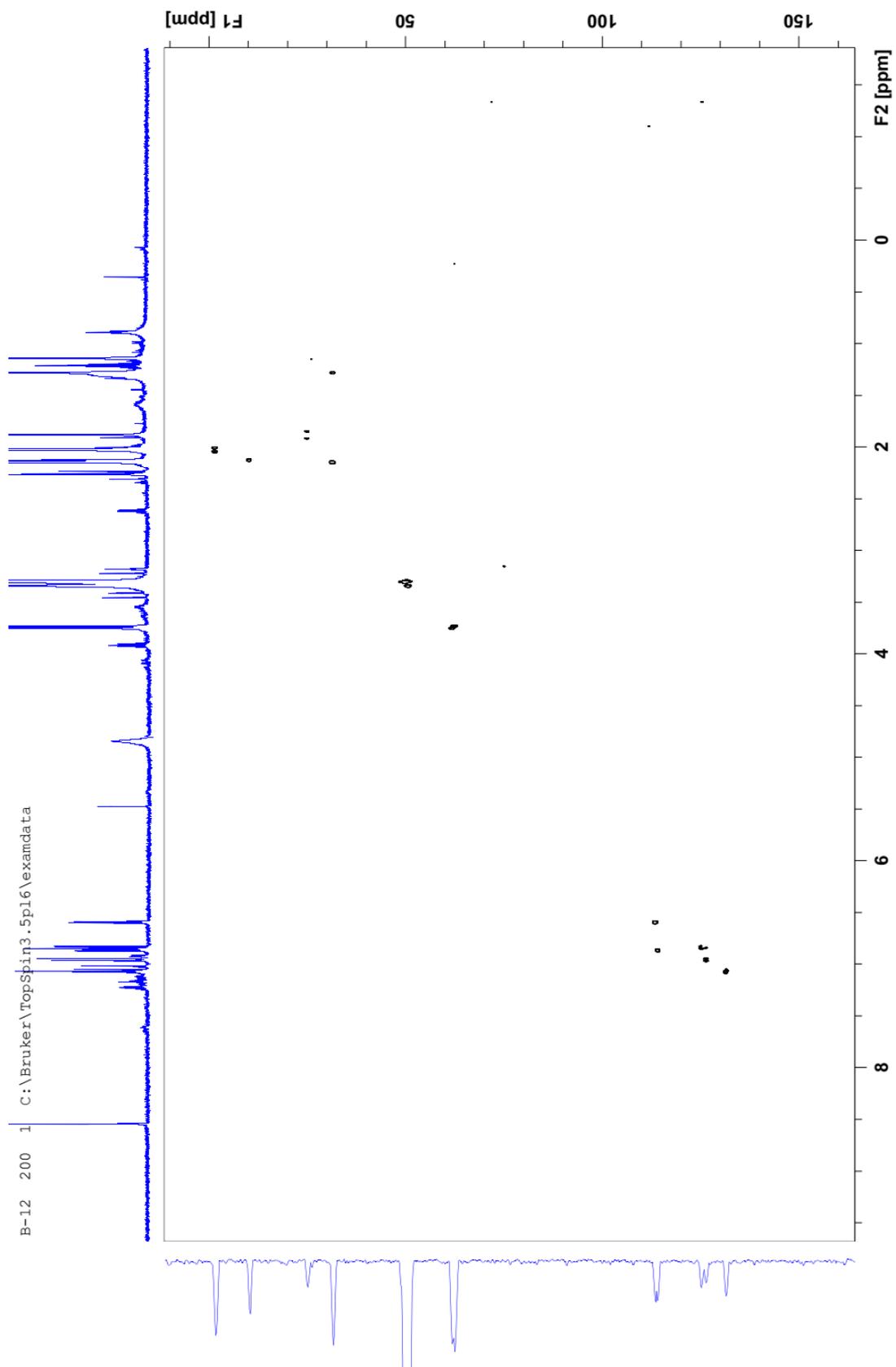
8.3.11 – Espectro HSQC – B9 - Afzelina



8.3.12 – Espectro COSY – B12 – Bauhiniastatina 2



8.3.13 – Espectro HSQC – B12 – Bauhiniastatina 2



8.3.14 – Espectro HMBC – B12 – Bauhiniastatina 2

